

# SISTEMA DNA-CITOLIQU (DCS): UM NOVO SISTEMA PARA CITOLOGIA EM BASE LÍQUIDA – ASPECTOS TÉCNICOS

## DNA-CITOLIQU SSTEM (DCS): A NEW LIQUID BASE CYTOLOGY SYTEM – TECHINAL ASPECTS

Adhemar Longatto-Filho<sup>1</sup>, Gislene Namiyama<sup>2</sup>, Aduino Castelo Filho<sup>3</sup>,  
Maria Regina Viann<sup>4</sup>, Gerson B das Dôres<sup>5</sup>, Eliane Taromaru<sup>6</sup>

### RESUMO

**Introdução:** DCS é um novo sistema de citologia em base líquida para células coletadas no UCM. **Objetivo:** avaliar aspectos técnicos do DCS, com diferentes protocolos, em um primeiro experimento com 144 amostras. Em segundo experimento, com 50 amostras, estudar os achados com 30 segundos de vórtex. **Métodos:** colheu-se material para o preparado convencional com espátula de Ayre e escova endocervical. Usou-se a mesma escova, com células endocervicais residuais, para escovar a ectocérvice, acondicionando-a em tubo com UCM. De cada amostra obteve-se quatro lâminas, com tempo de vórtex de 5, 10, 15 e 20 segundos, protocolos 1 a 4. Utilizaram-se os seguintes critérios citológicos para definir a qualidade da amostra: distribuição celular (áreas vazias e amassamento), artefatos de fixação, celularidade e presença de células da ZT. **Resultado:** no primeiro experimento observaram-se diferenças significativas apenas entre os protocolos 1 e 4. Comparados aos esfregaços convencionais, os preparados DCS mostraram menos áreas vazias nas lâminas 1 e 4 ( $p = 0,024$  e  $p = 0,003$ ). Nenhum artefato de fixação e alta representação da ZT foi encontrado nos protocolos 3 e 4. No experimento 2, embora sem significância estatística, observou-se maior celularidade da ZT. Não se verificou qualquer efeito adverso na coloração de Papanicolaou, citomorfologia ou propriedades de fixação. **Conclusão:** os resultados com 20 ou 30 segundos de vórtex proporcionam citomorfologia bem preservada, alta representação de células endocervicais e melhor distribuição celular, sugerindo expectativa favorável quanto à *performance* desse sistema para fins diagnósticos.

**Palavras-chave:** citologia, citologia líquida, qualidade da amostra

### ABSTRACT

**Introduction:** DCS is a new liquid-base cytology system for cell collected in UCM. **Objective:** assess technical aspects of DCS under different protocols. **Methods:** the first experiment was performed with 144 samples. After cervical scraping with Ayre spatula and endocervical brushing, the sample was immediately smeared on the slide and alcohol-fixed. The same brush with residual cells was used to scrap the ectocervical surface and conditioned in a UCM tube. For each case, 4 slides were prepared according to DCS procedures, except the vortexing time (5, 10, 15 and 20 seconds) from protocols 1 to 4. The second experiment was made with 50 samples, with a vortexing time of 30 seconds. Cytological criteria for sample quality were: cell distribution (empty areas and clumping), fixation artifacts, cellularity and presence of TZC. **Results:** on the experiment 1, significant differences were detected between protocols 1 and 4, but not between protocols 2 and 3. Compared to conventional smears, DCS preparations showed lesser empty areas in slides 1 and 4 ( $p = 0.024$  and  $p = 0.003$ ). No fixation artifacts and high TZC representation were found in protocols 3 and 4. In the experiment 2, although not statistically significant, more cases with TZC were seen. No adverse effects were found on Pap staining, cytomorphology or on fixation cells properties. **Conclusion:** these preliminary results with 20 or 30 seconds vortexing yielded well-preserved cytomorphology, with high representation of endocervical cells and better cells distribution, thus leading to a favorable expectative regarding its use in large trials for assessing diagnostic performance.

**Keywords:** cytology, liquid cytology, specimen adequacy

ISSN: 0103-0465

DST – J bras Doenças Sex Transm 17(1): 56-61, 2005

## INTRODUÇÃO

Otimizar a eficácia do exame preventivo de Papanicolaou (Paptest) é objetivo consensual de todos os profissionais devotados aos programas para detecção e prevenção das neoplasias do colo uterino e de suas lesões precursoras<sup>1</sup>. Adicionalmente, desde que a infecção pelo papilomavírus humano (HPV) é hoje aceita como o evento necessário e principal para a carcinogênese da cérvix<sup>2</sup>, testes moleculares são recomendados como procedimento laboratorial adjunto, importante a seleção das pacientes com risco mais elevado para essas lesões<sup>3</sup>.

