

Capítulo 4

Técnicas citológicas

Luzia Fátima Gonçalves Caputo

Ester Maria Mota

Lycia de Brito Gitirana

A técnica citológica também faz parte da histotecnologia e possui grande importância no diagnóstico de algumas doenças que acometem os seres humanos e os animais. Essa é uma ferramenta fundamental no diagnóstico de tumores, função hormonal e infecções parasitárias. O exame colpocitológico, conhecido como Papanicolaou, é utilizado para detectar, nas mulheres, tumores de colo de útero. Seu idealizador, dr. George N. Papanicolaou, estabeleceu em 1942 os conceitos básicos de interpretação citológica e criou um método de coloração citológica que é utilizado, universalmente, até hoje.

A citopatologia analisa as células individualizadas, descamadas, expelidas ou retiradas da superfície de órgãos de diferentes partes do organismo. Como os materiais biológicos apresentam diferentes características, devido às distintas formas de organização e composição, a coleta do material destinado à análise citológica constitui uma etapa fundamental nesse processo. Há métodos específicos para coleta de materiais distintos. Além disso, nessa fase, são definidos os tipos de procedimentos mais adequados à análise dos preparados citológicos.

Algumas etapas da técnica citológica são semelhantes às da técnica histológica, mas com peculiaridades próprias, podendo também haver consideráveis interferências na qualidade final do diagnóstico, como coleta do material, fixação, processamento, coloração e leitura das lâminas citológicas.

1. Coleta de material

A origem das amostras dos preparados histológicos vem de fragmentos de tecidos oriundos de necrópsias e biópsias. Nos preparados citológicos, essa origem é um pouco mais diversificada, proveniente de líquidos orgânicos (urina, líquido, líquido ascítico, pericárdico, sinovial), punções aspirativas por agulha fina (pulmão, mama, tireoide, linfonodos, dentre outros), secreções (escarro, abscesso e fístula), lavados cavitários (brônquicos e broncoalveolares, vesiculares) e raspados (cervicovaginal, ocular).

Segundo suas características, as amostras são divididas em três grupos, e chegam ao laboratório para análise da seguinte forma:

Classificação da amostra	Método de coleta	Origem da amostra
Distensão celular (esfregaço)	Raspagem <i>swab</i> (Figura 11)	Colpocitologia
		Olhos
		Lavado brônquico
	<i>Imprint</i> ou decalque	Lesões cutâneas
		Biópsias
		Peças cirúrgicas
	Punção aspirativa	Sangue
		Lavado brônquico
		Líquor espinhal

Amostras pastosas	Expectoração	Escarro (Figura 6)	
	Punção ou drenagem	Abscessos	
		Massas necróticas	
Amostras líquidas	Espontânea ou por cateter	Urina	
	Escovação	Líquido sinovial	
	Punção	Escovação ou lavado	Líquido peritoneal ou ascítico
			Líquido pleural
			Líquido peritoneal ou ascítico
			Líquido pericárdico
			Lavado brônquico alveolar
			Lavado vesical
			Líquido estomacal
			Líquido sinovial

A natureza da amostra (líquida, pastosa ou sólida) irá definir a forma de coleta e preparo do material segundo as etapas da técnica citológica escolhida.

Distensão celular (esfregaço), (Figuras 1, 3, 8, 9, 10 e 11): é feita ao se distender sobre uma lâmina de vidro uma leve camada de fluidos corpóreos para o exame ao microscópio.

Lavado: o material é colhido com o auxílio de um cateter de instilação para lavagem, contendo solução salina, de uma cavidade do organismo. Exemplos: lavado broncoalveolar (LBA), brônquico (LB), peritoneal, entre outros. Geralmente os lavados se apresentam pouco celulares.

Escovados (Figuras 1, 2, 3 e 4): o material é colhido por esfoliação da superfície de mucosas, utilizando-se uma escova. O material obtido pode ser distendido sobre a superfície de uma lâmina de vidro, ou cortando-se a cabeça da escova e imergindo-a em solução salina ou em líquido conservante apropriado, procedendo-se em seguida à citologia de líquidos.

Impressões teciduais (“*imprint*”) (Figura 5): denomina-se impressões teciduais o procedimento em que se coloca a área lesionada do tecido em contato com a superfície de uma lâmina de vidro lisa, de forma semelhante ao procedimento para se obter impressão digital. As células superficiais da lesão passam para a superfície da lâmina de vidro e podem ser observadas ao microscópio. Esse procedimento é também denominado citologia de decalque.

