

# Aplicação do Método “Plasma-Tromboplastina/Trombina” no Preparo de Amostras Citológicas para Pesquisa de Câncer no Laboratório de Anatomia Patológica

## Application of the “Plasma-Thromboplastin/Thrombin” Method for Preparation of Cytological Samples for Cancer Research in Pathological Anatomy Laboratories

TERCIA MARIA MENDES LOUSA DE CASTRO<sup>1</sup>  
MARCOS DE VASCONCELOS CARNEIRO<sup>2</sup>  
VÂNIA MARIA MORAES FERREIRA<sup>3</sup>  
ANDREA BARRETO MOTOYAMA<sup>4</sup>  
FABIANA PIRANI CARNEIRO<sup>5</sup>

### RESUMO

**Objetivo:** Realizar uma revisão da literatura sobre a aplicação do método “plasma-tromboplastina/trombina” no preparo de “cell block” de amostras citológicas para pesquisa de câncer no laboratório de Anatomia Patológica. **Material e Métodos.** Para a elaboração do estudo foram realizadas buscas na base de dados PubMed, SciELO e LILACS utilizando os descritores “Cell block effusion”, “Cell block preparation” e “Cell block method”. **Resultados:** O método “plasma-tromboplastina/trombina” tem sido descrito no preparo de diferentes tipos de amostras citológicas: efusões (líquidos das cavidades pleural, peritoneal, pericárdica), lavado peritoneal, aspirados e amostras em meio líquido. 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. Os estudos que comparam o método “plasma-tromboplastina/trombina” com outros métodos 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 sobre suas vantagens sobre outras técnicas. Os métodos mais usados no preparo do “cell block” são os que utilizam ágar e plasma-tromboplastina/trombina. As vantagens do “método plasma-tromboplastina” em relação aos outros métodos são execução fácil, baixo custo, ausência de artefatos celulares relacionados ao aquecimento, melhor celularidade, melhor distribuição celular e melhores resultados da imunocitoquímica. **Conclusão:** O “cell block” preparado pelo método “plasma-tromboplastina/trombina” pode ser considerado uma ferramenta diagnóstica complementar ao citocentrifugado e aplicável na rotina de laboratórios de Anatomia Patológica públicos e privados para a pesquisa de câncer.

### DESCRIPTORIOS

Imunocitoquímica. Citologia. “Cell Block”. Método “Plasma-Tromboplastina”.

### ABSTRACT

**Objective:** To perform a literature review on the application of the “plasma-thromboplastin/thrombin” method for cell block preparation of cytological samples in cancer research in pathological anatomy laboratories. **Material and Methods:** Bibliographical searches were carried out in the databases PubMed, SciELO and LILACS using the descriptors “cell block effusion”, “cell block preparation” and “cell block method”. **Results:** The “plasma-thromboplastin/thrombin” method has been described for preparation of different types of cytological samples, including effusions (liquids from the pleural, peritoneal and pericardial cavities), peritoneal lavage, aspirated samples, and samples in liquid medium. The description of the technique was not reported in some studies or was performed just partially. Variations in the studies were found with regard to centrifugation time and speed, as well as to quantity of plasma, thrombin and thromboplastin used. Only a few studies have compared the “plasma-thromboplastin/thrombin method” with other cell block preparation methods using different types of samples. The studies have frequently included a small sample size, which makes it difficult to establish a solid conclusion on the advantages of this method over other approaches. The most commonly used methods for cell block preparation include those using agar and thromboplastin/thrombin. The advantages of the “plasma/thromboplastin” method in relation to other methods are easiness to implement, low cost, no cell artifacts related to heating, better cellularity, better cellular distribution and better immunocytochemistry results. **Conclusion:** Cell block preparation using the plasma-thromboplastin/thrombin method can be considered a diagnostic tool adjunctive to the cytocentrifuged one that is applicable to the routine of public and private pathological anatomy laboratories for cancer research.

### DESCRIPTORS

Immunocytochemistry. Cytology. “Cell Block”. “Plasma-Thromboplastin” Method.

