

ANGELA CURY DE MELLO SÁ

**USO DA SAPONINA EM FIXADORES PARA
EXAME CITOLÓGICO**

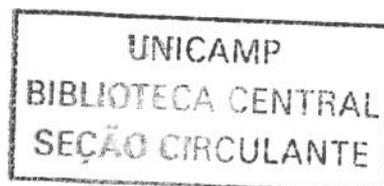
Este exemplar corresponde à versão final da Dissertação de Mestrado apresentada ao Curso de Pós-Graduação Ciências Médicas da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, para obtenção do título de Mestre em Ciências Médicas, Área Anatomia Patológica da aluna **Angela Cury de Mello Sá**.
Campinas, 12 de dezembro de 2001.

Prof. Dr. Konradin Metzger
Orientador



CAMPINAS

2001



ANGELA CURY DE MELLO SÁ

**USO DA SAPONINA EM FIXADORES PARA
EXAME CITOLÓGICO**

Dissertação de Mestrado apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do título de Mestre em Ciências Médicas, área de Anatomia Patológica.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Konradin Metze

CO-ORIENTADORA: Profa. Dra. Miriam Aparecida da Silva Trevisan

CAMPINAS

2001

ii

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

UNIDADE Be
Nº CHAMADA T/UNICAMP
Sa 11u
V _____ EX _____
TOMBO BCI 50654
PROC 16-83710 2
C _____ DX _____
PREÇO R\$ 11,00
DATA 07/09/02
Nº CPD _____

CM00172654-2

BIB ID 255944

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP**

Sa 11u Sá, Angela Cury de Mello
"O uso da saponina em fixadores para exame citológico" / Angela
Cury de Mello Sá. Campinas, SP : [s.n.], 2001.

Orientadores : Konradin Metze, Miriam Aparecida Silva Trevisan
Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas.

1. Hemólise. 2. Citologia. 3. Fixação (Histologia). I. Konradim
Metze. II. Miriam Aparecida Silva Trevisan. III. Universidade Estadual
de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

Banca examinadora da Dissertação de Mestrado

Orientador: Prof. Dr. Konradin Metze

Membros:

1. Prof. Dr. Norair Selvrans dos Reis
2. Prof. Dr. Paulo Latuf Filho
3. Prof. Dr. Konradin Metze

Curso de pós-graduação em Ciências Médicas, Área de Concentração em Anatomia Patológica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 12/12/2001

20024204

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais Álvaro e Rosely, aos meus avós Moacyr e Esther, e para minhas irmãs Deborah, Lilian e Carolina.

São os protagonistas da história da minha vida, responsáveis pelo meu caráter e personalidade; são os meus sinônimos de amor.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus pela minha vida, pela determinação e perseverança que Ele semeou em meu coração antes mesmo do meu nascimento, e pelo Seu amor e cuidados constantes comigo, pois creio que toda direção da minha vida e execução deste trabalho é e foi dada por Ele.

Ao Prof. Dr. Konradin Metze, pela orientação, compreensão, interesse, disposição, atenção e carinho despendidos, sem o qual não seria possível a finalização deste trabalho.

À Profª. Dra. Miriam Aparecida da Silva Trevisan, pela orientação neste trabalho, e principalmente pela liberdade que me foi confiada.

Ao Prof. Dr. José Vassallo pela doação dos anticorpos, e à todos do LAPE pela amizade, carinho e disposição em ajudar.

Às queridas Maria do Carmo Machado da Silva e Elisabeth Justi Rodrigues pela amizade, paciência, carinho e atenção e todos os favores dispensados.

Às amigas Conceição e Mégui pelo constante incentivo no desenvolvimento deste trabalho.

Ao Sérgio Roberto Cardoso, pela atenção e explicações dispensadas durante todo o desenvolvimento da tese, e ao Ismael Vêncio, Léa de Magalhães Simões e Priscila Duarte pela atenção, carinho e disposição para ajudar.

Ao William, pelo carinho, atenção e disposição no auxílio da coleta do material.

Ao Prof. Dr. Norair Salviano dos Reis, pela atenção e delicadeza nas sugestões finais do trabalho.

Ao Paulo Latuf Filho, pela dedicação, atenção, carinho e tempo dispensados na reta final do trabalho.

Um dia morri para George Muller, para suas opiniões e preferências, gosto e vontade; morri para o mundo, sua aprovação ou censura; morri para a aprovação ou acusação até mesmo de meus irmãos e amigos; e desde então tenho procurado apenas apresentar-me aprovado diante de Deus.

George Muller

	PÁG.
RESUMO	xiv
1. INTRODUÇÃO	17
2. OBJETIVO	25
3. MATERIAS E MÉTODOS	27
3.1. MATERIAIS.....	28
3.2. MÉTODOS.....	30
3.2.1. Coleta.....	30
3.2.2. Confeção das lâminas.....	31
3.2.2.1. Raspado de fígado.....	31
3.2.2.2. Raspado de linfonodo.....	31
3.2.2.3. Técnicas de fixação.....	31
3.2.2.4. Avaliação dos esfregaços.....	33
3.2.3. Testes estatísticos.....	36
4. RESULTADOS	37
4.1. FÍGADO E LINFONODO.....	38
4.1.1. Quantidade de hemácias.....	38
4.1.2. Citoplasma e núcleo.....	38
4.1.3. PAS e AgNOR.....	41
4.1.4. Reações imunocitoquímicas.....	41
5. DISCUSSÃO	48
6. CONCLUSÃO	54

7. SUMMARY	56
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59
9. APÉNDICE	66
9.1. Técnicas histoquímicas e imunocitoquímicas.....	67
9.1.1. PAS (ARMED FORCES, 1957) (LILLIE, 1965).....	67
9.1.2. AgNOR (PLOTON, 1986).....	69
9.1.3. Imunocitoquímica (SANTOS, <i>et al.</i> , 1999).....	70
9.2. Colorações.....	73
9.2.1. GIEMSA/HE (G/HE).....	73
9.2.2. LEISHMANN (MAIA, 1967).....	73
9.3. Preparações de soluções.....	74
9.3.1. Solução fixadora (SFX) – (1:1, álcool 95% e Formolina tamponada)..	74
9.3.2. Saponina a 0,1% (KEEBLER, 1993).....	74
9.3.3. Gluconato de cálcio a 0,3% (KEEBLER, 1993).....	74
9.3.4. Álcool 95% (A).....	75
9.3.5. Álcool-formol (AF).....	75
9.3.6. Formolina tamponada.....	75
9.3.7. Solução de HANKS.....	75

LISTA DE ABREVIATURAS

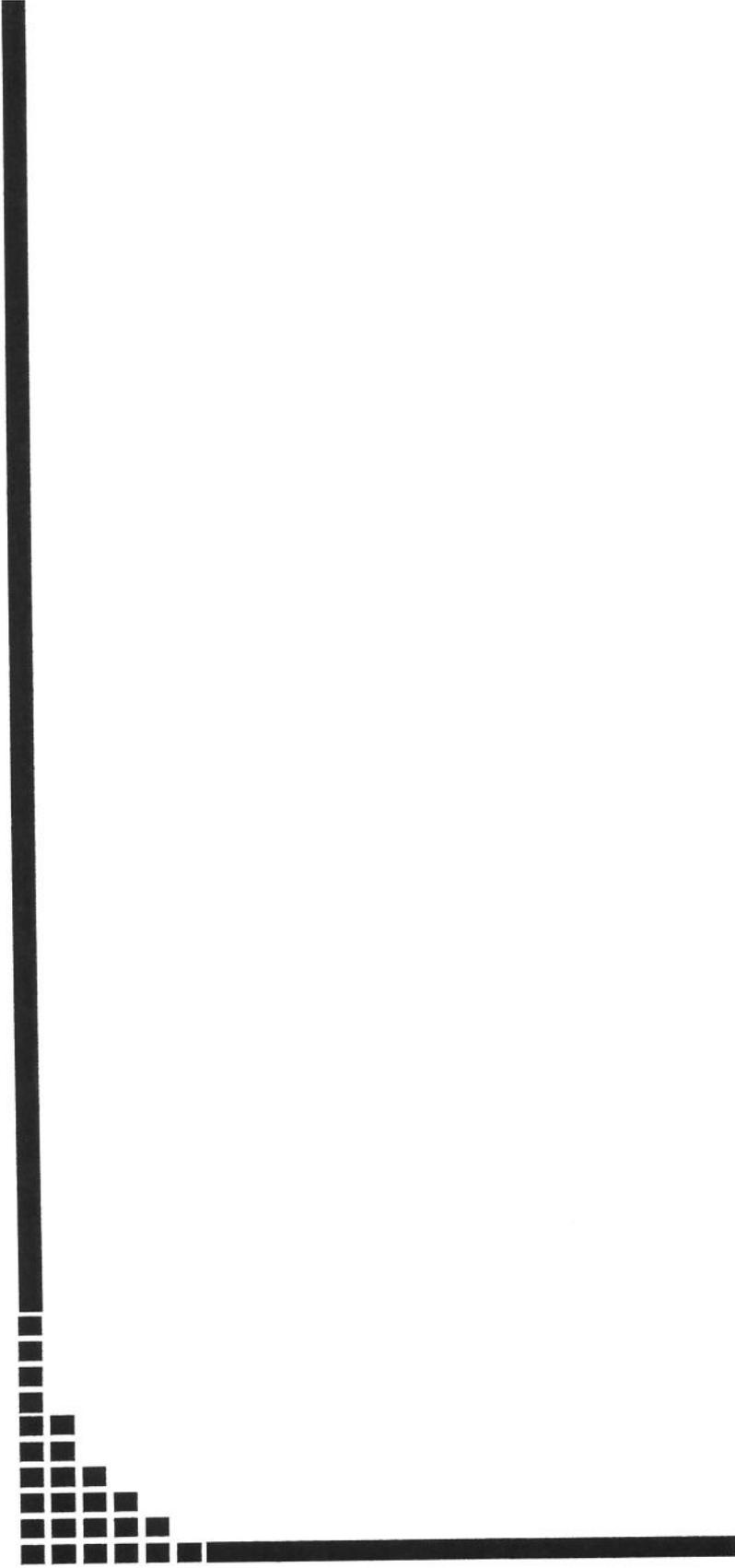
ABC	Complexo Avidina-biotina peroxidase
Ag	Prata
AgNOR	Impregnação com prata da região organizadora de nucléolo
AL	Técnica de pós-fixação em álcool 95%
ALFO	Técnica de pós-fixação em álcool-formol
BSA	Soroalbumina-bovina
CEA	Antígeno carcino-embrionário
DAB	Diaminobenzidina
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
G	Coloração de Giemsa
G/HE	Coloração por Giemsa/Hematoxilina-eosina
h	Hora
hs	Horas
HCl	Ácido clorídrico
HDII	Solução fixadora de Hadley e Dym(1987), modificada
HE	Coloração por Hematoxilina de Harris
L	Coloração de Leishmann
min.	Minutos
ml	Mililitros
µl	Microlitros

multilink E453	Pool de anticorpos secundários anti-camundongo e anti-coelho biotinilados
PAS	Ácido periódico de Schiff
PBS	Solução tampão fosfato
pH	Concentração hidrogeniônica
s	Segundos
SE	Técnica de fixação por dessecação (esfregão seco ao ar sem pós-fixação, corado por Leishmann)
SFX	Técnica de fixação imediata na solução fixadora teste
35βH11	Citoqueratina de baixo peso molecular

	PÁG.
TABELA 1. Avaliação da interferência do material de fundo na leitura dos esfregaços citológicos analisados.....	33
TABELA 2. Avaliação da qualidade de preservação citoplasmática nos esfregaços citológicos analisados.....	34
TABELA 3. Avaliação da qualidade de preservação nuclear nos esfregaços citológicos analisados.....	34
TABELA 4. Avaliação da interferência da quantidade de hemácias na leitura dos esfregaços citológicos analisados.....	35
TABELA 5. Avaliação da intensidade de reação para AgNOR, ou ausência de reação nos esfregaços citológicos analisados.....	35
TABELA 6. Avaliação da intensidade de reação para PAS, CEA e 35 β H11, ou ausência de reação nos esfregaços citológicos analisados.....	35
TABELA 7. Avaliação das técnicas de fixação AL, ALFO, SE, SFX e P em esfregaço de fígado pelo observador 1 (primeira leitura).....	42
TABELA 8. Avaliação das técnicas de fixação AL, ALFO, SE, SFX e P em esfregaço de fígado pelo observador 1 (segunda leitura).....	42
TABELA 9. Avaliação das técnicas de fixação AL, ALFO, SE, SFX e P em esfregaço de fígado pelo observador 2.....	43
TABELA 10. Avaliação das técnicas de fixação AL, ALFO, SE, SFX e P em esfregaço de linfonodo pelo observador 1 (primeira leitura).....	43
TABELA 11. Avaliação das técnicas de fixação AL, ALFO, SE, SFX e P em esfregaço de fígado pelo observador 1 (segunda leitura).....	44

TABELA 12. Coeficiente de correlação entre 2 observadores na avaliação de esfregaço de fígado pela técnica de pós-fixação em álcool 95%.....	44
TABELA 13. Coeficiente de correlação entre 2 observadores na avaliação de esfregaço de fígado pela técnica de pós-fixação em álcool-formol.	45
TABELA 14. Coeficiente de correlação entre 2 observadores na avaliação de esfregaço de fígado pela técnica de fixação por dessecação (esfregaço seco ao ar sem pós-fixação, corado por Leishmann).....	45
TABELA 15. Coeficiente de correlação entre 2 observadores na avaliação de esfregaço de fígado pela técnica de fixação imediata na solução fixadora SFX.....	45
TABELA 16. Coeficiente de correlação entre o tempo percorrido de coleta e o processamento da amostra de fígado, e a qualidade dos esfregaços nas diferentes técnicas de fixação.....	46
TABELA 17. Coeficiente de correlação entre o tempo percorrido de coleta e o processamento da amostra de linfonodo, e a qualidade dos esfregaços nas diferentes técnicas de fixação.....	47

	PÁG.
FIGURA 1. Estrutura molecular da saponina na forma esteroidal e triterpenóide, resultante da hidrólise ácida.....	23
FIGURA 2. Estrutura molecular do ácido quilaico, onde R'=CHO e R''=OH.....	29
FIGURA 3. Esfregaço de fígado fixado imediatamente pela solução fixadora SFX. Núcleos e citoplasmas bem preservados e restos de hemácias no material de fundo, contudo sem interferência na avaliação citológica.....	39
FIGURA 4. Esfregaço de fígado seco ao ar sem pós-fixação, corado por Leishmann. Grande quantidade de hemácias sobre e entre as células, podendo interferir na avaliação da lâmina. Os núcleos e citoplasmas são satisfatoriamente preservados.....	39
FIGURA 5. Esfregaço de fígado seco ao ar e pós-fixado em álcool 95%. Remoção intensa da quantidade de hemácias do material de fundo com boa preservação da morfologia nuclear e citoplasmática.....	40
FIGURA 6. Esfregaço de fígado seco ao ar e pós-fixado em álcool-formol. Remoção intensa da quantidade de hemácias do material de fundo com boa preservação da morfologia nuclear e citoplasmática.....	40



RESUMO

A saponina é um grupo de hemolisinas enzimáticas derivado de uma variedade de plantas, pode ser útil na preparação de amostras hemorrágicas, limpando as hemácias do material de fundo da lâmina. O objetivo de nosso estudo foi investigar se a saponina pode ser usada na remoção de hemácias do material de fundo na rotina, esfregaços citológicos secos ao ar em comparação com fixados imediatamente.