Figura 1. Coletores para citologia Figura 2. Escovado cervicovaginal. esfoliativa.

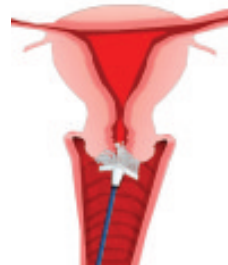


Figura 3. Distensão citológica pela espátula de Ayre.



Figura 4. Fixação de escovado citológico.



Figura 5. Impressão tecidual em lâminas (*imprint*).

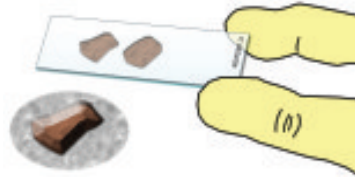


Figura 6. Escarro espontâneo ou induzido para coleta de material.



2. Fixação das amostras

O principal objetivo da fixação é preservar a morfologia celular e a composição química das células após a sua retirada do organismo.

Tipos de fixação

A. Fixação seca

Esse tipo de fixação é utilizado quando se realiza a coloração de May-Grünwald-Giemsa, pois o metanol presente na solução corante age como fixador. É o tipo de fixação utilizada para distensão de células sanguíneas, *imprint* de baço, gânglios linfáticos, entre outros.

B. Fixação por revestimento

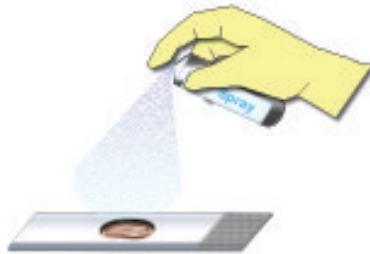
É usada na obtenção dos esfregaços citológicos. Os fixadores são constituídos de polietilenoglicol (Carbowax) e álcool, comercialmente vendidos na forma líquida ou em *spray*. As amostras são fixadas pelo gotejamento do fixador ou pela pulverização do aerossol das embalagens em *spray* (Figura 7), sendo secas à temperatura ambiente, pois o álcool fixa e evapora, enquanto o polietilenoglicol forma uma película que protege e preserva a amostra. Existem vários protocolos para este tipo de fixador; citaremos um dentre os vários que existem na literatura.

Carbowax em etanol 95%

Etanol 95%.....	95 mL
Polietilenoglicol 4000.....	5g

Lembrar: antes de corar as amostras fixadas em Carbowax, banhá-las em etanol 95% por 10 minutos para remover a película de polietilenoglicol.

Figura 7. Fixação por revestimento.



C. Fixação por líquidos fixadores

○ fixador citológico universal é o etanol 95%, um agente coagulante, que penetra na célula desidratando-a e intensificando a diferenciação nuclear e citoplasmática após a coloração.

Outros fixadores, como o Carnoy, metanol, álcool isopropílico 80%, etanol 50%, líquido de Bouin, dentre outros, também podem ser utilizados como fixadores celulares, variando a escolha e o tempo de fixação de acordo com natureza da amostra.

3. Processamento das amostras

○ acondicionamento do material é essencial para evitar a perda de conteúdo. A identificação da amostra e o preenchimento correto da ficha de solicitação médica (contendo o nome do paciente, idade, data da coleta, natureza da amostra e sua localização, tipo de exame requerido, dados clíni-

cos, nome do médico requisitante e telefone) são informações relevantes para evitar o extravio do material.

O processamento da amostra requer procedimentos específicos de acordo com a natureza do material a ser analisado. Descreveremos aqui alguns desses procedimentos.

A. Distensão celular (Figuras 1, 3, 8, 9, 10 e 11): geralmente, a distensão chega ao laboratório pronta, tendo sido manipulada pelo clínico ou cirurgião e fixada em etanol 95%. Na maioria das vezes, quando a distensão chega seca, o material é destinado à coloração pelo método de May-Grünwald-Giemsa e, dependendo da amostra, pode-se ou não fixar pelo metanol durante cinco minutos. Deve-se preparar esse tipo de amostra de modo a formar uma fina camada de células, permitindo assim melhor diferenciação celular. Distensões espessas produzem artefatos e hipercoram as células dificultando sua análise.

Figura 8. Distensão celular.

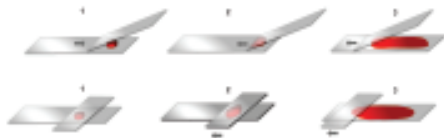


Figura 9. Distensão após biópsia por agulha.



