

ALTERNATIVA DE FIXAÇÃO NO PROCESSO CITOLÓGICO

ALTERNATIVE FIXATION IN CYTOLOGICAL PROCESS

Marcio Santos De **Carvalho**^{1*}, Joana Albuquerque Bastos De **Sousa**², Rayssa Ferreira Cavaleiro De **Macedo**², Nayanna Matos De **Sousa**³, Roberta Janaína Soares **Mendes**³, Arthur Antunes Costa **Bezerra**³, Vandilson Pinheiro **Rodrigues**⁴, Erika Martins **Pereira**⁵

¹Mestrando em Odontopediatria pela Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo FORP-USP.

²Mestranda em Odontologia pelo Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade do Maranhão- UFMA

³Graduado em Odontologia pela Universidade Federal do Maranhão- UFMA.

⁴Professor Doutor do Departamento de Morfologia, Curso de Odontologia da Universidade Federal do Maranhão- UFMA.

⁵Professora Doutora do Departamento de Odontologia II, Curso de Odontologia da Universidade Federal do Maranhão- UFMA.

* Rua Monte Alegre, 180. Belize Residence Torre B. Apto 902, Ribeirão Preto- São Paulo – SP.
E-mail: marciosantcar@gmail.com

Submetido em: 17/09/2019; Aceito em: 02/09/2020

RESUMO

Os fixadores eleitos para a rotina citológica são o etanol a 96% e o formol a 10%. Na última década, surgiram fixadores alternativos que apresentam variações na sua composição, além de conter concentrações menores de álcool e a não utilização do formol por este último apresentar propriedades carcinogênicas. Entre estes, encontram-se alguns fixadores alcoólicos, como o RCL2 e alguns alternativos como mel, açúcar mascavo e spray fixador de penteado de cabelo, mas ainda existem poucos trabalhos que comprovem a eficiência destes outros fixadores. O objetivo deste estudo foi avaliar a eficácia de um fixador alternativo ao formol e apresentar condições de aquisição em locais e situações em que o formol não é encontrado. Foram coletadas amostras da mucosa jugal e do dorso da língua dos participantes da pesquisa, essas amostras foram fixadas e divididas em grupos segundo os seguintes fixadores: RCL2, álcool 96%, formol a 10% e spray fixador de cabelo vendido em todas as farmácias com diversas marcas comerciais. Os parâmetros morfológicos como: integridade e arquitetura celular analisadas com o fixador de cabelo apresentou bons resultados quando comparado aos demais fixadores já utilizados na rotina citológica, sendo possível a sua utilização como produto alternativo nas fixações de citologias esfoliativas. Entretanto sugere-se que novos testes de coloração sejam realizados para maior acurácia das análises.

Palavras-chave: Citologia Esfoliativa. Fixadores. Formol.

ABSTRACT



The fixatives that are used for cytological routine are 96% ethanol and 10% formaldehyde. In the last decade, alternative fixatives have emerged, which show variations in their composition, in addition to containing lower concentrations of alcohol and the non-use of formaldehyde since the latter has carcinogenic properties. Among these, are of her alcoholic fixatives, such as RCL2 and some alternatives such as honey, brown sugar and hair styling spray, although only few studies have proven the efficiency of these other fasteners. The objective of this study was to evaluate the effectiveness of an alternative fixative to formaldehyde and to present the conditions of acquisition in places and situations where formaldehyde is not available. Samples of the oral mucosa and dorsum of the tongue of the research participants were collected. These samples were fixed and divided into groups according to the following fixatives: RCL2, 96% alcohol, 10% formaldehyde and hair fixing spray sold in all pharmacies with different trademarks. The morphological parameters such as: integrity and cellular architecture that were analyzed with the hair fixer showed good results when compared to the other fixers that were already being used in cytological routines, making it useful as an alternative product in the fixations of exfoliative cytologia. However, it is suggested that new color tests be performed for greater accuracy of the analyses.

Keywords: Cytology. Fixatives. Formaldehyde.

INTRODUÇÃO

A citologia refere-se às técnicas diagnósticas utilizadas no exame de células oriundas de várias partes do organismo para determinar a causa ou a natureza da doença que as acometem. Durante a citologia esfoliativa são observados características e possíveis alterações celulares como, a descamação das superfícies epiteliais das mucosas em geral (MORAES *et al.*, 2010; LUCENA *et al.*, 2011; REYS *et al.*, 2017).