A preparação de amostra citológica de fígado e linfonodo de cães foi realizada em quadruplicata (imediatamente após a morte do animal) e processada da seguinte maneira:

1. Grupo SFX - Esfregaços foram imediatamente colocados na solução fixadora SFX, composta por 1:1 de álcool a 95% e de formalina tamponada, e 0,1% de saponina.

2. Coloração convencional (SE) - Esfregaços foram deixados secar ao ar por 30 minutos depois corados por Leishmann.

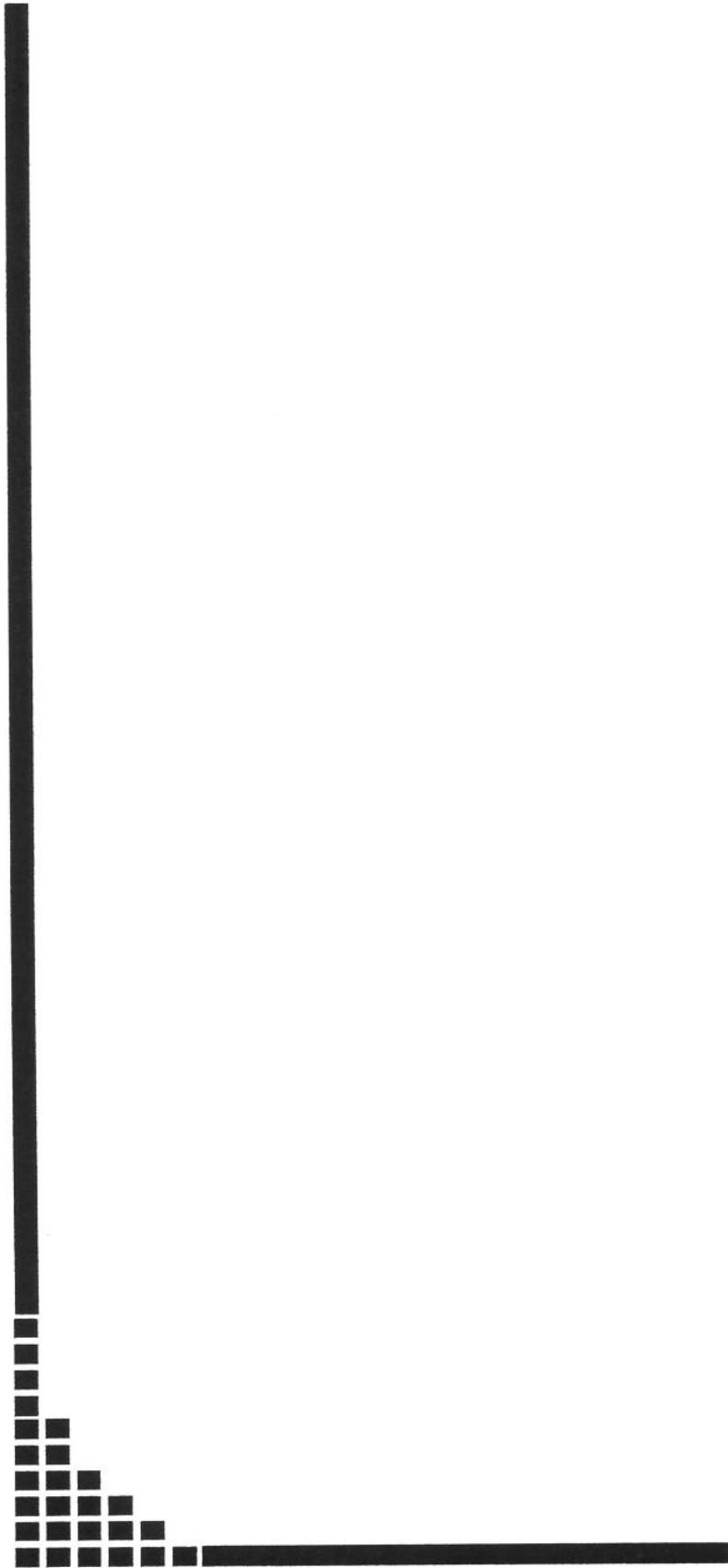
3. Pós-fixação com álcool 95% (AL) - Esfregaços secos ao ar foram reidratados e incubados em solução de saponina a 0,1%. Depois fixados em álcool 95% e corados pela técnica de coloração modificada Giemsa/Hematoxilina-Eosina.

4. Pós-fixação com álcool-formol (ALFO) - Esfregaços secos ao ar foram reidratados e incubados em solução de saponina a 0,1%. Depois fixados em álcool-formol e corados pela técnica de coloração modificada Giemsa/Hematoxilina-Eosina.

A qualidade das lâminas preparadas e seus resultados foram comparados pelo teste de Friedman (Winstat 3.1 software).

Os melhores resultados para a visualização de núcleo e detalhes celulares foram observados no grupo com fixação imediata em álcool-formol contendo 0,1% de saponina, apesar de ter sido pequeno o efeito de limpeza das hemácias do material de fundo. Por outro lado este efeito foi pronunciado em amostras secas ao ar, apesar da qualidade da visualização citológica ter sido inferior.

Concluimos que não há um método que produz resultados com excelente coloração e limpeza total de hemácias. Nossos resultados tem a vantagem da lise de hemácias pela saponina em material seco ao ar seguido por fixação com álcool 95% produzindo razoável remoção de hemácias, bem como boa preservação de detalhes citológicos.



1. INTRODUÇÃO

A fixação é um processo utilizado na preparação do material que se destina à exame citológico e histológico, que busca manter o tecido o mais próximo o possível do seu estado em vida, permitindo o seu exame por métodos tão simples que vão desde uma coloração de rotina (como por exemplo Leishmann e Hematoxilina/Eosina) até análise de DNA através de técnicas sofisticadas (DOYLE & O'LEARY, 1992; HOPWOOD, 1996; LILLIE, 1965; GANTER & JOLLES, 1969).

Podemos citar como objetivos da fixação, a preservação da morfologia e composição química da célula, provocando a morte celular, de modo que a estrutura da célula viva se conserve, evitando as alterações *post-mortem*, (representadas por autólise, isto é, a destruição das células por suas enzimas; e por heterólise, matando as bactérias ou impedindo sua proliferação, evitando alterações das estruturas tissulares decorrentes de sua atividade); que modificam, profundamente, a constituição celular (ROBERTIS et al., 1960; HOPWOOD, 1996; LILLIE, 1965; GANTER & JOLLES, 1969) (GRIMALDI, 1981).

Assim como limitar as alterações quando os tecidos são processados em líquidos desfavoráveis, como o xilol e a parafina quente (GRIMALDI, 1981); endurecer os tecidos para que resistam melhor às etapas posteriores da técnica histológica, facilitando cortes delgados; aumentar a afinidade de alguns componentes tissulares pelos corantes, facilitando a coloração das estruturas; “esterilizar” as células, providenciando desta maneira mais segurança para quem irá manipular o material no laboratório; preservar a reatividade de proteínas, lipídeos e outros componentes celulares para subsequente reação histoquímica, imuno-histoquímica e de biologia molecular.(HOPWOOD, 1996; LILLIE, 1965; GANTER & JOLLES, 1969).

Alguns dos fixadores preservam satisfatoriamente a maioria dos tecidos de um organismo e são chamados fixadores gerais ou universais, por exemplo, a formalina a 10% (GRIMALDI, 1981).

Os fixadores podem ser, classificados em físicos (calor, frio e dessecação) ou químicos, estes constituídos de uma só substância (álcool, ácido, éter, etc.) ou mais de uma substância (misturas fixadoras, como por exemplo o fixador de Karnovsky; o Carnoy; o Methacarn; etc.) (SANTOS, 1926; YAMADA & RINCON, 1996; HOPWOOD, 1996; GANTER & JOLLES, 1969).

Geralmente utiliza-se dois tipos de fixadores químicos, os que precipitam proteínas (etanol, ácido acético, ácido pícrico) e os que promovem ligação cruzada (aldeídos) (HOPWOOD, 1996).

Em esfregaços e sedimentos para exame citológico, é usado, há muitos anos, o etanol como fixador, com grande sucesso na preservação das estruturas celulares e se prestando muito bem para estudos imunocitoquímicos (KEEBLER, 1993).

Com o intuito de realizar uma fixação perfeita dentro do possível, devemos ficar atentos para os seguintes fatores que interferem no processo :

1. Tampões e concentração hidrogeniônica:

Os valores de pH dos fixadores variam e, geralmente, a concentração hidrogeniônica é ajustada à faixa fisiológica de pH. A fixação satisfatória ocorre entre pH 6 a 8, mas deve-se tomar muito cuidado na escolha do tampão, pois este pode reagir com o fixador. Se o tecido for usado para histoquímica enzimática, então os cuidados devem ser redobrados, para assegurar que os tampões não inibam as enzimas ou reajam com meio de incubação.

2. Temperatura:

Geralmente, a fixação tecidual ou celular é feita à temperatura ambiente. Para a microscopia eletrônica e algumas reações histoquímicas, a faixa de temperatura é de 0 a 4°C.

Alguns autores são favoráveis à fixação em baixas temperaturas, reduzindo a autólise e diminuindo a difusão dos vários componentes celulares. Outros preferem a fixação em altas temperaturas, onde as reações envolvidas na fixação ocorrem mais rapidamente.

3. Osmolalidade da solução fixadora:

Os efeitos da pressão osmótica exercida pelas soluções fixadoras são retração celular (solução hipertônica) e células tumefeitas quando usados fixadores hipotônicos. Portanto, variando a osmolalidade da solução fixadora é possível alterar a estrutura dos sistemas de membrana.

4. Concentração do fixador:

O que vai determinar a concentração do agente fixador numa solução é o seu poder de penetração, de fixação e a sua solubilidade no veículo usado para a solução.

5. Duração da fixação:

O tempo de fixação é variável de acordo com o poder penetrante do fixador, com o tempo necessário para completar as reações bioquímicas entre o fixador e o tecido e com a temperatura em que se encontra.

A fixação deve ser imediata, ou seja, o tempo entre a coleta e a fixação deve ser o menor possível.

6. Volume de fixador:

O volume do fixador utilizado deve ser de 10 a 20 vezes maior que o fragmento.

7. Relação fixador/coloração:

Não deve ser usado fixador que contenha substâncias incompatíveis com os corantes que em geral, são utilizados em reações imuno-histoquímicas, imunocitoquímicas.

Apesar de alguns dos fixadores preservarem satisfatoriamente a maioria dos tecidos de um organismo e por isso são chamados fixadores gerais ou universais (por exemplo, a formalina a 10%), não existe fixador ideal para todos os componentes teciduais nem celulares (GRIMALDI, 1981) (YAMADA & RINCON, 1996; MAIA, 1967; HOPWOOD, 1996; DOYLE & O'LEARY, 1992).

A tentativa de manter intacta a estrutura celular é impossível, pois os fixadores modificam de alguma maneira a estrutura íntima da célula (SANTOS, 1926).

Deve ser considerado que os componentes tissulares são diversos e com diferentes propriedades físicas e químicas e, deste modo, explicando o fato da dificuldade ou impossibilidade de se ter um fixador universal (GRIMALDI, 1981).

Devido à esta dificuldade, alguns fixadores são compostos por misturas de substâncias químicas, formuladas com o intuito de compensar a deficiência ou propriedade de uma determinada substância fixadora, com a adição de outras substâncias que pudessem complementar e melhorar o efeito fixador (YAMADA & RINCON, 1996).

Além das dificuldades na fixação do material biológico destinado tanto à análise histo como citológica, observamos na citologia a presença de material hemorrágico e material de fundo interferindo ou impossibilitando a análise do material citológico.

O material de fundo de uma lâmina citológica pode ser composto de muco, restos celulares, exudato inflamatório, líquido extra-celular, hemácias.