Figura 10. Formas de distensão celular.

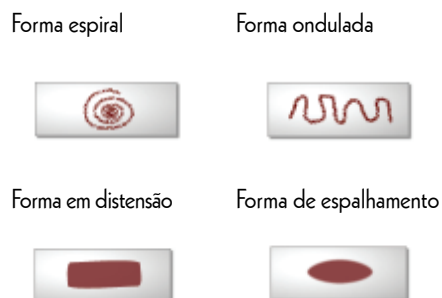
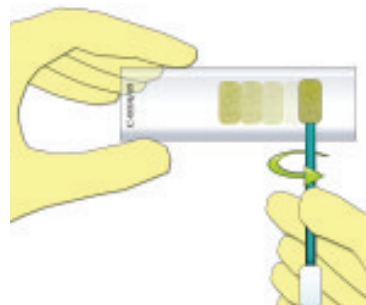


Figura 11. Distensão celular por swab.



B. Amostras pastosas: devem ser analisadas antes de processadas para a análise. Coloca-se o material em uma placa de Petri com fundo escuro e selecionam-se as regiões mais densas, escuras e/ou sanguinolentas. Essas áreas são colocadas sobre lâminas de vidro para distender, obtendo-se uma camada de células (distensão celular) e fixando o material imediatamente em etanol 95% (Figura 8).

C. Amostras líquidas: são as amostras que possuem maior diversidade de procedimentos, dependendo do tipo de amostra. Citaremos aqui os mais utilizados:

Líquidos, como urina, lavados, derrames de cavidades e líquido sinovial podem ser pré-fixados em etanol 50%, ou enviados imediatamente ao laboratório após a coleta, podendo ser também conservados a 4°C até o envio. O uso de anticoagulantes deve ser avaliado de acordo com o tipo de material coletado. As amostras líquidas subdividem-se em dois grupos:

- Transudatos: são pouco celulares e de cor clara.
- Exsudatos: são ricos celularmente, escuros, de natureza neoplásica ou inflamatória.

Estas amostras podem ser processadas de acordo com sua riqueza celular, por meio da centrifugação (Figura 12) ou citocentrifugação (Figuras 13 e 14).

Centrifugação

É preferida quando o material se apresenta hipercelular.

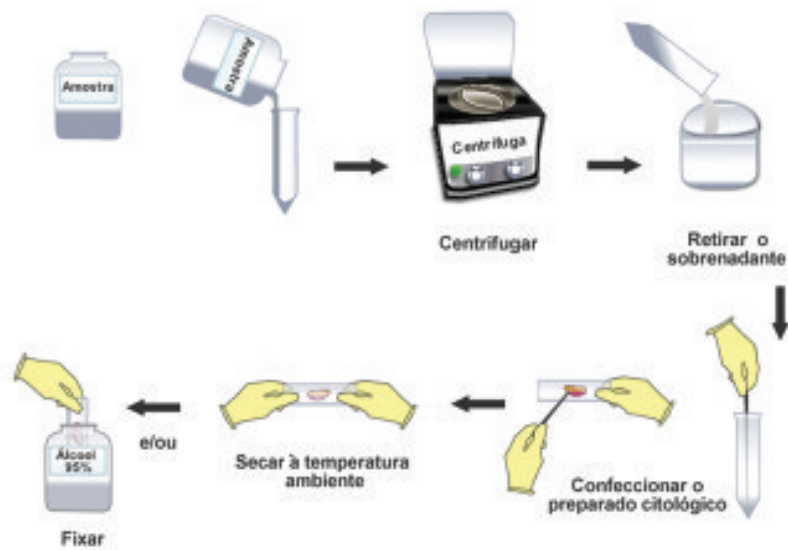
Procedimento:

- 1- Colocar o líquido em tubos “Falcon” com tampa.
- 2- Centrifugar a 1.500 rpm por 10 minutos.
- 3- Descartar o sobrenadante.
- 4- Aspirar o sedimento com pipeta Pasteur.
- 5- Colocar o sedimento em lâminas limpas e desengorduradas e proceder à distensão celular.

6- Deixar secar ao ar e/ou fixar em álcool 95% imediatamente; a secagem ao ar é necessária se o método de coloração for o May-Grünwald-Giemsa.

Observação: As amostras poderão vir em tubos com anticoagulante ou não.

