

FineFIX[®]: fixador alcoólico alternativo para a prática citológica?

D Silva¹, C Carvalho², H Scigliano³, S Fernandes⁴ & R A Silva⁵

^{1,2,3,4,5}Centro de Investigação em Saúde e Ambiente, Escola Superior de Tecnologia da Saúde do Porto (CISA-ESTSP), Instituto Politécnico do Porto, Vila Nova de Gaia, Portugal

^{1,2}Serviço de Anatomia Patológica, Centro Hospitalar do Porto - Hospital Geral de Santo António, Porto, Portugal

¹dianaimsilva@gmail.com; ²cristinadcarvalho@gmail.com; ³hms@estsp.ipp.pt; ⁴smf@eu.ipp.pt; ⁵ras@eu.ipp.pt

RESUMO

Um dos factores que contribui para a baixa sensibilidade da citologia urinária é a fixação em etanol. Neste trabalho foi avaliada a citomorfologia e as características tintoriais de lavados vesicais fixados pelo FineFIX[®] ou pelo RCL2[®] comparativamente aos fixados pelo etanol. A análise dos achados microscópicos revelou que as preparações fixadas pelo RCL2[®] apresentam qualidade inferior ($p=0,001$), enquanto as fixadas pelo FineFIX[®] apresentam qualidade semelhante às fixadas pelo etanol ($p=0,204$). Relativamente às características nucleares, o FineFIX[®] providencia qualidade superior ao etanol ($p=0,027$). O FineFIX[®] é um potencial fixador citológico por aumentar o detalhe nuclear, característica importante para o diagnóstico.

Palavras-Chave: Citologia Urinária, Sensibilidade, Etanol, FineFIX[®], RCL2[®]

ABSTRACT

One of the factors that contribute to the low sensitivity of the urinary cytology is fixation by ethanol. We evaluated the morphology and cytological dyeing features of bladder washings fixed by FineFIX[®] or by RCL2[®] compared to fixed by ethanol. The analysis of microscopic findings showed that preparations fixed by RCL2[®] present lower quality ($p=0,001$), while preparations fixed by FineFIX[®] present quality similar to those fixed by ethanol ($p=0,204$). With respect to nuclear characteristics, the FineFIX[®] provides higher quality than ethanol ($p=0,027$). The FineFIX[®] is a potential fixative for cytology by increase the nuclear detail, an important feature for diagnosis.

Keywords: Urine cytology, Sensitivity, Ethanol, FineFIX[®], RCL2[®]

1. INTRODUÇÃO

A citologia urinária é, teoricamente, um dos métodos de eleição para o rastreio e *follow-up* de lesões do tracto urinário, nomeadamente da neoplasia do epitélio urotelial (Brown, 2000; Demay, 2007; Têtu, 2009). As vantagens deste método estão relacionadas com a técnica de colheita do material biológico, que é não invasiva e de fácil execução, e com o diagnóstico citológico, que é rápido e muito específico. No entanto, a impossibilidade de determinar a localização exacta da lesão através da urina ou do lavado vesical, assim como o elevado número de resultados falso-negativos, principalmente nas lesões de baixo grau, constituem as principais desvantagens da citologia urinária (Badalament et al, 1987; Brown, 2000; Demay, 2007; Têtu, 2009). Um dos motivos para a baixa sensibilidade deste método prende-se com a fraca acuidade da observação microscópica, causada frequentemente pelos efeitos da fixação celular, principalmente ao nível do núcleo (Grégoire et al, 1997; Lindberg and Ohlin, 1978).

O fixador eleito para a rotina citológica é o etanol a 96%, cujo mecanismo de actuação consiste na precipitação das proteínas celulares e do glicogénio (Bancroft and Gamble, 2008). As principais vantagens do etanol, como fixador, baseiam-se na sua elevada velocidade de difusão, e na capacidade de preservar a estrutura dos antigénios celulares (Bancroft and Gamble, 2008; Jamur and Oliver, 2010). Por outro lado, o etanol provoca uma retracção significativa do citoplasma e perde rapidamente a sua actividade (Bancroft and

Gamble, 2008; Hermansen et al, 1989). Adicionalmente, o etanol não fixa adequadamente a cromatina (Bignold, 2002), facto que se reflecte na acuidade da observação microscópica, sendo este um motivo importante para encontrar um fixador substituto do etanol para a citologia urinária.