Este material pode obscurecer a morfologia celular, interferindo na avaliação microscópica, e produzir erros, como falsos-negativos; erros na amostragem e preparação do esfregaço citológico também podem ser responsáveis por uma alta porcentagem de esfregaços falsos-negativos, que são esfregaços com positividade mascarada, levando à uma avaliação deficiente do material citológico, considerando a amostra negativa, sendo que na verdade ela é positiva.(LINDER & ZAHNISER, 1997; CORKILL et al., 1997; WILBUR et al., 1997; WEIDMANN et al., 1997).

O resultado falso-negativo em esfregaço citológico pode ocorrer por: erro de amostragem (amostra não representativa, transferência não significativa do material para a lâmina); erro de leitura (células importantes para o diagnóstico podem ser mascaradas pelo material de fundo, hemácias ou por sobreposição de células, e a análise de características de áreas importantes como o núcleo pode ser dificultada e impossibilitada); ou finalmente erro de interpretação (WILBUR, et al., 1997; LINDER & ZAHNISER, 1997).

Na tentativa de diminuir a probabilidade de erros que podem produzir resultados falsos-negativos, atenta-se para os seguintes procedimentos: cuidado na coleta da amostra (que deve ser representativa); confecção da lâmina com camadas finas de células e bem distribuídas; e destruição de hemácias, e para isso, pode-se utilizar a saponina como agente hemolisante.

As saponinas são macromoléculas constituídas por substâncias que, após hidrólise por ácidos, dão origem a açúcares (“oses”) e substâncias de natureza química diferente de açúcares, chamadas de aglicão ou sapogenina. De acordo com a estrutura da sapogenina, há dois grupos de saponina, a saponina esteroidal e a triterpenóide (COSTA, 1987; TREASE & EVANS, 1978; SHIBATA, 1977).

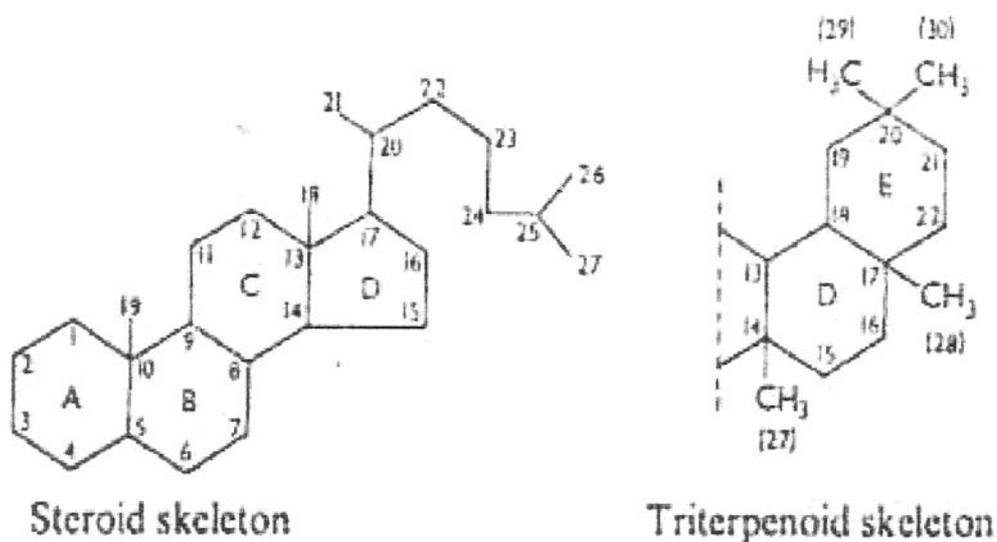


FIGURA 1. Estrutura molecular da saponina na forma esteroidal e triterpenóide, resultante da hidrólise ácida.

A saponina é considerada um heterósido, podendo ser isolada da *Saponaria officinalis* L., já conhecida como saboeira, devido à sua propriedade afrogênica, ou seja, ela forma espuma abundante quando agitada na água, semelhante ao sabão. Tal propriedade se deve à tensão superficial elevada das suas soluções aquosas (COSTA, 1987).

As soluções aquosas de saponinas são neutras, mostram-se, na maioria das vezes, tóxicas, necrosantes e hemolíticas. Sua atividade hemolítica é vista em soluções muito diluídas, e pode ser detectada em concentração de até 0,01%, e é explicada pela combinação da saponina com os esteróides e outros lipídeos da membrana plasmática dos eritrócitos, aumentando a permeabilidade celular (COSTA, 1987; TREASE & EVANS, 1978; SHIBATA, 1977).

A saponina é usada como agente permeabilizante de membranas celulares de células pré-fixadas em glutaraldeído e paraformaldeído, facilitando a penetração dos reagentes de detecção na imunolocalização de antígenos, de marcadores de membrana,

marcadores citoplasmáticos, análise de DNA, quantificação da infecção celular e replicação do *T. gondii*, e quantificação de receptor glicocorticóide intracelular por citometria de fluxo (GLASOVÁ et al., 1995; MAC VILLE et al., 1995; GRUTZKAU et al., 1997; BENSON & BUSCH, 1996; JAMUR & OLIVER, 1996; ULFGREN et al., 1995; MULLER et al., 1999; GAY et al., 1999; GORISSE et al., 1999; KONIKOVA et al., 1998; LORE et al., 1998; BERKI et al., 1998; FRANEK et al., 1994; MRKOCI et al., 1997).

A avaliação por microscopia eletrônica de estruturas intracelulares (citoesqueleto), é melhorada com a perfusão de saponina, que pela permeabilização da membrana plasmática possibilita a saída de proteínas solúveis no citoplasma, e reduz assim o material granular reduzido (CHRISTIAN et al., 1999; TAKUMIDA & ANNICO, 1994; BENSON & BUSCH, 1996; GRUTZKAU et al., 1997; TERADA et al., 1997).

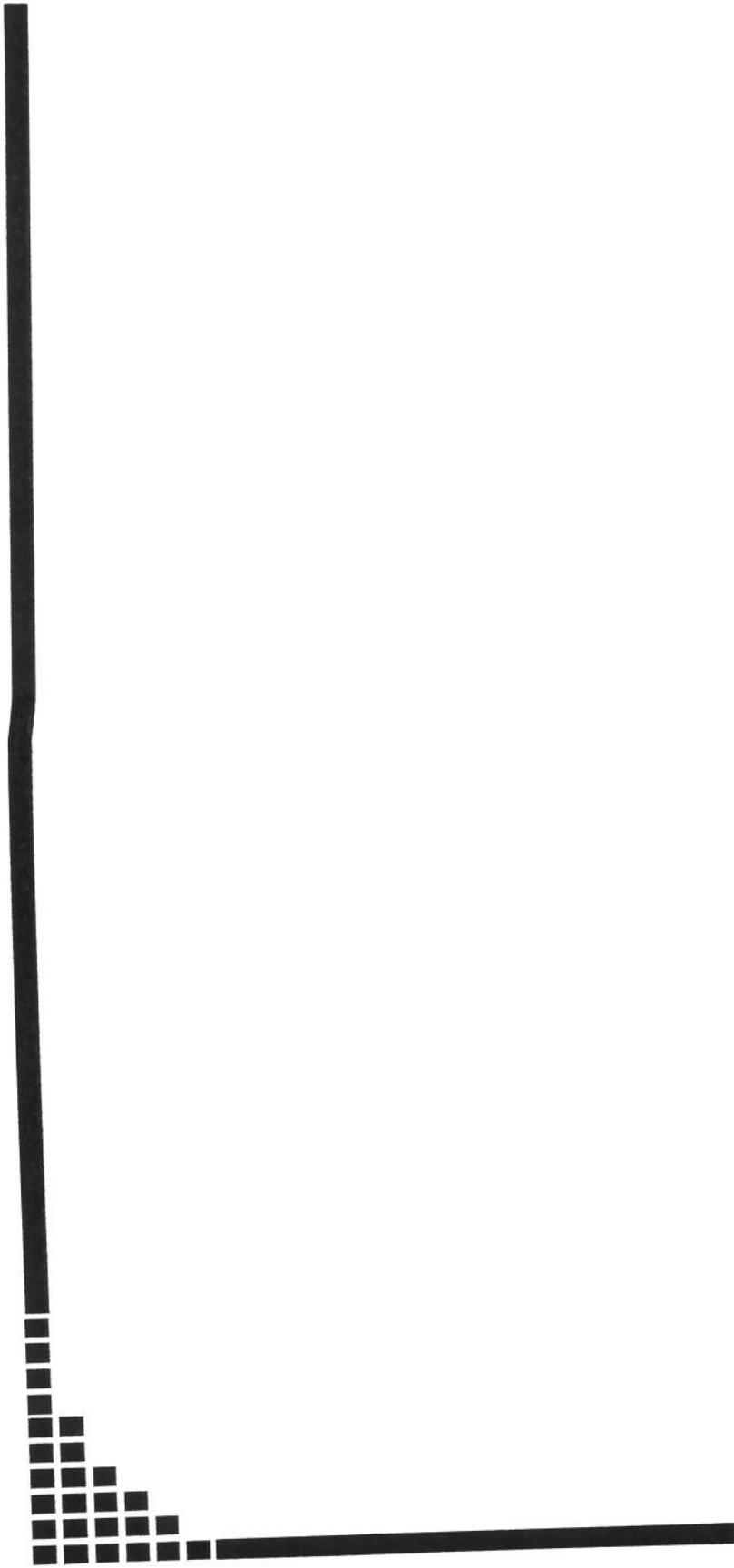
A saponina tem sido muito usada na lise de hemácias em preparação de amostras de sangue periférico para contagem eletrônica de leucócitos. É também usada na preparação de amostras de sangue para análise de parasitas da malária (UMLAS, 1972; WEIDMANN et al., 1997).

Em esfregaços citológicos hemorrágicos a saponina pode ser usada como agente hemolisante, onde a suspensão de células é submetida à hemólise. Sugere-se esta técnica em esfregaços citológicos onde hemácias são visualizadas depois de centrifugação (KEEBLER, 1993; UMLAS, 1972; WEIDMANN et al., 1997).



2. OBJETIVO

Este presente trabalho teve como objetivo desenvolver um fixador simples e eficaz, utilizando a saponina como agente hemolisante com o intuito de melhorar a análise do esfregaço, visando uma técnica rápida, de baixo custo e compatível com a rotina diária, que por sua simplicidade reduz a chance de ocorrência de erros desde a fixação até a análise do esfregaço citológico.



3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. MATERIAIS

Para a realização do presente trabalho foi utilizado uma amostra de 45 cães de raças variadas, machos e fêmeas, com peso variando entre 10kg e 30kg, sem medicação prévia, cedidos pelo Núcleo de Medicina e Cirurgia Experimental da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas, utilizados nas aulas de “cirurgia experimental”. Destes foram coletados amostras de fígado e linfonodo mesentérico.

Foram realizados estudos prévios para a padronização das técnicas de fixação desenvolvidas neste trabalho, onde os esfregaços foram fixados diretamente em Carnoy (DEWITT et al., 1957; LEHMANN et al., 1995; GANTER & JOLLES, 1970; WEIDMANN et al., 1997; DOYLE & O’LEARY, 1992; UMLAS, 1972); em Methacarn, que é uma modificação do Carnoy (LI et al., 1995); numa solução fixadora “HDII” (contendo formalina + glutaraldeído + saponina + tampão fosfato) (BENSON & BUSCH, 1996); e na solução fixadora SFX padronizada no estudo, porém com diferentes concentrações de saponina (saponina 1%; 0,5%; 0,25%; 0,1% e 0,01%).

Os fixadores Carnoy e Methacarn não foram padronizados pois produziram uma retração citoplasmática indesejável e foram deficientes na remoção de hemácias; a solução HDII também não removeu as hemácias do material, sendo também descartado seu uso.

A SFX com saponina a 0,1% foi padronizada de acordo com a análise da eficácia da remoção das hemácias, observada em testes com concentrações variadas de 0,001%, 0,01%, 0,05% e 0,1% de saponina.

Foi utilizada neste trabalho a saponina Quillaja Bark (SIGMAS/S-7900), retirada da *Quillaja saponaria*, da família das Rosaceae (dicotiledônea), que é uma árvore medindo 18m de altura e achada no Chile, Peru e Bolívia. A estrutura triterpenóide da sapogenina resultante da hidrólise é o ácido quilaico (TREASE & EVANS, 1978) (Figura 2).

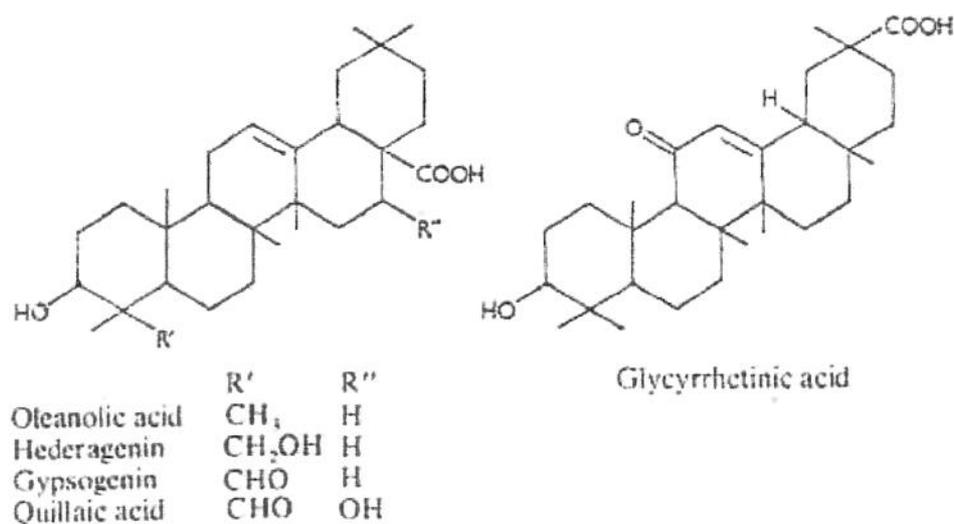


FIGURA 2 – Estrutura molecular do ácido quilaico, onde R'=CHO e R''=OH.