Na área odontológica, esse recurso semio-técnico pode ser mais explorado, principalmente em virtude desta técnica quando bem utilizada apresentar uma possibilidade de realizar um diagnóstico precoce de lesões bucais. De fato, inúmeras alterações bucais podem ser analisadas através do epitélio da mucosa bucal, sendo o exame citopatológico viável para obtenção do diagnóstico precoce dessas alterações (GRAÇA *et al.*, 2007).

Independente da técnica utilizada para remoção do tecido, o material coletado precisa passar por um bom tratamento de fixação para que se obtenha um resultado microscópico satisfatório. Assim, o tecido deve ser transferido e fixado imediatamente em uma solução fixadora apropriada, sendo que o principal objetivo do fixador é a preservação dos tecidos e um estado semelhante a vida (BHATTACHARYYA *et al.*, 2018).

Entre os fixadores de rotina nos laboratorios de patologia o etanol 96% apresenta vantagens como, a fixação mais rápida, melhor preservação de glicogênio, DNA e RNA, além da abolição de vapores carcinogênicos (SINGH *et al.*, 2015). No entanto, apresenta desvantagens que incluem a variabilidade da coloração do tecido, encolhimento e endurecimento do tecido, depósito de pigmento artefactual em amostras de sangue, lise parcial ou completa de eritrócitos e aumento da inflamabilidade (GRAÇA *et al.*, 2007; SINGH *et al.*, 2015).

Em contrapartida o fixador considerado padrão ouro é o formol 10% que apresenta vantagens como fácil disponibilidade, natureza econômica, além da boa vida útil que permite armazenamento a longo prazo. No entanto, apresenta efeitos negativos, de acordo com a Administração de Segurança e Saúde Ocupacional (OSHA) e a Agência Internacional de Pesquisa sobre Câncer (IARC), que declararam o elevado potencial de perigo da sua utilização (MAYAN *et al.*, 1995; IARC, 2006; KURIACHAN *et al.*, 2017). O IARC classificou o formaldeído como carcinógeno humano que pode potencialmente produzir diferentes neoplasias, como o carcinoma nasofaríngeo, sendo este o principal motivo para sua substituição, além de apresentar baixa penetração e fixação lenta (IARC *et al.*, 2006; CAMPOS *et al.*, 2016; KURIACHAN *et al.*, 2017).

O RCL2 é a marca comercial de um fixador a base de álcool composto basicamente por etanol e ácido acético que surgiu no mercado como uma alternativa ao formaldeído. Apresenta a vantagem de não ser tóxico e ainda é possível manter os protocolos já utilizados nos laboratórios de patologia, o que permite uma fácil adesão nesses locais (MASIR *et al.*, 2012). É considerado um fixador possível para a substituição do formol. No entanto, apresenta problemas como o custo e qualidade da preservação do detalhe do citoplasma e da eosinofilia citoplasmática (MASIR *et al.*, 2012).

Pelos efeitos negativos do considerado padrão ouro da fixação, e pelas desvantagens dos demais fixadores, surgem os fixadores alternativos, muitos ainda estão na fase de pesquisa, são representados pelo mel, xarope de açúcar, açúcar mascavo (GAZZIERO *et al.*, 2010; KURIACHAN *et al.*, 2017). Essas são algumas das alternativas que estão surgindo no âmbito científico, como forma de sanar os riscos provados pelo formaldeído ou com o objetivo de encontrar um material que apresente melhores resultados que o etanol (SINGH *et al.*, 2015; PANDIAR *et al.*, 2017).

Nesse sentido, o principal objetivo deste estudo foi comparar os fixadores de rotina de laboratórios de patologia (formol 10%, etanol 96% e RCL2 com um spray fixador de cabelo com componentes básicos de álcool, amino metipropanol e tenso ativos de acrilatos/octilacrilamida avaliando a citomorfologia e as características tintoriais das células esfoliativas de diferentes áreas da boca para poder sugerir um fixador alternativo nas citologias esfoliativas.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras e Grupos

No presente trabalho foram coletadas amostras da mucosa jugal e dorso língua de adultos na faixa etária acima de 18 anos, de ambos os sexos, sem predileção por raça, matriculados no Curso de Odontologia da UFMA. Todos os pacientes avaliados foram orientados e concordaram com os objetivos da pesquisa que foi conduzida eticamente de acordo com a Declaração de Helsinki (World Medical Association), registrada na Plataforma Brasil e aprovada pelo comitê de ética da Universidade Federal do Maranhão (UFMA) sob o parecer número 1.073.629.