Na última década, surgiram no mercado vários fixadores alternativos ao formol a 10% com o intuito de substituir/eliminar este fixador com propriedades cancerígenas (IARC, 2004) da prática histológica dos laboratórios de Anatomia Patológica. Entre estes encontram-se alguns fixadores alcoólicos, como o RCL2[®] e o FineFIX[®].

O RCL2[®] apresenta na sua composição etanol (70%), que aumenta a taxa de difusão da mistura fixadora nos tecidos e células, e ácido acético, em pequena percentagem, que impede a retracção significativa dos tecidos, conferida pelo etanol (Lassalle et al, 2009).

O FineFIX[®] é uma mistura de etanol, água destilada, glicerol, álcool polivinílico e carboidratos monoméricos (Gazziero e tal, 2009).

Estudos recentes têm mostrado que a fixação por fixadores à base de etanol, como o RCL2[®] e o FineFIX[®], conferem bons resultados no que respeita à histomorfologia, qualidade dos ácidos nucleicos, e preservação das proteínas (Delfour et al, 2006; Gazziero et al, 2009; Stanta e tal, 2006). Além disso, este tipo de fixadores à base de etanol não apresenta as desvantagens frequentemente associadas à fixação pelo etanol, como a retracção celular, a vacuolização e a picnose nuclear (Delfour et al, 2006; Gazziero et al, 2009).

Estudos em *cell blocks* mostraram que o FineFIX[®] preserva a arquitectura celular, a morfologia nuclear e citoplasmática, e não interfere como as características tintoriais das células (Gazziero e tal, 2009).

Até ao momento, os efeitos dos fixadores comerciais RCL2[®] e FineFIX[®] foram avaliados apenas na rotina histológica, desconhecendo-se os seus efeitos na prática citológica.

O principal objectivo deste estudo piloto é avaliar a citomorfologia e as características tinturiais das células esfliativas de lavados vesicais fixadas pelas duas soluções recentemente comercializadas, o FineFIX[®] e o RCL2[®], comparativamente às fixadas pelo fixador de rotina citológica, o etanol a 96%. Com este estudo, pretende-se encontrar um fixador alternativo ao etanol que melhore a acuidade da observação microscópica e, conseqüentemente, aumente a sensibilidade da citologia urinária.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Amostras

No presente estudo foram utilizados 18 lavados vesicais de pacientes que estão a ser seguidos no Serviço de Urologia do Centro Hospitalar do Porto – Hospital Geral de Santo António (CHP-HGSA) para *follow-up* de Carcinoma Urotelial.

2.2 Fixação e Processamento das amostras

A partir de cada lavado vesical, foram realizadas três preparações citológicas em monocamada pelo método de citocentrifugação: uma foi fixada pelo FineFIX[®] (*Milestone, Sorisole, Italy*), outra pelo RCL2[®] (*Alphelys, Paris, France*), e outra pelo etanol a 96%. O tempo de fixação para todas as amostras foi, aproximadamente, de 24 horas. Após a fixação, as preparações citológicas foram coradas pela coloração de Hematoxilina-Eosina (HE) e avaliadas microscopicamente quanto à citomorfologia e às características tintoriais.

2.3 Avaliação microscópica

A avaliação da fixação foi efectuada ao microscópio óptico por dois observadores independentes, tendo em consideração parâmetros morfológicos (detalhe nuclear, membrana nuclear e detalhe citoplasmático) e parâmetros relacionados com as características tintoriais das células (intensidade da coloração, basofilia nuclear e eosinofilia citoplasmática). Os diferentes parâmetros foram avaliados de acordo com os critérios apresentados na Tabela 1.

Na avaliação de cada parâmetro foi utilizada uma escala ordinal comparativa, isto é, a pontuação atribuída a cada um dos parâmetros de uma dada amostra fixada com RCL2[®] ou FineFIX[®] teve em consideração a observação da preparação citológica fixada em etanol a 96% da mesma amostra.

A escala ordinal utilizada na avaliação das preparações citológica fixadas com RCL2[®] ou FineFIX[®] foi a seguinte: 0 – qualidade inferior à obtida na preparação fixada em etanol a 96%; 1 – qualidade semelhante à obtida na preparação fixada em etanol a 96%; 2 – qualidade superior à obtida na preparação fixada em etanol a 96%.

Tabela 1. Critérios utilizados na avaliação dos diferentes parâmetros utilizados para a avaliação do efeito da fixação de lavados vesicais pelos fixadores RCL2[®], FineFIX[®] e etanol a 96%.

