

Organizadores

Thiago Beltrami Dias Batista
Aline Cristina Batista Rodrigues Johann
Renata Iani Werneck
Edvaldo Antonio Ribeiro Rosa
Luciana Reis Azevedo Alanis

Manual Técnico de Processamento de Materiais em Citologia Clínica

Organizadores

Thiago Beltrami Dias Batista

Aline Cristina Batista Rodrigues Johann

Renata Iani Werneck

Edvaldo Antonio Ribeiro Rosa

Luciana Reis Azevedo Alanis

Manual Técnico de Processamento de Materiais em Citologia Clínica



Curitiba
2019

©2019, Thiago Beltrami Dias Batista e outros
2019, PUCPRESS

Este livro, na totalidade ou em parte, não pode ser reproduzido por qualquer meio sem autorização expressa por escrito da Editora.

Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR)

Reitor

Waldemiro Gremski

Vice-reitor

Vidal Martins

Pró-Reitora de Pesquisa, Pós-Graduação e Inovação

Paula Cristina Trevilatto

Conselho Editorial

Alex Villas Boas Oliveira Mariano

Aléxei Volaco

Carlos Alberto Engelhorn

Cesar Candiottto

Cilene da Silva Gomes Ribeiro

Cloves Antonio de Amíssis Amorim

Criselli Maria Montipó

Eduardo Damião da Silva

Evelyn de Almeida Orlando

Fabiano Borba Viana

Katya Kozicki

Kung Darh Chi

Léo Peruzzo Jr.

Luis Salvador Petrucci Gnoato

Marcia Carla Pereira Ribeiro

Rafael Rodrigues Guimarães Wollmann

Rodrigo Moraes da Silveira

Ruy Inácio Neiva de Carvalho

Suyanne Tolentino de Souza

Vilmar Rodrigues Moreira

PUCPRESS

Coordenação

Michele Marcos de Oliveira

Edição

Susan Cristine Trevisani dos Reis

Edição de arte

Rafael Matta Carnasciali

Preparação de texto

Susan Cristine Trevisani dos Reis

Revisão

Camila Fernandes de Salvo

Projeto Gráfico

Ana Paula Vicentin Ferrarini

Capa

Ana Paula Vicentin Ferrarini

Diagramação

Ana Paula Vicentin Ferrarini

Imagens da Capa e Miolo

Montagens à partir de foto cedida pelos autores

PUCPRESS / Editora Universitária Champagnat

Rua Imaculada Conceição, 1155 – Prédio da Administração – 6º andar

Campus Curitiba – CEP 80215-901 – Curitiba / PR

Tel. +55 (41) 3271-1701

pucpress@pucpr.br

Dados da catalogação na publicação

Pontifícia Universidade Católica do Paraná

Sistema Integrado de Bibliotecas – SIBI-PUCPR

Biblioteca Central

Edilene de Oliveira dos Santos CRB 9/1636

M294
2019

Manual técnico de processamento de materiais em citologia clínica /
organizadores, Thiago Beltrami Dias Batista ... [et al.].
Curitiba : PUCPRESS, 2019
34 p. ; 23 cm

Inclui bibliografias

ISBN 978-85-54945-42-8

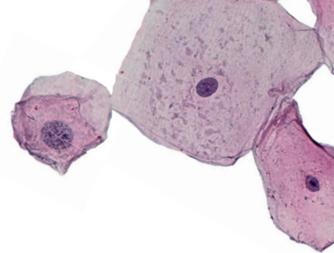
ISBN 978-85-54945-41-1 (e-book)

1. Tecnologia de laboratórios médicos. 2. Imuno-histoquímica. 3. Diagnóstico de laboratório. 4. Citologia. 5. Câncer – Citodiagnóstico. I. Batista, Thiago Beltrami Dias.

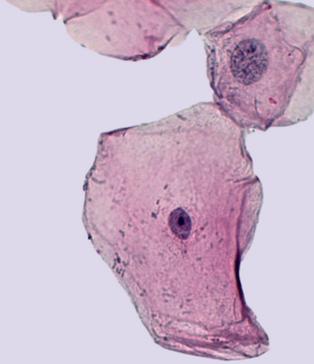
19-033

CDD 23. ed. – 616.075078

Sumário



1. Apresentação	5
2. Coleta e processamento pela técnica de citologia esfoliativa	6
2.1. Citologia convencional	7
2.2. Citologia em meio líquido	8
3. Coloração Papanicolaou	10
3.1. Protocolo de coloração	11
3.2. Interpretação	12
4. Citologia a fresco com KOH	13
4.1. Interpretação	14
5. Coloração por Ácido Periódico de Schiff (PAS)	15
5.1. PAS sem digestão - procedimento	16
5.2. PAS com digestão - procedimento	17
5.3. Solução de diastase	18
6. Coloração de GRAM	19
6.1. Procedimento	20
6.2. Interpretação	21
7. Coloração AgNOR	22
7.1. Técnica	23
7.2. Interpretação	24
8. Coloração de Feulgen	25
8.1. Procedimento	26
8.2. Interpretação	26
9. Imunocitoquímica	27
9.1. Método de detecção direta	28
9.2. Método de detecção indireta	29
9.3. Aplicação da imunocitoquímica	29
10. Bibliografia	31

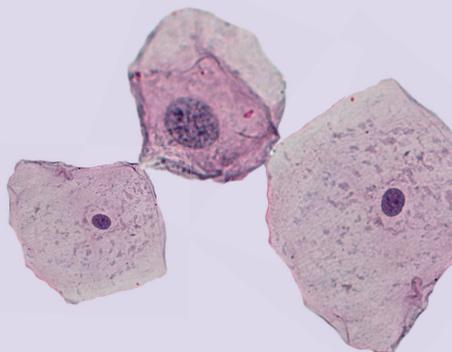


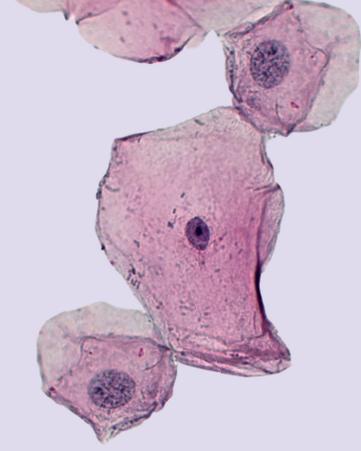
1. Apresentação

A citologia clínica é uma das formas de análise mais empregadas na prevenção ao desenvolvimento de lesões neoplásicas. Sua principal atuação reside no rastreamento de lesões pré-malignas localizadas no colo do útero feminino, auxiliando na detecção precoce e favorecendo o tratamento dessas alterações. Com menor frequência, outros órgãos e tecidos também são alvos do rastreamento pela técnica citológica para identificação de alterações celulares e lesões potencialmente malignas, tais como: mama, tireoide, pulmão, bexiga, mucosa bucal e mucosa anal. Novas ferramentas de prevenção surgem a cada dia, porém a citologia continua sendo a mais importante em se tratando de rastreamento e detecção precoce.