Estas amostras foram divididas por grupo de solução fixadora da seguinte forma: Grupo 01 - 30 amostras, sendo 15 de mucosa jugal e 15 de dorso de lingual, fixadas com o RCL2; Grupo 02 - 30 amostras, sendo 15 de mucosa jugal e 15 de dorso de lingual, fixadas com o spray fixador de cabelo (componentes

básicos de álcool, amino metipropanol e tenso ativos de acrilatos/octilacrilamida ; Grupo 03 - 30 amostras, sendo 15 de mucosa jugal e 15 de dorso de lingual, fixadas com o álcool 96% e Grupo 04 - 30 amostras, sendo 15 de mucosa jugal e 15 de dorso de lingual, fixadas com o formol a 10%.

Coleta e Fixação do material

A coleta foi realizada através de raspagem, da mucosa jugal e do dorso da língua de cada participante, com espátula de metal previamente esterilizada. Em seguida as amostras foram transferidas para lâminas de vidro pela técnica de esfregaço e imediatamente fixadas pelo fixador de escolha.

No processo de fixação das amostras para o grupo RCL2, as lâminas com o material coletado foram borrifadas com a solução a uma distância de 15 cm em posição vertical da lâmina. Para o processo de fixação usando o spray fixador de cabelo com componentes básicos de álcool, amino metipropanol e tenso ativos de acrilatos/octilacrilamida, as lâminas com o material coletado foram borrifadas com a solução a uma distância de 15 cm em posição vertical da lâmina. Em relação ao Álcool 96%, as lâminas com o material coletado foram colocadas em suporte plástico com separação individual entre as lâminas e ficaram submersas na solução até o momento da coloração. O Formol a 10%, as lâminas com o material coletado foram colocadas em suporte plástico com separação individual entre as lâminas e ficaram submersas na solução até o momento da coloração.

A fixação teve tempo mínimo de 30 minutos e máximo de 12 horas e em seguida as preparações citológicas foram coradas pela coloração de Hematoxilina-Eosina (HE) e avaliadas microscopicamente quanto à citomorfologia e às características tintoriais de cada lâmina.

A avaliação da fixação foi efetuada ao microscópio óptico por quatro observadores independentes, treinados previamente, tendo em consideração parâmetros morfológicos e parâmetros relacionados com as características tintoriais das células, seguindo variáveis como, integridade celular (IC), arquitetura celular (AC), morfologia nuclear (MN), morfologia citoplasmática (MC) e reação tintorial (RT). Apresentando escores de 0 sem IC 1 com IC, 0 sem AC e 1 com AC, 0 sem MN e 1 com MN, 0 sem MC e 1 com MC e 0 não corada, 1 pouco corada, 2 bem corado e 3, excesso de coloração para a variável RT.

Na avaliação de cada parâmetro foi utilizada uma escala ordinal comparativa, isto é, a pontuação atribuída a cada um dos parâmetros de uma dada amostra fixada com os diferentes fixadores e comparadas com as características observadas na preparação citológica fixada em etanol a 96% e formol a 10%.

Todos os dados obtidos foram armazenados em tabela construída pela equipe pesquisadora e em seguida submetidos a análise estatística.

Análise Estatística

Os dados foram analisados utilizando os recursos do software SPSS 18.0 (IBM, Chicago, IL, USA). A estatística descritiva foi realizada utilizando medidas de frequência absoluta e porcentagens, médias e desvio-padrão. O Teste Exato de Fisher foi utilizado na análise comparativa da avaliação citológica entre os grupos com uso de fixadores diferentes. O nível de significância adotado foi de ($P < 0,05$).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após a coleta das amostras, as variáveis foram agrupadas nos diferentes grupos da pesquisa. O fixador alternativo testado (spray fixador de cabelo com componentes básicos de álcool, amino metipropanol e tensos ativos de acrilatos/octilacrilamida), foi comparado com os já utilizados nos laboratórios de patologia. Apresentando resultados significativos ao etanol e ao formol em relação arquitetura e morfologia citoplasmática com ($P < 0,05$). Dados positivos foram observados também na integridade celular ao ser comparado ao etanol e a morfologia nuclear ao ser comparado ao formol, em geral apresentou resultados semelhantes em todas as variáveis quando foi comparado ao RCL2, conforme pode ser observado na Tabela 1.

Tabela 1 - Análise comparativa das variáveis da avaliação histológica entre os diferentes métodos de fixação.