Neste contexto, o desenvolvimento esperado para otimizar o desempenho de programas de escrutínio do câncer de colo uteri-

<sup>1</sup> Pesquisador Científico do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, Brasil. *postdoctoral fellowship* Universidade do Minho, Escola de Ciências da Saúde, Braga, Portugal.

<sup>2</sup> Pesquisador Científico do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, Brasil.

<sup>3</sup> Professor Adjunto de Doenças Infecciosas da Escola de Medicina da Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, Brasil

<sup>4</sup> Diretora, CICAP, Laboratório de Patologia Cirúrgica, Hospital Alemão Oswaldo Cruz, São Paulo, Brasi

<sup>5</sup> Diretor Científico Digene Brasil, São Paulo, Brasil

<sup>6</sup> Responsável Técnica da Digene Brasil, São Paulo, Brasil

Outros membros do Grupo de Estudo DNA-Citoliq, **co-autores:** Sueli Maeda; Mauricio SB Leite; Elias F Mizziara; Alvaro P. Pinto; Antonio LMA Horta; Jose L Portugal; Carlos A. Ribeiro; Ruy Luzzatto.

**Fonte Financiadora:** Este estudo teve parte de seu financiamento realizado pela Digene do Brasil Ltda.

no é o desenvolvimento de meios conservantes que permitam a avaliação diagnóstica, na mesma coleta, com o preparo de amostras citológicas preservando a morfologia e evitando o fundo indesejado, tais como o muco, hemorragia e infiltrado inflamatório, além de permitir, também, a realização dos testes moleculares<sup>3,4</sup>.

Recentemente, os sistemas de citologia de base líquida foram desenvolvidos a fim de melhorar a exatidão de resultados do Paptest por oferecer preparados com resíduos e artefatos reduzidos que poderiam, eventualmente, conduzir a erros de interpretação diagnóstica<sup>2</sup>.

O meio da coleta universal (UCM – *Universal Collecting Medium*) foi recentemente desenvolvido como meio versátil para a citologia e a pesquisa de ácido nucléico em uma única amostra<sup>5</sup>. No laboratório de citopatologia, esta amostra em base líquida é homogeneizada com uso de vórtex a fim de se destacar as células aderidas à escova de coleta e obter-se celularidade amostral aleatorizada. Subseqüentemente, até 12 amostras podem ser preparadas simultaneamente de acordo com protocolo manual. Todos os dispositivos usados fazem parte integrante do sistema DNA-Citoliq (Digene, Brasil).

O presente estudo visa apresentar os procedimentos técnicos envolvidos nesta preparação manual, avaliando as propriedades técnicas relacionadas com a adequação dos preparados cervicovaginais.

## MÉTODOS

Na primeira experiência, 144 amostras pareadas foram coletadas e preparadas em seis laboratórios privados de diferentes regiões: CIAP (Brasília), Instituto de Patologia (Porto Alegre), Instituto Roberto Alvarenga (Belo Horizonte), Annalab (Curitiba), Biocito (Goiania), e Salomão & Zoppi (São Paulo). A primeira preparação foi feita conforme protocolo convencional com espátula de Ayre, raspando-se a ectocérvice e a escova do *kit* de coleta UCM para a obtenção das células endocervicais. Imediatamente após a coleta, realizou-se o esfregaço em lâmina citológica. Usou-se a mesma escova, com a amostra endocervical residual, para a coleta do espécime ectocervical. Essa escova foi, então, acondicionada em tubo contendo 1 mililitro de solução de UCM, o qual foi agitado por 30 segundos para homogeneizar o espécime.

A fim de se determinar o tempo mais adequado de vórtex na preparação das lâminas, submeteram-se as amostras a quatro procedimentos diferentes, no que concerne ao tempo: 5, 10, 15 e 20 segundos, protocolos de números 1 a 4, respectivamente.

Na segunda parte do estudo, 50 pares de amostras foram coletados em um dos laboratórios (S&Z), e usadas para avaliar se o aumento no tempo de vórtex para 30 segundos poderia trazer benefício adicional à qualidade dos preparados.