Parâmetro	Critério
Detalhe nuclear	Padrão de cromatina e nucléolo
Membrana nuclear	Delimitação do núcleo
Detalhe citoplasmático	Homogeneidade/heterogeneidade do citoplasma
Intensidade da coloração	Brilho/contraste da coloração
Basofilia nuclear	Características tintoriais do núcleo
Eosinofilia citoplasmática	Características tintoriais do citoplasma

2.4 Análise Estatística

Os resultados foram tratados estatisticamente no *software Statistical Package for the Social Sciences (SPSS)* para o Windows[®] versão 17.0 (SPSS Inc, Chicago, Illinois).

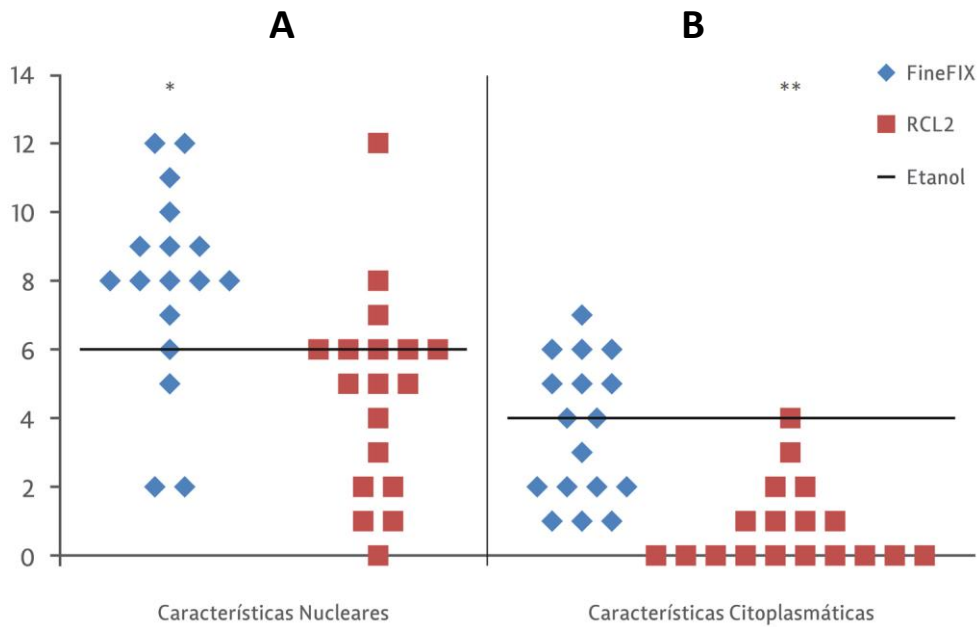
De forma a averiguar a concordância inter-observadores, efectuou-se o teste de *Wilcoxon*, um teste estatístico não paramétrico para 2 amostras emparelhadas. As observações foram consideradas concordantes para um nível de significância (α) de 0,05 quando $p \geq 0,05$. O mesmo teste foi utilizado para averiguar se existem diferenças estatisticamente significativas entre a qualidade da fixação obtida pelos diferentes fixadores. As diferenças encontradas foram consideradas estatisticamente significativas para um valor de $p \leq 0,05$.

3. RESULTADOS

As avaliações efectuadas pelos dois observadores independentes foram concordantes, facto que permitiu avaliar estatisticamente os resultados obtidos para as preparações citológicas fixadas pelo FineFIX[®] e pelo RCL2[®] comparativamente aos obtidos para as preparações citológicas fixadas pelo etanol a 96%.

Uma vez que uma boa observação do núcleo, nomeadamente do detalhe da cromatina, do nucléolo e a delimitação da membrana nuclear, só é possível quando as características morfológicas e tintoriais são preservadas pelo fixador, foi realizada uma análise destas características no seu conjunto, isto é, para cada amostra foi realizado o somatório das pontuações atribuídas a esses parâmetros. Pela análise estatística foi possível constatar que, no global, o FineFIX[®] preserva melhor as características morfológicas e tintoriais do núcleo do que o etanol ($p=0,027$) (Figura 1A). Em contrapartida, a fixação pelo RCL2[®] não preserva tão bem as características nucleares como o fixador de rotina citológica, embora as diferenças encontradas não tenham significado estatístico para um nível de significância de 0,05 ($p=0,079$) (Figura 1A).