- 1 Mestranda do Curso de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília (UNB), Brasília-DF
- 2 Professor Doutor do Curso de Medicina da Universidade Católica de Brasília (UCB), Brasília-DF
- 3 Professora Associada da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília (UNB), Brasília-DF
- 4 Professora Adjunta da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília (UNB), Brasília-DF
- 5 Professora Adjunta da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília (UNB) e do Curso de Medicina da Universidade Católica de Brasília (UCB), Brasília-DF

**D**e acordo com as estimativas 2016/2017, o Brasil deverá registrar no próximo ano 596 mil casos de câncer segundo o INCA (Instituto Nacional do Câncer)<sup>1</sup>. A análise de amostras citológicas é um procedimento de rotina no diagnóstico e acompanhamento de pacientes com cânceres de elevada incidência e morbimortalidade como carcinomas de mama, pulmão, cólon, estômago e tireoide<sup>2</sup>. A citologia é um método diagnóstico acessível, rápido, de baixo custo e pouco invasivo, mas apresenta sensibilidade e especificidade baixas decorrentes principalmente da escassez de células neoplásicas encontradas nas amostras, sendo muitas vezes difícil diferenciar, neste exame, as células benignas das malignas ou mesmo identificar a origem de uma célula neoplásica<sup>3-5</sup>. Esta limitação do exame citológico na pesquisa de células neoplásicas do paciente com câncer resulta inevitavelmente em diagnósticos e tratamentos tardios, erros no estadiamento e prognóstico e uso de técnicas diagnósticas invasivas. 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<sup>6,7</sup>.

“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<sup>2</sup>. Na rotina diagnóstica, o “cell block” é um método complementar de preparo de amostras de citologia esfoliativa (efusões/líquidos das cavidades pleural, peritoneal e pericárdica, lavados peritoneais e broncoalveolar, liquor) e citologia aspirativa<sup>2</sup>. Nas 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<sup>8,9</sup>. Dentre os métodos de preparação de “cell block” descritos, o método “plasma-tromboplastina/trombina” tem sido considerado uma técnica de fácil execução e de melhor qualidade para aplicação de imunocitoquímica<sup>10-13</sup>. 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. Através deste método “plasma-tromboplastina/trombina”, a princípio, qualquer e toda a amostra poderia ser arquivada e ser utilizada para estudo imunocitoquímico. O objetivo deste estudo foi, portanto, realizar uma revisão da literatura sobre a aplicação método “plasma-tromboplastina/trombina” no preparo de diferentes amostras citológicas para pesquisa de câncer.

## MATERIAL E MÉTODOS

Para a elaboração da revisão, buscas nas bases de dados PubMed, SciELO e LILACS foram realizadas utilizando os descritores “Cell block effusion”, “Cell block preparation”, “Cell block method” e “cell block immunocytochemistry”. Posteriormente, uma busca nas referências dos artigos selecionados foi realizada. Dentre os artigos relacionados ao tema, 25 foram selecionados, todos com idioma em inglês e do tipo original ou de revisão. Todos os artigos encontrados sobre o método “plasma-tromboplastina/trombina” no preparo de amostras citológicas para diagnóstico foram incluídos. Dentre os artigos sobre os outros métodos de preparo de “cell block”, apenas os mais recentes, relevantes e aqueles nos quais o método foi usado para diagnóstico de amostras citológicas foram incluídos.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Tipos das amostras citológicas

O método “plasma-tromboplastina/trombina” 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.

## 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 formol e submetido a processamento histológico habitual. Se as amostras estiverem fixadas em álcool ou formol, elas devem ser lavadas com salina ou PBS (phosphate buffered saline) para não prejudicar a formação do coágulo<sup>17</sup>. 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 foi de 5 min e o formol foi utilizado na fixação do coágulo<sup>12,14,17</sup>. Até duas tentativas adicionais sucessivas para a formação do coágulo são relatadas<sup>17</sup>.

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 amostra.

Um método de preparo de “cell block” de amostras com grande quantidade de sedimento, amplamente usado nos laboratórios de Anatomia

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

Tipo	Número	Volume	Estudos
Efusões	29	-	Fetsch <i>et al.</i> (2002) <sup>14</sup>
	38	10-20ml	Kulkarni <i>et al.</i> (2009) <sup>12</sup>
	25	50ml	Jing <i>et al.</i> (2013) <sup>13</sup>
	100	10ml	Shukla <i>et al.</i> (2015) <sup>15</sup>
Lavado peritoneal	10	-	Selvaggi (2003) <sup>16</sup>
Aspirado por agulha fina	32	-	Kulkarni <i>et al.</i> (2009) <sup>12</sup>
Citologia em base líquida não ginecológica	12	30ml	Nigro <i>et al.</i> (2007) <sup>10</sup>
Citologia em base líquida ginecológica	125	50ml	Keyhani-Rofagha & Vesey-Sheket (2002) <sup>17</sup>

**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 <sup>fetsch</sup> , 1500 rpm <sup>keyhani</sup> , 2320 rpm <sup>jing</sup> , 2500rpm <sup>shukla</sup>
Tempo de centrifugação	10 min <sup>fetsch,shukla</sup> , 5 min <sup>keyhani,jing</sup>
Plasma	6 gotas <sup>nigro</sup> , 2 gotas <sup>kulkami,shukla</sup> , 2,3 gotas <sup>jing</sup> , 2,3 gotas<3ml (sedimento)>4-10 gotas <sup>keyhani</sup>
Trombina	2,3 gotas <sup>jing</sup> , 1ou2 gotas <3ml de sedimento>3ou4gotas <sup>keyhani</sup>
Tromboplastina	6 gotas <sup>nigro</sup> , 4 gotas <sup>kulkami</sup> , 2 gotas <sup>shukla</sup>

Patológica, pela facilidade de execução da técnica, é a sedimentação simples. A técnica 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 parafina<sup>18,19,20</sup>. 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”<sup>21</sup>.

