



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

**PREPARO DE AMOSTRAS CITOLÓGICAS DE EFUSÕES, LAVADOS
(BRONCOALVEOLAR E PERITONEAL) E LÍQUOR PELO MÉTODO
“PLASMA-TROMBOPLASTINA”.**

TÉRCIA MARIA MENDES LOUSA DE CASTRO

BRASÍLIA-DF

2016

TÉRCIA MARIA MENDES LOUSA DE CASTRO

**PREPARO DE AMOSTRAS CITOLÓGICAS DE EFUSÕES, LAVADOS
(BRONCOALVEOLAR E PERITONEAL) E LÍQUOR PELO MÉTODO
“PLASMA-TROMBOPLASTINA”**

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

Orientadora: Profa. Dra Fabiana Pirani Carneiro

BRASÍLIA-DF

2016

TÉRCIA MARIA MENDES LOUSA DE CASTRO

**PREPARO DE AMOSTRAS CITOLÓGICAS DE EFUSÕES, LAVADOS
(BRONCOALVEOLAR E PERITONEAL) E LÍQUOR PELO MÉTODO
“PLASMA-TROMBOPLASTINA”**

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

Aprovado em 29/02/2016.

BANCA EXAMINADORA

Profa Dra Fabiana Pirani Carneiro
(Presidente)
FM – Universidade de Brasília

Prof. Dr. Albino Verçosa Magalhães
(Membro titular interno)
FM – Universidade de Brasília

Dra Lívia Bravo Maia
(Membro titular externo)
HUB – Universidade de Brasília

Profa Dra Andrea Barretto Motoyama
(Membro suplente externo)
FS – Universidade de Brasília

FICHA CATALOGRÁFICA

CASTRO, TÉRCIA MARIA MENDES LOUSA DE

Preparo de Amostras Citológicas de Efusões, Lavados (Broncoalveolar e Peritoneal) e Líquor Pelo Método “Plasma-Tromboplastina”, 2016.

Orientador: Fabiana Pirani Carneiro

Dissertação de Mestrado - Universidade de Brasília, Faculdade da Saúde, 2016.

Departamento de Patologia.

- | | |
|-------------------------|----------------------------|
| 1. “Cell block” | 2. “Plasma-tromboplastina” |
| 3. Amostras citológicas | 4. Imunocitoquímica |

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

CASTRO, T.M.M.L. (2016). Preparo de Amostras Citológicas de Efusões, Lavados (Broncoalveolar e Peritoneal) e Líquor Pelo Método “Plasma-Tromboplastina” Dissertação de Mestrado, Departamento de Patologia, Universidade de Brasília, Brasília, DF, 51 p.

CESSÃO DE DIREITOS

NOME DO AUTOR: Tércia Maria Mendes Lousa de Castro

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO: Preparo de Amostras Citológicas de Efusões, Lavados (Broncoalveolar e Peritoneal) e Líquor Pelo Método “Plasma-Tromboplastina”.

GRAU / ANO: Mestre / 2016

É concedida à Universidade de Brasília a permissão para reproduzir cópias desta dissertação de mestrado e para emprestar ou vender tais cópias somente para propósitos acadêmicos e científicos. O autor reserva outros direitos de publicação e nenhuma parte desta dissertação de mestrado pode ser reproduzida sem a autorização por escrito do autor.

Tércia Maria Mendes Lousa de Castro
Brasília - DF - Brasil
tercialousa@gmail.com

Dedico este trabalho aos meus pais Jovelino Pedro e Benedita, por serem a base do que me tornei. Aos meus filhos Marília e Jovellino Pedro, por compreenderem minhas ausências.

AGRADECIMENTOS

- Ao Divino Espírito Santo e ao meu Anjo de Guarda, que me permitiram sabedoria e leveza nos momentos necessários;
- À Profa Fabiana Pirani, que acreditou em meu potencial acadêmico e me deu todo apoio e suporte para que este trabalho viesse a desabrochar; pela a sua paciência ao me conduzir nos trilhos científicos;
- Aos meus pais que me ensinaram a ser persistente, não desistir diante dos percalços que a vida possa nos oferecer;
- Aos meus filhos que souberam compreender a necessidade dos meus isolamentos;
- Aos pacientes, pois seus dados proporcionaram a realização desta pesquisa, em uma aplicação do preceito de amenizar o sofrimento do próximo, transformando seu próprio sofrimento em esperança de aperfeiçoar o diagnóstico dos que vierem a ter doença semelhante;
- Ao Centro de Anatomia Patológica, do Hospital Universitário de Brasília, meus mais que sinceros agradecimentos, a todos pela cooperação com a coleta de dados, em especial à Deisiane (Recepção) e ao Celso (Citologia), por suas estimadas colaborações;
- Ao Centro de Patologia Clínica, do Hospital Universitário de Brasília, em especial ao Aluizio Soares (Hematologia) por sua valiosa colaboração;
- Ao Bráulio e Elizabete, pela dedicação na execução dos trabalhos técnicos laboratoriais necessários para pesquisa;
- Aos alunos jovens talentos para a ciência, do curso de medicina, Raphael, Guilherme e Larissa, pela importante contribuição no desenvolvimento deste trabalho;
- Aos professores do Departamento de Patologia, da Faculdade de Medicina, da Universidade de Brasília, em especial às professoras Leonora Vianna, Andrea Motoyama e Vânia Ferreira, pelo apoio e acolhimento caloroso;
- A todas as pessoas que me deram força, principalmente minha amiga Maria da Gloria, para os íntimos “Glorinha”, que sempre esteve presente em todos os momentos;

- À equipe do Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, da Universidade de Brasília, em especial à Edigrês, por sua atenção e orientação preciosas;
- Ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, da Universidade de Brasília, pelo apoio financeiro;
- Às pessoas que me declararam como inimiga e me fizeram chorar, por elas terem me ensinado a estratégia de articular, contornar e superar as dificuldades que fui exposta.

“Leve na sua memória para o resto de sua vida as coisas boas que surgiram no meio das dificuldades. Elas serão uma prova de sua capacidade em vencer as provas e lhe darão confiança na presença divina, que nos auxilia em qualquer situação, em qualquer tempo, diante de qualquer obstáculo.”

CHICO XAVIER

“O futuro dependerá daquilo que fazemos no presente.”

MAHATMA GANDHI

RESUMO

A análise de amostras citológicas é um procedimento de rotina no diagnóstico e seguimento de pacientes com cânceres de baixa incidência e nos de elevada incidência e nos cânceres e morbimortalidade. “Cell block” consiste em uma forma de preparação citológica na qual o precipitado da amostra centrifugada é incluído em parafina e submetido a processamento histológico habitual. Apesar do “cell block” ser considerado um método diagnóstico de grande aplicabilidade na rotina diagnóstica, os estudos que utilizam essa técnica são escassos, com pequeno número de amostras e há variação na descrição dos diferentes métodos de preparo. Além disso, não está bem estabelecida a indicação de cada método, de acordo com os diferentes tipos e aspectos das amostras citológicas. Portanto, o objetivo desta pesquisa foi avaliar a aplicabilidade do método “plasma-tromboplastina” no preparo de “cell block” de 299 amostras citológicas (líquido pleural, ascítico e pericárdico, lavados peritoneal e broncoalveolar, líquido, urina e aspirados de lesões císticas) no laboratório de Anatomia Patológica do HUB da UnB. Citocentrifugado, “cell block” e imunocitoquímica foram preparados para cada amostra citológica. O método “plasma-tromboplastina” para preparo do “cell block” foi aplicável, tecnicamente, em amostras sem sedimento ou com pequena quantidade de sedimento e em outras com sedimento de sangue, correspondendo a 88,3% (264/299) delas. As amostras com grande quantidade de sedimento e com anticoagulante, 11,7% (35/299) foram preparadas pelo método “ágar”. Celularidade e distribuição celular adequadas com preservação da morfologia dos agrupamentos e das células foram observadas nas amostras preparadas pelos métodos “plasma-tromboplastina” e “ágar”. O padrão de marcação imunocitoquímica foi semelhante ao geralmente observado em citocentrifugados. Foi observada concordância em 96,9% (290/299), kappa =0,88 (positivo e negativo para malignidade) entre os diagnósticos do “cell block” e do citocentrifugado. O método “plasma-tromboplastina” se aplica na rotina diagnóstica do laboratório de Anatomia Patológica por ser um método tecnicamente viável. A concordância elevada entre o citocentrifugado e o “cell block” preparado pelo método “plasma-tromboplastina” para o diagnóstico de câncer e, principalmente, a detecção de câncer apenas no “cell block” em algumas amostras sugere que o método pode diminuir os resultados falsos-negativos do citocentrifugado.

Palavras-chave: Amostras biológicas; “Cell block”; Imunocitoquímica; “Plasma-tromboplastina”.

ABSTRACT

The cytological analysis is a routine procedure in the diagnosis and management of patients with high incidence and mortality cancers. "Cell block" consists of a form of cytological preparation in which the precipitate of the centrifuged sample is embedded in paraffin and subjected to the usual histological processing. Despite the "cell block" be considered a diagnostic method of wide applicability in routine practice, studies using this technique are scarce, with small numbers of samples and there is variation in the description of the different methods of preparation. Moreover, the indication of each method according to the different types and aspects of cytological samples is not well established. Thus, the aim of this study was to evaluate the applicability of the "plasma-thromboplastin" method in the preparation of "cell block" of cytological samples (pleural effusion, ascites, pericardial fluid, peritoneal and bronchoalveolar lavage, cerebrospinal fluid, urine and aspirated cystic lesions) in the laboratory of Pathological Anatomy of HUB. Conventional cytological smear, "cell block" and immunocytochemistry were prepared for each cytological sample. The "plasma-thromboplastin" method to prepare the "cell block" was applicable, technically, in samples without sediment or small amount of sediment and in sample with sediment of blood, corresponding to 88.3% (264/299) of the samples. Samples with large amount of sediment and anticoagulant, 11.7% (35/299) were prepared by the "agar" method. Adequate cellularity and cellular distribution with preservation of the morphology of groups and cells were observed in the samples prepared by "plasma-thromboplastin" and "agar" methods. The immunocytochemical staining pattern was similar to that usually observed in conventional cytological smears. Agreement was observed in 96.9% (290/299), kappa = 0.88 (positive and negative for malignancy) between the diagnoses of "cell block" and conventional cytological smears. The "plasma-thromboplastin" method is applicable for the routine diagnosis Pathology laboratory to be a viable method technically. The high correlation between conventional cytological smears and "cell block" prepared by the "plasma-thromboplastin" method for diagnosis of cancer and the cancer detection only in the "cell block" in some samples suggests that the method may decrease the false-negatives results of the conventional cytological smears.

Keywords: Biological samples ; " Cell block " ; immunocytochemistry ; " Plasma - thromboplastin " .

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Método “plasma-tromboplastina”.....21
- Figura 2** – Diferentes aspectos e tipos das amostras. (A) amarelo citrino, líquido ascítico. (B) purulento, líquido de cisto muscular. (C) hemorrágico, líquido ascítico. (D) opaco e acastanhado, lavado peritoneal. (E) aquoso com muco, sangue e coágulo “natural” (na seta), lavado broncoalveolar. (F) aquoso (líquor).....34
- Figura 3** – Amostras sem (A), com pequena (B) e com grande quantidade de sedimento (C) após a centrifugação.....35
- Figura 4** – Amostra de líquido ascítico antes da centrifugação (A), coágulo preparado pelo método “plasma-tromboplastina” em formalina (B) e no cassete (C) antes do processamento histológico.35
- Figura 5** – Cortes histológicos de “cell block” preparados pelo método “plasma-tromboplastina”, HE. (A) agrupamentos celulares de adenocarcinoma numerosos e bem distribuídos (40X). (B) atipias nucleares em células dispostas em agrupamentos glandulares (200X). (C) Fragmentos de tecido com carcinoma epidermóide (100X). (D) Estruturas fúngicas (seta) e células degeneradas (cabeça da seta) (200X).....37
- Figura 6** – Amostra hemorrágica antes da centrifugação (A) após a centrifugação (B) e após a retirada do sobrenadante (C) com halo (seta) e camada de hemácias abaixo do halo (asterisco). (D), (E) e (F) cortes histológicos do “cell block” preparados pelo método “plasma-tromboplastina”, HE (100X): (D) halo; (E) camada de hemácias e (F) precipitado.38
- Figura 7** – Coágulo “natural” em amostra de líquido pleural. (A) coágulo no frasco (seta) e (B) coágulo no cassete. (C) e (D) cortes histológicos do coágulo “natural” e do “cell block” preparados pelo método “plasma-tromboplastina”, HE.39

Figura 8 – (A) e (B) imunocitoquímica, expressão de MOC-31, 200X. Agrupamentos de adenocarcinoma com células coradas em marrom no citoplasma e membrana. (A) amostra fixada com formol. (B) amostra fixada com álcool. (C) e (D) imunocitoquímica, expressão de receptor de estrógeno, 200X. Agrupamentos de adenocarcinoma com células coradas em marrom no núcleo. (C) amostra fixada com formol. (D) amostra fixada com álcool. (E) e (F) imunocitoquímica, expressão de ki67, 200X. Agrupamentos de adenocarcinoma com células coradas em marrom no núcleo. (E) amostra fixada com formalina a 4% (formol a 10%). (F) amostra fixada com álcool.40

Figura 9 – Amostra de lavado peritoneal com grande quantidade de sedimento antes (A) e após (B) a centrifugação. Gel formado pelo método “ágar” em formalina a 4% (formol a10%) (C) e no cassete antes (D) e após (E) o processamento histológico.....41

Figura 10 – Cortes histológicos de “cell block” preparados pelo método “ágar”, HE (coloração com intensidade fraca). (A) agrupamentos celulares de adenocarcinoma numerosos e bem distribuídos (40X). (B) agrupamentos glandulares de adenocarcinoma com atipias celulares e corpo de psammoma (seta) (100X).42