Para maior confiabilidade dos resultados obtidos na citologia, é imprescindível observar algumas regras de coloração e montagem do material. Este manual visa direcionar as práticas de preparo do material, com foco em amostras da mucosa bucal, abordando formas de coloração a serem empregadas na técnica citológica na rotina do laboratório de patologia.

Este manual foi desenvolvido por estudantes de pós-graduação matriculados na disciplina **Interpretação de Exames Complementares**, ofertada pelo Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR), sob responsabilidade dos Professores Dra. Luciana Reis Azevedo Alanis, Dra. Aline Cristina Batista Rodrigues Johann, Dra. Renata Iani Werneck e Dr. Edvaldo Antonio Ribeiro Rosa. Um dos objetivos da disciplina era a elaboração de material técnico em áreas correlatas com carência de informação direcionada à prática odontológica.



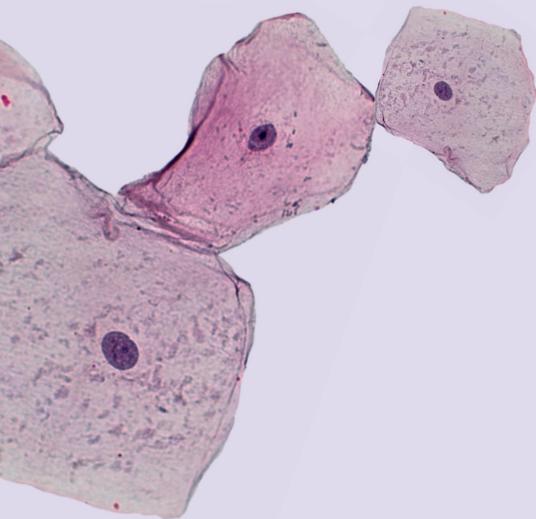


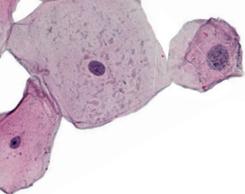
2. Coleta e processamento pela técnica de citologia esfoliativa

Isabela Maria Vasconcelos Silva

Liziane Cattelan Donaduzzi

Thiago Beltrami Dias Batista





A citologia esfoliativa é uma técnica utilizada para identificação de células com alterações displásicas, mas também serve como ferramenta para identificação de microrganismos e descrição de processos fisiológicos e inflamatórios dos tecidos. As amostras geralmente contêm variados tipos celulares representativos do local da coleta, assim como leucócitos, microrganismos e objetos estranhos. As principais vantagens da citologia são facilidade da coleta, rápida execução e possibilidade de obtenção de mais de uma amostra do mesmo local, caso necessário.¹⁻³

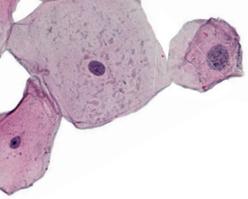
2.1. Citologia convencional

2.1.1. Materiais necessários

- Gaze;
- Álcool 70%;
- Espátula de madeira, aço ou poliuretano, ou escova;
- Lâmina de vidro com extremidade fosca;
- Lápis para identificação;
- Fixador celular (spray ou álcool a 95%);
- Recipiente apropriado para transporte das lâminas.

2.1.2. Passo a Passo

- I.** Identificar a lâmina com os dados do paciente;
- II.** Se a lâmina de vidro estiver engordurada ou suja, ela deve ser limpa e desinfetada com álcool a 70% com auxílio de uma gaze estéril. Resíduos de sujeira ou matéria aderida à lâmina podem comprometer o exame;
- III.** Preparo do paciente;

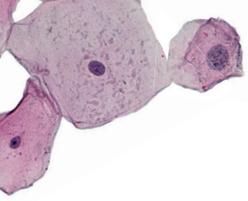


- IV.** Coleta destinada a análise morfológica: realizar bochechos com soro fisiológico ou água por 1 minuto;
- V.** Coleta destinada para análise de microrganismos: não realizar bochechos;
- VI.** Raspar a área de interesse com espátula ou escova, obter a amostra com apoio firme contra a mucosa, vagarosamente;
- VII.** Fazer a aplicação do material coletado na lâmina;
- VIII.** Quando utilizar espátula: o material coletado deve ser estendido em único sentido na lâmina de maneira uniforme, com suave pressão;
- IX.** Quando utilizar escova: a escova deve ser rolada pela lâmina com suave pressão para deposição do material de forma homogênea em um único sentido;
- X.** Realizar fixação imediata em álcool absoluto (ou álcool 50% + éter 50%) ou spray fixador. O spray fixador deve ser aplicado a uma distância de 15-20 cm com quantidade suficiente para cobrir o material;
- XI.** Após a fixação, esperar a lâmina secar em posição horizontal;
- XII.** A lâmina deve ser acondicionada em embalagem adequada (porta lâminas individuais ou laminários).

2.2. Citologia em meio líquido

A citologia em meio líquido foi desenvolvida com o intuito de melhorar a sensibilidade das análises citológicas. O método permite o preparo de lâminas com menor sobreposição de material, além de testes moleculares, geralmente utilizados para a identificação do HPV.¹⁻³

Existem diversas marcas comerciais de kits para o preparo da citologia em meio líquido. A escolha da metodologia mais adequada irá proporcionar melhor experiência com esse tipo de material. Este manual visa descrever de forma genérica como são realizadas as coletas e preparos de citologia em meio líquido, sem focar em marcas específicas.



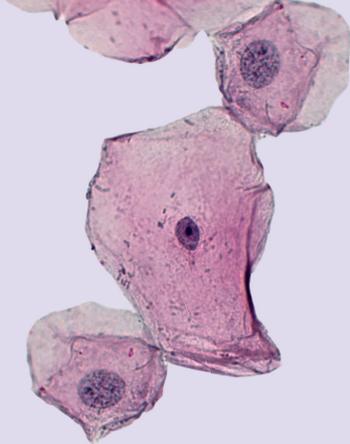
2.2.1. Materiais necessários

- Espátula de madeira, aço ou poliuretano, ou escova;
- Lápis para identificação;
- Frasco com líquido preservativo.