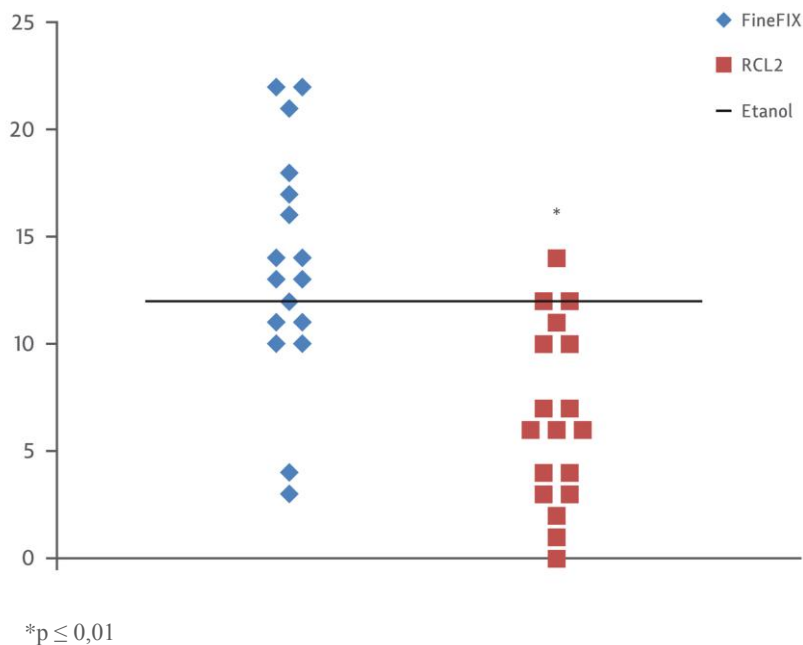
No que concerne ao efeito da fixação do FineFIX[®] nas características citoplasmáticas (detalhe do citoplasma e eosinofilia citoplasmática) não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas quando comparado ao efeito do etanol a 96%, ($p=0,387$) (Figura 1B). Em contrapartida, o efeito do RCL2[®] nas características do citoplasma é de qualidade significativamente inferior às encontradas pela fixação com o etanol a 96%, verificado através do valor de p ($p=0,000$) (Figura 1B).



* $p \leq 0,05$ ** $p \leq 0,01$

Figura 1. Distribuição da pontuação total de cada amostra fixada pelos diferentes fixadores. Pontuação obtida através do somatório dos pontos atribuídos pelos dois observadores independentes relativos às características nucleares e citoplasmáticas. Valores de p encontrados pela comparação com as preparações citológicas de referência (fixadas pelo etanol a 96%).

O efeito da fixação, de um modo geral, de cada um dos fixadores em estudo, está representado na Figura 2, onde é possível verificar que o FineFIX[®] é um fixador comparável ao etanol a 96% ($p=0,204$), enquanto o RCL2[®] confere uma qualidade significativamente inferior às preparações citológicas do que o fixador de rotina citológica ($p=0,001$).



* $p \leq 0,01$

Figura 2. Distribuição da pontuação total de cada amostra fixada pelos diferentes fixadores. Pontuação obtida através do somatório dos pontos atribuídos pelos dois observadores independentes a todos os parâmetros avaliados. Valores de p encontrados pela comparação com as preparações citológicas de referência (fixadas pelo etanol a 96%).

A análise dos resultados obtidos neste estudo é constatada na Figura 3, onde pode ser observado que o detalhe nuclear encontrado nas células fixadas em RCL2[®] (Figura 3B) é muito similar ao das células fixadas pelo etanol (Figura 3A). Relativamente às células fixadas pelo FineFIX[®] estas apresentam melhor detalhe nuclear (Figura 3D) comparativamente ao observado nas células fixadas em etanol a 96% (Figura 3C). Adicionalmente, o citoplasma das células fixadas com RCL2[®] apresenta vacúolos, não sendo possível visualizar a homogeneidade/heterogeneidade citoplasmática (Figura 3B), ao contrário do que se observa nas células fixadas com FineFIX[®] (Figura 3D) ou etanol a 96% (Figura 3C).