A maioria das amostras se apresenta sem ou com pequena quantidade de sedimento, sendo o “cell block” destas amostras preparados adicionando-se ao precipitado substâncias como Histogel, ágar, albumina, e plasma com tromboplastina/trombina<sup>21-23,10</sup>. Dentre estas, as mais usadas são ágar e plasma- tromboplastina/trombina<sup>21</sup>. 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<sup>13,21</sup>. Nigro *et al.* (2007) observaram que o “cell block” de amostras em base líquida preparado pelo método “plasma-tromboplastina/trombina” 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 albumina<sup>10</sup>. O método “plasma-tromboplastina/trombina” é uma técnica de execução fácil quando comparada com o método “ágar”<sup>12</sup>. Os estudos que comparam o método “plasma-tromboplastina/trombina” 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 sobre 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 laboratórios<sup>24, 25</sup>.

## Comparação com o citocentrifugado

Em amostras de efusões (líquidos pleural, peritoneal e pericárdico) o “cell block” preparado pelo método “plasma-tromboplastina/trombina” apresenta melhor custo-benefício quando comparado com o citocentrifugado, principalmente quando se aplica a imunocitoquímica<sup>14</sup>. O estudo imunocitoquímico no “cell block” apresenta como vantagens a facilidade de interpretação, a menor coloração de fundo, permitir a utilização de um maior número de anticorpos e disponibilidade de arquivamento e uso em estudos futuros<sup>14</sup>. Dentre as desvantagens, destaca-se o maior custo, a necessidade de um tempo maior para execução do método e, conseqüentemente, um atraso no diagnóstico<sup>14</sup>. 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 imunocitoquímica<sup>16</sup>. 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 do aumento do custo e tempo de execução<sup>17</sup>. O custo adicional e específico do emprego do método do método “plasma-tromboplastina/trombina” se refere à aquisição da tromboplastina, 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.

## CONCLUSÃO

O método “plasma-tromboplastina/trombina” tem sido usado no preparo de diferentes tipos de amostras citológicas sendo considerado uma técnica viável tecnicamente e financeiramente. O método se

aplica na maioria das amostras, principalmente em amostras sem sedimento ou com pequena quantidade de sedimento. O método apresenta algumas vantagens em relação ao citocentrifugado e outros métodos de preparo de “cell block”, principalmente se há necessidade de imunocitoquímica. Portanto, o “cell

block” preparado pelo método “plasma-tromboplastina/trombina” pode ser considerado uma ferramenta diagnóstica complementar ao citocentrifugado e aplicável na rotina de laboratórios de Anatomia Patológica públicos e privados para a pesquisa de câncer.

## REFERÊNCIAS

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;2013(10):1-8.
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. 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.
12. 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.
13. 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.
14. 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.
15. Shukla P, Kaur S, Gulwani HV. *International Journal of Biomedical Research* 2015; 6 (1): 890-896.
16. Selvaggi SM. Diagnostic pitfalls of peritoneal washing cytology and the role of cell blocks in their diagnosis. *Diagn Cytopathol.* 2003; 28(6):335-41.
17. Keyhani-Rofagha S, Vesey-Sheket M. Diagnostic value, feasibility, and validity of preparing cell blocks from fluid-based gynecologic cytology specimens. *Cancer.* 2002 25; 96(4):204-9.
18. 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.
19. 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.
20. 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), Vol-6(7): 1280-1283.

21. 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.
22. 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.
23. 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.
24. Wagner DG, Russell DK, Benson JM *et al.* CellientTM automated cell block versus traditional cell block preparation: a comparison of morphologic features and immunohistochemical staining. *Diagn Cytopathol* 2011; 39(10):730-6.
25. Prendeville S, Brosna T, Browne TJ, McCarthy J. Automated CellientTM cytoblocks: better, stronger, faster? *Cytopathology* 2014; 25(6):372-80

**Correspondência**

Fabiana Pirani Carneiro, M.D.

Centro de Anatomia Patológica

Hospital Universitário de Brasília, UNB

Via L2 Norte, SGAN 604/605

Brasília – Goiás - Brasil - CEP: 70840-050

E-mail: [fabianapirani@hotmail.com](mailto:fabianapirani@hotmail.com)