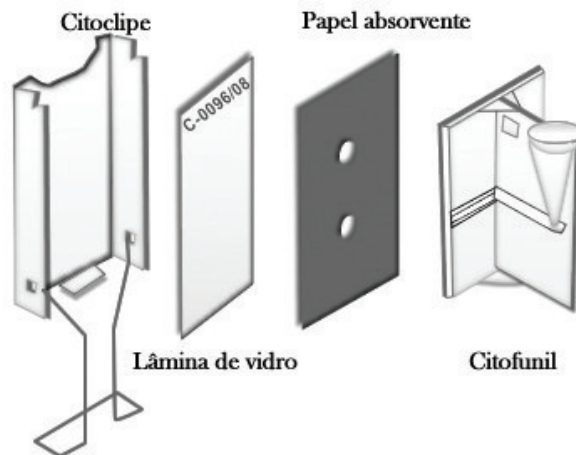
Figura 12. Procedimento para centrifugação



Citocentrifugação

Possibilita a análise citológica de líquidos com baixíssima densidade celular (hipocelulares). Esse método é necessário para concentrar as células em suspensão, que com a centrifugação se depositam diretamente sobre uma região das lâminas de vidro, perfazendo um diâmetro de 5 mm, enquanto o meio de suspensão é absorvido por papel absorvente próprio.

Figura 13. Utensílios para citocentrifugação.



Vantagens:

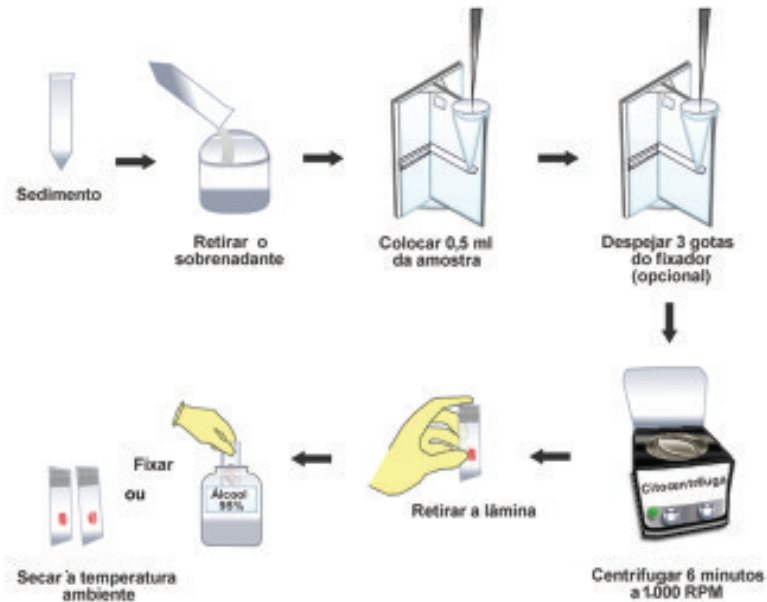
Requer pouco volume (0,1 a 0,5 mL por lâmina).

Alta confiabilidade do resultado: as células da amostra serão depositadas numa região pequena da lâmina medindo 5 mm de diâmetro.

Procedimento:

- 1- Pipetar 0,5 mL da amostra no citofunil, previamente acoplado ao citoclipe, à lâmina e ao papel absorvente.
- 2- Centrifugar a 1.200 rpm por 10 minutos.
- 3- Retirar o conjunto e desacoplar a lâmina.
- 4- Deixar secar ao ar e/ou fixar em álcool 95% imediatamente. Se o método de coloração for o May-Grünwald-Giemsa, deixar secar ao ar.

Figura 14. Procedimento para citocentrifugação.



D. Bloco celular ou cell block (Figura 14)

É um procedimento que reúne as técnicas citopatológicas e histopatológicas e é utilizado quando se deseja obter uma alta concentração celular, complementando o diagnóstico, com a vantagem de aproveitar todo o sedimento da amostra, além de permitir a armazenagem desse sedimento para futuras análises, se necessário. Essa técnica é empregada em citodiagnóstico de amostra líquida ou pastosa, quando há dificuldade para fechar diagnóstico de tumores pouco diferenciados.