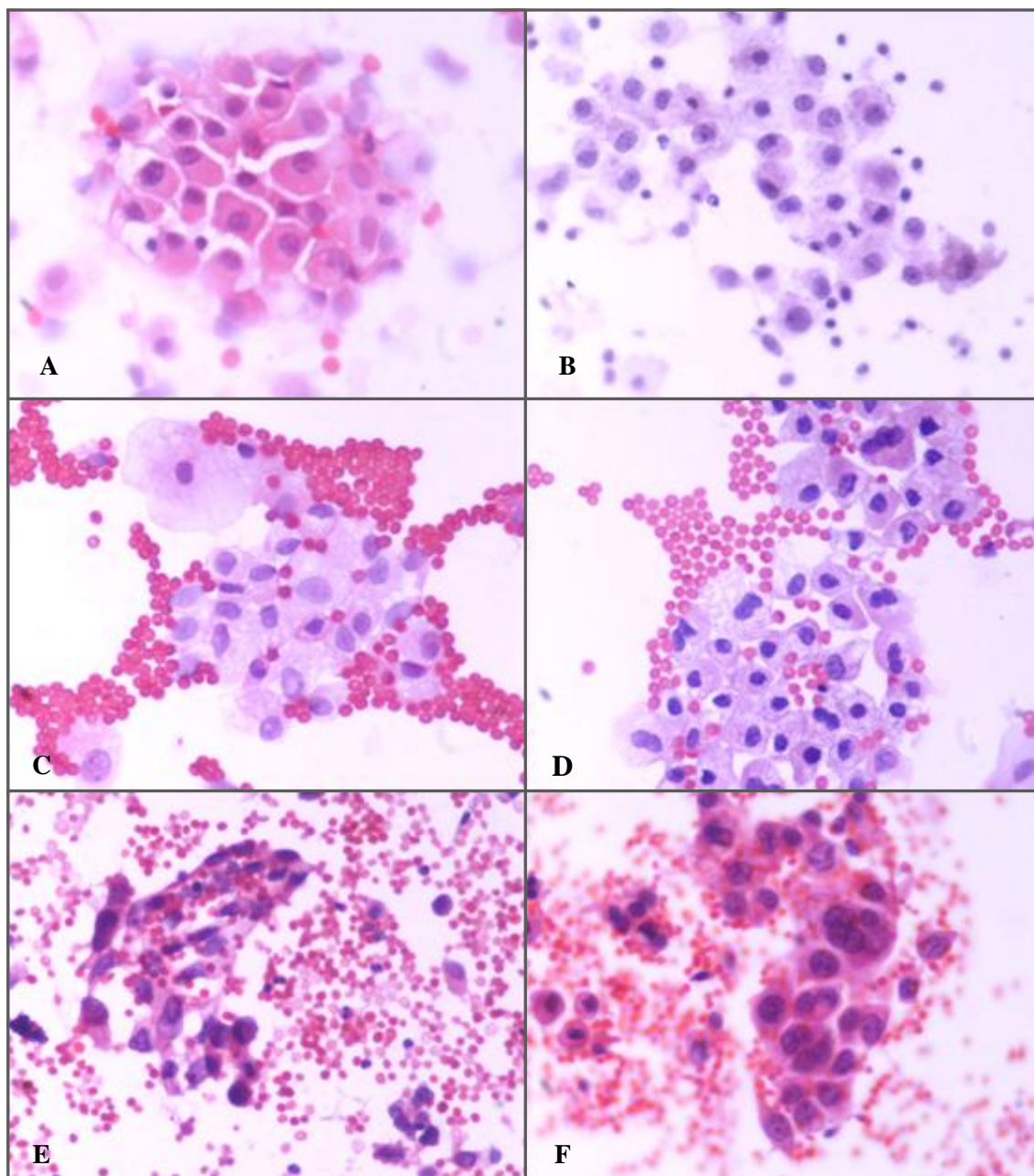


Figura 3. Fotografias ilustrativas das preparações citológicas de lavados vesicais fixadas pelo etanol a 96% (A, C, E), RCL2[®] (B) e pelo FineFIX[®] (D e F), coradas pela coloração de HE (Ampliação 400x).

Como referido anteriormente a morfologia celular é observada apenas ao microscópio de luz através da coloração celular, pelo que a qualidade da coloração vai afectar a visualização da morfologia. Um dos factores que afecta a coloração das células e tecidos é a fixação, uma vez que a afinidade dos corantes pelos componentes celulares varia com o tipo de fixador utilizado.

Por observação da figura 3 constata-se um bom contraste entre a coloração do núcleo e a do citoplasma das células fixadas quer em etanol a 96% (Figura 3E) quer em FineFIX[®] (Figura 3F), sendo fácil a sua observação. O mesmo resultado não foi observado nas células fixadas em RCL2[®] (Figura 3B), onde o contraste entre as colorações nuclear e citoplasmática é fraco.