Figura 11 – Imunocitoquímica, expressão de MOC-31 (A) e Ki67 (B), 200X. (A) agrupamentos de adenocarcinoma com células coradas em marrom no citoplasma e membrana (amostra fixada com formalina). (B) agrupamentos de adenocarcinoma com células coradas em marrom no núcleo (amostra fixada com formalina).....43

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** – Distribuição dos estudos sobre o método “plasma-tromboplastina” de acordo com o tipo, número e volume das amostras.20
- Tabela 2** – Variações na técnica de preparo do coágulo com relação à velocidade e tempo de centrifugação, quantidades de plasma, trombina/tromboplastina.....22
- Tabela 3** – Distribuição dos tipos de amostras de acordo com o método de preparo do “cell block”36
- Tabela 4** – Frequência de resultados concordantes e discordantes entre citocentrifugados e “cell block” nas amostras preparadas pelo método “plasma-tromboplastina” e “ágar”43

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CEP-FM	Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da UnB
DAB	3-4, Diaminobenzidina
DH ₂ O	Água destilada
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HCl	Ácido Clorídrico
HE	Hematoxilina e eosina
HRP	<i>Horseradish Peroxidase</i>
HUB	Hospital Universitário de Brasília
INCA	Instituto Nacional do Câncer
KCl	Cloreto de Potássio
KH ₂ PO ₄	Fosfato de Potássio monobásico
LSAB	Labelled Streptavidin Biotin
NaCl	Cloreto de sódio
Na ₂ HPO ₄	Fosfato de Sódio dibásico
PBS	phosphate buffered saline
rpm	Rotação por minuto
TBS	Tris buffered Saline

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
1.1 “CELL BLOCK”	19
1.2 MÉTODO “PLASMA-TROMBOPLASTINA”	20
1.2.1 TIPOS DAS AMOSTRAS CITOLÓGICAS.....	20
1.2.2 DESCRIÇÃO DA TÉCNICA	20
1.2.3 COMPARAÇÃO COM OUTROS MÉTODOS DE PREPARO DE “CELL BLOCK”	22
1.2.4 COMPARAÇÃO COM CITOCENTRIFUGADO	24
2 JUSTIFICATIVA	25
3 OBJETIVOS	26
3.1 Geral.....	26
3.2 Específicos	26
4 MATERIAIS E MÉTODOS	27
4.1 AMOSTRAS	27
4.1.1 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO	27
4.1.2 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO	27
4.2 CITOCENTRIFUGADO	27
4.3 “CELL BLOCK”	28
4.3.1 Método “plasma-tromboplastina”	28
4.3.2 Método “ágar”	29
4.3.4 IMUNOCITOQUÍMICA.....	30
4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA	33
5 RESULTADOS	34
5.1 AMOSTRAS	34
5.2 MÉTODO “PLASMA-TROMBOPLASTINA”	35
5.3 MÉTODO “ÁGAR”	41
6 DISCUSSÃO	44
6.1 CARACTERÍSTICAS DA AMOSTRA	44

6.2 VIABILIDADE TÉCNICA E FINANCEIRA DO MÉTODO “PLASMA-TROMBOPLASTINA”	45
6.3 QUALIDADE DOS RESULTADOS DAS AMOSTRAS PREPARADAS PELO MÉTODO.....	47
6.4 CONCORDÂNCIA ENTRE O “CELL BLOCK” PREPARADO PELO MÉTODO “PLASMA-TROMBOPLASTINA” E O CITOCENTRIFUGADO PARA A PESQUISA DE CÉLULAS NEOPLÁSICAS.....	49
6.5 APLICAÇÃO DO MÉTODO “ÁGAR”	49
6.6 PERSPECTIVAS.....	51
7 CONCLUSÕES	52
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53

1 INTRODUÇÃO

De acordo com as estimativas 2016/2017, o Brasil deverá registrar nos próximos anos 596 mil novos casos de câncer, segundo o INCA (Instituto Nacional do Câncer)¹. A análise de amostras citológicas é um procedimento de rotina no diagnóstico e seguimento de pacientes com cânceres de elevada incidência e morbimortalidade como carcinomas de mama, pulmão, cólon, estômago e tireóide².

A citologia é um método diagnóstico acessível, rápido, de baixo custo e pouco invasivo, mas apresenta sensibilidade e especificidade variável, dependendo de vários fatores, resultando na escassez de células neoplásicas, sendo muitas vezes difícil diferenciar, neste exame, as células benignas das malignas ou mesmo identificar a origem de uma célula neoplásica³⁻⁵.

Um método complementar à citologia, também aplicado no laboratório de Anatomia Patológica, é a imunocitoquímica em que são usados marcadores celulares que permitem diferenciar a célula benigna da maligna, identificar o tecido de origem da célula neoplásica e, ainda, sugerir o provável sítio primário da neoplasia, em casos de metástase^{6,7}.

“Cell block” consiste em uma forma de preparação citológica na qual o precipitado da amostra centrifugada é incluído em parafina e submetido a processamento histológico habitual². Na rotina diagnóstica, ele é um método complementar de preparo de amostras de citologia esfoliativa (efusões/líquidos das cavidades pleural, peritoneal, pericárdico, lavados peritoneais e broncoalveolar, líquido) e citologia aspirativa².

Em amostras em que há necessidade de realização de imunocitoquímica, o “cell block” apresenta algumas vantagens em relação ao citocentrifugado: facilidade de interpretação morfológica, menor relação custo-benefício, possibilidade de realização de maior número reações imunocitoquímicas e de arquivamento do bloco de parafina para uso em técnicas futuras^{8,9}. Dentre os seus métodos de preparo descritos, o “plasma-tromboplastina/trombina” tem sido

considerado uma técnica de execução fácil e de melhor qualidade para aplicação de imunocitoquímica¹⁰⁻¹⁷.

Atualmente, na maioria nos laboratórios de Anatomia Patológica, apenas parte das amostras é citocentrifugada, sendo a amostra residual desprezada e o “cell block” preparado apenas daquelas amostras que apresentam resíduos sólidos. Ao adicionar plasma e tromboplastina nos precipitados dos centrifugados possibilita-se a formação de coágulos contendo células da amostra, os quais podem ser incluídos em parafina. A princípio, por meio deste método “plasma-tromboplastina/trombina”, toda e qualquer amostra poderia ser arquivada e utilizada para estudo imunocitoquímico.

1.1 “CELL BLOCK”

Este é um dos métodos mais antigos de preparação para a microscopia e consiste na inclusão de sedimentos de amostras citológicas em parafina^{18,19}. Vários estudos mostram que ele deve ser usado para o processamento de todo o material residual que permanece após a conclusão das preparações citológicas^{18,19}. Este material, geralmente, contém fragmentos de tecido importantes que não podem ser processados por técnicas citológicas^{18,19}.

O método utiliza técnicas histológicas para o processamento e, portanto, oferece como vantagem: várias seções do mesmo material podem ser coradas com corantes de rotina, como hematoxilina e eosina, ou com colorações especiais para a identificação de mucina, melanina, bactérias e fungos. Além disso, pode também servir para imunocitoquímica^{18,19,20}.

A formalina tamponada é o fixador mais usado e que permite procedimentos adicionais^{18,19,20}. O benefício da técnica é a presença de resíduos sólidos que permite o reconhecimento de padrões histológicos da lesão que não podem ser identificados em esfregaços e citocentrifugados^{18,19,20}. As amostras citológicas, mais frequentemente enviadas para o laboratório de Anatomia Patológica, são as efusões (líquido pleural, ascítico e pericárdico), lavados (peritoneal e broncoalveolar), líquido, aspirados de lesões císticas e amostras citológicas em meio líquido².

Vários métodos de preparo de “cell block”, com uso de diferentes substâncias, já foram descritos: “agar”²¹⁻²⁶, “HistoGel”²⁷⁻²⁹, “gelatin albumin”¹⁰, “collodion”³⁰, “pre-gelatinized starch”³¹, “sodium alginate”³², “polyvinyl alcohol foam”³³, “gelatin capsules”³⁴, “tissue coagulum clot”³⁵⁻³⁷ e “plasma-tromboplastina/trombina”¹⁰⁻¹⁶. O preparo automatizado também tem sido descrito^{23,38-44}. Há uma variação significativa na descrição de cada técnica com relação a fixação da amostra, volume e concentração das substâncias empregadas, o que dificulta comparar a eficácia dos métodos⁴⁵⁻⁴⁶. Dentre estes, os mais usados são os métodos “agar” e “plasma-tromboplastina/trombina”⁴⁵.

1.2 MÉTODO “PLASMA-TROMBOPLASTINA/TROMBINA”

1.2.1 Tipos de amostras citológicas

O método “plasma-tromboplastina” tem sido descrito no preparo de diferentes tipos de amostras citológicas: efusões, lavado peritoneal, aspirados e amostras em meio líquido. Na tabela 1, os estudos foram distribuídos de acordo com o tipo, o número e o volume de amostras.

Tabela 1. Distribuição dos estudos sobre o método “plasma-tromboplastina” de acordo com o tipo, número e volume das amostras.

Tipo	Número	Volume	Estudos
Efusões	29	-	Fetsch et al. (2002) ¹³
	38	10- 20mL	Kulkarni et al. (2009) ¹¹
	25	50mL	Jing et al. (2013) ¹²
	100	10mL	Shukla et al. (2015) ¹⁶
Lavado peritoneal	10	-	Selvaggi (2003) ¹⁴
Aspirado por agulha fina	32	-	Kulkarni et al. (2009) ¹¹
Citologia em base líquida não ginecológica	12	30mL	Nigro et al. (2007) ¹⁰
Citologia em base líquida ginecológica	125	50mL	Keyhani-Rofagha & Vesey-Shecket (2002) ¹⁵

1.2.2 Descrição da técnica

A técnica consiste na formação de coágulo adicionando plasma e trombina/tromboplastina ao precipitado do centrifugado. O coágulo formado é, em seguida, transferido para papel de filtro, acondicionado em cassete, fixado em formalina a 4% (formol a 10%) e submetido a processamento histológico habitual (Figura 1).

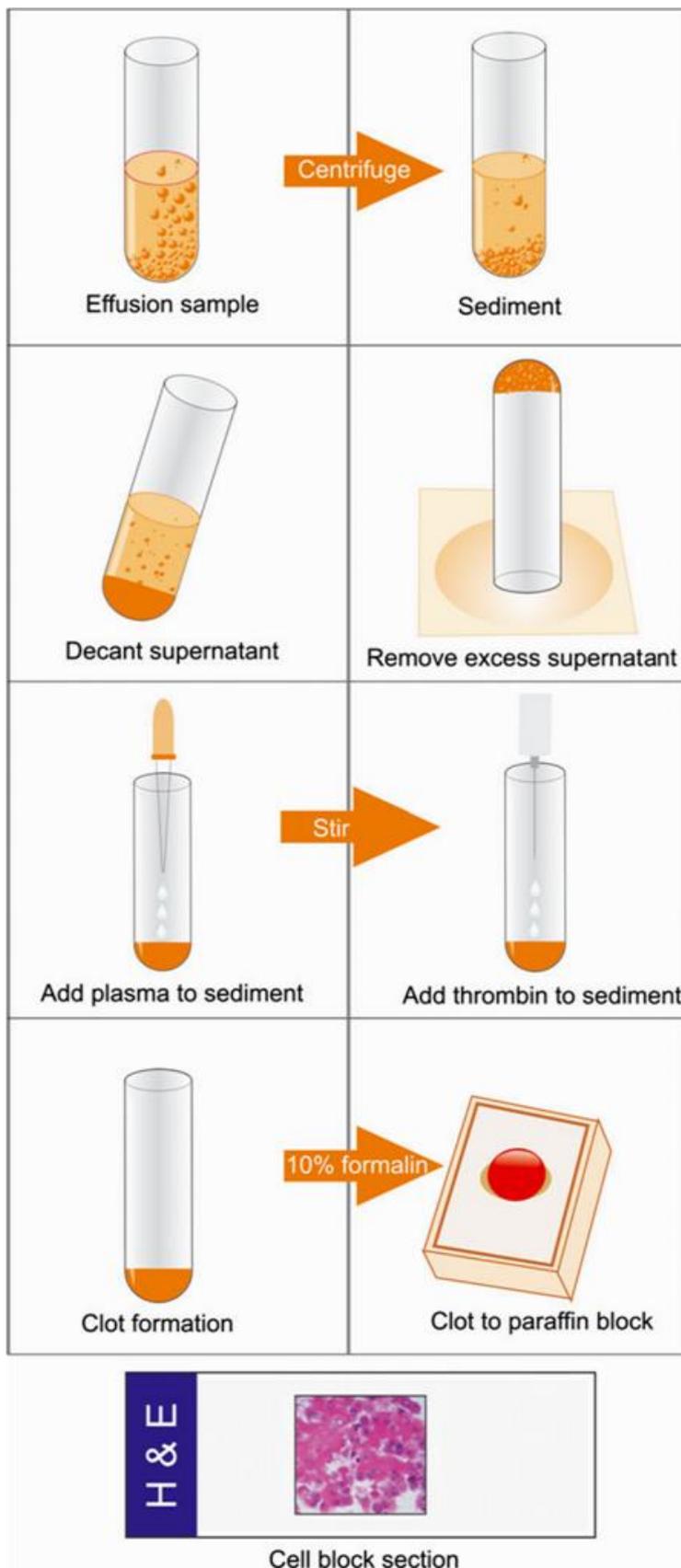


Figura 1. Método “plasma-tromboplastina”
Fonte: Jain e col. (2014).