2.2.2. Passo a Passo

- I.** Identificação do frasco com líquido preservativo;
- II.** Preparo do paciente;
- III.** Coleta destinada a análise morfológica: realizar bochechos com soro fisiológico ou água por 1 minuto;
- IV.** Coleta destinada para análise de microrganismos: não realizar bochechos;
- V.** Raspar a área de interesse com espátula ou escova, obter a amostra com apoio firme contra a mucosa, vagarosamente;
- VI.** Armazenamento da amostra. A amostra deve ser acondicionada diretamente no frasco contendo a solução preservativa por, no mínimo, 1 hora antes do processamento;
- VII.** Quando utilizar escova: a cabeça da escova deve ser destacada e inserida no frasco com líquido preservativo;
- VIII.** Quando utilizar espátula: o coletor das células deve ser agitado dentro do frasco com líquido preservativo por 10 a 15 vezes para que as células se soltem.

O preparo do material em lâmina deverá ser realizado de acordo com a bula do produto adquirido. Em meios de conservação preparados manualmente, podem ser utilizadas técnicas de centrifugação para concentração e deposição do material em lâmina.

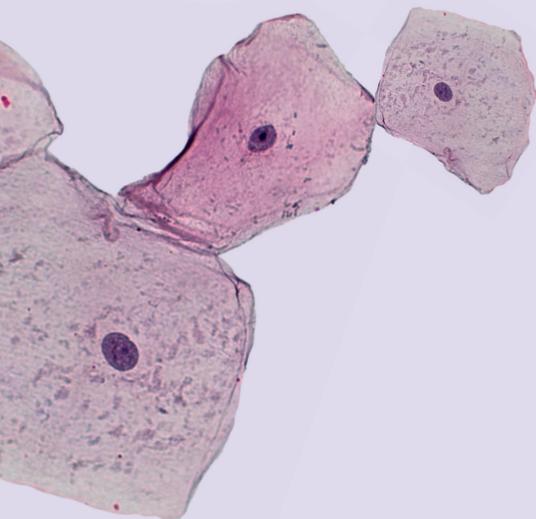


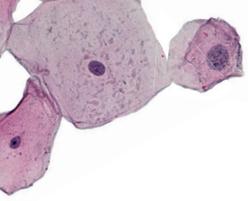
3. Coloração Papanicolaou

Layza Rossatto Oppitz

Valéria Kruchelski Huk

Thiago Beltrami Dias Batista



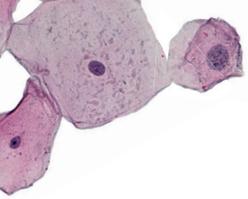


A coloração de Papanicolaou foi desenvolvida e adaptada posteriormente para a identificação de alterações nucleares indicativas de displasia. Permite a definição de detalhes estruturais do núcleo, determina a transparência celular, diferencia elementos celulares cianófilos e eosinófilos, possibilitando melhor identificação dos tipos celulares, além de permitir a identificação de microrganismos e a visualização de alterações citopáticas causadas por vírus.^{2,3}

3.1. Protocolo de coloração*

- I.** Mergulhar em álcool etílico absoluto por 1 minuto;
- II.** Mergulhar em água destilada por 1 minuto;
- III.** Mergulhar em hematoxilina de Harris por 1 a 3 minutos;
- IV.** Lavar em água corrente por 5 minutos;
- V.** Mergulhar em álcool etílico a 70%;
- VI.** Mergulhar em álcool etílico a 95%;
- VII.** Mergulhar em álcool etílico absoluto;
- VIII.** Mergulhar em Orange G por 2 minutos;
- IX.** Mergulhar 3 vezes em álcool etílico absoluto;
- X.** Mergulhar em EA-65 por 3 minutos;
- XI.** Mergulhar em álcool etílico a 95%;
- XII.** Mergulhar em álcool etílico absoluto;
- XIII.** Mergulhar em álcool etílico absoluto;
- XIV.** Dar 3 banhos consecutivos em xilol por 1 minuto cada (o xilol pode ser substituído por secagem em estufa por 20 minutos a 60 °C);
- XV.** Montar com meio de montagem entre lâmina e lamínula.

* Tendo em vista a variedade de marcas existentes de corantes para coloração de Papanicolaou, o laboratório pode e deve ajustar os tempos de coloração de acordo com a aprovação do patologista/citologista.



O número de cubas com álcool ou corante pode variar de acordo com o kit de coloração de Papanicolaou utilizado, bem como o tempo necessário em cada um dos corantes.

Alguns kits apresentam cubas em concentrações decrescentes de álcool para promover a hidratação do material no passo que antecede a coloração pela Hematoxilina de Harris.

Deve ser feita uma avaliação da necessidade de realizar a filtragem dos corantes e a troca das cubas com álcool em períodos pré-definidos. Esse tempo irá variar de acordo com a frequência de utilização e as condições de armazenamento do material.

A utilização do xilol nos últimos passos da coloração fica a critério do laboratório, lembrando que deve ser feita sempre dentro da capela de exaustão devido ao potencial tóxico do xilol.

3.2. Interpretação

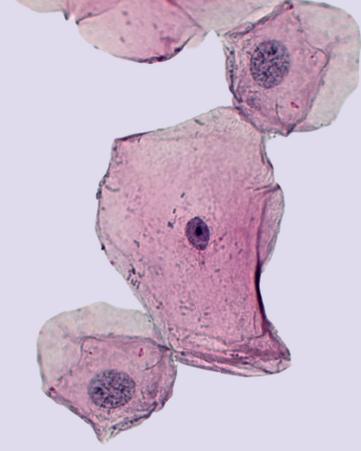
O escrutínio da lâmina deve contemplar toda sua área e deve ser realizado em objetiva de 10x ao microscópio de luz. Sempre que for necessária a identificação de qualquer estrutura, ampliar com a objetiva de 40x.

As estruturas serão coradas de acordo com as seguintes propriedades:

Hematoxilina: corante básico de solução aquosa que cora estruturas ácidas (basofílicas/cianófilas), interagindo com ácidos nucleicos. Resulta em coloração azul escura do núcleo celular; reage com citoplasma de células escamosas.

Orange G: corante ácido, de base alcoólica, com dois grupamentos sulfônicos. Resulta em coloração amarela ou alaranjada dos componentes básicos (acidófilos/eosinofílicos) do citoplasma de células escamosas maduras. Cora parcialmente hifas fúngicas.