Todas as amostras foram preparadas de acordo com protocolo preconizado para o sistema DNA-Citoliq, descrito a seguir, que permite preparação simultânea de 12 espécimes, por meio do dispositivo chamado prepegene, como mostrado na **Figura 1**.

Realizaram-se os seguintes passos na preparação amostral:

1. Agitar no vórtex os 12 tubos plásticos contendo UCM em alta velocidade pelo tempo proposto em cada protocolo. Nesta etapa, as células destacam-se da escova de coleta.
2. Ao se pipetar o material, evitar os grumos que ainda estiverem presentes.
3. Pipetar a amostra sobre a membrana de policarbonato, de 25 mm, que compõe o filtrogene, espalhando uniformemente a alíquota na superfície, com o cuidado de não tocar a membrana com a ponta da pipeta para se evitar o rompimento.
4. Travar o prepegene por 10 segundos para que haja filtração e transferência do material para a lâmina.
5. Destruar com cuidado e abrir colocando-se o tampo para trás.
6. Retirar o suporte plástico, lamigene, com todas as lâminas.
7. Colocar o lamigene com os preparados em solução alcoólica a 95%.
8. Fazer a coloração da maneira usual.

Os seguintes parâmetros foram usados para a avaliação da qualidade dos preparados: distribuição das células pelo preparado; áreas vazias e amassamento (*clumping*); artefatos de fixação; celularidade (hipocelular ou hiper celular) e presença das células da zona da transformação (ZT).

**Análise Estatística.** Os parâmetros de avaliação de qualidade das lâminas preparadas utilizando diferentes tempos de vórtex foram comparados através dos testes de qui-quadrado e exato de Fisher. Foram consideradas como estatisticamente significantes as diferenças com probabilidade de ocorrência ao acaso inferiores a 5% (erro alfa).

## RESULTADOS

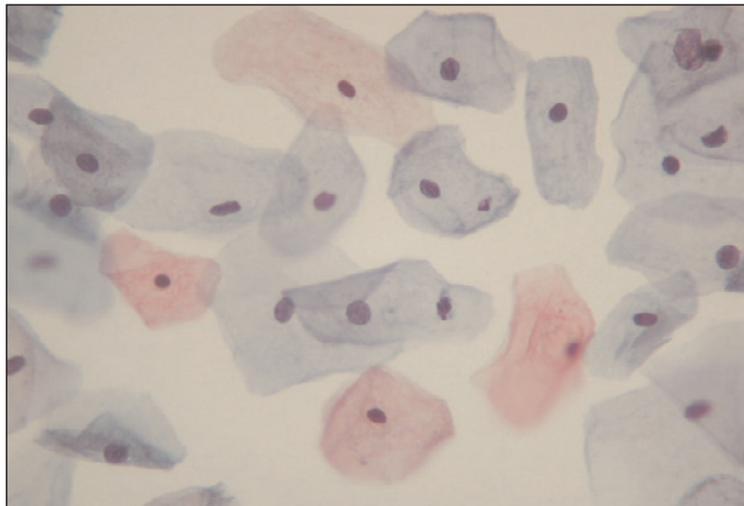
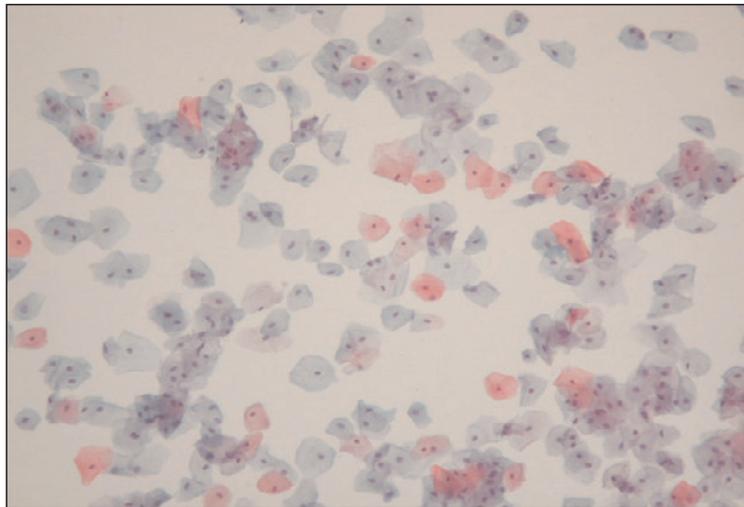
O tempo médio para a preparação de 12 lâminas foi cerca de oito minutos.