As amostras fixadas em álcool ou formalina devem ser lavadas com salina ou PBS (do inglês, *phosphate buffered saline*) para evitar que o fixador dificulte a formação do coágulo^{11,15}. A descrição da técnica não foi realizada em alguns estudos ou foi realizada apenas parcialmente e com variações entre eles com relação à velocidade e tempo de centrifugação, quantidades de plasma, trombina e tromboplastina (Tabela 2). O tempo para a formação do coágulo é de até 5 min¹⁵ e a formalina a 4% diluída em DH₂O é utilizada na fixação do coágulo^{11,13,15}. Até duas tentativas adicionais sucessivas são relatadas para a formação do coágulo¹⁵.

Tabela 2. Variações na técnica de preparo do coágulo com relação à velocidade e tempo de centrifugação, quantidades de plasma, trombina/tromboplastina.

Velocidade de centrifugação	1200 rpm ¹³ , 1500 rpm ¹⁵ , 2320 rpm ¹² , 2500rpm ¹⁶
Tempo de centrifugação	10min ^{13,16} , 5 min ^{12,15}
Plasma	6 gotas ¹⁰ , 2 gotas ^{11,16} , 2,3 gotas ¹² , 2,3 gotas <3mL do sedimento>4-10gotas ¹⁵
Trombina	2,3 gotas ¹² , 1ou2 gotas <3mL de sedimento>3ou4gotas ¹⁵
Tromboplastina	6 gotas ¹⁰ , 4 gotas ¹¹ , 2 gotas ¹⁶

1.2.3 Comparação com outros métodos de preparo de “Cell Block”

O “cell block” pode ser preparado de amostras sem sedimento, de amostras com pequena ou grande quantidade de sedimento, assim como dos resíduos sólidos e coágulos naturais presentes na amostra²⁰.

A sedimentação simples é um método de preparo de amostras com grande quantidade de sedimento, amplamente usado nos laboratórios de Anatomia Patológica, pela facilidade de execução da técnica. Esta consiste em centrifugar a amostra, transferir o sedimento para um papel com auxílio de uma espátula, acondicionar em cassete, fixar em formol, submeter o sedimento a processamento histológico habitual e inclusão em parafina⁴⁷⁻⁴⁹. Contudo, o

sedimento é friável e durante o processamento há perda e diluição significativa de células resultando em celularidade escassa nos cortes histológicos do “cell block”⁴⁵.

A maioria das amostras se apresenta sem ou com pequena quantidade de sedimento, sendo o “cell block” delas preparado adicionando-se ao precipitado substâncias como ágar, albumina, histogel e plasma com tromboplastina/trombina^{10,22,28,45}. Dentre estas, as mais usadas são ágar e “plasma-tromboplastina/trombina”⁴⁵. De uma forma geral, a desvantagem no emprego destas técnicas é o maior tempo necessário para o preparo do “cell block”; artefatos celulares relacionados ao aquecimento do ágar e histogel também são descritos^{12,45}.

Nigro e col. (2007) observaram que o “cell block” de amostras em base líquida preparada pelo método “plasma-tromboplastina” apresenta melhor celularidade, melhor distribuição celular e melhores resultados da imunocitoquímica quando comparado com “cell block” preparado pela sedimentação simples, sedimentação com filtro invertido e técnica da albumina¹⁰. Kulkarni e col. (2009) concluíram também que o método “plasma-tromboplastina” é uma técnica de execução fácil quando comparada com o método “ágar”¹¹. Os estudos que comparam o método “plasma-tromboplastina” com outras técnicas de preparo do “cell block”, usando diferentes tipos de amostra, são escassos e, muitas vezes, com pequeno número de amostras e isto dificulta uma conclusão definitiva de suas vantagens sobre as outras técnicas.

O “cell block” pode, ainda, ser preparado de forma automatizada, mas os equipamentos de alto custo utilizados inviabilizariam seu emprego na maioria dos laboratórios³⁸⁻⁴⁴. As principais vantagens deste método são a maior celularidade e a rapidez no processamento que tem duração de menos de 60 minutos, enquanto no “cell block” tradicional esse tempo é de aproximadamente 24 horas²³.

1.2.4 Comparação com citocentrifugado

Em amostras de efusões (líquidos pleural, ascítico e pericárdico) o “cell block” preparado pelo método “plasma-tromboplastina” apresenta melhor custo-benefício quando comparado com o citocentrifugado e citologia em meio líquido, principalmente quando se aplica a imunocitoquímica¹³.

O estudo imunocitoquímico no “cell block” apresenta como vantagens a facilidade de interpretação, a menor coloração de fundo, permite a utilização de um maior número de anticorpos e disponibilidade de arquivamento e uso em estudos futuros¹³. Dentre as desvantagens, destaca-se o maior custo, a necessidade de um tempo maior para execução do método e, conseqüentemente, um atraso no diagnóstico¹³.

Em amostras de lavados peritoneais, apesar de o “cell block” não ser usado rotineiramente no laboratório, a vantagem em relação ao citocentrifugado seria a presença de fragmentos de tecido com aspectos histológicos da lesão e os melhores resultados da imunocitoquímica¹⁴. Em amostras ginecológicas em base líquida, o emprego do “cell block” preparado pelo método “plasma-tromboplastina/trombina” proporcionaria um possível aumento da sensibilidade e especificidade, apesar de onerar o custo e o tempo de execução¹⁵.

2. JUSTIFICATIVA

A sensibilidade e a especificidade baixas do exame citológico na pesquisa de células neoplásicas de pacientes com câncer resultam, inevitavelmente, em diagnósticos e tratamentos tardios, erros no estadiamento e prognóstico e uso de técnicas diagnósticas invasivas. O uso associado do citocentrifugado com “cell block” aumenta a detecção de câncer, a identificação dos respectivos sítios primários e tipos histológicos nas amostras citológicas⁴⁷⁻⁵⁰. O método de preparo do “cell block” ideal deve ser de execução fácil, custo baixo, qualidade satisfatória e aplicável para a maioria de amostra citológica. Apesar do “cell block” ser considerado um método diagnóstico de grande aplicabilidade na rotina diagnóstica, os estudos são escassos, com pequeno número de amostras e há variação na descrição dos diferentes métodos de preparo. Além disso, não está bem estabelecida a indicação de cada método de acordo com os diferentes tipos e aspectos das amostras citológicas.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar a aplicabilidade do método “plasma-tromboplastina” no preparo de “cell block” de amostras citológicas (líquido pleural, ascítico, líquido pericárdico, lavados peritoneal e broncoalveolar, líquido, urina e aspirados de lesões císticas) no laboratório de Anatomia Patológica da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar a aplicação do método “plasma-tromboplastina” de acordo com as características da amostra: tipo, aspecto e quantidade de sedimento.
- Avaliar a viabilidade técnica do emprego método “plasma-tromboplastina” na preparação de “cell block” das amostras citológicas.
- Avaliar a quantidade, distribuição e preservação das células, a expressão de marcadores imunocitoquímicos no “cell block” preparado pelo método “plasma-tromboplastina”.
- Verificar a concordância entre o citocentrifugado e o “cell block” preparado pelo método “plasma-tromboplastina” para a pesquisa de células neoplásicas.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 AMOSTRAS

4.1.1 Critérios de Inclusão: O presente trabalho constituiu-se em um estudo no qual foram analisadas amostras citológicas (líquido pleural, ascítico, líquido pericárdico, lavados peritoneal e broncoalveolar, líquido, urina e aspirados de lesões císticas) enviadas ao Laboratório de Anatomia Patológica, do Hospital Universitário de Brasília, nos anos de 2013 e 2014, acondicionadas em geladeira, por um período de até 2 semanas.

4.1.2 Critérios de Exclusão: Foram excluídas do estudo as amostras de pacientes menores do que 18 anos, indígenas, incapazes, e casos de negativa na participação do estudo.

O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa – CEP-FM (768.140), conforme anexo A (pág 60).

4.2 CITOCENTRIFUGADO

Indicação: todas as amostras

Material:

- Papel de filtro
- Micropipetas
- Ponteiras
- Álcool 99%

Etapas da técnica:

- Pipetar 1 mL da amostra no citofunil, previamente acoplado ao citoclipe e à lâmina e ao papel absorvente.
- Centrifugar a 2000 rpm por 2 minutos centrifuga modelo “Cytopro® cytocentrifuge - Rotor / AC-160”
- Retirar o conjunto e desacoplar a lâmina.
- Fixar a lâmina em álcool 99% imediatamente.
- Coloração: método de Papanicolaou.

Observações:

Nesta técnica, as células em suspensão se depositam na lâmina de vidro, perfazendo um diâmetro de 5 mm, enquanto o meio de suspensão é absorvido por papel absorvente próprio.

4.3 “CELL BLOCK”

4.3.1 Método “plasma-tromboplastina”

Indicação: Amostras sem ou com pequena quantidade de sedimento e amostra com sedimento de sangue (sem anticoagulante).

Material:

- Plasma humano
- Tromboplastina (NEOPLASTINE r CI PLUS 5)
- Tubo de propileno/polietileno de fundo cônico de coluna de 15mL.
- Micropipetas
- Ponteiras
- Pipeta de Pasteur descartável
- Pinça serrilhada
- Cassete
- Papel manteiga e tesoura
- Formalina a 4% (formol a10%)

Etapas da técnica:

- Retirar o plasma para descongelar.
- Centrifugar a amostra por 5 minutos a 1500 rpm
- Desprezar o sobrenadante com a pipeta
- Adicionar 50µL de plasma no precipitado e homogeneizar
- Adicionar 50µL de tromboplastina e homogeneizar por cerca de 1 minuto
- Deixar o coágulo se formar em até 2 minutos
- Quando o coágulo não se formar, repetir a técnica ou usar o método “agar”
- Após a formação do coágulo, adicionar 2mL de formalina a 4% para promover o deslocamento do coágulo do fundo do frasco e fixação da amostra.

- Retirar o coágulo do frasco, envolver em papel manteiga e colocar em cassete para processamento histológico habitual e coloração pela Hematoxilina-eosina (HE).

Observações:

- Se a amostra foi fixada com o álcool ou enviada ao laboratório com anticoagulante, o sedimento deve ser lavado em pelo menos duas tentativas adicionais sucessivas, com uma solução salina ou PBS, uma vez que estas substâncias inibem a coagulação com plasma e tromboplastina.
- Preparo PBS 10X (1L)
 - NaCl (137mM) – 80g
 - KCl (2,7mM) – 2g
 - Na₂HPO₄ {fosfato de sódio dibásico} –14,4g
 - KH₂PO₄ (2mM) {fosfato de potássio monobásico} – 2,4g
 - DH₂O – 800mL
 - Ajustar o pH para 7,4 com HCl
 - Completar o volume para 1L e Autoclavar.
- Nas amostras incolores, recomenda-se colocar eosina no coágulo antes do processamento histológico para facilitar a visualização no momento da inclusão em parafina.
- O plasma usado na técnica foi obtido no Centro de Patologia Clínica do Hospital Universitário de Brasília/UnB, no laboratório de hematologia, distribuído em micro túbulos tipo “ependorfs” e preservado no congelador por até 3 meses. Alguns minutos antes do uso, o plasma era mantido em temperatura ambiente até se tornar líquido.

4.3.2 Método “ágar”

Indicação: Amostras com grande quantidade de sedimento.

Material:

- Ágar (Ágar bacteriológico- Himedia)
- Tubo Falcon de 15mL.
- Micropipetas
- Ponteiras
- Pipeta de Pasteur descartável

- Pinça serrilhada
- Cassete
- Papel manteiga e tesoura
- Formalina a 4% (formol a 10%)

Técnica:

- Preparo do Agar: 1% a 5% (dissolver 1 a 5g de ágar bacteriano em 100 mL de água fervente)
- Centrifugar a amostra por 5 minutos a 1500 rpm
- Desprezar o sobrenadante com a pipeta
- Adicionar de 200µL a 500µl de ágar no precipitado (de acordo com a quantidade de sedimento) e homogeneizar por cerca de 1 minuto.
- Após a formação do gel, acrescentar 2mL de formalina a 4% no frasco para promover o deslocamento do gel do fundo do frasco e fixação da amostra.
- Remover o gel do frasco e colocar em cassete para processamento histológico habitual e coloração pela Hematoxilina-eosina (HE).

Observações:

- O ágar dissolvido deve ser colocado em frascos de vidro estéreis com uma tampa de rosca. A tampa do frasco deve ser fechada frouxamente até resfriamento e endurecimento, sendo em seguida, completamente fechada hermeticamente e o frasco armazenado em uma geladeira. Quando for usar, derreter o ágar em um banho maria a 60 °C ou micro-ondas.
- Descartar o ágar não utilizado no final do dia.