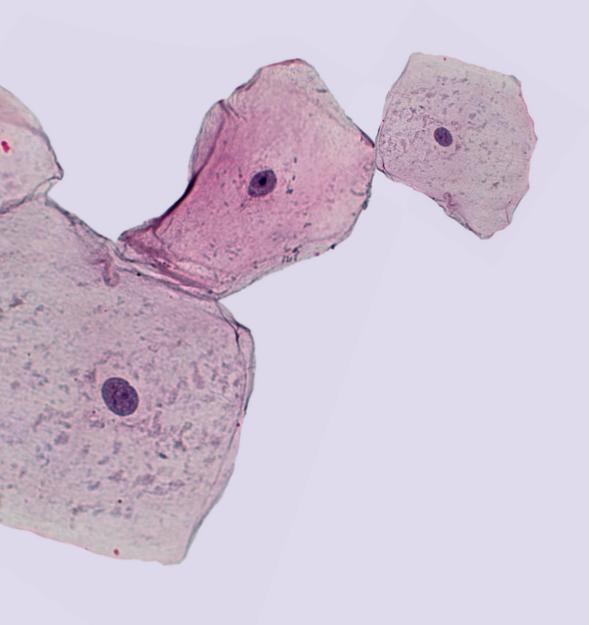
EA-65: corante de base alcoólica, com afinidade por estruturas basofílicas/ácidas (cianofílicas) e acidófilas/básicas (eosinofílicas). Cora de verde-luz grânulos oxifílicos do citoplasma de células escamosas menos maduras e de células glandulares.

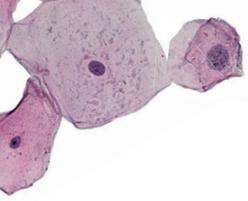


4. Citologia a fresco com KOH

Layza Rossatto Oppitz

Valéria Kruchelski Huk





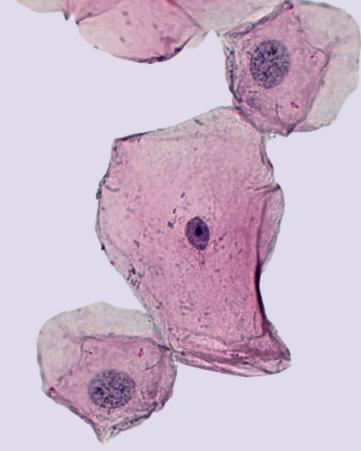
Método de coloração utilizado para identificar estruturas fúngicas filamentosas ou leveduriformes presentes em material biológico. Essa técnica é utilizada para facilitar a visualização dessas estruturas, promovendo a dissolução de queratina e muco presentes na amostra.⁴

- I.** Colocar uma porção da amostra a ser examinada em uma lâmina de microscopia;
- II.** Colocar 1 ou 2 gotas de KOH (10 ou 20%) sobre a lâmina;
- III.** Cobrir a preparação com uma lamínula;
- IV.** Aquecer ligeiramente sobre a chama sem deixar ferver a mistura, para intensificar a clarificação;
- V.** Examinar a preparação após 20 minutos com microscópio óptico comum, inicialmente com a objetiva de 10x seguida por objetiva de 40x, com o diafragma fechado;
- VI.** Uma releitura pode ser realizada após algumas horas. Nesse caso, guardar a amostra em câmara úmida.

Obs.: a concentração do KOH a ser utilizada varia de acordo com o material a ser observado. Quanto maior a quantidade de queratina e muco, recomendam-se maiores concentrações.

4.1. Interpretação

Observar o material em microscópio de luz com intensidade luminosa baixa e condensador afastado da lâmina. A regulagem do diafragma também deve ser ajustada para melhor observação. As estruturas fúngicas se apresentam refringentes. Confirmar a identificação com objetiva de 40x.

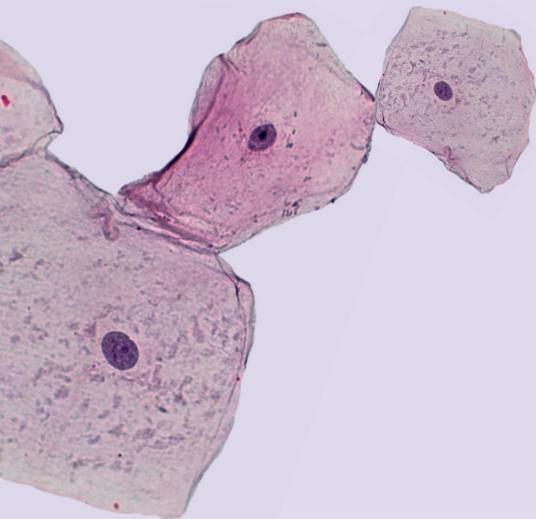


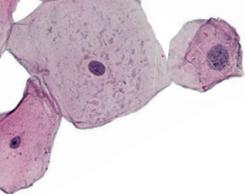
5. Coloração por Ácido Periódico de Schiff (PAS)

Aaron Bensaul Trujillo Lopez

Alessandra Soares Ditzel

Paula Guerra Bubadra





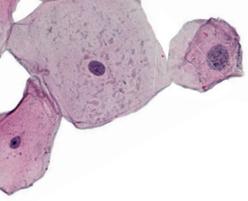
Método de coloração utilizado para observação de estruturas com alta **proporção de carboidratos**, como glicogênio, glicoproteínas, proteoglicanos, geralmente encontrados em tecidos conjuntivos, muco e membranas basais. Assim, essa coloração é utilizada para detecção de glicogênio, mucinas neutras, membranas basais e, principalmente, para evidenciar fungos e parasitas.⁵⁻⁸

A coloração PAS pode ser classificada em:

- PAS sem digestão: na presença do glicogênio a coloração torna-se púrpura brilhante. Na presença somente de mucina a coloração será púrpura escura.
- PAS com digestão (PAS-D): indicada quando se pretende eliminar o glicogênio para observar apenas mucinas neutras epiteliais. Uma solução de amilase é utilizada; a amilase hidrolisa essencialmente o amido e o glicogênio no material analisado. Apresenta coloração púrpura escura.

5.1. PAS sem digestão - procedimento

- I. Colocar ácido periódico, que fica na geladeira, sobre as lâminas por 20 minutos;
- II. Lavar em água destilada;
- III. Deixar escorrer bem a água;
- IV. Colocar o reativo de Schiff, que fica na geladeira, sobre as lâminas por 40 minutos;
- V. Lavar em água sulfurosa, 3 banhos de 5 minutos cada;
- VI. Lavar em água corrente;
- VII. Corar com Hematoxilina de Harris de 30 segundos a 1 minuto, dependendo da qualidade do corante;
- VIII. Lavar em água corrente;
- IX. Deixar secar e prosseguir com a desidratação e a diafanização do material, caso necessário;
- X. Montar a lâmina com lamínula e meio de montagem.



5.1.1. Interpretação

Os núcleos apresentam cor azul-arroxeadado, devido a coloração pela hematoxilina de Harris. Reação Positiva: vermelho-púrpura, para fungos, glicogênio, mucina, fibrina, gotas de coloide, depósitos hialinos, membranas basais, etc.