Fez-se também um estudo prévio com o material fixado em álcool 95% antes de ser submetido à ação da saponina a 0,1% por 40s, mas observamos uma ineficácia na remoção das hemácias. Teve-se a impressão de que as hemácias ficam aderidas à lâmina.

Também realizamos estudos prévios com as diferentes técnicas de coloração, por Giemsa; Hematoxilina-eosina (HE) (ARMED FORCES, 1957) (LILLIE, 1965), e Giemsa/Hematoxilina-eosina (G/HE, segundo uma modificação da técnica clássica de coloração por HE, feita na rotina do Laboratório de Citologia do Departamento de Anatomia Patológica – FCM/UNICAMP).

Observamos, que a coloração por G/HE se destacou pela nitidez da coloração do núcleo.

A padronização da coloração por G/HE foi baseada no fato de que temos um padrão de comparação dos esfregaços testes com os da rotina diária do Laboratório de Citologia do Departamento de Anatomia Patológica – FCM/UNICAMP.

Preconiza-se em manuais de coloração que após fixação no álcool 95% ou no álcool/formol, deve-se passar as lâminas em álcoois mais diluídos, como por exemplo álcool 70% e 50%, antes de colocá-las em água, mas na prática observamos que não é necessário, e visando a rapidez da técnica, sem prejudicar a qualidade do material, as lâminas foram hidratadas em água diretamente após a fixação com álcool 95% ou com álcool/formol.

A técnica de impregnação por prata da região organizadora de nucléolo (AgNOR) utilizada, é uma modificação da clássica, utilizada pelo Laboratório de Citologia do Departamento de Anatomia Patológica – FCM/UNICAMP. As etapas à seguir foram introduzidas na técnica para manter a coloração do material estável, pois observa-se que algumas lâminas se descoram rapidamente: colocar as lâminas em cuba de vidro contendo solução de metabissulfito de sódio 0,1% por 3min., lavar em água destilada e colocar em cuba de vidro contendo tiosulfato de sódio 2% por 3min. e lavar novamente em água destilada (TREVISAN, et al., 1998).

3.2. MÉTODOS

3.2.1. Coleta

A coleta foi realizada logo após a morte do animal, num tempo que variou entre 2 a 20min..

O material foi, posteriormente, avaliado por 2 observadores.

3.2.2. Confeção das lâminas

3.2.2.1. Raspado de fígado

Com o uso de navalha, foi feito raspado de cortes transversais de fígado de cães recém-sacrificados, seguido de esfregação em lâmina de vidro.

De cada cão, foram coletadas 4 amostras de fígado, sendo 1 lâmina colocada em tubo contendo a solução fixadora teste (SFX) e 3 lâminas colocadas em tubo seco (sem fixador, deixando secar por 1h a 192hs).

3.2.2.2. Raspado de linfonodo

Com o uso de navalha, foi feito raspado de cortes transversais de linfonodos mesentéricos de cães recém-sacrificados, seguido de esfregação em lâmina de vidro.

De cada cão, foram coletadas 4 amostras de linfonodo, sendo 1 lâmina colocada em tubo contendo a solução fixadora teste (SFX) e 3 lâminas colocadas em tubo seco (sem fixador, deixando secar por 1h a 192hs).

3.2.2.3. Técnicas de fixação

- Fixação imediata com solução fixadora teste (SFX).

O material citológico foi fixado por no mínimo 1h, e depois hidratado por 10min em água destilada. Em seguida, foi realizada a técnica de coloração por G/HE.

- Fixação em temperatura ambiente por dessecação
 - Sem pós-fixação

Após a secagem do esfregaço na lâmina, foi realizada a coloração de Leishmann (L).

- Pós- fixação com álcool 95% (AL)

Após a secagem do esfregaço na lâmina, este foi hidratado em solução de Hanks por 15min. Depois as lâminas foram colocadas em solução de saponina a 0,1% durante 40 segundos à temperatura ambiente, e colocadas imediatamente em solução de gluconato de cálcio a 0,3% por 2min. a temperatura ambiente.

Em seguida, as lâminas foram fixadas em álcool 95% durante 10min em temperatura ambiente, e depois hidratadas por 5min em água destilada. Foi realizada em seguida à técnica de coloração por G/HE.

- Pós-fixação com álcool/formol (ALFO)

Após a secagem do esfregaço na lâmina, este foi hidratado em solução de Hanks por 15min. Depois as lâminas foram colocadas em solução de saponina a 0,1% durante 40 segundos a temperatura ambiente, e colocadas imediatamente em solução de gluconato de cálcio a 0,3% por 2min. a temperatura ambiente.

Em seguida, as lâminas foram fixadas em álcool-formol durante 15min em temperatura ambiente, e depois hidratadas por 5min em água destilada. Foi realizada em seguida à técnica de coloração por G/HE.

A preparação das soluções se encontra no apêndice.

3.2.2.4. Avaliação dos esfregaços

A avaliação se fundamenta na importância da qualidade da morfologia celular e do esfregaço como um todo para o exame citopatológico. Com a graduação de 0 a 4 podemos avaliar semi-quantitativamente a qualidade da imagem do núcleo; do citoplasma; do fundo do esfregaço, a quantidade de hemácias; e a qualidade das reações histoquímicas e imunocitoquímicas.

As características específicas de cada estrutura celular e reações são relacionadas nas Tabelas 1, 2, 3, 4, 5 e 6.

TABELA 1. Avaliação da interferência do material de fundo na leitura dos esfregaços citológicos analisados.

INADEQUADO	0	Não permite avaliação citológica, devido à existência de, pelo menos, uma das seguintes alterações: excesso de material proteináceo ou de hemácias no fundo; células muito aglomeradas.
RUIM	1	Existência de material proteináceo, hemácias e células aglomeradas, dificultando a avaliação citológica.
ACEITÁVEL	2	A presença de material proteináceo, hemácias e células aglomeradas não comprometem a avaliação citológica.
BOM	3	Pouca quantidade de material proteináceo, hemácias e aglomerados celulares.
ÓTIMO	4	Quantidade mínima ou inexistente de material proteináceo, hemácias e aglomerados celulares.

TABELA 2. Avaliação da qualidade de preservação citoplasmática nos esfregaços citológicos analisados.

INADEQUADO	0	Citoplasmas fundidos.
RUIM	1	Citoplasma muito condensado e fundido.
ACEITÁVEL	2	A maior parte do citoplasma é identificável.
BOM	3	Citoplasma nítido, com detalhes de vacuolização.
ÓTIMO	4	Todos os detalhes celulares estão bem preservados, sem distorção ou retração, nem entumescimento.

TABELA 3. Avaliação da qualidade de preservação nuclear nos esfregaços citológicos analisados.

INADEQUADO	0	Núcleos com cromatina indistinta.
RUIM	1	Núcleos contraídos com cromatina compactada ou pouco individualizada.
ACEITÁVEL	2	A cromatina é identificável, embora um pouco compacta. núcleo distinto.
BOM	3	A cromatina e a carioteca são nítidas.
ÓTIMO	4	Todos os detalhes celulares estão bem preservados, sem distorção ou retração.

TABELA 4. Avaliação da interferência da quantidade de hemácias na leitura dos esfregaços citológicos analisados.

AUSENTE	0	Não há presença de hemácias
POUCA	1	Poucas hemácias esparsas, mostrando ausência em alguns campos.
MODERADA	2	Vários campos com hemácias, porém sem superposição com as células epiteliais.
GRANDE	3	Muitos campos com hemácias entre e sobre as células epiteliais.
ABUNDANTE	4	Hemácias cobrindo quase todas as células, vistas em pequeno aumento (20x)

TABELA 5. Avaliação da intensidade da reação para AgNOR ou ausência de reação nos esfregaços citológicos analisados.

0	Ausência de reação
1	Pontos muito discretos, muitos núcleos sem reação positiva.
2	Pontos evidentes, porém com pouca definição, dificultando a contagem.
3	Pontos evidentes com boa definição em pelo menos metade das células
4	Pontos perfeitamente distintos e bem corados em todas as células.

TABELA 6. Avaliação da intensidade de reação para PAS, CEA e 35βh11, ou ausência de reação nos esfregaços citológicos analisados.

0	Ausência de reação
1	Discreta reação em poucas células.
2	Algumas células bem coradas e muitas sem reação
3	Muitas células bem coradas, porém a reação não foi uniforme no esfregaço inteiro.
4	Reação nítida e bem definida em todas as células.

3.2.3. Testes estatísticos

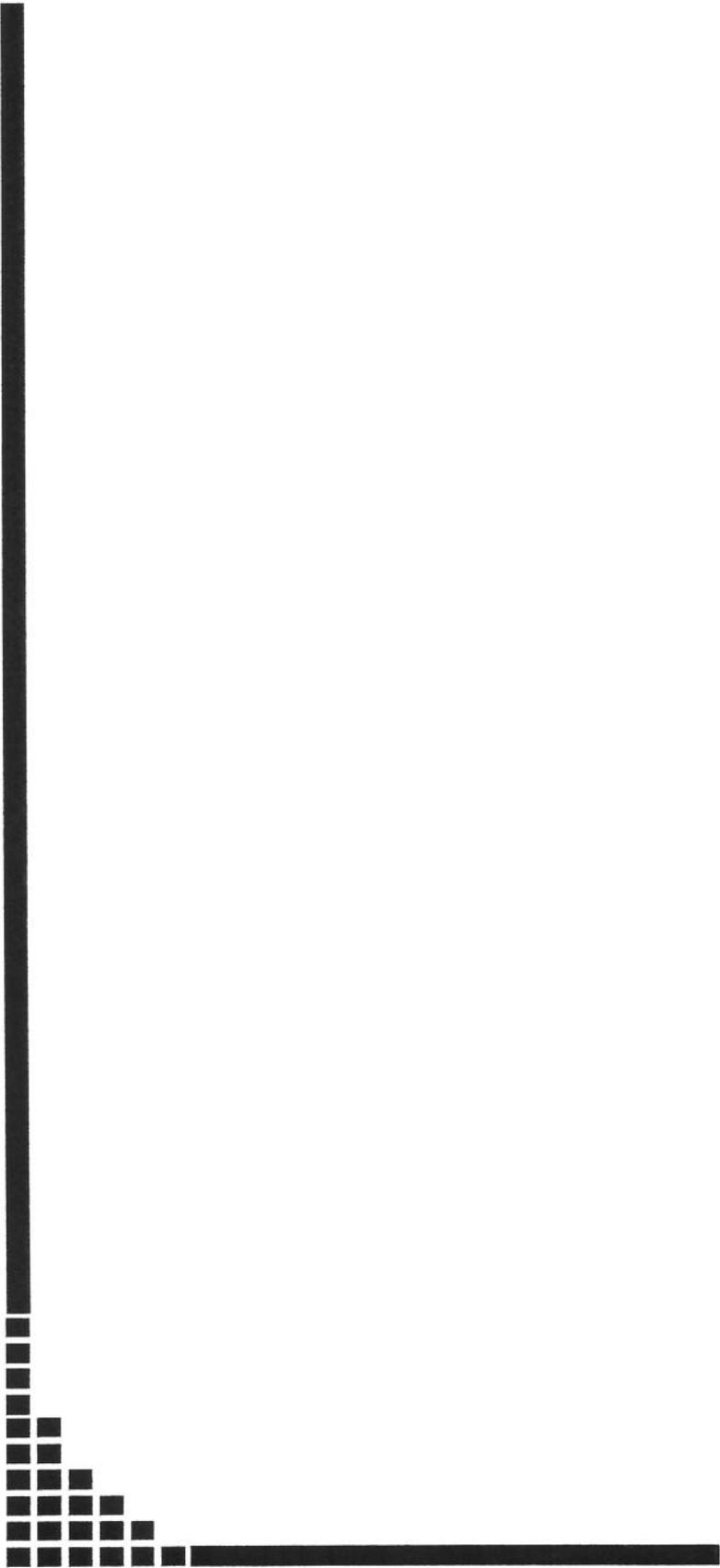
As pontuações entre os dois observadores foram comparadas pelo teste de Spearman para postos.

Para as comparações entre os 4 grupos de diferentes técnicas de fixação, foi aplicado o teste de Friedman.

O nível de significância foi definido como $< 0,05$.

A correção do erro alfa foi feita de acordo com Cross and Chaffin (CROSS & CHAFFIN, 1982).

Pelo teste de Spearman, foi detectado influência da variação do tempo entre coleta da amostra e processamento da mesma (1h a 192hs), na qualidade do esfregaço.



4. RESULTADOS

4.1. FÍGADO E LINFONODO

4.1.1. Quantidade de hemácias

Foi observado na maioria dos lâminas, tanto de fígado como de linfonodo, uma “escassa ou pequena” quantidade de hemácias no fundo dos esfregaços secos ao ar tratados pela solução de saponina e pós-fixados por álcool 95% e por álcool-formol. A minoria foi avaliada como “moderada” quantidade de hemácias, traduzida pelos restos celulares resultantes da hemólise, que permaneceram no esfregaço (Tabelas 7, 8, 9, 10 e 11) (Figuras 5 e 6).

Nos esfregaços fixados imediatamente pela SFX teste contendo saponina em sua formulação, foi observado “pequena ou moderada” quantidade de hemácias na maioria dos casos, tanto para fígado como para linfonodo. Os esfregaços tratados pela SFX apresentaram usualmente a presença de grande quantidade de restos celulares, resultantes da hemólise, aderidos a lâmina, mas sem interferir na leitura das células (Tabelas 7, 8, 9, 10 e 11) (Figura 3).