4.3.4 Imunocitoquímica

As reações imunocitoquímicas foram realizadas em centrifugados previamente emblocados. Foram empregados anticorpos habitualmente usados na rotina (Apêndice A). O método utilizado para amplificação da reação foi o da Estreptoavidina-Biotina-Peroxidase (LSAB) e sua revelação foi realizada com utilização do 3-4, Diaminobenzidina (DAB). O protocolo da reação imunocitoquímica foi realizada seguindo as seguintes etapas:

Material:

- Lâminas silicalizadas com o corte a 4 μ ou o citocentrifugado
- Tampão citrato (10mM - pH6,0) + tween
- Cubas próprias e berços resistentes a temperaturas e a solventes
- Vaporizador
- Água destilada e água corrente
- Peróxido de hidrogênio
- Tampão TBS (Tris buffered Saline) com e sem tween
 - o Preparo das soluções:
 - o Tris 0,2M
 - Trizma – 24,22g
 - DH₂O – 1000mL
 - o HCl N/10
 - HCl – 8,5mL
 - DH₂O – 1000mL
 - o Tris pH 7,3
 - Tris 0,2M – 125mL
 - HCl N/10 – 225mL
 - DH₂O – 150mL
 - o TBS (solução de uso) conservar na geladeira
 - Tris pH 7,3 – 500mL
 - DH₂O – 4,5L
 - Cloreto de sódio – 38,25g
 - Ajustar o pH para 7,3 com HCl
 - o TBS para Lavagem de lâminas
 - TBS (solução de uso) – 500mL
 - Tween 20 – 500mL
- Papel toalha
- Câmara úmida
- Micropipetas
- Ponteiras
- Microtubos

- Albumina bovina a 1% para diluição do anti corpo primário
- Câmara úmida
- Geladeira
- anticorpo primário (Apêndice A) e anticorpo secundário (kit LSAB)
- cromogênico 3-4, diaminobenzidina (Kit DAB)
- Hematoxilina de Harris
- Álcoois 70%, 80%, 95% e dois a 99,5%
- Xileno (xilol)
- Meio de montagem permanente
- Lamínulas

Técnica:

- Recuperação antigênica: Realizada com de tampão citrato (10mM - pH6,0) + tween em vaporizador (Steamer) entre 96 a 99°C, por 20 min, com as lâminas submersas neste tampão.
- Resfriamento à temperatura ambiente, com as lâminas ainda imersas no tampão citrato por cerca de 20min ou até o tampão estiver na temperatura de 50 °C.
- Lavagem das lâminas em água destilada em cinco banhos.
- Bloqueio da peroxidase endógena: com peróxido de hidrogênio + DH₂O na proporção de 26mL de H₂O₂ para 230mL de DH₂O – 2 banhos de 15 minutos cada.
- Lavagens em água destilada em três banhos.
- Imersão em tampão TBS (Tris buffered Saline) + tween, e remoção do excesso de TBS + tween nas lâminas com papel toalha para serem submetidas à imunocoloração.
- Incubação das lâminas contendo as amostras com o anticorpo primário (Apêndice A) em câmara úmida “*overnight*” (18 horas) sob refrigeração (2-8 ° C).
- Lavagem das lâminas com TBS + tween a fim de retirar o excedente de anticorpo do material em 3 banhos de 3min minutos cada, retirar o excesso de TBS + tween com papel toalha.

- Incubação com o anticorpo secundário biotilado (“kit” LSAB, Dako Cytomation) em câmara úmida a temperatura ambiente (ar condicionado 18 a 22 °C).
- Lavagem das lâminas com TBS + tween em 3 banhos de 5 minutos cada, retirar o excesso de TBS + tween com papel toalha.
- Incubação com o complexo streptavidina-peroxidase (kit LSAB, Dako Cytomation) em câmara úmida a temperatura ambiente (ar condicionado 18 a 22 °C) durante 30 minutos.
- Lavagem das lâminas com TBS + tween em 3 banhos de 5 minutos cada, retirar o excesso de TBS + tween com papel toalha.
- Revelação: a imunocoloração foi desenvolvida pela adição de substrato cromogênico 3-4, diaminobenzidina (DAB) (100mg%) com tampão de diluição.
- Lavagem em água destilada.
- Contra coloração com Hematoxilina de Harris.
- Lavagens em água corrente.
- Desidratação em banhos de álcoois (5 banhos).
- Diafanização em banhos de xileno (xilol) (4 banhos).
- Montagem com meio de montagem permanente (Entellan, Merck, Alemanha) e lamínula.

4.4 Análise estatística

Coeficiente Kappa foi utilizado para a avaliação do grau de concordância entre o diagnóstico do “cell block” e o diagnóstico do citocentrifugado: 0,01-0,20 concordância discreta, 0,21- 0,40 concordância fraca, 0,41-0,60 concordância moderada, 0,61-0,80 concordância substancial e 0,81-,99 concordância quase perfeita.

5 RESULTADOS

5.1 AMOSTRAS

Foi utilizado um total de 299 amostras citológicas distribuído nos seguintes tipos: líquido pleural, n=70; líquido peritoneal ou ascítico n=64; líquido pericárdico n=3; lavado peritoneal=70; lavado broncoalveolar, n=58; líquido, n=19; urina, n=1 e aspirados, n=14. Os diagnósticos dos pacientes de acordo com o tipo de amostra estão dispostos no Apêndice B. O volume das amostras utilizado no preparo do “cell block” variou de 2 a 50 mL. Os maiores volumes enviados para o laboratório foram de amostras de líquido pleural e peritoneal e os menores de líquido.

O aspecto das amostras apresentou uma variação com relação densidade e coloração (aquosa, amarelo-citrino, quilosa, purulento, acastanhada, hemorrágica, etc.). Todas as amostras de líquido apresentaram um aspecto aquoso. As de lavado broncoalveolar também se apresentaram aquosas, mas com quantidades variáveis de sangue e muco. As de lavado peritoneal frequentemente se apresentaram opacas e acastanhadas. As de líquido pleural, peritoneal e pericárdico apresentaram diferentes aspectos com graus variáveis de sangue (Figura 2). Outras amostras ainda apresentaram resíduos sólidos e coágulos naturais antes ou depois da centrifugação (seta, Figura 2).

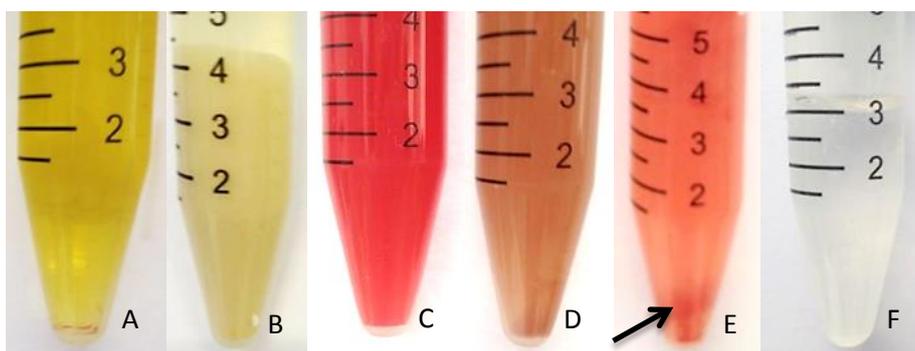


Figura 2. Diferentes aspectos e tipos das amostras. (A) amarelo citrino, líquido ascítico. (B) purulento, líquido de cisto muscular. (C) hemorrágico, líquido ascítico. (D) opaco e acastanhado, lavado peritoneal. (E) aquoso com muco, sangue e coágulo “natural” (na seta), lavado broncoalveolar. (F) aquoso (líquor).

Após a centrifugação, as amostras foram divididas em: sem sedimento, com pequena ou com grande quantidade de sedimento (Figura 3).

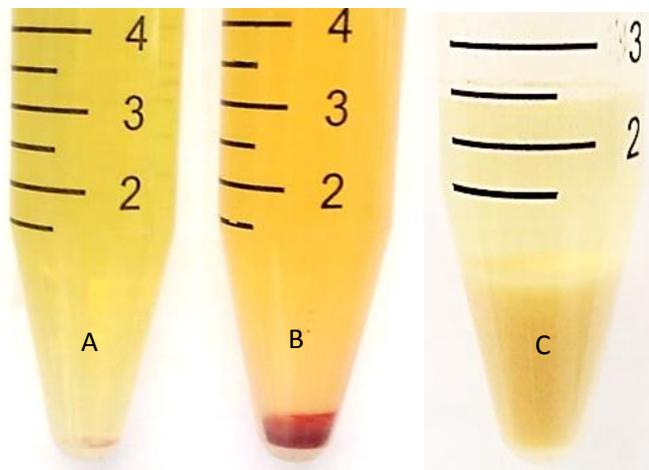


Figura 3. Amostras sem (A), com pequena (B) e com grande quantidade de sedimento (C) após a centrifugação.

5.2 MÉTODO “PLASMA-TROMBOPLASTINA”

O método “plasma-tromboplastina” para preparo do “cell block” foi aplicável, tecnicamente, apenas nas amostras sem sedimento ou com pequena quantidade de sedimento e amostra com sedimento de sangue (Figura 4).

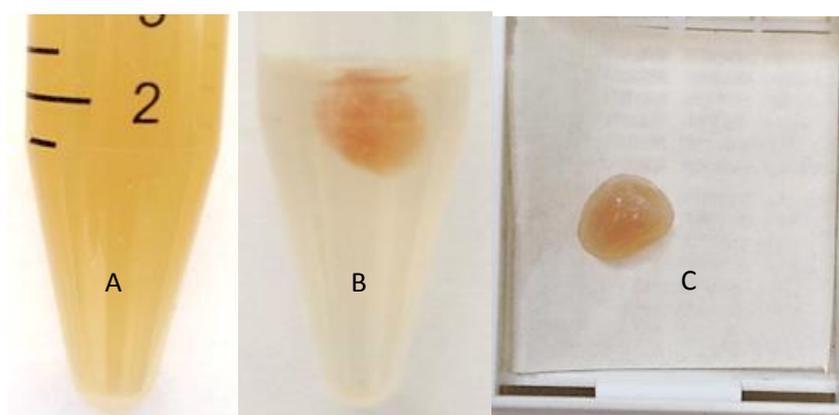


Figura 4. Amostra de líquido ascítico antes da centrifugação (A) coágulo preparado pelo método “plasma-tromboplastina” em formalina a 4% (B) e no cassete (C) antes do processamento histológico.

As amostras com grande quantidade de sedimento e com anticoagulante foram preparadas pelo método “ágar” (Tabela 3). O método “plasma-tromboplastina” foi aplicado em 88,3% (264/299) das amostras: 94,3% (66/70) de líquido pleural; 95,3% (61/64) de líquido peritoneal ou ascítico; 100% (3/3) de líquido pericárdico; 67,1% (47/70) de lavado peritoneal; 94,8% (55/58) de lavado broncoalveolar; 100% (19/19) de líquido e na amostra de urina; 85,7% (12/14) de aspirados.

Tabela 3. Distribuição dos tipos de amostras de acordo com o método de preparo do “cell block”

Método	Tipos de amostras								Total
	Líquido pleural	Líquido ascítico	Líquido pericárdico	Lavado peritoneal	Lavado broncoalveolar	Líquor	Urina	Aspirado	
Plasma-tromboplastina	66	61	3	47	55	19	1	12	264
Ágar	4	3	0	23	3	0	0	2	35
Total	70	64	3	70	58	19	1	14	299

Microscopicamente, foram observadas celularidade e distribuição celular adequadas com preservação da morfologia dos agrupamentos e das células (Figura 5A e 5B). Fragmentos de tecido com manutenção da arquitetura histológica foram identificados em amostras de líquidos e lavados (Figura 5C). Contaminação fúngica e artefatos de degeneração/morte celular foram observados em amostras com maior intervalo de tempo entre coleta e preparo do “cell block” (Figura 5D).

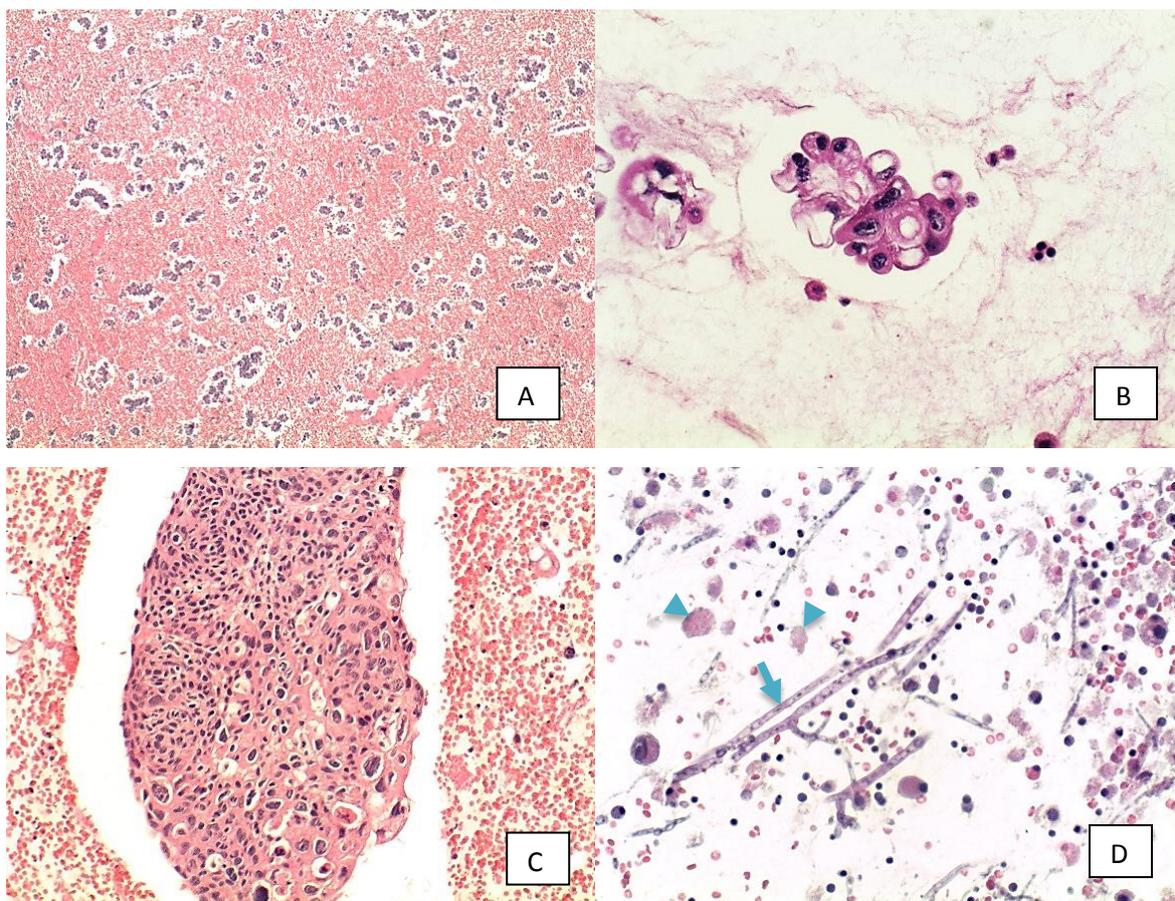


Figura 5. Cortes histológicos de “cell block” preparados pelo método “plasma-tromboplastina”, HE. (A) agrupamentos celulares de adenocarcinoma numerosos e bem distribuídos (40X). (B) atipias nucleares em células dispostas em agrupamentos glandulares (200X). (C) Fragmentos de tecido com carcinoma epidermoide (100X). (D) Estruturas fúngicas (seta) e células degeneradas (cabeça da seta) (200X).