Variáveis	Etanol		Formol		RCL2		spray		Valor de P		
	n	%	n	%	n	%	n	%	Etanol versus Spray	Formol versus Spray	RCL2 versus Spray
Integridade celular									<0,001*	0,125	0,071
<i>Sem integridade</i>	20	66,7	10	33,3	11	36,7	4	13,3			
<i>Com Integridade</i>	10	33,3	20	66,7	19	63,3	26	86,7			
Arquitetura celular									<0,001*	<0,001*	0,071
<i>Sem arquitetura</i>	21	70,0	17	43,3	11	36,7	4	13,3			
<i>Com arquitetura</i>	9	30,0	13	56,7	19	63,3	26	86,7			
Morfologia nuclear									0,670	0,020*	1,000
<i>Identificável</i>	2	6,7	13	43,3	4	13,3	4	13,3			
<i>Não identificável</i>	28	93,3	17	56,7	26	86,7	26	86,7			
Morfologia citoplasmática									<0,001*	0,020*	0,071
<i>Identificável</i>	18	60,0	13	43,3	11	36,7	4	13,3			
<i>Não identificável</i>	12	40,0	17	56,7	19	63,3	26	86,7			

Notas: n – frequência absoluta; % - frequência relativa; *Diferenças estatisticamente significantes através do teste Exato de Fisher ($P < 0,05$).

Fonte: os autores

Em relação aos dados tintoriais na pesquisa foi observado que o spray de cabelo não apresentou resultados satisfatórios quando foi comparado aos demais fixadores da pesquisa.

Tabela 2 - Análise comparativa reação tintorial entre os diferentes métodos de fixação.

Variáveis	Etanol		Formol		RCL2		spray		Valor de P		
	n	%	N	%	n	%	n	%	Etanol versus Spray	Formol versus Spray	RCL2 versus Spray
Reação tintorial									0,001*	<0,001*	<0,001*
<i>Não corada</i>	1	3,3	2	6,7	2	6,7	2	6,7			
<i>Pouco corada</i>	20	66,7	5	16,7	16	53,3	18	60,0			
<i>Bem corada</i>	9	30,0	16	53,3	12	40,0	2	6,7			
<i>Excesso de corante</i>	0	0	7	23,3	0	0	8	26,6			

Notas: n – frequência absoluta; % - frequência relativa; *Diferenças estatisticamente significantes através do teste Exato de Fisher ($P < 0,05$).

Fonte: os autores

Existem alguns efeitos tóxicos produzidos pelos fixadores considerados padrão ouro, causam dermatite e vermelhidão nos olhos, ao serem inalados em níveis baixos, irrita o nariz e nos níveis mais elevados leva a bronquite e sintomas de asma. Além disso, pode levar a casos de acidose metabólica, taquipnéia, icterícia respectivamente (KURIACHAN *et al.*, 2017). Dessa forma, a toxicidade desses fixadores leva muitos pesquisadores a procurarem fixadores naturais ou fixadores que não apresentem uma toxicidade tão elevada (KURIACHAN *et al.*, 2017)

Substitutos naturais pesquisados como, açúcar, açúcar mascavo, mel já estão apresentando resultados satisfatórios (BHATTACHARYYA *et al.*, 2018). São conhecidos no mercado como fixadores alternativos que não oferecem perigo a saúde, são compatíveis com processamento de rotina, coloração semelhante ou próxima do padrão ouro e não requerem equipamentos especiais (BHATTACHARYYA *et al.*, 2018). A escolha do fixador dessa pesquisa teve como princípio redução de custo, facilidade na obtenção do produto, não apresentar vapores carcinógenos e ainda possibilitam um processo de fixação nas áreas distantes dos grandes centros urbanos.

Embora não apresentando diferenças estaticamente significativas da integridade celular entre o spray fixador de cabelo comparado com o formol, o spray promoveu resultados melhores em várias variáveis ao ser comparado com o etanol. Isso promove uma possibilidade de adesão desse produto.

O spray ao ser comparado com o RCL2 apresentou resultados semelhantes em todas as variáveis testadas pelos pesquisadores, o que faz com que esse fixador apresente uma real potencialidade de uso. O RCL2 é um aldeído que nos últimos anos vem sendo testado e apresenta uma forte adesão em muitos laboratórios de patologia, por não ser tóxico como o formol, apresenta resultados benéficos para saúde de quem o manipula. O spray de cabelo teria como vantagem sobre o RCL2 menos custo (MASIR *et al.*, 2012).

A qualidade da preservação do citoplasma não é tão relevante como a do núcleo para discriminar uma lesão maligna de uma lesão benigna, a importância da manutenção dessa preservação é voltada quando o objetivo está relacionado a imunocitoquímica (SILVA *et al.*, 2010). Para obtenção do objetivo desse trabalho, as propriedades apresentadas pelo spray fixador em relação a morfologia nuclear e citoplasmática foram semelhantes as observadas ao formol. O que se constitui boas propriedades para escolha do fixador testado.