Fixação – vários são os fixadores utilizados para o *cell-block*, alguns inclusive adicionam corantes para facilitar a visualização da amostra durante e após o processamento. Destacamos alguns fixadores a seguir:

• **Formalina 10%:**

Formaldeído comercial.....	100 mL
Água destilada	900mL

• **Formol-Salina:**

Formaldeído comercial.....	100 mL
Água destilada.....	900 mL
Cloreto de sódio (NaCl).....	9 g

• **AFA ou FAA – álcool - formalina - ácido acético (muito utilizado para *cell-block*):**

Etanol (95 - 100%).....	85 mL
Formaldeído comercial	10 mL
Ácido acético glacial.....	5 mL

• **Carnoy:**

Álcool etílico absoluto.....	60 mL
Clorofórmio.....	30 mL
Ácido acético glacial.....	10 mL

• **Líquido de Bouin:**

Solução saturada de ácido pícrico (aquosa).....	75 mL
Formaldeído comercial.....	25 mL
Ácido acético glacial.....	5 mL

Tempo de fixação: 4-24 horas. (para linfoma deve-se deixar de 48-72 horas).

Tratamento prévio dos cortes para a remoção do ácido pícrico:

- 1- Desparafinizar e hidratar até o álcool 95%.
- 2- Colocar as lâminas em uma solução de álcool 70% saturado com carbonato de lítio durante 5 minutos.
- 3- Lavar em água corrente durante 3 minutos.
- 4- Lavar em água destilada durante 5 minutos.

E. B-5 ou formalina tamponada sublimada:

Muito utilizada para amostras contendo sangue.

Solução estoque:

Cloreto de mercúrio ($HgCl_2$).....	12 g
Acetato de sódio (CH_3COONa)	2,5 g
Água destilada.....	200 mL

Solução de uso (preparar somente antes do uso):

Solução estoque de B-5.....	20 mL
Formaldeído comercial.....	2 mL

Tratamento prévio dos cortes para remoção de pigmento de mercúrio:

- 1- Desparafinizar e hidratar os cortes
- 2- Imergir durante 5 minutos na solução de lugol sob agitação.
- 3- Lavar em água.
- 4- Colocar as lâminas em tiosulfato de sódio 5% por 1 minuto ou até a completa remoção da cor amarela do lodo.
- 5- Lavar em água corrente durante 5 minutos.

Solução de lugol:

Iodo (I ₂).....	2,5 g
Álcool 70%.....	500 mL

Procedimento para *cell-block*:

- 1- Centrifugar as amostras por 10 minutos a 1.000 rpm.
- 2- Desprezar o sobrenadante, retirar o sedimento e fixar as amostras de 5 minutos a 1 hora – o tempo de fixação pode variar de acordo com o fixador e a quantidade da amostra. Proceder à fixação colocando o sedimento no líquido fixador que se encontra em frasco apropriado para sedimentação.
- 3- Centrifugar novamente por 2 minutos na mesma rotação, retirar o fixador e manter o sedimento formando um *pellet*.
- 4- Iniciar a desidratação com etanol 80% e seguir com um banho de etanol 95% e dois banhos de etanol 100%. O tempo de desidratação também varia de acordo com a quantidade da amostra, podendo variar de 5 minutos até 1 hora em cada banho. Centrifugar durante poucos minutos em cada banho.
Obs. Esta etapa e as seguintes podem ser realizadas no processador automático de tecidos, desde que o *pellet* da amostra se encontre envolto em papel de filtro, evitando a perda do material durante o processamento.
- 5- Clarificar em dois banhos de xilol, variando de 5 a 15 minutos. Centrifugar ao final por poucos minutos para formar o *pellet*.
Obs. Para retirar o xilol, deve-se descartar o sobrenadante e secar o *pellet* com papel absorvente.
- 6- Fazer dois banhos, de 15 minutos a 1 hora, em parafina

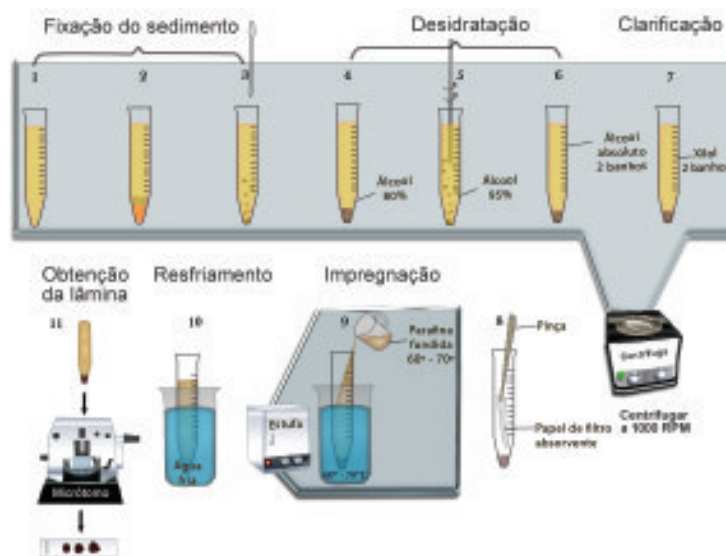
fundida na estufa; o tempo varia de acordo com o tamanho do *pellet* formado.