Os esfregaços secos ao ar sem pós-fixação apresentaram uma quantidade variável de hemácias (“moderada ou grande ou abundante”) (Tabelas 7, 8, 9, 10 e 11) (Figura 4).

4.1.2. Citoplasma e núcleo

A preservação da morfologia do núcleo e do citoplasma foi predominantemente avaliada como “boa ou ótima” nos esfregaços fixados imediatamente pela SFX teste, tanto no fígado como no linfonodo (Tabelas 7, 8, 9, 10 e 11) (Figura 3).

O núcleo e o citoplasma de linfócitos e hepatócitos foram satisfatoriamente preservados tanto nos esfregaços secos ao ar sem pós-fixação, como nos esfregaços pós-fixados por álcool 95% e por álcool-formol (Tabelas 7, 8, 9, 10 e 11) (Figuras 4, 5 e 6).

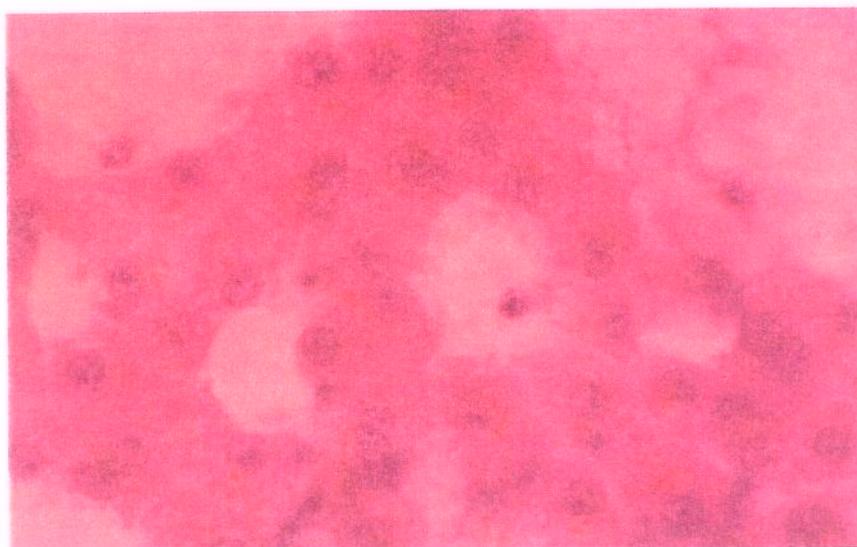


FIGURA 3. Esfregaço de fígado fixado imediatamente pela solução fixadora SFX. Núcleos e citoplasmas bem preservados e restos de hemácias no material de fundo, contudo sem interferência na avaliação citológica. Aumento da objetiva, emersão.

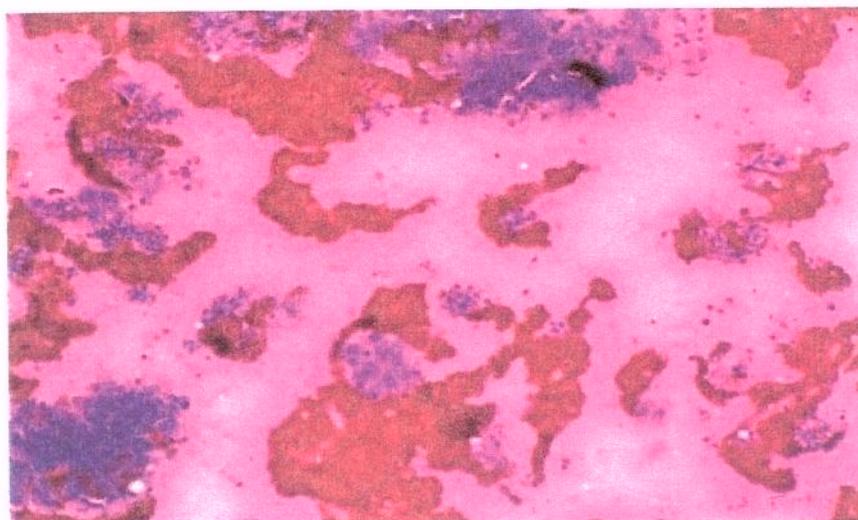


FIGURA 4. Esfregaço de fígado seco ao ar sem pós-fixação, corado por LEISHMANN. Grande quantidade de hemácias sobre e entre as células, podendo interferir na avaliação da lâmina. Os núcleos e citoplasmas são satisfatoriamente preservados. Aumento da objetiva 20x.

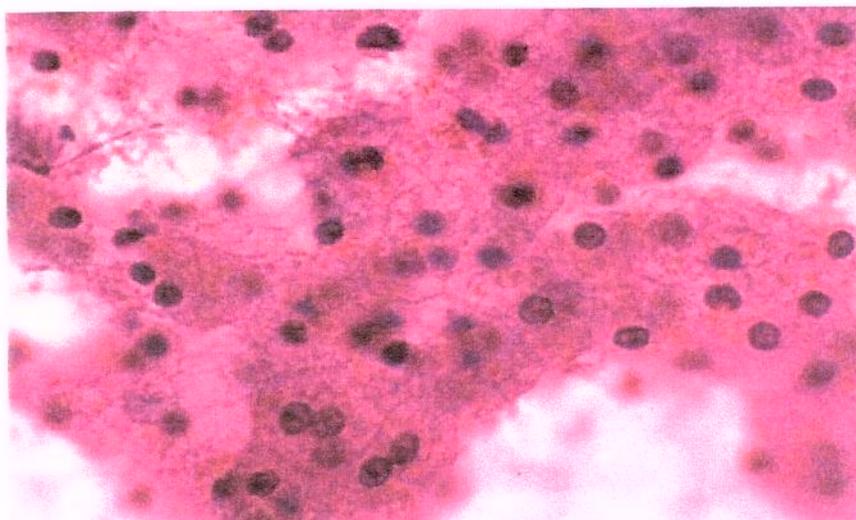


FIGURA 5. Esfregaço de fígado seco ao ar e pós-fixado em álcool 95%. Remoção intensa da quantidade de hemácias do material de fundo com boa preservação da morfologia nuclear e citoplasmática. Aumento da objetiva 40x.

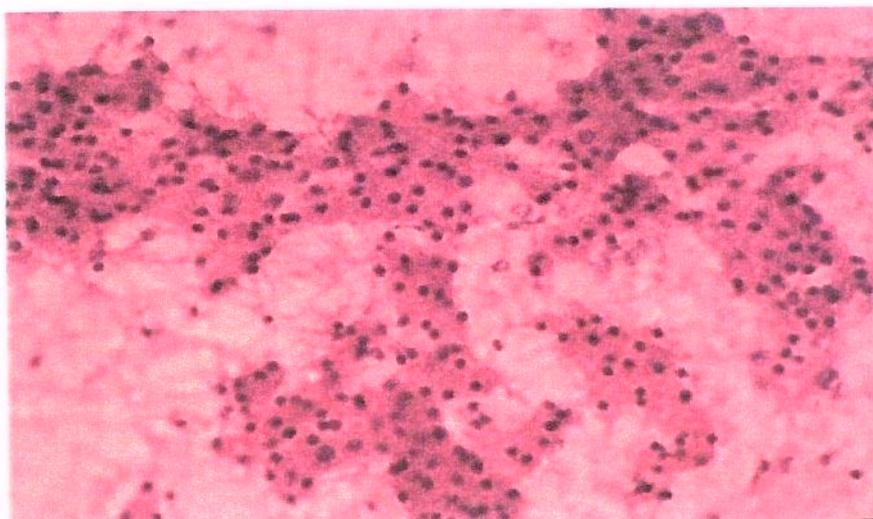


FIGURA 6. Esfregaço de fígado seco ao ar e pós-fixado em álcool-formol. Remoção intensa da quantidade de hemácias do material de fundo com boa preservação da morfologia nuclear e citoplasmática. Aumento da objetiva 20x.

4.1.3. PAS e AgNOR

A solução fixadora mostrou excelentes resultados nas amostras de fígado, superando com destaque os demais fixadores, especialmente na reação do PAS (Tabelas 8 e 9).

Para as amostras de linfonodo o PAS foi excelente nos esfregaços secos ao ar sem pós-fixação, e para os esfregaços submetidos às outras técnicas de fixação foram negativas as reações (Tabelas 10 e 11).

A técnica de AgNOR, para amostras de linfonodo, apresentou uma variação dos resultados bons e ruins nos esfregaços submetidos às diferentes técnicas de fixação, sendo um número insuficiente de casos testados, não alcançando poder estatístico. O grupo da SFX teve um resultado mais constante, avaliados entre 2 e 3 (Tabelas 8, 9, 10 e 11).

4.1.4. Reações imunocitoquímicas

A solução fixadora obteve melhores resultados, embora os esfregaços pós-fixados por álcool 95% e por álcool-formol também tenham mostrado resultados próximos em qualidade. Chama a atenção que para todos os esfregaços secos ao ar, sem pós-fixação, foram negativos às reações imunocitoquímicas (Tabelas 8 e 9).

As diferentes técnicas de fixação citológica (AL, ALFO, SE e SFX) foram avaliadas em relação aos seguintes parâmetros, de acordo com a leitura de cada observador:

- qualidade da morfologia celular;
- interferência da quantidade de hemácias e de material de fundo na leitura da lâmina;
- presença ou ausência de reação para as técnicas de AgNOR, PAS e imunocitoquímica;
- nível de significância do teste de Friedman sobre cada item citado acima. de acordo com a leitura de cada observador (P).

As tabelas em seguida mostram detalhadamente o “ranking” dos resultados.

TABELA 7. Avaliação das técnicas de fixação AL, ALFO, SE, SFX e P em esfregaços de fígado pelo observador 1 (primeira leitura).

FÍGADO					
(A.C.M.S.)	AL	ALFO	SE	SFX	P
Fundo	3,03	2,60	2,32	2,03	0,005
Hemácias	2,47	2,20	0,09	1,26	<0,0001
Citoplasma	2,83	2,43	1,75	2,74	<0,0001
Núcleo	2,09	1,91	2,46	3,53	<0,001

TABELA 8. Avaliação das técnicas de fixação AL, ALFO, SE, SFX e P em esfregaços de fígado pelo observador 1 (segunda leitura).

FÍGADO					
(A.C.M.S.)2X	AL	ALFO	SE	SFX	P
FUNDO	3,24	3,09	1,01	2,64	<0,0001
HEMÁCIAS	1,70	1,74	3,86	2,68	<0,0001
CITOPLASMA	2,72	2,41	1,57	3,3	<0,0001
NÚCLEO	2,22	2,25	1,86	3,66	<0,0001
PAS	1,80	2,40	1,80	4,00	0,02
AgNOR	2,83	2,33	1,16	3,66	0,12
CEA	3,10	2,80	1,40	2,70	0,16
35βH11	2,83	2,33	1,50	3,33	0,35

TABELA 9. Avaliação das técnicas de fixação AL, ALFO, SE, SFX e P em esfregaços de fígado pelo observador 2.

FÍGADO					
(M.A.S.T.)	AL	ALFO	SE	SFX	P
Fundo	3,00	2,64	2,26	2,10	0,063
Hemácias	2,36	2,12	0,18	1,34	<0,0001
Citoplasma	2,66	2,68	1,42	3,24	<0,0001
Núcleo	2,04	2,44	2,16	3,36	0,001
PAS	1,80	2,40	1,80	4,00	0,20
AgNOR	2,83	2,33	1,16	3,66	0,12
CEA	3,10	2,80	1,40	2,70	0,16
35βH11	2,83	2,33	1,50	3,33	0,35

TABELA 10. Avaliação das técnicas de fixação AL, ALFO, SE, SFX e P em esfregaço de linfonodo pelo observador 1 (primeira leitura).

LINFONODO					
(A.C.M.S.)	AL	ALFO	SE	SFX	P
Fundo	2,59	2,55	3,00	1,85	0,001
Hemácias	2,07	2,15	1,49	0,30	<0,0001
Citoplasma	2,20	2,05	2,79	2,94	0,005
Núcleo	1,86	1,87	2,40	3,85	<0,0001
PAS	1,90	2,20	4,00	1,90	0,02
AgNOR	2,70	2,70	1,90	2,70	0,70

TABELA 11. Avaliação das técnicas de fixação AL, ALFO, SE, SFX e P em esfregaço de linfonodo pelo observador 1 (segunda leitura).

LINFONODO					
(A.C.M.S.)2x	AL	ALFO	SE	SFX	P
Fundo	3,0	3,02	1,44	2,60	<0,0001
Hemácias	1,90	1,69	3,83	2,57	<0,0001
Citoplasma	2,16	2,01	2,13	3,7	<0,0001
Núcleo	1,96	1,95	2,09	4,0	<0,0001
PAS	1,90	2,20	4,00	1,90	0,027
AgNOR	2,60	2,70	1,80	3,0	0,55

De acordo com as tabelas abaixo, o coeficiente de correlação entre os 2 observadores, mostra um alto índice de reprodutibilidade:

TABELA 12. Coeficiente de correlação entre 2 observadores na avaliação de esfregaço de fígado pela técnica de pós-fixação em álcool 95%.

ÁLCOOL	COEFICIENTE	P
Fundo	0,936	$6 \cdot 10^{-2}$
Hemácias	0,915	$16,5 \cdot 10^{-11}$
Citoplasma	0,858	$4 \cdot 10^{-8}$
Núcleo	0,702	$8 \cdot 10^{-5}$

TABELA 13. Coeficiente de correlação entre 2 observadores na avaliação de esfregaço de fígado pela técnica de pós-fixação em álcool-formol.