As amostras preparadas de acordo com o protocolo estavam, na maioria dos casos, distribuídas homogeneamente no círculo de 25 milímetros, com extensas áreas de aspecto regular e distribuição em camada fina. Todavia, também se observaram células sobrepostas (**Figura 2**). A morfologia celular foi facilmente interpretável, com a policromasia citoplasmática preservada. As características nucleares foram também identificadas facilmente. A textura da cromatina, a afinidade à hematoxilina, os nucléolos e o envelope nuclear foram preservados e claramente identificados. As células epiteliais glandulares também foram adequadamente representadas na maioria dos casos (**Figura 3**). As células cilíndricas ou colunares foram vistas com aspecto de camada fina e, em diversas vezes, imitavam uma “microbiópsia”, com alguns grupos apresentando células glandulares sobrepostas interpretadas como hiperplásicas. Frequentemente as características nucleares eram similares àquelas vistas em preparados convencionais.

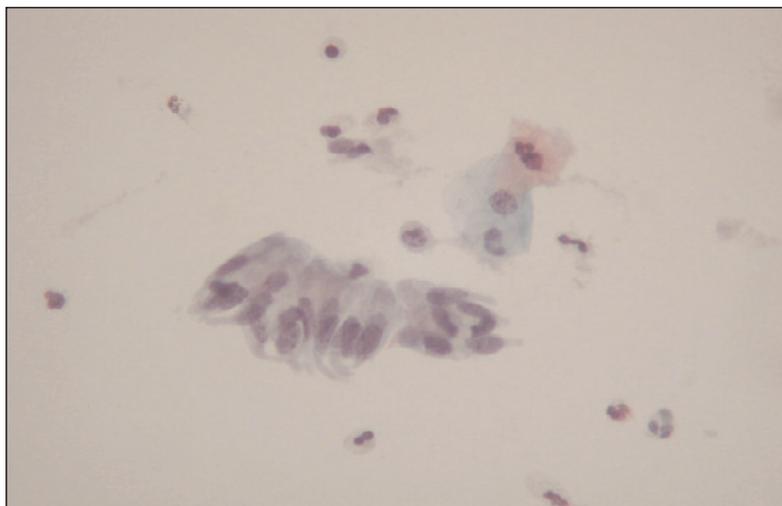
Em geral, os parâmetros avaliados foram significativamente melhores quando a lâmina foi preparada com tempo de agitação no vórtex de 20 segundos do que com 5 segundos (**Tabela 1**).



**Fig 1** - Visão interna do equipamento prepene. Na parte superior, vê-se a posição das lâminas



**Fig 2** - A (x 10) e B (x 40) mostram células superficiais e intermediárias



**Fig. 3** - Aspecto morfológico das células endocervicais no sistema DCS.

- Variáveis de qualidade citopatológica. Correlação entre o preparado convencional e os protocolos 1 e 4 do DCS.

Variável	DCS		
	Convencional	Protocolo 1	Protocolo 4
Área Vazia			
sim	131	116	113
não	10	24	28
p		0,024	0,003
Amassamento			
sim	115	105	99
não	26	35	42
p		0,18	0,029
Artefatos de Fixação			
sim	0	1	0
não	140	139	140
p			
Hipocelularidade			
sim	1	7	4
não	140	133	137
p		0,07	0,37
Hiper celularidade			
sim	1	2	2
não	140	138	139
p		1	1
Zona de transformação			
sim	105	90	106
não	36	50	35
p		0,013	1

- Variáveis de qualidade citopatológica. Correlação entre o preparado convencional e o do sistema DNA-Citoliq com 30 segundos de agitação em vórtex.

Variável	DCS 20 segundos	DCS 30 segundos	p
Área vazia			
<b>sim</b>	34	34	
<b>não</b>	16	16	1,00
Amassamento			
<b>sim</b>	38	29	
<b>não</b>	12	21	0,49
Artefatos de fixação			
<b>sim</b>	0	0	
<b>não</b>	50	50	-
Hipocelularidade			
<b>sim</b>	0	1	
<b>não</b>	50	49	-
Hiper celularidade			
<b>sim</b>	0	0	
<b>não</b>	50	50	-
Zona de transformação			
<b>sim</b>	35	40	
<b>não</b>	15	10	0,18

Em contraste, nenhuma diferença significativa foi encontrada entre os tempos de 5, 10 e 15 segundos, sendo, por isso, omitida da tabela.