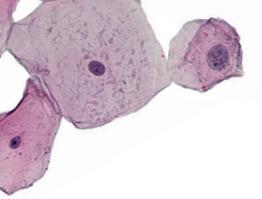
5.2. PAS com digestão - procedimento

- I.** Deixar na solução de digestão pela diastase, previamente aquecida a 37 °C, por 1 hora;
- II.** Lavar as lâminas em água corrente;
- III.** Mergulhar as lâminas em ácido periódico por 20 minutos;
- IV.** Deixar escorrer bem o corante e lavar em água destilada;
- V.** Escorrer toda a água da lâmina;
- VI.** Mergulhar as lâminas no reativo de Schiff por 40 minutos;
- VII.** Lavar em água sulfurosa, 3 banhos de 5 minutos cada;
- VIII.** Lavar em água corrente;
- IX.** Corar com Hematoxilina de Harris de 30 segundos a 1 minuto;
- X.** Lavar em água corrente;
- XI.** Colocar as lâminas na bandeja e deixar secar o material. Proceder com a desidratação e a diafanização, caso necessário;
- XII.** Montar a lâmina com lamínula e meio de montagem.

5.2.1. Interpretação

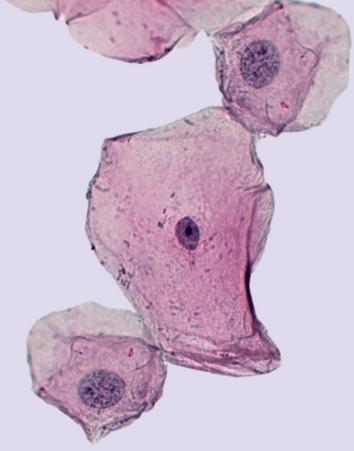
Os núcleos apresentam cor azul-arroxeadado, devido a coloração pela hematoxilina de Harris. Reação Positiva: vermelho-púrpura, para fungos, mucina, fibrina, gotas de coloide, depósitos hialinos, membranas basais, etc.

Obs.: Nesse PAS, o glicogênio é digerido; portanto, não cora na cor púrpura brilhante.



5.3. Solução de diastase

A concentração da solução de diastase a ser utilizada deve ser de 1 g/L de diastase do malte diluída em tampão fosfato (pH 6,0).

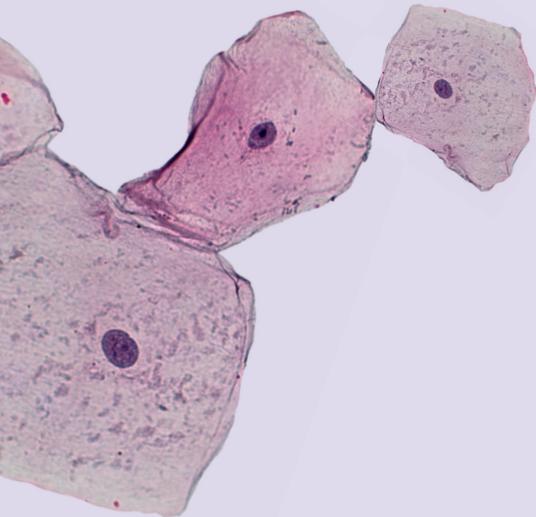


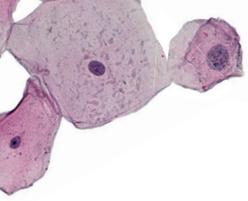
6. Coloração de GRAM

Aaron Bensaul Trujillo Lopez

Alessandra Soares Ditzel

Paula Guerra Bubadra



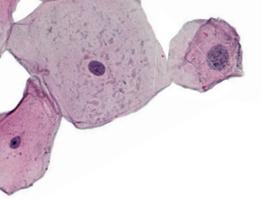


Método de coloração, originalmente proposto por Gram, utilizado para identificar grupos bacterianos por meio da sua estrutura, os quais se coram de maneira diferente, de acordo com a composição da sua parede celular.^{9,10}

Após algumas adaptações da técnica, o violeta-de-metila vem sendo empregado ao invés do violeta-de-genciana. Por já conter um fixador químico em sua composição, o uso do violeta-de-metila torna desnecessária a fixação por chama, que poderia causar desestruturação da membrana e, conseqüentemente, coloração incorreta do material. O álcool acetona foi substituído por álcool etílico. Eventuais descolorações exacerbadas do material eram detectadas com o uso do álcool acetona. Outra alteração foi a substituição da fucsina pela safranina, que possui coloração mais diferenciada que o violeta, assumindo a cor vermelha clara.¹⁰

6.1. Procedimento

- I.** Cobrir o esfregaço com violeta-de-metila e deixar por 15 segundos;
- II.** Adicionar água ao violeta-de-metila na mesma proporção e deixar por mais 45 segundos;
- III.** Escorrer o corante e lavar em água corrente delicadamente;
- IV.** Cobrir a lâmina com lugol 5% e deixar agir por 1 minuto;
- V.** Escorrer o lugol e lavar em água corrente delicadamente;
- VI.** Lavar a lâmina com álcool etílico (99,5° GL); este processo irá descorar o material. Parar o procedimento quando não for mais visualizada a remoção do corante;
- VII.** Lavar em água corrente delicadamente;
- VIII.** Cobrir a lâmina com safranina e deixar agir por 30 segundos;
- IX.** Lavar em água corrente delicadamente;
- X.** Secar o material ao ar livre, podendo utilizar papel absorvente nas bordas e na parte inferior da lâmina;
- XI.** Colocar uma gota de óleo de imersão sobre o esfregaço;
- XII.** Ler em objetiva de imersão.



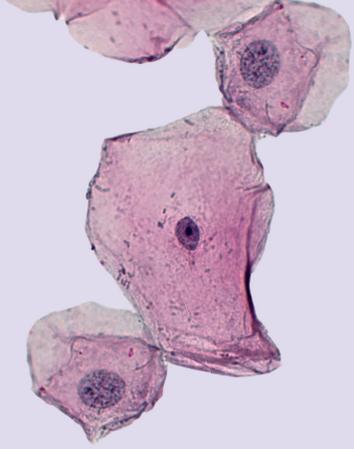
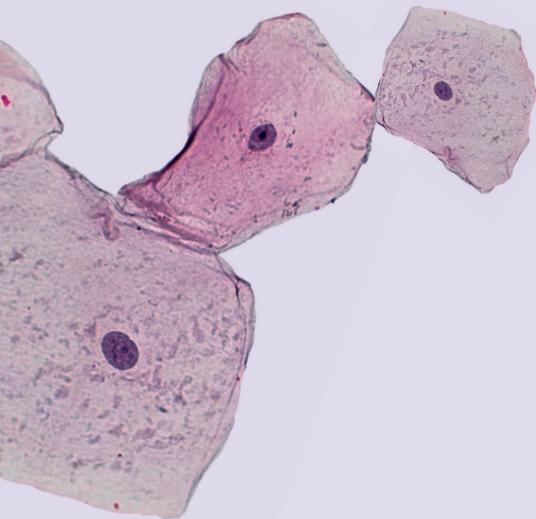
6.2. Interpretação

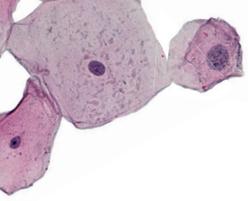
- Bactérias com parede celular espessa (gram-positivas) coram-se em roxo.
- Bactérias com parede celular delgada (gram-negativas) coram-se em vermelho.