CONCLUSÃO

Frente aos resultados analisados pode-se concluir que spray fixador de cabelo com componentes básicos de álcool, amino metipropanol e tensos ativos de acrilatos/octilacrilamida, apresentou resultados semelhantes em relação ao Etanol nos parâmetros integridade celular, arquitetura celular e morfologia. Em relação ao formol, o spray apresentou semelhança com arquitetura, morfologia nuclear e citoplasmática. O spray apresentou resultados mais próximos ao RCL2, podendo neste caso sugerir uma substituição deste pelo spray de cabelo a esse produto.

Em relação a qualidade tintorial analisada o spray apresentou resultados insatisfatórios quando comparado aos demais fixadores utilizados nas pesquisas. Sugerindo uma necessidade de novas pesquisas voltadas para

alterações na metodologia de tempos de corantes para se conseguir um resultado mais adequado.

REFERÊNCIAS

BHATTACHARYYA, A. *et al.* Probing natural substitute for formalin: Comparing honey, sugar, and jaggery syrup as fixatives. **National Journal of Maxillofacial Surgery**, v. 9, n. 1, p. 14-21, 2018.

CAMPOS, L. S. *et al.* Avaliação de diferentes fixadores na preservação das características histológicas de pele de orelha de cães. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 68, n. 5, p. 1212-1218, 2016.

GRAÇA, F. R. Citologia para clínicos: como utilizar esta ferramenta diagnóstica. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 35, n. 2, p. 267-269, 2007.

GAZZIERO, A. *et al.* Morphological quality and nucleic acid preservation in cytopathology. **Journal Clinical Pathology**, v. 62, p. 429-434, 2009.

IARC (**International Agency for Research on Cancer**). IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans: Formaldehyde, 2-butoxyethanol, and 1-tert-butoxypropan-2-ol. Lyon, France, v. 88, n. 2, p. 1-445, 2006.

JAMUR, M. C.; OLIVER, C. Cell fixatives for immunostaining. **Methods in Molecular Biology**, v. 558, p. 55-61, 2010.

JAMAL, A. A. *et al.* The Innovative Safe Fixative for Histology, Histopathology, and Immunohistochemistry Techniques: "Pilot Study Using Shellac Alcoholic Solution Fixative. **Microscopy research and technique**. v. 77, n. 5, p. 385-393, 2014.

KURIACHAN, D. *et al.* Analysis of Fixative Properties of Three Eco-friendly Substances: A Comparison with Formalin. **Oral and Maxillofacial Pathology Journal**; v. 8, n. 2, p. 79-84, 2017.

LUCENA, S. E. E. *et al.* Método de Coleta e a Qualidade do Esfregaço de Mucosa Oral. **Revista de Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial**, v. 11, n. 2, p. 55-62, 2011.

MAYAN, O. *et al.* Formaldeído: contribuição para o estudo de alguns dos seus efeitos numa população de técnicos de laboratório. **Revista Trabalho, Educação e Saúde**, v.1, n. 1, p. 9-51, 1995.

MORAES, M. *et al.* Virtual Database of Exfoliative Cytology in Mouth Injuries. **Oral Science**, v. 2, n. 1, p. 17-22, 2010.

MASIR, N. *et al.* RCL2, a potential formalin substitute for tissue fixation in routine pathological specimens. **Histopathology**, v. 60, n. 5, p. 804-815, 2012.

PANDIAR, D. *et al.* Use of jaggery and honey as adjunctive cytological fixatives to ethanol for oral smears. **Jornal Oral Maxillofac Pathol.** v. 21, n. 2, p. 317, 2017.

REYS, I. G. *et al.* Diagnostic cytopathological analysis performed in patients attended by the stomatology clinic of the Universidade Federal Fluminense. Nova Friburgo/ RJ **Revista Odontológica de Araçatuba**, v. 38, n. 2, p. 46-50, 2017.

SILVA, D. *et al.* Finefix: fixadores alcoólicos alternativo para a prática citológica? **RECIPP - Repositório Científico do Instituto Politécnico do Porto. ICH Gaia-Porto**, Portugal, 2010.

SINGH, A. *et al.* Comparison of honey with ethanol as an oral cytological fixative: A pilot study. **Journal of Cytology**, v. 32, n. 2, p. 113-117, 2015.