Nas amostras com sedimento com grande quantidade de sangue, após a centrifugação formou-se, em algumas delas, um halo esbranquiçado acima da camada de hemácias com celularidade elevada constituída por leucócitos, células mesoteliais e células epiteliais malignas (Figura 6).

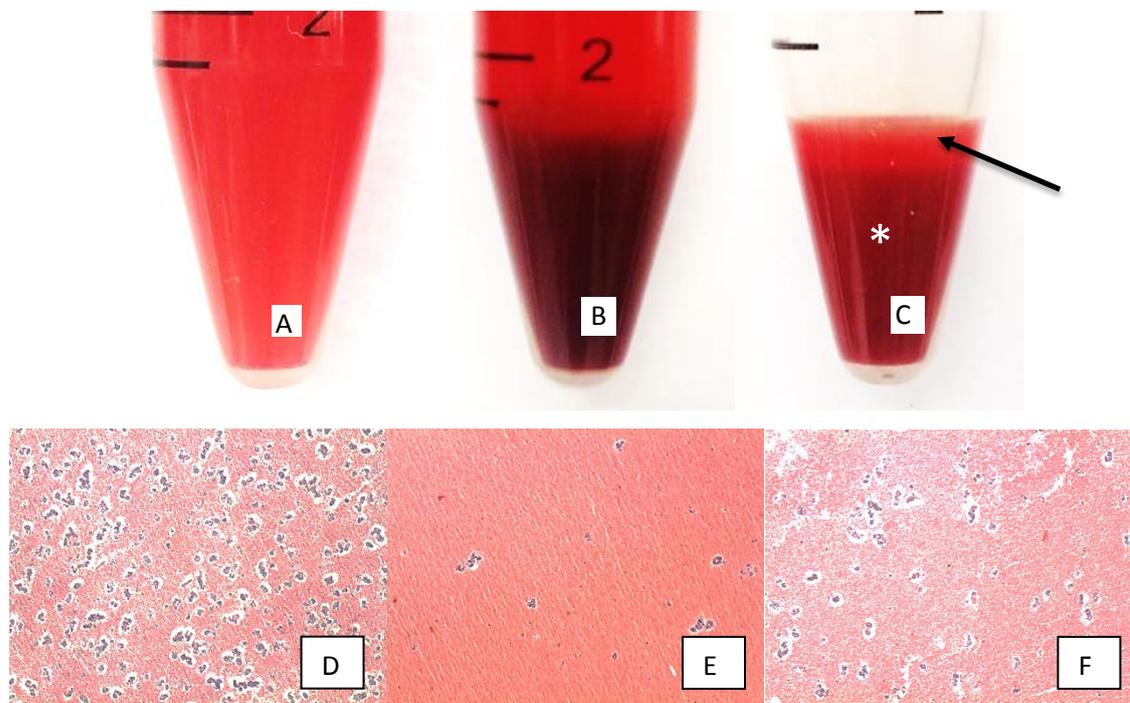


Figura 6. Amostra hemorrágica antes da centrifugação (A), após a centrifugação (B) e após a retirada do sobrenadante (C) com halo (seta) e camada de hemácias abaixo do halo (asterisco). (D) (E) e (F) cortes histológicos do “cell block” preparado pelo método “plasma-tromboplastina”, HE (100X): (D) halo; (E) camada de hemácias e (F) precipitado.

Resíduos sólidos e coágulos naturais encontrados foram separados para inclusão e, geralmente, apresentaram maior celularidade que o coágulo formado pelo método “plasma-tromboplastina” da mesma amostra (Figura 7).

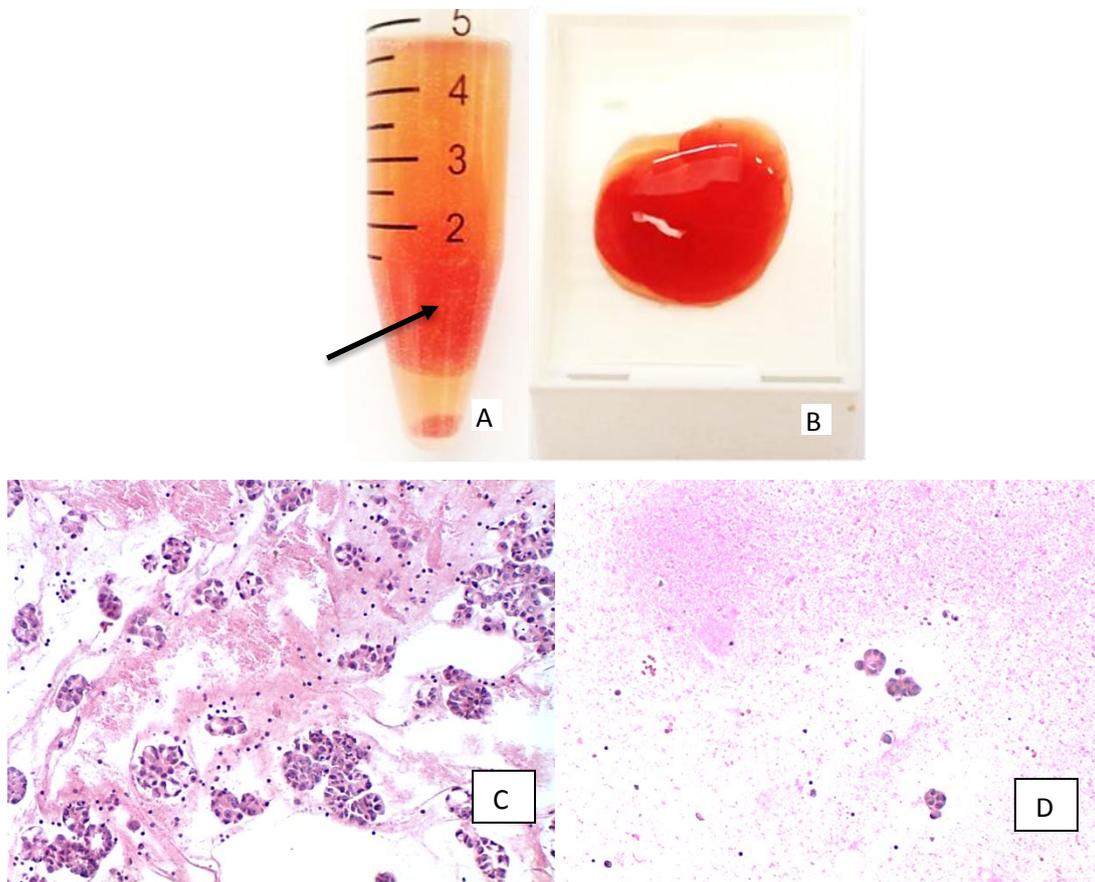


Figura 7. Coágulo “natural” em amostra de líquido pleural (A) coágulo no frasco (seta) e (B) coágulo no cassete). (C) e (D) cortes histológicos do “cell block” preparado pelo método “plasma-tromboplastina”, HE (100X): (C) coágulo “natural” com numerosos agrupamentos glandulares de adenocarcinoma; (D) coágulo preparado pelo método “plasma-tromboplastina” com escassos agrupamentos glandulares de adenocarcinoma.

O padrão de marcação imunocitoquímica foi semelhante ao geralmente observado em citocentrifugados (Figura 8)

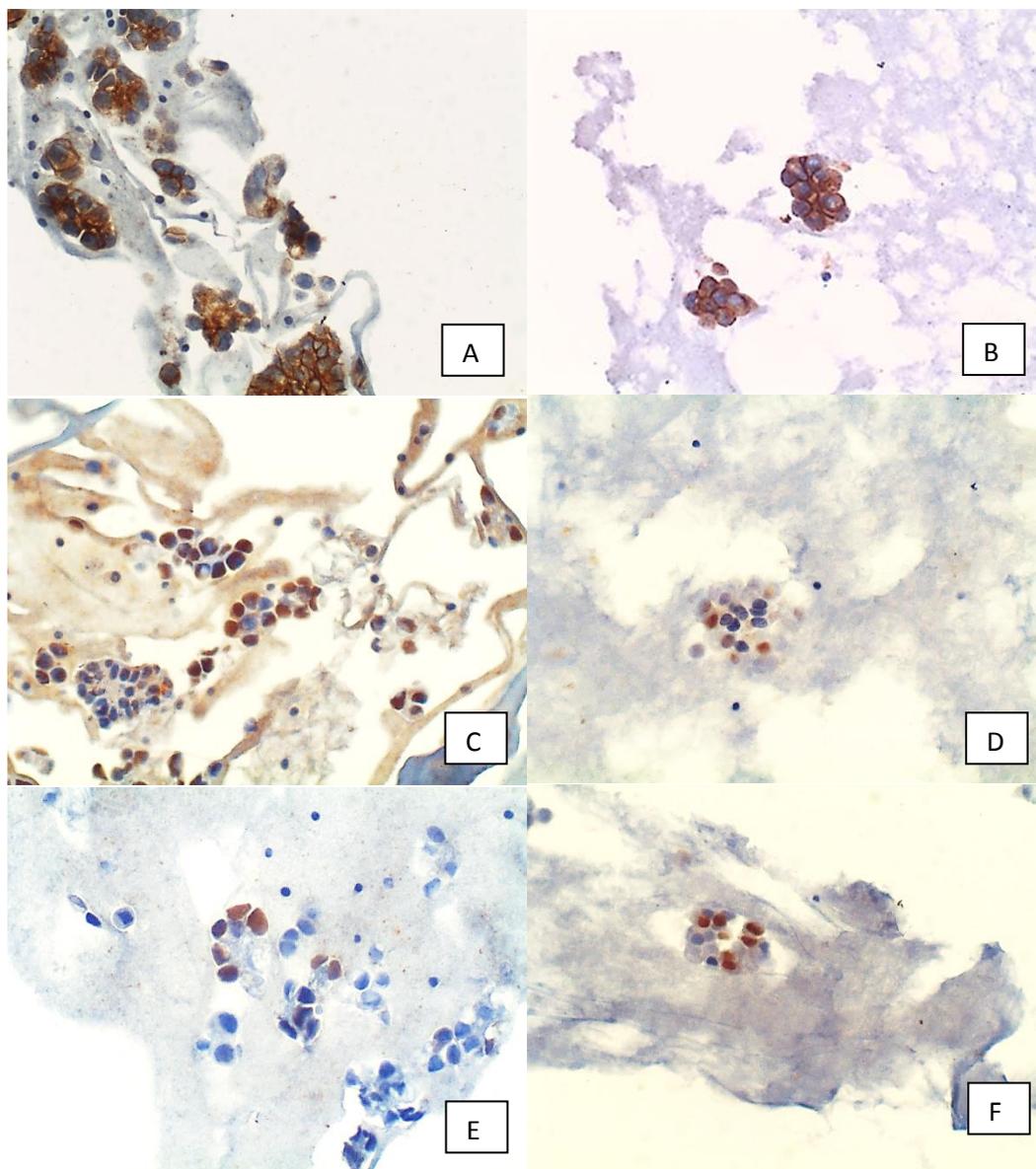


Figura 8. (A) e (B) imunocitoquímica, expressão de MOC-31, 200X. Agrupamentos de adenocarcinoma com células coradas em marrom no citoplasma e membrana. (A) amostra fixada com formol. (B) amostra fixada com álcool. (C) e (D) imunocitoquímica, expressão de receptor de estrogênio, 200X. Agrupamentos de adenocarcinoma com células coradas em marrom no núcleo. (C) amostra fixada com formol. (D) amostra fixada com álcool. (E) e (F) imunocitoquímica, expressão de ki67, 200X. Agrupamentos de adenocarcinoma com células coradas em marrom no núcleo. (E) amostra fixada com formol. (F) amostra fixada com álcool.

5.3 MÉTODO “ÁGAR”

O método “ágar” para preparo do “cell block” foi usado em amostras com grande quantidade de sedimento e com anticoagulante, sendo que 11,7% (35/299) do total das amostras: 5,7% (4/70) das amostras de líquido pleural; 4,7% (3/64) das amostras de líquido peritoneal ou ascítico; 0% (0/3) das amostras de líquido pericárdico; 32,9% (23/70) das amostras de lavado peritoneal; 5,2% (3/58) das amostras de lavado brônquico, 0% (0/19) das amostras de líquido, nenhuma amostra urina e 14,3% (2/14) das amostras de aspirados. Na figura 9, amostra de lavado peritoneal antes e depois da centrifugação e do coágulo antes e após o processamento.