7. Coloração AgNOR

Aieli Carini Michels

Aldini Beuting Pereira Kitahara





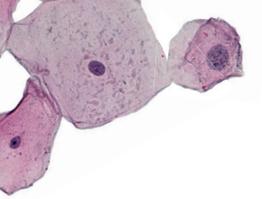
7.1. Técnica

As Regiões Organizadoras de Nucléolos (NORs) são componentes nucleolares que contêm um conjunto de proteínas argirofílicas, seletivamente coradas por prata, responsável pela síntese de ribossomos. Após a coloração de prata, as NORs podem ser facilmente identificadas como pontos negros exclusivamente localizados em toda a área nucleolar e são chamados de “AgNORs”.^{11,12}

7.1.1. Passo a passo

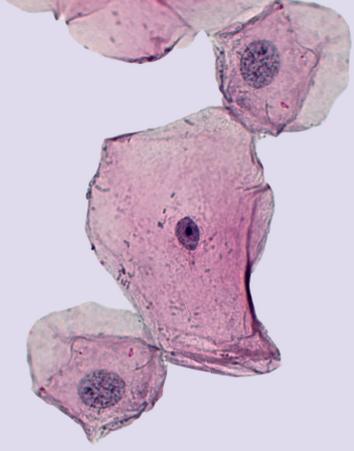
Protocolo de coloração de prata proposto pelo Comitê Internacional para a quantificação de AgNOR.¹³

- I.** Fixar os esfregaços em etanol 95%;
- II.** Pós-fixar a amostra por 30 minutos na solução de Carnoy (etanol absoluto: ácido acético glacial 3:1 v/v);
- III.** Hidratar por meio de álcoois graduados em água destilada;
- IV.** Preparar uma solução de gelatina a 0,66% dissolvida em água ultrapura. Adicionar a essa solução ácido fórmico, de modo a formar uma solução final de 0,33%;
- V.** Aquecer até 37 °C;
- VI.** Dissolver o nitrato de prata na solução de ácido gelatino-fórmico para fazer uma solução final de 33%;
- VII.** Imediatamente mergulhar as lâminas na solução obtida;
- VIII.** Corar no escuro em temperatura constante de 37 °C por 12 minutos;
- IX.** Descartar a solução e lavar as lâminas em vários banhos seguidos de água destilada;
- X.** Desidratar o material e seguir com a montagem da lâmina com lamínula.



7.2. Interpretação

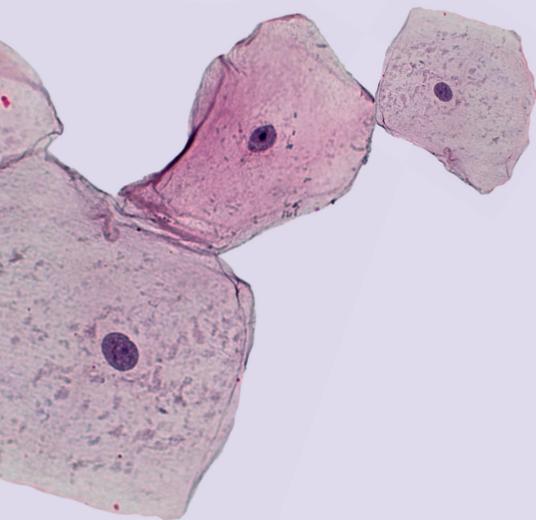
Observar o material corado em microscópio de luz. As proteínas NORs aparecem como pontos negros bem definidos dentro dos núcleos.

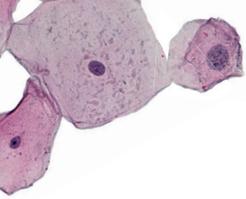


8. Coloração de Feulgen

Aieli Carini Michels

Aldini Beuting Pereira Kitahara





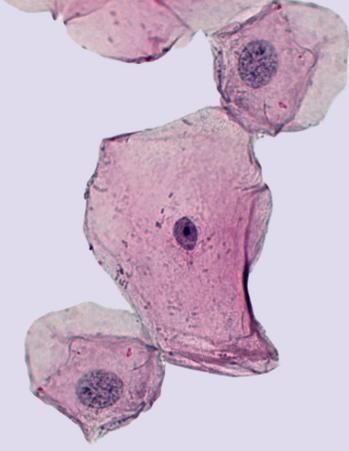
Esta técnica é destinada a coloração de DNA dupla fita para visualização de núcleos e micronúcleos.¹

8.1. Procedimento

- I.** Colocar as amostras em HCl 1M pré-aquecido a 60 °C durante 10 minutos;
- II.** Mergulhar as amostras no reagente de Schiff por 10 minutos;
- III.** Lavar as amostras em 3 banhos de metabissulfito 0,05M por um período de 2 minutos em cada banho;
- IV.** Lavar as amostras por 5 minutos em água corrente;
- V.** Contra corar por alguns segundos em 0,01% fast-green FCF C.I. n° 42053 em 95% etanol. Caso fique muito forte, lavar ligeiramente em água corrente;
- VI.** Completar a desidratação com etanol e xilol e prosseguir com a montagem do material.

8.2. Interpretação

Realizar a leitura em objetiva de 40x. A cromatina nuclear aparece corada em vermelho-rosa intenso.



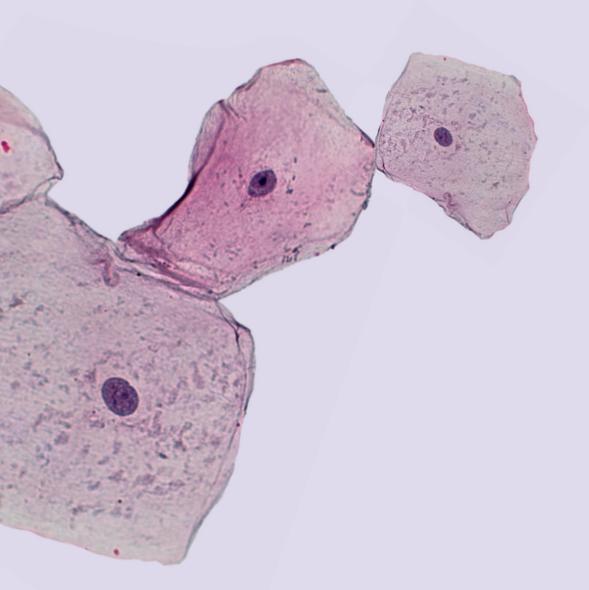
9. Imunocitoquímica

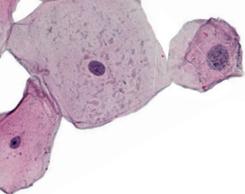
Carlos Antonio Schäffer Penteado

Patrícia Tolentino da Rosa de Souza

Suelen Teixeira Luiz

Luciana Reis Azevedo Alanis





O método da imunocitoquímica tem como objetivo identificar antígenos (proteínas e moléculas presentes nas células e tecidos) de forma específica, por meio da fixação de anticorpos com substâncias marcadoras, para posterior leitura em microscópio. Nesta técnica, os anticorpos específicos se ligam às proteínas por intermédio de uma sequência única de aminoácidos, formando um complexo antígeno-anticorpo.