7- Esfriar e retirar o *pellet* impregnado pela parafina.

8- Montar um bloco de parafina.

9- Seccionar o bloco em micrótomo e corar pelo método desejado.

Figura 15. Processamento manual para *cell-block* (esquema adaptado do original do Dr. N. Fukushima, Doai Memorial Hospital, Tóquio).



4. Colorações citológicas

A qualidade da coloração citológica está diretamente relacionada às características tintoriais dos corantes, ao processamento da amostra (espessura dos esfregaços) e à fixação. Esses cuidados devem ser observados para se evitar artefatos e dificuldade de análise do material.

Muitas colorações histológicas podem ser empregadas na citologia, algumas das quais com pequenas modificações. Os métodos mais empregados

são o mucicarmin de Mayer, May-Gruenwald-Giemsa, hematoxilina e eosina, ácido periódico Schiff (PAS), Grocott, Shorr, entre outros. Porém, o método de Papanicolaou (Pap) é o mais difundido e empregado, pela grande demanda diagnóstica, e por ser a coloração comumente aplicada às amostras colpocitológicas para diagnóstico de câncer ginecológico.

O método de Papanicolaou utiliza um conjunto de corantes e tem como objetivo a evidenciação das variações na morfologia e dos graus de maturidade e de atividade metabólica celular. Esse método se baseia nas ações de um corante básico (com afinidade pelo núcleo das células: a hematoxilina), um corante ácido (que se combina com o citoplasma das células queratinizadas: orange G) e um corante policromático (que oferece tonalidades de cores diferentes no citoplasma das células: EA-65).

Este método abrange cinco etapas:

- Hidratação: esta etapa requer a reposição gradual da água das células por meio de banhos alcoólicos de concentrações decrescentes até a água destilada.
- Coloração nuclear: as células hidratadas podem agora receber um corante aquoso para corar os núcleos (hematoxilina de Harris).
- Desidratação: para receber corantes alcoólicos citoplasmáticos, devemos agora retirar a água das células com banhos alcoólicos de concentrações crescentes.
- Coloração citoplasmática: nesta etapa, o citoplasma das células é corado pelos corantes orange G e EA-65, de modo a diferenciar com diversas tonalidades o citoplasma das células de acordo com a sua maturidade e metabolismo.
- Desidratação, clarificação e selagem: a água agora deve ser retirada com concentrações alcoólicas crescentes, clarificadas e seladas com meios permanentes hidrofóbicos.

Descreveremos a seguir os métodos mais empregados. Outros métodos estão descritos na literatura recomendada.

A. Método de Papanicolaou (Papanicolaou, 1942)

Soluções:

- Hematoxilina de Harris (Harris, 1900)

Hematoxilina.....	5,0 g
Etanol 100%.....	50,0 mL
Alúmen de potássio [KAl(SO ₄) ₂].....	100 g
Água destilada.....	1.000 mL
Óxido de mercúrio (HgO – pó vermelho).....	2,5 g

Dissolva o alúmen em água destilada com o auxílio de uma placa aquecedora e um agitador magnético em um recipiente com capacidade para 2.000 mL, para evitar que derrame quando a solução entrar em ebulição. Misture a hematoxilina no álcool à temperatura ambiente em outro recipiente separado. Lentamente, combine as duas soluções aquecendo em placa aquecedora, até entrar em ebulição. Retire da fonte de calor e acrescente lentamente o óxido mercúrio, com cuidado, pois o óxido reage com a solução fazendo-a entrar rapidamente em ebulição, podendo sair, inclusive, do recipiente. Retorne a solução para a fonte de calor até que tome a tonalidade púrpuro-escura. Esfrie, e a solução estará pronta.

Para uso:

Acrescente 20 mL de ácido acético glacial para intensificar a coloração dos núcleos.

Filtre sempre antes de cada uso.