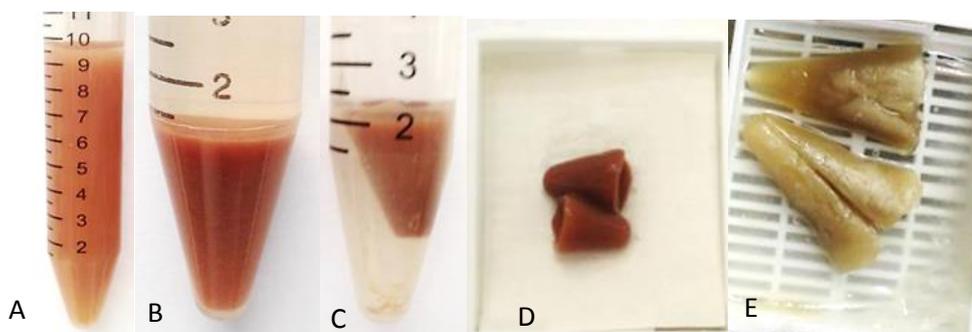


Figura 9. Amostra de lavado peritoneal com grande quantidade de sedimento antes (A) e após (B) a centrifugação. Gel formado pelo método “ágar” em formalina (C) e no cassete antes (D) e após (E) o processamento histológico.

Celularidade, distribuição celular e preservação da morfologia da célula adequadas foram observadas nas amostras preparadas pelo método “ágar” (Figura 10). A coloração HE apresentou uma intensidade mais fraca nas amostras preparadas por este método.

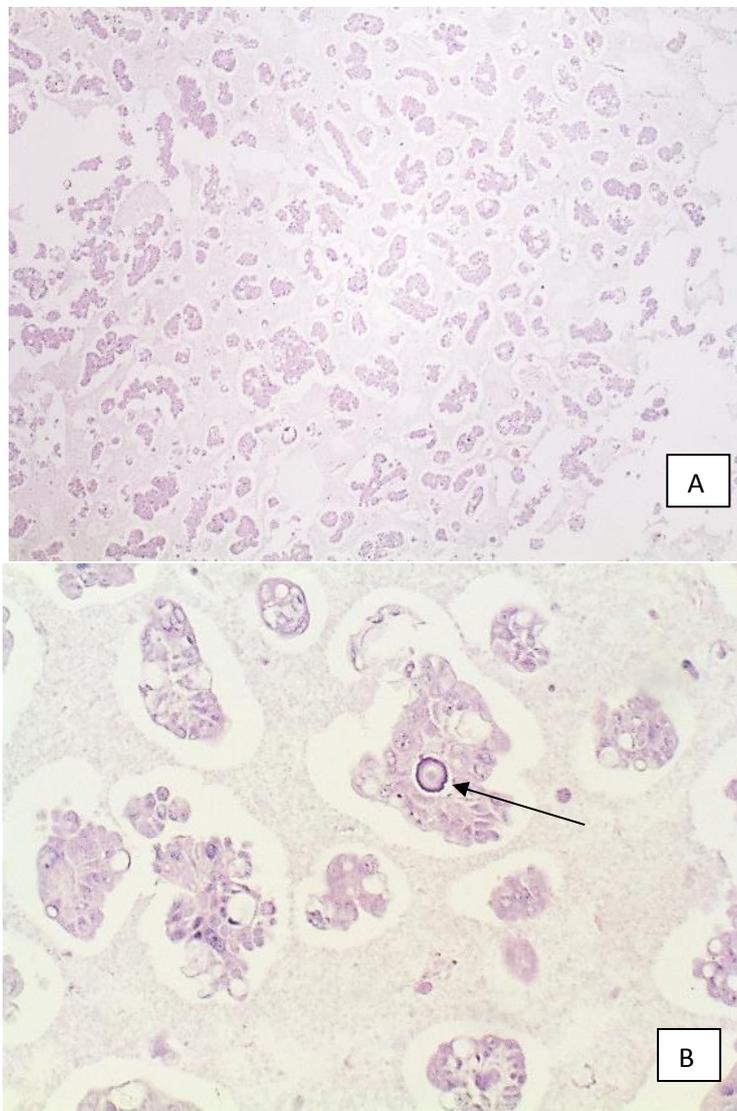


Figura 10. Cortes histológicos de “cell block” preparados pelo método “ágar”, HE (coloração com intensidade fraca). (A) agrupamentos celulares de adenocarcinoma numerosos e bem distribuídos (40X). (B) agrupamentos glandulares de adenocarcinoma com atipias celulares e corpo de psammoma (seta) (100X).

O padrão de marcação imunocitoquímica foi semelhante ao geralmente observado em citocentrifugados (Figura 11).

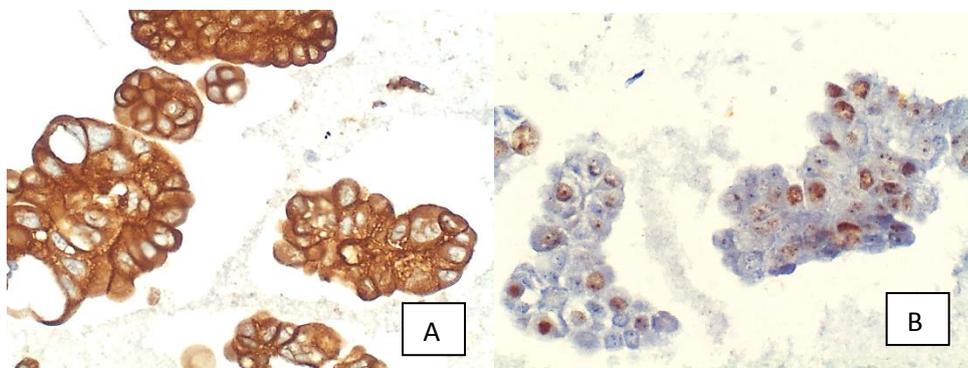


Figura 11. Imunocitoquímica, expressão de MOC-31 (A) e Ki67 (B), 200X. (A) agrupamentos de adenocarcinoma com células coradas em marrom no citoplasma e membrana (amostra fixada com formalina). (B) agrupamentos de adenocarcinoma com células coradas em marrom no núcleo (amostra fixada com formalina).

Concordância (positivo e negativo para malignidade) entre o diagnóstico do “cell block” e o diagnóstico do citocentrifugado foi observada em 96,9% (290/299), kappa =0,88.

Tabela 4. Frequência de resultados concordantes e discordantes entre citocentrifugado e “cell block” nas amostras preparadas pelo método “plasma-tromboplastina” e “agar”.

Citocentrifugado	“Cell block”		Total
	Positivo	Negativo	
Positivo	43	2	45
Negativo	7	247	254
Total	50	249	299

6 DISCUSSÃO

O “cell block” é um método complementar ao citocentrifugado na análise de amostras citológicas enviadas para o laboratório de Anatomia Patológica para pesquisa de células neoplásicas. Este estudo foi avaliar a aplicabilidade do método “plasma-tromboplastina” no preparo do “cell block” considerando, as características da amostra, a viabilidade técnica e financeira e, principalmente, a qualidade e a concordância dos resultados quando se compara com o citocentrifugado.

6.1 Características da amostra

As amostras citológicas, mais frequentemente enviadas para o laboratório de Anatomia Patológica, nas quais o método “plasma-tromboplastina” é potencialmente aplicável são as efusões (líquido pleural, ascítico e pericárdico), lavados (peritoneal e broncoalveolar), líquido, aspirados de lesões císticas, urina e amostras citológicas em meio líquido. Este método já foi descrito em amostras de efusões^{11-13,16}, lavado peritoneal¹⁴, aspirados¹¹ e em amostras em meio líquido^{10,15}. A aplicação deste método em amostras de lavado broncoalveolar, líquido e urina não foi encontrada. No presente estudo foram usadas amostras de efusões (líquido pleural, ascítico e pericárdico), lavados (peritoneal e broncoalveolar), líquido, urina e aspirados. Dentre as limitações deste estudo destaca-se a não obtenção de amostras de citologia em meio líquido e a aplicação do método em um número pequeno de amostras de urina e de aspirado de lesões císticas.

O aspecto das amostras foi variável com relação a densidade (sem, com pequena ou grande quantidade de sedimento) e coloração (aquosa, amarelo-citrino, esverdeada, acastanhada, hemorrágica, etc.), sendo as amostras hemorrágicas as mais propensas a formação de coágulo. A característica da amostra mais importante na determinação da aplicabilidade da técnica foi a quantidade de sedimento/precipitado. O método “plasma-tromboplastina” para preparo do “cell block” demonstrou-se aplicável principalmente nas amostras sem sedimento ou com pequena quantidade de sedimento identificado, antes e/ou depois da centrifugação. As amostras de lavado peritoneal foram as que

apresentaram com maior frequência grande quantidade de sedimento. As de líquor, geralmente, teve o aspecto aquoso e todas se apresentaram sem sedimento. Com isso, pode-se dizer que o método é aplicável em todas as amostras deste tipo. Uma característica importante de algumas amostras foi a presença de resíduos sólidos e coágulos naturais que foram incluídos separadamente. Estes coágulos naturais, geralmente, apresentaram maior celularidade que o coágulo formado pelo método “plasma-tromboplastina”.

Portanto, com relação às características da amostra, a princípio, o método “plasma-tromboplastina” é aplicável em qualquer tipo de amostra citológica, principalmente naquelas com aspecto hemorrágico, sem ou com pequena quantidade de sedimento.

6.2 Viabilidade técnica do método “plasma-tromboplastina”

O método “plasma-tromboplastina” consiste, basicamente, em centrifugar a amostra, desprezar o sobrenadante, inserir plasma e tromboplastina no frasco e misturar com o precipitado do centrifugado, possibilitando a formação de um coágulo que contém células da amostra e que pode ser incluído em parafina. São descritas na literatura até duas tentativas adicionais sucessivas para a formação do coágulo. Um dos fatores que podem dificultar a formação do coágulo é a prévia fixação da amostra com álcool ou formalina e uso de anticoagulantes¹².

Nestas situações citadas anteriormente, há indicação de lavagem com solução salina ou PBS antes de adicionar o plasma e a tromboplastina. No presente estudo, tentou-se aplicar o método em amostras com anticoagulantes e fixadas em álcool sem a lavagem. Nas amostras com anticoagulante, foi necessária mais de uma tentativa para a formação de coágulo e as amostras fixadas com álcool apresentaram um precipitado após a centrifugação, que dificultou a formação do coágulo. Portanto, a amostra ideal para a aplicação do método “plasma-tromboplastina” não deve ser submetida a fixação e anticoagulação.

O volume da amostra usado para o preparo do “cell block” variou de 2 a 50mL. Os menores volumes disponíveis foram das amostras de líquor. A técnica

não é descrita ou é descrita apenas parcialmente em estudos prévios e com variações entre eles com relação à velocidade e tempo de centrifugação, quantidades de plasma trombina e tromboplastina¹⁰⁻¹⁶.

No presente estudo, padronizou-se centrifugar as amostras por 5 minutos a 1500 rpm e usar 50µL de “plasma-tromboplastina”. Com relação ao volume foram testados de 30 a 300 µL de “plasma-tromboplastina” e optou-se por um volume pequeno (50 µL) visando a maior concentração de células. Contudo, este volume pode ser definido de acordo com a celularidade da amostra observada no citocentrifugado e quantidade de sedimento.

Para amostras de líquido, devido à celularidade baixa, o ideal seria optar pelo menor volume possível, mas observamos que volumes menores que 50 µL resultavam em coágulos de difícil manuseio, principalmente após o processamento. Volumes maiores (50 a 300µL) de plasma e tromboplastina foram testados para se conseguir obter formação do coágulo nas amostras com grande quantidade de sedimento. Contudo, na maioria das vezes, mesmo com volumes maiores, várias tentativas foram necessárias.

A perda celular consequente às sucessivas tentativas e maior diluição do precipitado resultou em celularidade escassa. A maioria das amostras com grande sedimento foi do tipo lavado peritoneal, a qual, geralmente, já apresentam celularidade baixa no citocentrifugado e no “cell block”, o que contribuiu ainda mais para a escassez de células. Devido a essa dificuldade na execução, maior tempo de preparo e qualidade menor dos resultados optou-se pelo método do ágar para as amostras com essa característica. O tempo para a formação do coágulo descrito em estudo prévio foi de até 5 min, mas no presente estudo a formação do coágulo foi observada até 5 min e notou-se que quando o coágulo não se formava em até 2 minutos, uma nova tentativa seria necessária¹⁵.

A formalina foi o fixador usado em estudos prévios^{11,13,15} e no presente estudo. A fixação em álcool foi testada e provocou fragmentação do coágulo em algumas amostras.

A presença de muco, observada principalmente nas amostras de lavado broncoalveolar, dificultou a aplicação da técnica. O muco precipitado no fundo do

frasco após a centrifugação impedia a formação do coágulo. Portanto, a retirada do muco antes da centrifugação é recomendada.

Um aspecto interessante, observado nas amostras hemorrágicas, foi a formação, após a centrifugação, de um halo esbranquiçado acima da camada de hemácias. Leucócitos, células mesoteliais, células epiteliais malignas foram encontradas neste halo o que sugere que ele não deve ser desprezado junto com a camada de hemácias.

O custo adicional e específico do emprego do método “plasma-tromboplastina” se refere à aquisição da tromboplastina (cerca de 25 centavos, por exame), já que o plasma pode ser adquirido gratuitamente no setor de Hematologia do Hospital. Os equipamentos e outros materiais de consumo empregados na técnica são usualmente utilizados no processamento das amostras de biópsias e, portanto, presentes em qualquer laboratório de Anatomia Patológica.

Em resumo, com relação à viabilidade técnica e financeira do método “plasma-tromboplastina”, trata-se de um método de preparo de “cell block” de execução fácil e rápida e de baixo custo, aplicável em laboratórios públicos e privados de Anatomia Patológica.

6.3 Qualidade dos resultados das amostras preparadas pelo método “plasma-tromboplastina”

A qualidade dos preparados citológicos (citocentrifugado e “cell block”) depende do número, arranjo, distribuição e preservação das células. Os resultados das amostras preparadas pelo método “plasma-tromboplastina” foram satisfatórios quando se analisou comparativamente com os resultados do citocentrifugado.