São os anticorpos que, quando fixados em marcadores, oferecem a visão da presença desses antígenos nas células e tecidos. Essa ligação pode ocorrer através da conjugação de substância fluorescente, formando um complexo antígeno-anticorpo identificado por fluorescência; da conjugação de uma enzima como a peroxidase, que é amplamente utilizada, ou da conjugação por substâncias elétron-densas, como a ferritina e o ouro coloidal.¹⁴

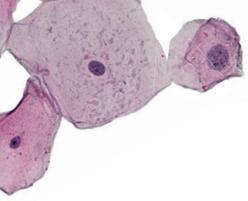
A imunocitoquímica tem aplicação na detecção de doenças infecciosas, na avaliação de biomarcadores em neoplasias e na detecção de diferenciação celular em neoplasias.¹⁵

9.1. Método de detecção direta

A técnica consiste em utilizar um anticorpo (anticorpo primário) para se ligar diretamente ao antígeno da célula. Cada anticorpo com um marcador já fixado à sua estrutura, que pode ser uma enzima ou fluorocromo, liga-se em um epítipo de um antígeno.¹⁵

O método direto é mais utilizado em casos de imunofluorescência e na detecção de antígenos altamente expressos. As principais vantagens da técnica são rapidez e especificidade, pois não é necessário o passo da adição dos anticorpos secundários.¹⁶

A principal desvantagem é a baixa sensibilidade. Como apenas um anticorpo liga-se em cada antígeno, ocorre baixa amplificação de sinal, o que pode ser agravado se a quantidade de antígenos na célula for limitada, acarretando na dificuldade de identificação.¹⁷



9.2. Método de detecção indireta

É realizado quando a lâmina com o tecido ou células é exposta ao anticorpo específico não marcado, originado em uma espécie de mamífero determinada. O material é lavado e o antígeno só pode ser observado ao microscópio após uma segunda imersão do material em solução contendo um segundo anticorpo marcado por fluorescência. Esse segundo anticorpo deve ser originado em uma espécie diferente de mamífero, geralmente coelhos, camundongos ou ratos, ao qual é destinada a primeira imunoglobulina utilizada. A técnica indireta torna-se mais sensível do que a técnica direta, pois cada molécula de anticorpo pode fixar cinco moléculas de anticorpo fluorescente.^{1,14}

9.3. Aplicação da imunocitoquímica

Há possibilidade de utilização de alguns anticorpos (Tabela 1), tais como TOP2A, Ki-67, p16, CINtec® PLUS (P16 INK4a e Ki-67) e ProExomo (TOP2 A e MCM2), para o rastreamento de carcinoma cérvico-vaginal em ensaios de imunocitoquímica.¹⁸⁻²² No entanto, para o carcinoma de células escamosas bucal, relata-se apenas a imunocitoquímica para detecção de displasia e estágios precoces dessa lesão.²³ Assim, os ensaios de imunocitoquímica com marcadores, como antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA), Ki-67 e p53 (Tabela 2), têm sido amplamente utilizados em lesões bucais.²⁴⁻²⁶

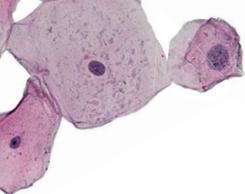


Tabela 1 – Marcadores para carcinoma cérvico-vaginal por meio da técnica imunocitoquímica.

Marcador	Função
TOP2 A	Enzima de DNA. Marcador tardio da carcinogênese cervical (lesão de alto grau).
Ki-67	Proteína nuclear e nucleolar detectada em células em proliferação. Em displasia e carcinoma, a expressão estende-se além de um terço do epitélio. Marcador relacionado ao risco de progressão de lesões precursoras para carcinoma.
P16 INK4a	Inibidor da cinase ciclino-dependente superexpresso em quase todas as lesões precursoras e carcinoma.
MCM2	Proteínas de manutenção do minicromossoma, aparecendo durante a replicação do DNA. Superexpressas na neoplasia cervical.

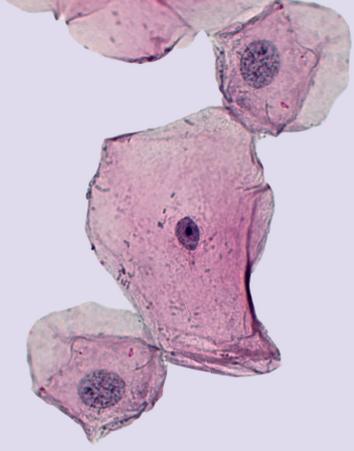
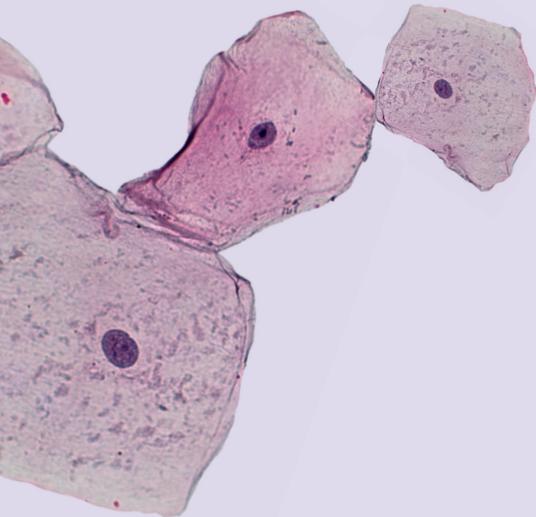
Fonte: TOP2 A²¹⁻²²; Ki-67²⁰⁻²¹; P16 INK4a¹⁸; MCM2²².

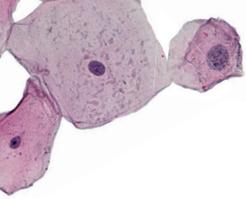
Tabela 2 – Marcadores para carcinoma de células escamosas por meio da técnica imunoistoquímica.