Comparadas aos esfregaços convencionais, as preparações de DNA-Citoliq com tempo de vórtex de 5 e 20 segundos mostraram número significativamente menor de áreas vazias com valores de p de 0,024 e 0,003, respectivamente. Todavia, o amassamento celular só foi menor com o tempo de vórtex de 20 segundos ( $p = 0,029$ ). Dentre os parâmetros analisados, com o tempo de vórtex de 10 e 15 segundos, somente se observou ausência de artefatos de fixação e representação elevada de células da ZT.

O prolongamento do tempo de agitação para 30 segundos não mostrou diferença significativa quando comparado com o tempo de 20 segundos, apesar de se observar tendência de menor formação de figuras de amassamento celular e maior representação da ZT (Tabela 2).

Com a coloração rotineira de Papanicolaou, não foi vista qualquer alteração tintorial, citomorfológica ou, ainda, nas propriedades de fixação.

## DISCUSSÃO

O presente estudo foi realizado com o intuito de avaliar o desempenho técnico do novo sistema de citologia em base líquida

denominado DNA-Citoliq. As células epiteliais conservadas no meio líquido UCM, recentemente desenvolvido<sup>5</sup>, e preparadas com o sistema DNA-Citoliq, nos protocolos denominados de 1 a 4, apresentaram-se, geralmente, como películas finas, adequadamente fixadas, com os detalhes citomorfológicos bem preservados.

As propriedades do DNA-Citoliq levam a considerável redução do tempo de escrutínio, permitindo avaliação das células epiteliais de maneira mais fácil devido à “limpeza” do preparado, que também reduz outros fatores que obscurecem a observação microscópica.

O protocolo do procedimento mostrou-se bastante útil para reduzir a variabilidade de qualidade entre os preparados, uma vez que há consistência e clareza nas etapas de execução do processo.

Importante passo na preparação das lâminas é a homogeneização das amostras líquidas que serão “impressas”, devendo ser realizada no vórtex, para o desprendimento do maior número possível de células da escova, do fundo e das paredes do tubo. Essas células, suspensas, serão a base da seleção aleatória, que sorteia de maneira uniforme a celularidade da amostra. Assim, o tempo de vórtex é a variável limitante. Na comparação com o preparado convencional há tendência para a hipocelularidade com tempo de 5 segundos, mas isso não ocorreu com 20 ou 30, como foi feito no segundo experimento.

## CONCLUSÃO

Como conclusão, a citologia em base líquida com o meio UCM e a preparação de lâminas com o sistema DNA-Citoliq e tempo de vórtex entre 20 e 30 segundos, permite obter boa celularidade, com representação elevada de células endocervicais e melhor distribuição celular. Isso possibilita considerar essa metodologia para estudos de grandes séries para avaliar seu desempenho diagnóstico.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Baandrup U, Bishop JW, Bonfiglio TA. Sampling, sampling errors and specimen preparation. *Acta Cytol* 2000; 44: 944-48.
2. Walboomers JM, Jacob S MV, Manos MM. Human Papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol* 1999; 189: 12-19.
3. Ferenczy A, Franco E. Cervical-cancer screening beyond the year 2000. *Lancet-Oncol* 2001; 2: 27-32.
4. Cohn DE, Herzog TJ. New innovations in cervical cancer screening. *Gynecol Surg Oncol* 2001; 44: 538-49.
5. Mielzynska-Lohmas I., Tang Y, Zhul J, Mcglynn S. Universal collection medium (UCM): a versatile medium for cytology, HPV DNA testing, and HPV RNA testing from a single patient specimen. 4<sup>th</sup> International Multidisciplinary Congress Abstract Book - Eurogin, Paris, France 2000.

### Endereço para Correspondência:

**ADHEMAR LONGATTO FILHO**

Instituto Adolfo Lutz – Divisão de Patologia  
Avenida Dr. Arnaldo, 355, Cerqueira Cezar,  
São Paulo, SP, Brasil. CEP: 01246-902.  
E-mail: venancio@uol.com.br

Recebido em: 13/02/05

Aprovado em: 18/03/05