ÁLCOOL-FORMOL	COEFICIENTE	P
Fundo	0,853	$6 \cdot 10^{-8}$
Hemácias	0,795	$19,7 \cdot 10^{-7}$
Citoplasma	0,873	$12 \cdot 10^{-9}$
Núcleo	0,855	$5 \cdot 10^{-8}$

TABELA 14. Coeficiente de correlação entre 2 observadores na avaliação de esfregaço de fígado pela técnica de fixação à seco corada por LEISHMANN.

SECO	COEFICIENTE	P
Fundo	0,849	$8 \cdot 10^{-8}$
Hemácias	0,617	$10 \cdot 10^{-4}$
Citoplasma	0,927	$2,5 \cdot 10^{-11}$
Núcleo	0,898	$10 \cdot 10^{-10}$

TABELA 15. Coeficiente de correlação entre 2 observadores na avaliação de esfregaço de fígado pela técnica de fixação imediata na solução fixadora SFX.

SFX	COEFICIENTE	P
Fundo	0,832	$2,5 \cdot 10^{-7}$
Hemácias	0,898	$11 \cdot 10^{-10}$
Citoplasma	0,789	$2,8 \cdot 10^{-6}$
Núcleo	0,600	$15 \cdot 10^{-4}$

O tempo entre a coleta das amostras e processamento das mesmas, pode influenciar a qualidade do esfregaço.

Foi observado que na técnica de fixação imediata pela SFX teste, a variação do tempo entre coleta das amostras de fígado e linfonodo, e processamento das mesmas não influenciou na preservação da morfologia celular, nem na remoção de hemácias (Tabelas 16 e 17).

As amostras de fígado secas ao ar sem pós-fixação não sofreram nenhuma influência significativa na qualidade do esfregaço. Já as amostras de linfonodo, na mesma técnica de fixação, apresentaram uma queda na preservação da morfologia celular (Tabelas 16 e 17).

Nas técnicas de pós-fixação, onde o material permaneceu seco ao ar por muito tempo até ser processado, foi observada uma queda na qualidade da preservação da morfologia celular de hepatócitos e linfócitos (Tabelas 16 e 17).

TABELA 16. Coeficiente de correlação (Spearman) entre o tempo percorrido de coleta e o processamento da amostra de fígado, e a qualidade dos esfregaços nas diferentes técnicas de fixação.

FÍGADO				
(A.C.M.S.)	FUNDO	HEMÁCIAS	NÚCLEO	CITOPLASMA
AL	-0,049 (p=0,76)	0,23 (p=0,14)	-0,31 (p=0,046)	0,17 (p=0,29)
ALFO	0,13 (p=0,4)	0,25 (p=0,10)	-0,6 (p=4,48.10 ⁻⁵)	-0,14 (p=0,36)
SE	0,16 (p=0,30)	0,028 (p=0,86)	0,15 (p=0,34)	0,22 (p=0,14)
SFX	-0,12 (p=0,44)	-0,12 (p=0,44)	-0,17 (p=0,28)	0,15 (p=0,32)

TABELA 17. Coeficiente de correlação (Spearman) entre o tempo percorrido de coleta e o processamento da amostra de linfonodo, e a qualidade dos esfregaços nas diferentes técnicas de fixação.

LINFONODO				
(A.C.M.S.)	FUNDO	HEMÁCIAS	NÚCLEO	CITOPLASMA
AL	-0,44 (p=0,003)	0,09 (p=0,56)	-0,46 (p=0,002)	-0,47 (p=16,5.10 ⁻⁴)
ALFO	-0,53 (p=3,22.10 ⁻⁴)	0,35 (p=0,024)	-0,48 (p=15,8.10 ⁻⁴)	-0,42 (p=0,006)
SE	-0,34 (p=0,03)	0,14 (p=0,36)	-0,62 (p=12,18.10 ⁻⁶)	-0,7 (p=4,84.10 ⁻⁷)
SFX	-0,35 (p=0,022)	0,07 (p=0,66)	0,0 (p=0,0)	-0,1 (p=0,48)



5. DISCUSSÃO

As técnicas desenvolvidas em nosso estudo, utilizaram saponina como agente hemolisante, como foi descrito por UMLAS (1972).

Este autor desenvolveu cinco técnicas diferentes, adicionando a saponina em diferentes etapas do processo, ou usando esfregaços fixados por diferentes fixadores.

No primeiro experimento a saponina foi adicionada à um sedimento sangüíneo resultante de centrifugação de material líquido-hemorrágico, que foi agitado por inversão. Esta suspensão foi centrifugada novamente, e do novo sedimento, foi feito um esfregaço, posteriormente fixado em álcool 95% e corado.

No segundo experimento, o material líquido-hemorrágico foi centrifugado e do sedimento hemorrágico obtido foi feito um esfregaço, posteriormente fixado em Carnoy, que, como a saponina, apresenta atividade hemolítica.

No terceiro experimento, o esfregaço hemorrágico foi submetido a solução de saponina, antes da secagem do material na lâmina. Posteriormente o esfregaço foi fixado em álcool 95%.

No quarto experimento, o esfregaço hemorrágico foi primeiro fixado em álcool 95%, e depois hemolisado pela saponina.

No quinto experimento o esfregaço hemorrágico foi fixado com spray de álcool isopropílico, e depois hemolisado pela ação da saponina.

Em todos estes experimentos, a saponina foi adicionada somente às células não fixadas e não secas.

Uma comparação entre o esfregaço citológico seco ao ar/reidratado, fixado e depois corado, e o esfregaço fixado tradicionalmente, feita num estudo, mostra que não existe diferença significativa na avaliação citológica do material, ou seja, as duas técnicas preservam a morfologia celular com qualidade, não interferindo na análise citológica (RANDALL & AMERONGEN, 1997).

Baseados neste estudo, e com o intuito de facilitar a coleta do material, queríamos desenvolver uma técnica de fixação simples e eficaz, contendo saponina como agente hemolisante, e que pudesse ser aplicada para material seco. A manipulação deste material (fixação, processamento e coloração) seria feita somente no laboratório, por profissionais treinados, possibilitando um melhor controle de qualidade na confecção das lâminas. Seria uma técnica prática e útil na rotina diária.

Aplicando os estudos de UMLAS (1972), significaria que o clínico/cirurgião precisaria manipular material em suspensão ou o esfregaço ainda não seco, o que certamente poderia trazer muitas fontes de erro na posterior análise citológica, pois não teríamos um controle de qualidade na confecção das lâminas.

Outros métodos tecnológicos foram desenvolvidos para melhorar a qualidade do esfregaço citológico eliminando material de fundo e hemácias, utilizando automação e reagentes comercializados, como por exemplo o CytoRich Red e o ThinPrep Test. (WEIDMANN et al., 1997; LINDER & ZAHNISER, 1997; CORKILL et al., 1997; WILBUR et al., 1997).

Comprovamos em nosso estudo a ação hemolítica da saponina numa técnica simples e financeiramente praticável na rotina laboratorial, inviabilizando a implantação dos métodos citados acima, devido o custo elevado.

Visando a fixação imediata das células e ao mesmo tempo a lise das hemácias, também desenvolvemos uma solução fixadora composta por saponina, assegurando uma técnica de preparação rápida do esfregaço citológico e também praticável na rotina.

A técnica de fixação imediata das células pela solução fixadora foi considerada melhor na preservação da morfologia nuclear e citoplasmática, quando comparada com as outras técnicas de fixação desenvolvidas em nosso estudo. Porém, a remoção do material de fundo e hemácias é destacada nas técnicas de pós-fixação.

Comparando os resultados das avaliações citológicas nas diferentes técnicas de fixação, conclui-se que não há fixador ideal, pois a menor interferência do material de fundo e das hemácias foi observada nas técnicas de pós-fixação “AL” e “ALFO”. Por outro

lado, a preservação do núcleo e do citoplasma foi considerada melhor nos esfregaços fixados imediatamente na solução “SFX”.

Portanto, se o objetivo for apenas diminuir a quantidade de hemácias, é recomendável as técnicas de pós-fixação nos esfregaços secos ao ar.

Porém, a melhor preservação da morfologia celular, parâmetro considerado por nós como mais importante, bem como excelentes resultados com reações histoquímicas foram observados após fixação imediata pela solução fixadora teste (SFX).

A positividade para a reação imunocitoquímica foi satisfatória no material pós-fixado em álcool 95% e em álcool-formol. Isto pode ser talvez explicado pelo uso da saponina antes da fixação, aumentando a permeabilidade de membrana celular e de organelas.

Como compromisso, seria “ideal” a introdução da técnica de pós-fixação “AL” e/ou “ALFO” na rotina diária, pois é praticável, podendo utilizar as lâminas com esfregaço seco ao ar.

Desta maneira a qualidade final do esfregaço seria melhorada, possibilitando um diagnóstico mais apurado. A técnica de pós-fixação é simples e de baixo custo. O tempo de processamento da lâmina citológica no laboratório seria de 30min..

A solução SFX na técnica de fixação imediata mostrou excelentes resultados quando avaliamos a preservação das estruturas celulares, como núcleo e citoplasma, porém a remoção dos restos celulares provenientes da hemólise é baixa, contudo não interfere na leitura da lâmina citológica.

As vantagens da solução fixadora SFX no uso diário seriam:

- técnica simples, rápida e de custo médio;
- coleta do material diretamente na solução fixadora, que será processado somente no laboratório, evitando quaisquer erros técnicos na manipulação do material;

- em amostras sangüinolentas facilita a avaliação citológica, mesmo quando a remoção de hemácias for baixa, pois há hemólise e os restos celulares das hemácias que permanecem aderidos à lâmina, não interferem na avaliação citológica;
- alta qualidade citológica, com preservação do citoplasma e núcleo; e ainda ação seletiva para hemácias, pois na concentração padronizada não ocorre destruição de outros elementos celulares.

Julgamos que a diminuição da quantidade de hemácias, sem a preservação do núcleo e do citoplasma, não seria desejável.

Portanto, os resultados produzidos pela fixação imediata com a SFX, ou seja, núcleos e citoplasmas muito bem preservados, são considerados mais importantes na rotina diagnóstica e por isso recomendamos seu uso.

Sugerimos também o uso das técnicas de pós-fixação com álcool 95% e com álcool-formol, pois a morfologia celular foi satisfatoriamente preservada, e tiveram desempenho razoável nas reações histoquímicas e imunocitoquímicas.

Deve-se ter cuidados especiais na manipulação da saponina, que podem tornar seu uso desvantajoso, como: devido a sua toxicidade, recomenda-se o uso de capela; sua ação prolongada pode provocar danos estruturais nas células, portanto deve-se bloquear sua atividade pela ação de íons cálcio na solução de gluconato de cálcio; o excesso de saponina pode destruir componentes celulares da amostra em análise, portanto deve-se utilizá-la em concentração adequada (NEDELKOFF et al., 1961).

As lâminas pós-fixadas ou sem pós-fixação, devem ser processadas num curto espaço de tempo após a secagem do esfregaço, assegurando uma melhor qualidade do material para análise. Acreditamos que a ação da saponina em material seco ao ar colhido há muito tempo, pode interferir na preservação da morfologia celular.

A remoção de hemácias pela saponina em material paralelamente fixado por álcool 95% é muito baixa. Hipotetizamos, que isto aconteça devido à forte adesão das

hemácias pelo fixador na lâmina, dificultando a ação hemolítica da saponina. Acreditamos que o mesmo processo ocorre com a solução SFX, onde os restos celulares da hemólise permanecem aderidos à lâmina pela ação do fixador.

A saponina com sua ação controlada e em concentrações adequadas altera muito pouco a estrutura morfológica das células, podendo até ser usada na microscopia eletrônica. Sua atividade hemolítica é eficaz, possibilitando uma avaliação citológica livre da interferência de hemácias e consequentemente um diagnóstico mais apurado.

Portanto, apesar de suas desvantagens, seu uso na preparação de esfregaços para análise citológica seria de grande benefício.

Apesar de UMLAS(1972) comparar a qualidade final dos esfregaços no seu trabalho, o autor não revela os critérios de avaliação, tampouco substância objetivamente os resultados desta avaliação. Além disto, a análise dos esfregaços foi realizada por apenas um observador, o que nos leva a considerar os resultados relativamente inseguros.

No nosso estudo a análise dos esfregaços foi feita por dois observadores, possibilitando a avaliação da reprodutibilidade dos resultados. Além disto tentamos desenvolver um sistema de avaliação mais objetivo possível, visando a preservação da morfologia celular; interferência da quantidade de hemácias e do material de fundo na leitura do esfregaço citológico, incluindo também a reatividade celular em relação as técnicas histoquímicas e imunocitoquímicas realizadas.

Encontramos na literatura parâmetros de avaliação semelhantes ao usado neste estudo, como a quantidade de material de fundo e de hemácias, e preservação da morfologia nuclear (carioteca, textura da cromatina) e citoplasmática (membrana celular) (BOSTWICK et al., 1994; WEIDMANN et al., 1997), o que valoriza a nossa tentativa.

Apesar do método de leitura por observadores ser ainda subjetivo, os coeficientes de correlação calculados entre os dois observadores mostraram uma boa reprodutibilidade, validando o nosso sistema de avaliação



6. CONCLUSÃO

Embora não exista um fixador ou solução fixadora ideal, como já visto na introdução, neste trabalho também chegamos à esta conclusão.

Ficou provado neste trabalho que a solução SFX preserva melhor (muito bem) o núcleo e o citoplasma, tanto no fígado como no linfonodo. A hemólise é eficaz, porém os restos celulares permanecem como material de fundo. As reações histo- e imunocitoquímicas foram excelentes no fígado, porém, nem tanto no linfonodo. É recomendado seu uso atentando para o fato de seu prazo de validade ser curto (10 dias).