- Ácido-álcool a 1%:

Ácido clorídrico (HCl).....1 mL
Etanol 70%..... 99 mL

- Água amoniacal:

Hidróxido de amônio (NH OH).....2 a 4 mL
Água destilada.....800 a 1.000 mL

- Corante orange G:

Solução estoque de orange G 10%:

Orange G.....10 g
Água destilada.....100 mL

Solução de uso do orange G :

Solução estoque.....20 mL
Ácido fosfotúngstico [$H_3P(W_3O_{10})_4$].....0,15 g
Etanol 95%.....980 mL

- Corante EA-65:

Soluções estoque eosina Y a 20%:

Eosina Y.....20 g
Água destilada.....100 mL

Solução estoque *light-green* SF a 3%:

Light-green SF.....3 g
Água destilada.....100 mL

Solução de uso do EA-65:

Solução estoque de eosina Y.....	20 mL
Solução estoque de <i>light-green</i> SF.....	10 mL
Ácido fosfotúngstico [$H_3P(W_3O_{10})_4$].....	2 g
Etanol 95%.....	700 mL
Metanol absoluto.....	250 mL
Ácido acético glacial.....	20 mL

Método

1- Etanol 80%.....	5-10 mergulhos
2- Etanol 70%.....	5-10 mergulhos
3- Etanol 50%.....	5-10 mergulhos
4- Água destilada I.....	5-10 mergulhos
5- Água destilada II.....	5-10 mergulhos
6- Hematoxilina de Harris	1-5 minutos
7- Água destilada.....	5-10 mergulhos
8- Diferenciar em álcool-ácido.....	3 mergulhos
9- Água destilada.....	5-10 mergulhos
10- Banho de água amoniacal.....	5 mergulhos
11- Água destilada.....	5-10 mergulhos
12- Etanol 50%.....	5-10 mergulhos
13- Etanol 70%	5-10 mergulhos
14- Etanol 95%.....	5 a 10 mergulhos
15- <i>Orange G</i> , solução de trabalho.....	1 minuto
16- Etanol 95%.....	5-10 mergulhos

- 17- Etanol 95%.....5-10 mergulhos
- 18- Etanol 95%.....5-10 mergulhos
- 19- Eosina-EA65, solução de trabalho.....5 minutos
- 20- Etanol 95%.....5-10 mergulhos
- 21- Etanol 95%.....5-10 mergulhos
- 22- Etanol 95%.....5-10 mergulhos
- 23- Etanol 100% I5-10 mergulhos
- 24- Etanol 100% II5-10 mergulhos
- 25- Etanol 100% III5-10 mergulhos
- 26- Xilol I.....5-10 mergulhos
- 27- Xilol II.....5-10 mergulhos
- 28- Xilol III.....5-10 mergulhos
- 29- Selar em meio hidrófobo.

Resultado:

- Células escamosas maduras.....róseo-avermelhada
- Núcleo.....vermelho-arroxeadado
- Células metabolicamente ativas..... verde-azulado
- Citoplasma queratinizado..... laranja ou amarelo

B. Método de May-Grünwald-Giemsa

Esse método de coloração é aplicado em distensões para a análise de elementos figurados do sangue periférico, medula óssea, ou elementos celulares colhidos por punção, esfoliação, *imprint* de tecidos ou concentrado de líquidos celulares, por meio de dois corantes.

Soluções:

- Solução estoque de May-Grünwald (vendida comercialmente – artigo Merck 1524).

- Solução estoque de Giemsa (vendida comercialmente – artigo Merck 9204).

- Tampão Sorensen pH 6,8.

- Solução A - fosfato de sódio monobásico (NaH_2PO_4) 0,2 M:

NaH_2PO_427,8 g

Água destilada.....1.000 mL

- Solução B - fosfato de sódio dibásico ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) 0,2 M:

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$28,39 g

Água destilada1.000 mL

- Solução de uso:

Solução A	Solução B	pH final 6,8
51 mL	49 mL	100 mL

- Solução de uso de May-Grünwald:

Solução estoque de May-Grünwald.....25 mL

Tampão Sorensen pH 6,8.....190 mL

• Solução de uso de Giemsa:

Solução estoque de Giemsa.....25 mL

Tampão Sorensen pH 6,8.....190 mL

Nota: As concentrações finais das soluções de uso de May-Grünwald e Giemsa podem ser ajustadas se necessário. Elas sempre devem ser preparadas antes de usar e desprezadas após o uso.

Método:

- 1- Fixar em metanol por 15 minutos.
- 2- Corar pela solução de uso de May-Grünwald por 5 minutos.
- 3- Escorrer o corante da lâmina.
- 4- Corar pela solução de trabalho de Giemsa por 10 minutos.
- 5- Lavar em tampão Sorensen pH 6,8.
- 6- Deixar secar à temperatura ambiente.
- 7- Clarificar com xilol.
- 8- Selar com meio hidrofóbico.