As células do precipitado ficaram diluídas na estrutura tridimensional do coágulo, mas não houve comprometimento da celularidade porque o volume de amostra usado no preparo do “cell block” (2-50mL) foi sempre maior que volume o do citocentrifugado (1mL). Contudo, nas amostras de líquido, o volume disponível para o preparo do “cell block” foi pequeno (máximo de 2mL). Por isso, as células,

que geralmente já são escassas neste tipo de amostra, se diluem no coágulo e vários cortes foram necessários em alguns casos para se detectar a célula neoplásica.

Os arranjos das células foram similares aos observados em citocentrifugados. A presença de ocasionais fragmentos de tecido, possibilitando a avaliação da arquitetura, foi, em algumas amostras, importante na conclusão diagnóstica. A homogeneização do plasma e da tromboplastina com o precipitado, por cerca de 1 minuto, contribuiu para a distribuição das células em toda a extensão do coágulo e sem sobreposição.

As amostras preparadas vários dias após a coleta apresentaram artefatos de degeneração e morte celular similarmente ao que ocorre nos citocentrifugados. Contaminação fúngica foi observada em algumas amostras e também esteve associada ao maior intervalo de tempo entre a coleta e o preparo do “cell block”.

A expressão de marcadores imunocitoquímicos, usualmente utilizados na rotina diagnóstica, foi analisada e os resultados similares aos observados no citocentrifugado.

A fixação com álcool, usada em citocentrifugados e em alguns tipos de “cell block”, tem como vantagem a preservação dos detalhes celulares e os ácidos nucleicos⁴⁵. Contudo, com este tipo de fixação, alguns autores obtiveram resultados da imunocitoquímica inconsistentes, com comprometimento da expressão de marcadores para receptores nucleares⁴⁵. No presente estudo, os resultados da imunocitoquímica realizados em citocentrifugados e em “cell block” fixado em álcool foram consistentes. Por tanto, testes em maior número de amostras seriam necessários para uma conclusão definitiva.

A presença de sedimento rico em proteínas causa reações inespecíficas na imunocitoquímica dificultando a interpretação nos preparados citológicos (citocentrifugados, citologia em meio líquido e “cell block”)¹³. Em concordância com estudos prévios, observou-se neste estudo que o uso do “cell block” preparado pelo método “plasma-tromboplastina” associado ao citocentrifugado aumenta potencialmente a especificidade e, conseqüentemente, diminui os

resultados falso-positivos na imunocitoquímica decorrentes de possíveis reações inespecíficas^{13,15}.

Concluindo, a presença de fragmentos de tecido e a facilidade na interpretação morfológica e imunocitoquímica podem ser consideradas as principais vantagens do “cell block” preparado pelo método “plasma-tromboplastina” em relação ao citocentrifugado.

6.4 Concordância entre o “cell block” preparado pelo método “plasma-tromboplastina” e o citocentrifugado para a pesquisa de células neoplásicas.

A concordância entre os resultados do “cell block” e do citocentrifugado foi significativa (Kappa= 0,88). Em sete amostras o diagnóstico de malignidade foi obtido apenas no “cell block”. A presença de fragmentos de tecido com preservação da arquitetura e o volume maior usado da amostra contribuiu para a definição diagnóstica do “cell block”.

Pode-se concluir, portanto, que a concordância elevada entre o citocentrifugado e o “cell block” preparado pelo método “plasma-tromboplastina” para o diagnóstico de câncer e, principalmente, a detecção de câncer apenas no “cell block” em algumas amostras sugere que o método pode diminuir os resultados falsos-negativos do citocentrifugado.

6.5 Aplicação do método “ágar”

O método “ágar” foi aplicado em amostras com sedimento abundante, que geralmente é friável, rico em proteínas e de baixa celularidade. Similarmente ao método “plasma-tromboplastina”, o método “ágar” é mais indicado para amostras com pequena quantidade de sedimento. A técnica consiste em adicionar ao precipitado uma solução aquecida de ágar, homogeneizar até a formação de um gel (abaixo de 50 °C). A concentração e o volume de ágar usado no preparo do “cell block” são variáveis na literatura. Kersten e col. (2000) utilizaram 1mL de agarose a 2%²². Choi e col. (2014) usaram 50 a 100µL, de acordo com a

quantidade de sedimento, de agarose a 3% do tipo padrão e do tipo “ultra-low gelling temperature” (ULGT)²⁴.

No presente estudo, concentrações de 1 a 5% de agar foram testadas e observou-se que quanto maior a concentração maior a dificuldade de homogeneização do ágar com o precipitado e concluiu-se que o ágar a 1% seria o mais adequado para execução da técnica. O volume da solução de ágar usado variou de 200 a 500 µL, de acordo com a quantidade de sedimento. Optou-se pelo menor volume possível para obtenção de maior concentração das células no “cell block”, principalmente porque a maioria das amostras era do tipo lavado peritoneal que, geralmente, apresenta celularidade baixa no citocentrifugado.

A técnica apresenta uma relação de custo-efetividade satisfatória²⁴⁻²⁶. O custo adicional e específico do emprego do método se refere à aquisição do ágar bacteriológico. Os equipamentos e outros materiais de consumo empregados na técnica são usualmente utilizados no processamento das amostras de biópsias e, portanto, presentes em qualquer laboratório de Anatomia Patológica.

A principal desvantagem no emprego do ágar no preparo do “cell block” é a dificuldade na manutenção da solução aquecida (50-60°) para evitar a sua solidificação até que a homogeneização com o precipitado seja concluída. No método “ágar” modificado por Choi e col. 2014, dois tipos de agarose foram usados em cada amostra: primeiro a tipo ULGT, que não solidifica à temperatura ambiente e facilita a homogeneização e, em seguida, a agarose padrão²⁴. A modificação proposta neste estudo prévio, apesar de melhorar a distribuição celular e, conseqüentemente a qualidade dos resultados, aumenta o tempo e custo da execução.

A distribuição e a morfologia dos agrupamentos e das células foram adequadas no presente estudo. Jain e col. (2014) destacaram possíveis artefatos técnicos relacionados ao aquecimento: grandes vacúolos citoplasmáticos, citoplasma denso e retração celular⁴⁵.

No presente estudo, as amostras com grande quantidade de sedimento geralmente são ricas em proteínas as quais causam reações inespecíficas na

imunocitoquímica dificultando a interpretação nos preparados citológicos. Os resultados da imunocitoquímica foram satisfatórios.

6.6 Perspectivas

Além da sua aplicação na rotina diagnóstica para pesquisa de câncer em laboratórios de Anatomia patológica, o método “plasma-tromboplastina” têm sido recentemente descrito em estudos experimentais para formação de “cell block” de células cultivadas em aderência e em suspensão. O “cell block” formado é subsequentemente usado para a construção tissue micro arrays (TMA) e análise citológica e imunocitoquímica das linhagens celulares.

7 CONCLUSÕES

- O método “plasma-tromboplastina” se aplica em amostras de líquido pleural, peritoneal e pericárdico, lavados peritoneal e broncoalveolar e líquor, principalmente em amostras sem sedimento ou com pequena quantidade de sedimento e em amostra com sedimento de sangue. O método “ágar” pode ser empregado como uma alternativa para amostras com mais sedimento e com anticoagulante.
- O método “plasma-tromboplastina” se aplica na rotina diagnóstica do laboratório de Anatomia Patológica por ser um método é tecnicamente viável.
- Foram observadas nas amostras preparadas pelo método “plasma-tromboplastina” celularidade e distribuição celular adequadas com preservação da morfologia dos agrupamentos e das células. O padrão de marcação imunocitoquímica foi semelhante ao observado em citocentrifugados. A presença de fragmentos de tecido e a facilidade na interpretação morfológica e imunocitoquímica podem ser consideradas as principais vantagens do “cell block” preparado pelo método “plasma-tromboplastina” em relação ao citocentrifugado.
- A concordância elevada entre o citocentrifugado e o “cell block” preparado pelo método “plasma-tromboplastina” para o diagnóstico de câncer e, principalmente, a detecção de câncer apenas no “cell block” em algumas amostras sugere que o método pode diminuir os resultados falsos-negativos do citocentrifugado.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 Estimativa 2016/2017: incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer. – Rio de Janeiro: INCA, 2016.
- 2 CHANDRA A, CROSS P, DENTON K, GILES T, HEMMING D, PAYNE C, WILSON A, WILSON P. The BSCC code of practice--exfoliative cytopathology (excluding gynaecological cytopathology). *Cytopathology*. 2009; 20(4):211-23.
- 3 HENDERSON DW, REID G, KAO SC, VAN ZANDWIJK N, KLEBE S. Challenges and controversies in the diagnosis of mesothelioma: Part 1. Cytology-only diagnosis, biopsies, immunohistochemistry, discrimination between mesothelioma and reactive mesothelial hyperplasia, and biomarkers. *J Clin Pathol*. 2013; 66(10):847-53.
- 4 VENTURA KC, YANG GC, LEVINE PH. Atypical papillary proliferation in gynecologic patients: a study of 32 pelvic washes. *Diagn Cytopathol*. 2005; 32(2):76-81.
- 5 LIU J, JIA H, YANG Y, DAI W, SU X, ZHAO G. Cerebrospinal fluid cytology and clinical analysis of 34 cases with leptomeningeal carcinomatosis. *J Int Med Res*. 2009; 37(6):1913-20.
- 6 SINGH G, MATHUR SR, IYER V K, JAIN D. Cytopathology of neoplastic meningitis: A series of 66 cases from a tertiary care center. *CytoJournal* 2013; 10:13.
- 7 HYUN TS, BARNES M, TABATABAI ZL. The diagnostic utility of D2-40, calretinin, CK5/6, desmin and MOC-31 in the differentiation of mesothelioma from adenocarcinoma in pleural effusion cytology. *Acta Cytol*. 2012; 56(5):527-32.
- 8 JALAL R, AFTAB K, HASAN SH, PERVEZ S. Diagnostic value of clot examination for malignant cells in serous effusions. *Cytopathology*. 2009; 20(4):231-4.
- 9 GONG Y, SUN X, MICHAEL CW, ATTAL S, WILLIAMSON BA, BEDROSSIAN CW. Immunocytochemistry of serous effusion specimens: a comparison of ThinPrep vs cell block. *Diagn Cytopathol*. 2003; 28(1):1-5.
- 10 NIGRO K, TYNSKI Z, WASMAN J, ABDUL-KARIM F, WANG N. Comparison of cell block preparation methods for nongynecologic ThinPrep specimens. *Diagn Cytopathol*. 2007; 35(10):640-3.
- 11 KULKARNI MB, DESAI SB, AJIT D, CHINOY RF. Utility of the thromboplastin-plasma cell-block technique for fine-needle aspiration and serous effusions. *Diagn Cytopathol*. 2009; 37(2):86-90.
- 12 JING X, LI QK, BEDROSSIAN U, MICHAEL CW. Morphologic and immunocytochemical performances of effusion cell blocks prepared using 3 different methods. *Am J Clin Pathol*. 2013; 139(2):177-82.

- 13 FETSCH PA, SIMSIR A, BROSKY K, ABATI A. Comparison of three commonly used cytologic preparations in effusion immunocytochemistry. *Diagn Cytopathol.* 2002; 26(1):61-6.
- 14 SELVAGGI SM. Diagnostic pitfalls of peritoneal washing cytology and the role of cell blocks in their diagnosis. *Diagn Cytopathol.* 2003; 28(6):335-41.
- 15 KEYHANI-ROFAGHA S, VESEY-SHECKET M. Diagnostic value, feasibility, and validity of preparing cell blocks from fluid-based gynecologic cytology specimens. *Cancer.* 2002; 96(4):204-9.
- 16 SHUKLA P, KAUR S, GULWANI HV. Diagnostic utility of Plasma Thromboplastin cell block preparation in cytological evaluation of serous effusions. *International Journal of Biomedical Research* 2015; 6(11): 890-896.
- 17 KHAN S, OMAR T, MICHELOW P. Effectiveness of the cell block technique in diagnostic cytopathology. *J Cytol.* 2012; 29:177–82.
- 18 BALES CE. Cytological technique, volume 2. In: Koss LG, ed. *Diagnostic Cytology and Its Histopathologic Bases.* 5th ed. Philadelphia, PA: Lippincott; 2006. p.1590-1592.
- 19 NAYLOR B. Pleural, Peritoneal, and Pericardial Effusions, part 2. In: Bibbo M, Wilbur D. *Comprehensive Cytopathology.* Philadelphia, PA: W. B. Saunders Company; 3rd ed. 2008. p. 515-77.
- 20 SHIDHAM VB, EPPLE J. APPENDIX 1. ATKINSON BF. Collection and processing of effusion fluids. In Shidham, Atkinson BF, ed. *Cytopathologic Diagnosis of Serous Fluids.* Philadelphia, PA: W. B. Saunders Company; 1st ed. 2007. p 207-37.
- 21 SMEDTS F, SCHRIK M, HORN T, HOPMAN AH. Diagnostic value of processing cytologic aspirates of renal tumors in agar cell (tissue) blocks. *Acta Cytol.* 2010; 54:587–94.
- 22 KERSTENS HM, ROBBEN JC, Poddighe PJ, MELCHERS WJ, BOONSTRA H, DE WILDE PC, MACVILLE MV, HANSELAAR AG. AgarCyto: a novel cell-processing method for multiple molecular diagnostic analyses of the uterine cervix. *J Histochem Cytochem.* 2000; 48(5):709-18.
- 23 KRUGER AM, STEVENS MW, KERLEY KJ, CARTER CD. Comparison of the Cellient[™] automated cell block system and agar cell block method. *Cytopathology.* 2014; 25(6):381-8.
- 24 CHOI SJ, CHOI YI, KIM L, PARK IS, HAN JY, KIM JM, CHU YC. Preparation of compact agarose cell blocks from the residues of liquid-based cytology samples. *Korean J Pathol.* 2014; 48(5):351-60.
- 25 MANSY SS, ABBAS MA, YEHIA HA, ABDELRAZIK SM, GHANEM LY, AMIN TM. Value of the innovated technique agarose cell block in improving the sensitivity of