A ação prévia da saponina em esfregaços secos ao ar, com pós-fixação em álcool 95% ou em álcool/formol, remove melhor as hemácias. A preservação celular é boa e o desempenho na reações histo- e imunocitoquímicas é razoável.

Considerando que a SFX não é comercializada, que precisa ser preparada no laboratório e enviada ao ambulatório ou consultório do médico, que a sua validade é limitada e que seu desempenho foi excelente em todos os itens, recomendamos seu uso num local com boa cooperação interdisciplinar, entre o laboratório e os demais serviços.

Considerando que o esfregaço seco ao ar é de fácil execução, que a passagem em saponina retira suficientemente as hemácias e que a pós-fixação tanto pelo álcool 95%, como pelo álcool-formol é adequada à morfologia celular, recomendamos seu uso sem restrições.

Desta forma, a escolha de um fixador deve ser feita conforme a prioridade do exame.



7. SUMMARY

Saponins, a group of enzymatic hemolysins derived from a variety of plants, may be helpful in the preparation of hemorrhagic cell samples by clearing the background. The aim of our study was to investigate, whether saponin may be helpful in removing the red cell background in routine, air-dried cytologic preparations in comparison with immediately fixed slides.

Cytologic touch preparations from liver and lymph nodes from mongrel dogs were processed as following:

1. SFX group – Smears were immediately put into the fixative SFX, composed of an aqueous, phosphate buffered solution containing 50% ethanol and 2% formaldehyde and 0,1% saponin.
2. Conventional staining (SE) – Smears were air-dried for at least 30 minutes and then stained according to Leishmann.
3. Alcohol- postfixation (AL) – Air dried smears were rehydrated and incubated in a 0,1% saponin solution and then fixed in 95% alcohol and stained with the modified Giemsa-haematoxilin staining.
4. Formol-Alcohol postfixation (FoAL) – Air dried smears were rehydrated and incubated in a 0,1% saponin solution and then fixed in formalin-alcohol solution and stained with the modified Giemsa-haematoxilin staining.

Staining quality was rated by a score and the results were compared by the Friedman test (Winstat 3.1 software).

The best results regarding the visualization of nuclear and cytologic details were achieved in the group with immediate fixation in formol-alcohol solution containing 0,1% saponin, although there was only a small clearing effect of the red blood cell background. On the other hand this effect was pronounced in air-dried specimens, although the quality of the cytologic visualization was inferior.

In conclusion, there is no method which provides both excellent staining results and maximum red blood cell clearing. As a compromise saponin-induced lysis of red blood cells in air-dried specimens followed by fixation with alcohol results in both reasonable removal of red blood cells, as well as a good preservation of cytologic details.



8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARMED FORCES INSTITUTE OF PATHOLOGY. - *Manual of Histologic and Special Staining Technics*. 1ed. Washington, D.C., 1957. 206p.
- BENSON, D.M. & BUSCH, R. - Fixation of testicular tissue for immunohistochemical and ultrastructural examination. *Andrologia*, **28**:27-33, 1996.
- BERKI, T.; KUMANOVICS, G.; KUMANOVICS, A.; FALUS, A. ; UJHELYI, E.; NEMETH, P. – PRODUCTION AND FLOW CYTOMETRIC APPLICATION OF A MONOCLONAL ANTIGLUCOCORTICOID RECEPTOR ANTIBODY. *J. IMMUNOL. METHODS.*, **214(1-2)**:19-27, 1998.
- BOSTWICK, D.G.; ANNOUF, N.A; CHOI, C. – ESTABLISHMENT OF THE FORMALIN-FREE SURGICAL PATHOLOGY LABORATORY. *ARCH.PATHOL.LAB.MED.* **18**:298-302, 1994.
- CHRISTIAN, H.C.; FLOWER, R.J.; MORRIS, J.F.; BUCKINGHAM, J.C. – LOCALISATION AND SEMI-QUANTITATIVE MEASUREMENT OF LIPOCORTIN 1 IN RAT ANTERIOR PITUITARY CELLS BY FLUORESCENCE-ACTIVATED CELL ANALYSIS/SORTING AND ELECTRON MICROSCOPY. *J. NEUROENDOCRINOL.*, **11(9)**:707-714, 1999.
- CORKILL, M.; KNAPP, D.; MARTIN, J.; HUTCHINSON, M.L. – SPECIMEN ADEQUACY OF THINPREP SAMPLE PREPARATIONS IN A DIRECT-TO-VIAL STUDY. *ACTA CYTOL.*; **41(1)**:39-44, 1997.
- COSTA, A.F. - Fármacos com saponósidos. In: _____. *Farmacognosia*. 1ed. Lisboa, Fundação Calouste Gulbenkian, 1987. p.338-370.
- CROSS, E.M. & CHAFFIN, W.W. - Use of binominal theorem in interpreting results of multiple tests of significance. *Educational and Psychological Measurement*, **42(1)**:25-34, 1982.
- DOYLE, C.T. & O' LEARY, J.J. - The search for the universal fixative or "magic juice". *J.Pathol.*, **166**:331-332, 1992.

- GANTER, P. & JOLLÈS, G. MÉTHODES HISTOLOGIQUES DE BASE –FIXATION. IN: _____ . *HISTOCHIMIE NORMALE ET PATHOLOGIQUE*. 1 ED. PARIS, ED. GAUTHIER-VILLARS, 1969. p 1-108.
- GANTER, P. & JOLLÈS, G. FORMULAIRE – MÉTHODES HISTOLOGIQUES DE BASE. IN: _____ *HISTOCHIMIE NORMALE ET PATHOLOGIQUE*. 1 ED. PARIS, ED. GAUTHIER-VILLARS, 1970. p 1381-1847.
- GAY-ANDRIEU, F; COZON,G.J.; KAH, S.; PEYRON, F. – FLOW CYTOMETRIC QUANTIFICATION OF TOXOPLASMA GONDII CELLULAR INFECTION AND REPLICATION. *J.PARASITOL.*, **85(3)**:545-549, 1999.
- GLASOVÁ, M; KONÍKOVÁ, E; KUSENDA, J; BABUSÍKOVÁ, O. –EVALUATION OF DIFFERENT FIXATION-PERMEABILIZATION METHODS FOR SIMULTANEOUS DETECTION OF SURFACE, CYTOPLASMIC MARKERS AND DNA ANALYSIS BY FLOW CYTOMETRY IN SOME HUMAN HEMATOPOIETIC CELL LINES. *NEOPLASMA*, **42(6)**:337-346, 1995.
- GORISSE, M.C.; VENTEO, L.; PLUOT, M. – A METHOD FOR SIMULTANEOUS QUANTIFICATION OF MONOCLONAL ANTIBODY KI-67 AND DNA CONTENT BY FLOW CYTOMETRY. APPLICATION TO BREAST CARCINOMAS. *ANAL. QUANT. CYTOL. HISTOL.*, **21(1)**:8-16, 1999.
- DEWITT, S.H.; DEL VECCHIO, P.R.; BORELLI, J.I.; HILBERG, A.W. – A METHOD FOR PREPERING WOUND WASHINGS AND BLOODY FLUIDS FOR CYTOLOGIC EVALUATION. *NATIONAL CANCER INSTITUTE*, **19(1)**:115-121, 1957.
- FRANEK, K.J.; WOLCOTT, R.M.; CHERVENAK, R. – RELIABLE METHOD FOR THE SIMULTANEOUS DETECTION OF CYTOPLASMIC AND SURFACE CD3 EPSILON EXPRESSION BY MURINE LYMPHOID CELLS. *CYTOMETRY*, **17(3)**:224-236, 1994.

- GRIMALDI FILHO, G. - Fixação. In: _____. *Manual de Técnica Histológica*. Instituto Oswaldo Cruz. 1ed. Rio de Janeiro, 1981. p.10-28.
- GRÜTZKAU, A.; KRÜGER-KRASAGAKES, S.; KÖGEL, H.; MÖLLER, A.; LIPPERT, U.; HENZ, B.M. – Detection of intracellular interleukin-8 in human mast cells: flow cytometry as a guide for immunoelectron microscopy. *J. Histochem. Cytochem.*, **45(7)**:935-945, 1997.
- HOPWOOD, D. - Fixation and Fixatives. In: BANCROFT, J.D.; STEVENS, A. – *Theory and Practice of Histological Techniques*. 4ed. New York Edinburgh London Madrid Melbourne San Francisco Tokio, Churchill Livingstone, 1996. p.21-42.
- JAMUR, M.C. & OLIVER, C. – Binding of antibody to the gamma subunit of FcεRI in rat basophilic leukemia cells results in morphological changes without inducing histamine release. *Cell. Tissue. Res.*, **284**:153-159, 1996.
- KEEBLER, C. M. - Cytopreparatory Techniques. In: KEEBLER, C. M. & SOMRAK, T. M. - *The manual of cytotechnology*. 7ed. Chicago, ASCP, 1993. p.889-917.
- KONIKOVA, E.; GLASOVA, M.; KUSENDA, J.; BABUSIKOVA, O. – INTRACELLULAR MARKERS IN ACUTE MYELOID LEUKEMIA DIAGNOSIS. *NEOPLASMA*, **45(5)**:282-291, 1998.
- LEHMANN, T.; VOLKL, A.; FAHIMI, H.D. – THE IMPORTANCE OF TISSUE FIXATION FOR LIGHT MICROSCOPIC IMMUNOHISTOCHEMICAL LOCALIZATION OF PEROXISOMAL PROTEINS: THE SUPERIORITY OF CARNOY'S FIXATIVE OVER BAKER'S FORMALIN AND BOUIN'S SOLUTION. *HISTOCHEMISTRY*, **103**:187-195, 1995.
- LI, S.; TUCK-MULLER, C.M.; YAN, Q.; WERTELECKI, W.; CHEN, H. – A rapid method for PCR amplification of DNA directly from cells fixed in Carnoy's fixative. *Am. J. Med. Genetics.*, **55**:116-119, 1995.

- LILLIE, R.D. FIXATION. IN: _____ *HISTOPATHOLOGIC TECHNIC AND PRATICAL HISTOCHEMISTRY*. 3ED, NEW YORK TORONTO SYDNEY LONDON, MC GRAW-HILL BOOK COMPANY, 1965. P 32-60.
- LINDER, J.; ZAHNISER, D. – THE THINPREP PAP TEST. *ACTA CYTOL.* **41(1)**:30-38; 1997.
- LORE, K.; SONNERBORG, A; SPETZ, A.L.; ANDERSSON, U.; ANDERSSON, J. – ERRATUM TO “IMMUNOCYTOCHEMICAL DETECTION OF CYTOKINES AND CHEMOKINES IN LANGERHANS CELLS AND IN VITRO DERIVED DENDRITIC CELLS” [CORRECTED AND REPUBLISHED ARTICLE ORIGINALLY PRINTED IN J. IMMUNOL. METHODS 1998 MAY 1;214(1-2):97-111]. *J. IMMUNOL. METHODS.*, **218(1-2)**:173-187, 1998.
- MACVILLE, M.V.E.; WIESMEIJER, K.C.; DIRKS, R.W.; FRANSEN, J.A.M.; RAAP, A .K. – Saponin pre-treatment in pre-embedding electron microscopic in situ hybridization for detection of specific RNA sequences in cultured cells: A Methodological Study. *J. Histochem. Cytochem.*, **43(10)**:1005-1018, 1995.
- MAIA, V. – Técnica histológica especial;. In: _____. *Compêndio de Estudos Histológicos*. 1ed. Recife. 1967. p.181-277.
- MAIA, V. – Técnica histológica geral. In: _____. *Compêndio de Estudos Histológicos*. 1ed. Recife. 1967. p.107-179.
- MELLO, E.S. & ALVES, V.AF. – GLOSSÁRIO DOS PRINCIPAIS MARCADORES IMUNOCITOQUÍMICOS. IN: ALVES, V.A.F.; BACCHI, C.E.; VASSALLO, J. – *MANUAL DE IMUNO-HISTOQUÍMICA*. 1 ED. SÃO PAULO, SOCIEDADE BRASILEIRA DE PATOLOGIA, 1999. p.260-270
- MRKOCI-FELNER, K.; NIEDERER, E.; BERGER, E.G. – FLOW CYTOMETRIC DETECTION OF THE GOLGI APPARATUS USING ANTIBODIES TO GLYCOSYLTRANSFERASES. *CYTOMETRY*, **28(1)**: 50-57,1997.

- MULLER, C.; BONMANN, M.; HEINDENREICH, S.; KIEHL, M.G.; KOCH, O.M.
 TYROSINE PHOSPHORYLATION IN PERIPHERAL T CELLS OF KIDNEY
 TRANSPLANT RECIPIENTS: ANALYSES OF BASELINE LEVELS AND
 RESPONSE TO T CELL RECEPTOR STIMULATION.
INT.J.MOL.MED.,4(2):141-144, 1999.
- NEDELKOFF,B.; CHRISTOPHERSON, W.M.; HARTER, J.S.- A method for
 demonstrating malignant cells in the blood. *Acta. Cytol.*, 5(3):203-205,1961.
- PLOTON, D.; MENAGER, M.; JEANNESSON, P.; HIMBER, G.; FIGLOU, F.; ADNET,
 J.J. - Improvement in the staining and visualization of the argyrophilic preteins of
 the nucleolar organizer regions at the opticallevel. *Histochem. J.*, 18:5-13, 1986.
- RANDALL, B. & Van AMERONGEM, L. - Commercial laboartory practice evaluation of
 airdried/rehydrated cervicovaginal smears vs. Tradionally –fixed smears. *Diagn.*
Cytopathol. 16(2):174-176, 1997.
- ROBERTIS, D.; NOWINSKI; W.; SAEZ, F. - Citologia General. In: _____.
Organización Morfológica de La Célula. 4 ed. Buenos Aires, El Ateneu, 1960.
 p.54-83.
- SANTOS, M. A. – Métodos histológicos gerais. In: _____. *Technica Histológica.* 1ed
 Bahia, Livraria e Papelaria Catilina, 1926. p.79-191.
- SANTOS, RM.T.M.; WAKAMATSU, A.; KANAMURA, C.T.; NONOGAKI, S.; PINTO,
 G.A. – Procedimentos laboratoriais em imuno-histoquímica e hibridização “*in situ*”.
 In: ALVES, V.A.F.; BACCHI, C.E.; VASSALLO, J. - *Manual de Imuno-*
histoquímica. 1 ed. São Paulo, Sociedade Brasileira de Patologia, 1999. p.237-259
- SHIBATA, S. Saponins with biological and pharmacological activity In: WAGNER, H. &
 WOLFF, P. - *New Natural Products and Plant Drugs with Pharmacological,*
Biological or Therapeutical Activity. 1ed. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New
 York, 1977. P 177-192.