Marcador	Função
PCNA	Proteína nuclear não histônica que permite verificar a verdadeira fração proliferativa da entidade estudada.
Ki67	Marcador de proliferação celular associado ao ciclo celular. Marcador prognóstico.
P53	Proteína citoplasmática. Quando uma célula é exposta a agentes carcinogênicos, há aumento dos níveis de proteína p53.

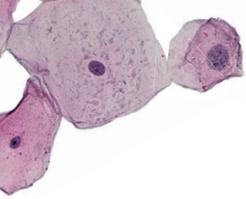
Fonte: PCNA²⁴; Ki67²⁶; P53²⁵.

10. Bibliografia





1. Koss LG, Melamed MR. Koss' diagnostic cytology and its histopathologic bases. v. 1. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins; 2006.
2. Consolaro MEL, Maria-Engler SS. Citologia clínica cérvico-vaginal: texto e atlas. São Paulo: Grupo Gen-Editora Roca Ltda.; 2012.
3. Molinaro EM, Caputo LFG, Amendoeira MRR. Conceitos e métodos para a formação de profissionais em laboratórios de saúde. v. 2. Fiocruz. Rio de Janeiro: EPSJV, IOC; 2010.
4. Zoccoli CM, Nowakonsky AV, Levy CE. Coleta, transporte e conservação de amostra. In: Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. Microbiologia clínica para o controle de infecção relacionada à assistência à saúde. Módulo 4 – Procedimentos laboratoriais: da requisição do exame à análise microbiológica e laudo final. 1. ed. Brasília: ANVISA; 2013. p. 15-40.
5. McManus JFA. The periodic acid routine applied to the kidney. *Am J Pathol.* 1948; 24(3):643-653.
6. Prophet EB, Mills B, Arrington JB, Sobin LH. Laboratory methods in histotechnology. Washington: American Registry of Pathology; 1992.
7. Neto AD. Caderno de referência 3: técnicas de Histopatologia. 1. ed. Brasília, Rio de Janeiro: Ministério da Saúde, CEPESC; 2012.
8. Tabatabaei Shafiei M, Carvajal Gonczi CM, Rahman MS, East A, François J, Darlington PJ. Detecting glycogen in peripheral blood mononuclear cells with periodic acid schiff staining. *J Vis Exp.* 2014; (94):e52199.
9. Bartholomew JW, Mittwer T. The Gram stain. *Bacteriological Reviews.* 1952; 16(1):1-29.
10. Martins CRF, Ferreira JAPS, Siqueira LFG, Ferreira LAP, Bazzo ML, Franchini M, Berro OJ, Valle S. Técnica de Coloração de GRAM. Brasília: Ministério da Saúde, Programa Nacional de Doenças Sexualmente Transmissíveis e Aids; 2001.
11. Trerè D. AgNOR staining and quantification. *Micron.* 2000; 31(2):127-131.
12. Thiele MCM, Bohn JC, Chaiben CL, Grégio AMT, Machado MAN, Lima AAS. Nucleolar organizer regions of oral epithelial cells in crack cocaine users. *Iran Biomed J.* 2013; 17(2):107-111.
13. Aubele M, Biesterfeld S, Derenzini M, Hufnagl P, Martin H, Ofner D, Ploton D, Rüschoff J. Guidelines of AgNOR quantitation. Committee on AgNOR Quantitation within the European Society of Pathology. *Zentralbl Pathol. Germany.* 1994; 140(1):107-108.
14. Kessel RG. Basic medical histology: the biology of cells, tissues, and organs. New York: Oxford University Press; 1998.



15. Lopes C. Métodos imunohistoquímicos. Pathologika [internet]; 2016 [cited 2018 Sep 27]. Available from: <https://pathologika.com/imuno-histoquimica/metodos-imunohistoquimicos>.
16. ABCAM. Direct vs indirect detection in IHC [internet]; [date of first publication unknown]. [cited 2018 Sep 27]. Available from: <https://www.abcam.com/tag/ihc>.
17. Chen X, Cho DB, Yang PC. Double staining immunohistochemistry. N Am J Med Sci. 2010; 2(5):241-245.
18. Brown CA, Bogers J, Sahebali S, Depuydt CE, De Prins F, Malinowski DP. Role of protein biomarkers in the detection of high-grade disease in cervical cancer screening programs. Journal of Oncology. 2012; 289315.
19. Salehinejad J, Sharifi N, Amirchaghmaghi M, Ghazi N, Shakeri MT, Ghazi A. Immunohistochemical expression of p16 protein in oral squamous cell carcinoma and lichen planus. Ann Diagn Pathol. 2014; 18(4):210-213.
20. Donà MG, Vocaturo A, Giuliani M, Ronchetti L, Rollo F, Pescarmona E, Carosi M, Vocaturo G, Benevolo M. p16/Ki-67 dual staining in cervico-vaginal cytology: correlation with histology, Human Papillomavirus detection and genotyping in women undergoing colposcopy. Gynecol Oncol. 2012; 126(2):198-202.
21. Peres AL, Paz e Silva KM, Araújo RFF, Lima Filho JL, Melo Júnior MR, Martins DBG, Pontes Filho NT. Immunocytochemical study of TOP2A and Ki-67 in cervical smears from women under routine gynecological care. J Biomed Sci. 2016; 23(1):42.
22. Badr RE, Walts AE, Chung F, Bose S. BD ProEx C: a sensitive and specific marker of HPV-associated squamous lesions of the cervix. Am J Surg Pathol. 2008; 32(6):899-906.
23. Scott IS, Odell E, Chatrath P, Morris LS, Davies RJ, Vowler SL, Laskey RA, Coleman N. A minimally invasive immunocytochemical approach to early detection of oral squamous cell carcinoma and dysplasia. Br J Cancer. 2006; 94(8):1170-1175.
24. Novellino ATN, Amorim RFB, Queiroz LMG, Freitas RA. Análise da imunoexpressão do PCNA e p53 em carcinoma de células escamosas oral: correlação com a gradação histológica de malignidade e características clínicas. Acta Cir Bras. 2003; 18(5):458-464.
25. Swaminathan U, Rao UK, Joshua E, Ranganathan K. Expression of p53 and Cyclin D1 in oral squamous cell carcinoma and normal mucosa: an immunohistochemical study. J Oral Maxillofac Pathol. 2012; 16(2):172-177.
26. Birajdar SS, Radhika M, Paremala K, Gadivan M, Sudhakara M, Soumya M. Expression of Ki-67 in normal oral epithelium, leukoplakic oral epithelium and oral squamous cell carcinoma. J Oral Maxillofac Pathol. 2014; 18(2):169-176.