Resultados:

Núcleos dos leucócitos.....azul-pálido
Citoplasma.....azul muito claro ou incolor
Granulações neutrófilas.....vermelho-claro
Granulações basófilas.....azul-escuro
Eosinófilos e eritrócitos.....vermelho-alaranjado.

Método de Shorr

Este método de coloração possui resultados semelhantes ao método de Papanicolaou, sendo aplicado como seu substituto em vários laboratórios de citopatologia.

Soluções:

- Solução corante de Shorr

Biebrich <i>Scarlet</i>	5,0 g
Orange G ou II.....	2,5 g
<i>Fast Green</i>	1,0 g
Ácido fosfomolibdico $H_3P(Mo_3O_{10})_4$	5,0 g
Ácido fosfotúngstico $[H_3P(W_3O_{10})_4]$	5,0 g
Ácido Acético Glacial.....	10 mL
Etanol 50 %.....	1.000 mL

Método:

1- Etanol 80%.....	5-10 mergulhos
2- Etanol 70%.....	5-10 mergulhos
3- Etanol 50%.....	5-10 mergulhos
4- Água destilada.....	5-10 mergulhos
5- Água destilada.....	5-10 mergulhos
6- Hematoxilina de Harris.....	1-5 minutos
7- Água destilada.....	5-10 mergulhos
8- Diferenciar em álcool-ácido.....	3 mergulhos.
9- Água destilada.....	5-10 mergulhos
10- Banho de água amoniacal.....	5 mergulhos

11- Água destilada.....	5-10 mergulhos
12- Etanol 50%.....	5-10 mergulhos
13- Etanol 60%.....	5-10 mergulhos
14- Corante de Shorr.....	6 minutos
15- Etanol 95% I.....	5-10 mergulhos
16- Etanol 95% II.....	5-10 mergulhos
17- Etanol 95% III.....	5-10 mergulhos
18- Etanol 100%.....	5-10 mergulhos
19- Etanol 100%.....	5-10 mergulhos
20- Etanol 100%.....	5-10 mergulhos
21- Xilol I.....	5-10 mergulhos
22- Xilol II.....	5-10 mergulhos
23- Xilol III.....	5-10 mergulhos

Resultados

Células eosinofílicas.....	citoplasma vermelho / laranja
Células basofílicas.....	citoplasma azul / esverdeado
Núcleos.....	azul / violeta escuro / marrom

Referências Bibliográficas

- CAPUTO, L. F. G. *Manual da disciplina de histotecnologia do curso técnico de Pesquisa em Biologia Parasitária do Instituto Oswaldo Cruz*. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2008. 112 p.
- COPETTI, N. *Manual de técnicas citológicas da Faculdade de Medicina da UFRGS*. Porto Alegre: UFRGS, 2004. 31 p.
- HARRIS, H. F. On the Rapid Conversion of Haematoxylin into Haematein in Staining Reactions. *J. Appl. Microsc.*, v. 3, p. 777-780, 1900.
- PAPANICOLAOU, G. N. A New Procedure for Staining Vaginal Smear. *Science*, n. 95, p. 438-439, 1942.

Para saber mais:

JUNQUEIRA, C. U.; JUNQUEIRA, L. M. M. S. *Técnicas básicas de citologia e histologia*. São Paulo: Santos, 1983. 123 p.

LOWE, J. *Histotechnology Technical Methods: Stain for Air Dried Cytology Preparations*. Disponível em : <http://www.nottingham.ac.uk/pathology/protocols/mgg.html>. Acesso em: 20 jul. 2009.

MICHALANY, J. *Técnica histológica em anatomia patológica*. 3. ed. São Paulo: EPU, 1981. 295 p.

OLIVEIRA, M. L. C. S.; MOTA, A. R. C.; VIERO, R. M. *Citotecnologia – manual de normas técnicas*. São Paulo: Faculdade de Medicina de Botucatu (Unesp), Laboratório de Citologia, Departamento de Patologia, 2000. 24 p.

PROPHET, E. B. et al. *Laboratory Methods in Histotechnology*. Washington, D.C.: Armed Forces Institute of Pathology, 1992 . 279 p.

WOODS, A. E.; ELLIS, R. C. *Laboratory Histopathology – A Complete Reference*. Nova York: Churchill Livingstone, 1994. v. 2.