- TAKUMIDA, M.; ANNIKO, M. – Cytoskeletal organization of the vestibular supporting cells. Saponin perfusion method for observing intracellular structures by scanning electron microscopy. *ACTA OTOLARYNGOL. STOCKH*, **114(2)**:150-155, 1994.
- TERADA, N.; FUJII, Y.; KITANO, K.; OHNO, S. – Membrane skeletons in avian erythrocytes as revealed by the quick-freezing and deep-etching method. *HISTOL. HISTOPATHOL.*, **12(2)**:349-357, 1997.
- TREASE, G.E. & EVANS, W.C. SAPONINS AND CARDIO-ACTIVE DRUGS. IN: *PHARMACOGNOSY*. 11 ED. LONDON, BAILLIÈRE TINDALL, 1978. P 475-506.
- TREVISAN, M; GOES, J.R.; COY, C. – A técnica AgNOR auxiliando no diagnóstico do câncer colorretal. *ARQ.GASTROENTEROL*. **35(2)**:89-94, 1998.
- ULFGREN, A-F.; LINDBLAD, S.; KLARESKOG, L.; ANDERSON, J.; ANDERSON, U. – Detection of cytokine producing cells in the synovial membrane from patients with rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.*, **54(8)**:654-661, 1995.
- UMLAS, J. – Preparation of blood Specimens for Cytologic Examination Using Saponin. *Acta Cytol.*; **16(2)**:186-188, 1972.
- YAMADA, A .T. & RINCON, M.C.A . – *Manual de Histotécnicas*. 1^a ed. Campinas-SP, UNICAMP, 1996. 34p.
- WEIDMANN, J.; KING, L.C.; BIBBO, M. – Modification of CytoRich Red Fixative System for Use on Bloody Pap and Fine-Needle Aspiration Smears. *Diagn.Cytophatol.*; **20(2)**:95-98, 1997.
- WEIDMANN, J.; CHAUBAL,A.; BIBBO, M. – Cellular Fixation- A Study of CytoRich Red and Cytospin Collection Fluid. *Acta Cytol.*; **41(1)**:182-187, 1997.
- WILBUR, D.C.; FACIK, M.S.; RUTKOWSKI, M.A .; MULFORD, D.K.; ATKISON, K.M. – Clinical Trials of the CytoRich Specimen-Preparation Device for Cervical Cytology. *Acta Cytol.*; **41(1)**:24-29, 1997.



9. APÊNDICE

9.1. TÉCNICAS HISTOQUÍMICAS E IMUNOCITOQUÍMICAS

Antes de realizar as técnicas de Ácido Periódico de Schiff (PAS), impregnação com a prata em região organizadora nucleolar (AgNOR) e Imunocitoquímica, as lâminas previamente coradas por G/HE foram desmontadas em xilol e descoradas em álcool acidulado no momento da reação; procedimento rotineiro em laboratório de citopatologia, devido a localização de áreas alteradas presente somente em determinada lâmina, ou até mesmo escassez de material.

9.1.1. PAS (ARMED FORCES, 1957) (LILLIE, 1965)

Foram submetidas a esta técnica lâminas de 5 cães (20 lâminas de fígado e 20 lâminas de linfonodo).

- Lavar as lâminas em água corrente;
- Passar em água desionizada;
- Incubar por 30min. em ácido periódico a 0,5% em temperatura ambiente;
- Lavar 5 vezes consecutivas em água destilada (em abundância);
- Retirar o excesso de água;
- Colocar as lâminas no Reativo de Schiff por 15min.;
- Repousar as lâminas em cuba contendo água da torneira por 5min.;
- Retirar as lâminas e lavá-las em água corrente por 5min., até a água permanecer limpa, retirando todo excesso do reativo;
- Corar com Hematoxilina de Harris por 10s. e lavar com água corrente por 5min.;
- Passar 2 vezes no álcool absoluto;
- Passar 2 vezes no xilol, e montar a lâmina.

ÁCIDO PERIÓDICO A 0,5% PARA A REAÇÃO DO PAS

- 0,5g de cristais de ác. periódico;
- Água destilada - 100ml;

REATIVO DE SCHIFF PARA REAÇÃO DO PAS

- Aquecer 200ml de água destilada até a ebulição;
- Tirar do fogo;
- Adicionar 1g de fucsina básica granulada, cuidadosamente, evitando reação térmica;
- Filtrar (quando a temperatura estiver em aproximadamente 60°C), agitando sempre, até que fique na temperatura ambiente;
- Adicionar 1g de metabissulfito de sódio;
- Adicionar 20ml de ácido clorídrico (HCl);
- Continuar agitando por mais 3 horas;
- Repousar a solução durante toda noite;
- Adicionar 2g de carvão ativado;
- Agitar por uma hora;
- Filtrar;

*estocar o corante a 4 –8°C.

9.1.2. AgNOR (PLOTON, 1986)

Foram submetidas a esta técnica, lâminas de 5 cães (20 lâminas de fígado e 20 lâminas de linfonodo).

- Escorrer o excesso de água das lâminas;
- Colocar as lâminas num recipiente fechado, ao abrigo da luz, sobre um suporte que as deixe niveladas;
- Cobrir as lâminas com a solução de prata (Ag) e fechar a caixa;
- Incubar por 30min. em temperatura ambiente, independente da época do ano;
- Retirar as lâminas da recipiente fechado e colocá-las em cuba de vidro;
- Lavar com água destilada por 3min. ou 6 vezes;
- Colocar em solução de metabissulfito de sódio a 0,1% por 3min.;
- Lavar com água destilada suficiente para retirar o excesso;
- Colocar em tiosulfato de sódio a 2% por 3min.;
- Lavar em água destilada;
- Passar as lâminas em 3 cubas de álcool absoluto;
- Passar as lâminas em 2 cubas de xilol e montar.

SOLUÇÃO DE PRATA

- 9g de nitrato de prata;
- 9ml de gelatina 2%
- 18ml de água (dissolução da prata na água).

GELATINA A 2%

- 1g de gelatina
- 49,5ml de água destilada
- 0,5ml de ácido fórmico

*solução estocada a 4 – 8° C

9.1.3. IMUNOCITOQUÍMICA (SANTOS, et.al, 1999)

Para a realização desta técnica foram doados pelo Laboratório de Anatomia Patológica Experimental – FCM/UNICAMP, os seguintes anticorpos: 35 β H11 (citoqueratina 8, de baixo peso molecular, característica de epitélio simples de ácinos e ductos glandulares, mas ausente nos epitélios escamosos. Espera-se positividade apenas nos carcinomas não escamosos), e o anticorpo CEA policlonal (antígeno carcinoembrionário, marcador epitelial, usado na caracterização do sítio de origem de uma variedade de carcinomas; são úteis na marcação da borda luminal do canalículo biliar em hepatocarcinomas) (MELLO & ALVES, 1999).

Foram submetidas a esta técnica 10 fígados, sendo 5 examinados com o anticorpo 35 β H11 e os outros com o anticorpo CEA policlonal, num total de 40 lâminas, considerando as 4 variações de técnica de fixação (AL, ALFO, SE, SFX) para cada caso.

Os casos de nº 20, 21, 22, 38 e 39 foram escolhidos para reação com o anticorpo 35 β H11, enquanto os de nº 33, 34, 35, 36 e 37 foram escolhidos para reação com o anticorpo CEA policlonal.

As reações foram confirmadas com a utilização de controle positivo para o anticorpo 35 β H11 e para o anticorpo CEA policlonal, e realizada sem bloqueio de peroxidase endógena.

- Desmontar as lâminas;
- Escorrer o excesso de xilol;
- Hidratar, passando por álcoois em concentrações decrescentes de 96%, 80% e 50% (lavar 2min. por vez);
- Repousar as lâminas em água destilada por 5min.;
- Trocar a água da cuba e lavar por mais 5min.;
- Lavar com o tampão PBS (2 vezes de 5min. cada, no agitador);
- Delinear a área da lâmina que contém o esfregaço com caneta Nankin;
- Colocar as lâminas novamente em cuba contendo PBS;
- Diluir os anticorpos em PBS + soroalbumina-bovina(BSA), sendo 1:50 a diluição do 35 β H11 e 1:1000 a diluição do CEA policlonal;
- Preparar quantidade suficiente para 200 μ l. de anticorpo por lâmina (devido a extensão do esfregaço);
- Pingar 200 μ l. do anticorpo em suas respectivas lâminas, enxugando primeiramente o excesso de PBS com papel de filtro;
- Incubar as lâminas por 30min. a 37°C (estufa) em bandeja úmida e tampada com alumínio para abrigo da luz;
- Incubar a 4°C/geladeira durante toda a noite;
- Lavar as lâminas em água destilada;
- Colocar em tampão PBS e lavar 3 vezes por 5min. cada em agitador;

- Cobrir o esfregaço com 200µl. de “multilink E453”(pool de anticorpos secundários anti-camundongo e anti-coelho, biotinizados) e incubar em estufa a 37°C/1 hora. Retirar o excesso do “multilink E453” com 3 lavagens de 5min. cada com PBS no agitador.
- Pingar 100 µl do Complexo Avidina-biotina-peroxidase(ABC), que deve ser preparado 30min. antes do uso;
- Incubar as lâminas em estufa a 37°C por 40min.;
- Passar as lâminas em água destilada;
- Colocar as lâminas em cuba contendo PBS;
- Transferir as lâminas para uma cuba contendo PBS aquecido (37°C/15min.) + 100µl de diaminobenzidina(DAB) + 100 µl de dimetilsulfóxido(DMSO) + 500 µl de água oxigenada 30%;
- Incubar por 5min. em estufa a 37°C;
- Colocar as lâminas em cuba contendo apenas PBS;
- Retirar as lâminas uma a uma, escorrendo e lavando-as em água corrente;
- Contra-corar as lâminas com hematoxilina de Harrys;
- Lavar em água destilada;
- Desidratar, passando em três cubas, contendo xilol;
- Montar o esfregaço com lâminula, utilizando resina sintética.

9.2. COLORAÇÕES

9.2.1. GIEMSA/HE (G/HE)

- colocar as lâminas na cuba de coloração e preencher com solução de Giemsa concentrada (passagem);
- lavar com água corrente e retirar o excesso;
- cobrir a cuba com hematoxilina de Harris por 8s.;
- lavar com água corrente para retirar o excesso;
- passar nos álcoois I, II e III;
- passar no xilol I, II e III;
- montar as lâminas, colocando resina sintética e lamínula

9.2.2. LEISHMANN (MAIA, 1967)

- cobrir as lâminas, uma à uma, com Leishmann, usando papel de filtro para reter resíduos;
- deixar de 3 a 4 minutos;
- diluir com água (gotas), a solução de cada lâmina;
- deixar por 20 minutos;
- lavar em água corrente;
- deixar secar;
- montar a lâmina seca com resina sintética e lamínula.

9.3. PREPARAÇÃO DE SOLUÇÕES

9.3.1. SOLUÇÃO FIXADORA (SFX) – (1:1, ÁLCOOL 95% E FORMALINA TAMPONADA)

- 50% de álcool 95%;
- 50% de formalina tamponada;
- 0,1% de saponina;

*solução estocada válida por 10 dias a 4 – 8° C.

9.3.2. SAPONINA A 0,1% (KEEBLER, 1993)

- 0,1g de saponina;
- 100ml de água destilada;
- 0,02g de sal sódico do ácido para-hidroxibenzoico

*solução estocada válida por 10 dias a 4 – 8° C

9.3.3. GLUCONATO DE CÁLCIO A 0,3% (KEEBLER, 1993)

- 0,3g de gluconato de cálcio;
- 100ml de água destilada;
- 0,02g de sal sódico do ácido para-hidroxibenzoico

*solução estocada válida por 10 dias a 4 – 8° C

9.3.4. ÁLCOOL 95% (A)

- 95ml de álcool absoluto;
- 5ml de água destilada

9.3.5. ÁLCOOL-FORMOL (AF)

- 50ml de álcool 95%;
- 50ml de formalina tamponada

9.3.6. FORMALINA TAMPONADA

- 100ml de formalina;
- 900ml de H₂O destilada;
- 4g de fosfato de sódio monobásico
- 6,5g de fosfato de sódio dibásico

*solução estocada válida por 20 dias em lugar seco

9.3.7. SOLUÇÃO DE HANKS

- 8g de cloreto de sódio;
- 0,4g de cloreto de potássio;
- 0,06g de fosfato dissódico;
- 0,1g de sulfato de magnésio;

- 0,14g de cloreto de cálcio;
- 0,1g de cloreto de magnésio;
- 1g de dextrose;
- 0,35g de bicarbonato de sódio;
- 0,02g de vermelho de fenol;
- q.s.p. 1l de água deionizada pH: 7,2
- agitar por 1h

*solução estocada a 4 – 8° C por 15 dias