- urine cytology in cases of bladder carcinoma. *Ultrastruct Pathol.* 2006; 30(5):379-85.
- 26 MANSY SS. Agarose cell block: innovated technique for the processing of urine cytology for electron microscopy examination. *Ultrastruct Pathol.* 2004; 28(1):15-21.
 - 27 VARSEGI GM, SHIDHAM V. Cell block preparation from cytology specimen with predominance of individually scattered cells. *J Vis Exp.* 2009;pii:1316.
 - 28 COLLINS GR, THOMAS J, JOSHI N, ZHANG S. The diagnostic value of cell block as an adjunct to liquid-based cytology of bronchial washing specimens in the diagnosis and subclassification of pulmonary neoplasms. *Cancer Cytopathol.* 2012;120(2):134-41.
 - 29 MONTGOMERY E, GAO C, DE LUCA J, BOWER J, ATTWOOD K, YLAGAN L. Validation of 31 of the most commonly used immunohistochemical antibodies in cytology prepared using the Cellient® automated cell block system. *Diagn Cytopathol.* 2014;42(12):1024-33.
 - 30 FAHEY C, BEDROSIAN UK. Collodion bag: a cell block technique for enhanced cell collection. *Lab Med.* 1993; 74:94–6.
 - 31 HE QL, ZHU YZ, ZHENG GJ, SHI LC, HU SW, LI CT. A new convenient technique for making cell blocks. *Cell Tissue Res.* 2012; 350:395–400.
 - 32 NODA Y, FUJITA N, KOBAYASHI G, ITOH K, HORAGUCHI J, TAKASAWA O, OBANA T, KOSHITA S, KANNO Y, SUZUKI T, HIRASAWA D, SUGAWARA T, OHIRA T, HARADA Y, TSUCHIYA T, SAWAI T, UZUKI M, KUROSE A. Diagnostic efficacy of the cell block method in comparison with smear cytology of tissue samples obtained by endoscopic ultrasound-guided fine-needle aspiration. *J Gastroenterol.* 2010; 45:868–75.
 - 33 MAYALL FG. An FNA cytology foam core device formaking cell blocks. *J Clin Pathol.* 2012; 65:959–61.
 - 34 WEN CH, TSAO SC, SU YC, WU CC, CHAI CY. Utility ofthe capsule-based technique for cell block preparation – in body fluids and Liqui-PREPTM specimens. *Acta Cytol.* 2011; 55:460–6.
 - 35 YUNG RC, OTELL S, ILLEI P, CLARK DP, FELLER-KOPMAN D, YARMUS L, ASKIN F, GABRIELSON E, LI QK. Improvement of cellularity on cell block preparations using the so-called tissue coagulum clot method during endobronchial ultrasound-guided transbronchial fine-needle aspiration. *Cancer Cytopathol.* 2012; 120:185–95.
 - 36 BELLIZZI AM, STELOW EB. Pancreatic cytopathology: apractical approach and review. *Arch Pathol Lab Med.* 2009; 133:388–404.

- 37 KHURANA U, HANDA U, MOHAN H, SACHDEV A. Evaluation of aspiration cytology of the liver space occupying lesions by simultaneous examination of smears and cell blocks. *Diagn Cytopathol.* 2009; 37: 557–63.
- 38 WAGNER DG, RUSSELL DK, BENSON JM, SCHNEIDER AE, HODA RS, BONFIGLIO TA. Cellient™ automated cell block versus traditional cell block preparation: a comparison of morphologic features and immunohistochemical staining. *Diagn Cytopathol.* 2011; 39:730–6.
- 39 HECHT SA, MCCORMACK M. Comparison of three cell block techniques for detection of low frequency abnormal cells. *Pathol Lab Med Int.* 2013; 5:1–7.
- 40 BOON ME. The Cellient system for paraffin histology can be combined with HPV testing and morphotyping the vaginal microbiome thanks to boon fixing. *Obstet Gynecol Int.* 2013; 2013:502357.
- 41 XING W, HOU AY, FISCHER A, OWENS CL, JIANG Z. The Cellient automated cell block system is useful in the differential diagnosis of atypical glandular cells in Papanicolaou tests. *Cancer Cytopathol.* 2014; 122:8–14.
- 42 VAN HEMEL BM, SUURMEIJER AJ. Effective application of the methanol-based PreservCyt(TM) fixative and the Cellient(TM) automated cell block processor to diagnostic cytopathology, immunocytochemistry, and molecular biology. *Diagn Cytopathol.* 2013; 41: 734–41.
- 43 GORMAN BK, KOSARAC O, CHAKRABORTY S, SCHWARTZ MR, MODY DR. Comparison of breast carcinoma prognostic/predictive biomarkers on cell blocks obtained by various methods: Cellient, formalin and thrombin. *Acta Cytol.* 2012; 56:289–96.
- 44 PRENDEVILLE S, BROSNA T, BROWNE TJ, MCCARTHY J. Automated Cellient™ cytoblocks: better, stronger, faster? *Cytopathology.* 2014; 25:372–80.
- 45 JAIN D, MATHUR SR, IYER VK. Cell blocks in cytopathology: a review of preparative methods, utility in diagnosis and role in ancillary studies. *Cytopathology.* 2014; 25(6):356-71.
- 47 THAPAR M, MISHRA RK, SHARMA A, GOYAL V, GOYAL V. Critical analysis of cellblock versus smear examination in effusions. *J Cytol.* 2009; 26(2):60-4.
- 48 SHIVAKUMARSWAMY U, ARAKERI SU, KARIGOWDAR MH, YELIKAR B. Diagnostic utility of the cell block method versus the conventional smear study in pleural fluid cytology. *J Cytol.* 2012; 29(1):11-5.
- 49 SHIVAKUMARSWAMY U, ARAKERI SU, KARIGOWDAR MH, YELIKAR B. The Role of the Cell Block Method in the Diagnosis of Malignant Ascitic Fluid Effusions. *Journal of Clinical and Diagnostic Research,* 2012 (Suppl); 6(7):1280-83.

- 50 LOUKERIS K, VAZQUEZ MF, SICA G, WAGNER P, YANKELEVITZ DF, HENSCHKE CI, CHAM MD, SAQI A. Cytological cell blocks: Predictors of squamous cell carcinoma and adenocarcinoma subtypes. *Diagn Cytopathol.* 2012; 40(5):380-7.
- 51 WANG P, GAO Q, SUO Z, MUNTHE E, SOLBERG S, MA L, WANG M, WESTERDAAL NA, KVALHEIM G, GAUDERNACK G. Identification and characterization of cells with cancer stem cell properties in human primary lung cancer cell lines. *PLoS One.* 2013; 8(3):e57020.
- 52 ZANINI C, FORNI M. The cell block technique revisited for cells cultured in adherence and as "spheres". *Histochem Cell Biol.* 2013; 140(6):685-90.

APENDICE A

Anticorpos primários usados na imunocitoquímica e seus respectivos, clones, diluições, controles e padrões de marcação.

Anticorpo	Marca Anti-Corpo	Clone	Diluição	Controle
Anti-Célula Mesotelial	CELL MARQUE	HBME-1	1:50	Carcinoma papilífero (tireoide)
Calretinin	DAKO	DAK-Calret 1	1:50	Carcinoma de adrenal
CD68	BIOCARE	KP1	1:100	Amígdala
CDx2	Abcam	AMT28	1:50	Carcinoma de colon
Chromogranin A	DAKO	DAK-A3	1:50	Tumor endócrino
Cytokeratin (PANCK)	DAKO	AE1/AE3	1:50	Epitélio
DESMINA	DAKO	D33	1:80	Hemorroidas
Epithelial Related Atigen	DAKO	MOC-31	1:100	Mucosa intestinal
Estrogen Receptor	LEICA/ NOVOCASTRA	6F11	1:100	Mama
IMP3	DAKO	69.1	1:500	Carcinoma gástrico
KI67	BIOCARE	SP6	1:50	Amígdala
Melan-A	DAKO	A103	1:25	Pele
Receptor Estrogen	DAKO	6F11	1:50	Mama
Wilms' Tumor 1 (WT1)	DAKO	6F-H2	1:300	Rim

APENDICE B

Diagnósticos histopatológicos e clínicos, obtidos dos prontuários dos pacientes, de acordo com o tipo de amostra

DIAGNÓSTICO	Líquido pleural	Líquido ascítico	Líquido pericárdico	Lavado broncoalveolar	Lavado peritoneal	Líquor	Urina	aspirado
Adenocarcinoma de pulmão	1			2		1		
Carcinoma epidermoide de pulmão				7		2		
Carcinoma de pequenas células de pulmão	3			1				
Carcinoma de pulmão sem outras especificações	2			4				
Carcinoma de mama	4				2	3		
Carcinoma de ovário	2	2			4	3		
Carcinoma de endométrio					7			
Carcinoma de colo uterino					2			
Carcinoma de cólon	1	3		1	1	1		
Carcinoma de estômago		7			3			
Carcinoma de pâncreas		2						
Carcinoma de vesícula biliar		1						
Carcinoma em pleura	7							
Carcinoma em peritônio		8			2			
Carcinoma neuroendócrino de pulmão				2				
Carcinoma papilífero da tireóide								1
Melanoma	1							
GIST		1						
Linfoma	3					3		
Tumor <i>borderline</i> de ovário		1			3			
Teratoma ovariano					7			
Cistadenoma de ovário		1			16			
Tumor de Brenner					1			
Abscesso ovariano					1			
Cisto ovariano					2			
Endometriose		1			3			
Duplicação intestinal					1			
Leiomioma uterino					1			
Adenoma intestinal		3						
Pneumonia	1			1				
Tuberculose		1		1				
Hidronefrose		1						
Fibroadenoma								3
Pleurite	1							
Neoplasia urotelial papilífera de baixo potencial de malignidade							1	
Diagnóstico indefinido	44	32	3	51	2	6	0	10
Total	70	64	3	70	58	19	1	14

GIST (gastrointestinal stromal tumor)

APENDICE C

REVISTA BRASILEIRA DE CIÊNCIAS DA SAÚDE (RBCS/UFPB)

ROTEIRO DE AVALIAÇÃO

ID27002

Título APLICAÇÃO DO MÉTODO PLASMA-TROMBOPLASTINA NO PREPARO DE AMOSTRAS CITOLÓGICAS PARA PESQUISA DE CÂNCER NO LABORATÓRIO DE ANATOMIA PATOLÓGICA

1. AVALIAÇÃO GERAL: O tema abordado é relevante, apresenta importância metodológica para atividades laboratoriais úteis em diagnóstico de doenças de impacto epidemiológico.

2. AVALIAÇÃO ESPECÍFICA: Avalie o manuscrito em relação aos seguintes itens:

A) Título: descreve adequadamente o que foi investigado? **SIM**

- Resumo: O resumo necessita de adequações estruturais, atualização de tempo verbal quando se refere aos objetivos, uma vez que o estudo já foi realizado (e não “será”)

B) Introdução:

- O autor faz uma problematização adequada do tema investigado, salientando a relevância do estudo em relação ao corpo de conhecimento existente? **SIM**
- Utiliza literatura atualizada para justificar o estudo? **De 20 artigos utilizados, 6 são dos últimos 5 anos. A especificidade do método pode justificar essa apresentação de artigos.**
- Os objetivos estão redigidos de forma clara, objetiva e traduzem integralmente o que foi investigado? **SIM**
- C. Método: Os métodos e procedimentos de coleta e de análise de dados estão descritos com clareza e são adequados? **SIM**
- D. Resultados: Os resultados foram apresentados com clareza no texto e disponibilizados adequadamente em tabelas e figuras (se aplicável), sem duplicação da informação? **SIM**
- E. Discussão e conclusão: O autor discute os resultados encontrados no estudo e relaciona-os com evidências de outros estudos da área, utilizando argumentação adequada para subsidiar a interpretação dos dados do estudo? **SIM**

- São identificadas e justificadas algumas limitações do estudo? **SIM**

- São identificadas as implicações/aplicações do estudo para a área de Ciências da

Saúde? **SIM**

- O autor conclui o estudo de forma adequada, baseado no que foi investigado e nos resultados obtidos? **SIM**

F. Referências: as referências bibliográficas utilizadas são adequadas (Vancouver) e atuais? **SIM**

3. CONCLUSÃO: Assinale uma das opções abaixo e, se possível, justifique sua decisão.

() Aceitação sem modificações;

(X) Aceitação com pequenas modificações, sem necessidade de nova revisão;

() Aceitação condicional, com necessidade de grandes modificações e nova revisão;

() Rejeição com a possibilidade de uma grande revisão do texto e submissão como um novo manuscrito, e portanto, iniciando um novo processo de avaliação;

() Não adequado para publicação.

Observações:

Há necessidade de adequações na formatação (espaçamentos)

Há autor citado no corpo do texto sem a identificação por número

Dimensões

O texto completo (título, autores, resumo, abstract, corpo do trabalho com figuras e referencias) deve estar contido em 15 páginas, digitadas em word com margens de **2,5**, espaço 1,5 e **fonte arial 11**.

O resumo necessita de adequações estruturais, atualização de tempo verbal quando se refere aos objetivos, uma vez que o estudo já foi realizado (e não "será")

Observar o seguinte:

Há necessidade de adequações na formatação (espaçamentos)

Há autor citado no corpo do texto sem a identificação por número

Dimensões

O texto completo (título, autores, resumo, abstract, corpo do trabalho com figuras e referencias) deve estar contido em 15 páginas, digitadas em word com margens de 2,5, espaço 1,5 e fonte arial 11.

ANEXO A