De notar que nas preparações citológicas fixadas pelo RCL2[®] não são observados eritrócitos (Figura 3B), enquanto nas preparações fixadas pelo FineFIX[®] (Figura 3D) e pelo etanol a 96% (Figura 3C) estes elementos celulares são visíveis.

4. DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

Os resultados deste estudo piloto mostram que as qualidades do FineFIX[®] como fixador são semelhantes às do etanol a 96%, apesar do mesmo não se verificar em relação ao RCL2[®], cuja qualidade da fixação é inferior comparativamente ao fixador de rotina citológica.

Embora não existam diferenças estatisticamente significativas entre o efeito global da fixação pelo FineFIX[®] e pelo etanol a 96%, o FineFIX[®] promove uma fixação de qualidade superior à do fixador de rotina citológica no que respeita à preservação das características nucleares, com significância estatística. Uma boa observação, nomeadamente do detalhe da cromatina, do nucléolo e da delimitação da membrana nuclear, é essencial para o estabelecimento de um diagnóstico correcto. Sendo assim, os efeitos do FineFIX[®] podem constituir uma mais-valia no aumento da acuidade da observação microscópica.

A qualidade da preservação do citoplasma, não é tão relevante como a do núcleo para discriminar uma lesão maligna de uma lesão benigna, no entanto pode ser significativamente importante quando se pretende evidenciar estruturas por histoquímica ou antigénios por imunocitoquímica. Relativamente ao FineFIX[®], a preservação das características citoplasmáticas é semelhante à do etanol a 96%, apesar do mesmo não acontecer com o RCL2[®], em que a qualidade da preservação do detalhe do citoplasma e da eosinofilia citoplasmática é significativamente inferior ao fixador de rotina citológica. De referir que neste estudo foi possível observar vacuolização citoplasmática das células fixadas pelo RCL2[®], o que constitui um artefacto de fixação.

Os resultados obtidos no presente estudo corroboram com os resultados descritos por Gazziero et al, 2009 em *cell blocks*, relativamente à boa preservação das características nucleares e citoplasmáticas pelo FineFIX[®]. Contrariamente a alguns estudos publicados sobre a fixação de tecidos pelo RCL2[®], este estudo mostrou que o RCL2[®] apresenta uma fraca capacidade de preservação das características citoplasmáticas (Douglas and William, 2005; Lassalle et al, 2009).

De acordo com o que se encontra descrito na literatura, as preparações citológicas fixadas pelo RCL2[®] evidenciaram a lise dos eritrócitos, causada pela acção de um dos seus constituintes, o ácido acético (Grégoire e tal, 1997). Neste tipo de amostra a presença de eritrócitos não interfere com o diagnóstico citológico. Contudo, este resultado deve ser considerado noutros tipos de amostra, como é o caso da citologia cervico-vaginal, em que a presença de diátese tumoral pode auxiliar na elaboração do diagnóstico (Solomon and Nayer, 2004).

A avaliação do efeito da fixação pelo FineFIX[®] e pelo RCL2[®] não foi efectuada em colorações histoquímicas nem em imunocitoquímica. Será interessante avaliar a preservação de alguns componentes celulares e a detecção de microorganismos, assim como de alguns antigénios, nomeadamente os antigénios que permitem diferenciar o carcinoma urotelial de baixo-grau do carcinoma urotelial de alto-grau.

Em conclusão, o FineFIX[®] é um potencial fixador alternativo ao etanol para a prática citológica, nomeadamente por aumentar o detalhe nuclear, característica importante para melhorar a acuidade da observação microscópica e, conseqüentemente, aumentar a sensibilidade da citologia urinária.

AGRADECIMENTOS

Um ilustre agradecimento ao Professor Doutor Carlos Lopes, Director do Serviço de Anatomia Patológica do CHP-HGSA, pela autorização concedida para a realização do estudo, nomeadamente no que respeita à utilização de amostras e equipamento.

Um especial agradecimento à Dra. Sandra Alves, pelo apoio prestado na análise estatística dos resultados obtidos.

Um último agradecimento, e não menos importante, às empresas INOPAT e ZMWay por terem cedido, gentilmente, os reagentes o FineFIX[®] e o RCL2[®], respectivamente, para a concretização deste estudo.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Baak, J.P., Noteboom, E., & Koevoets, J.J. (1989). The influence of fixatives and other variations in tissue processing on nuclear morphometric features. *Anal Quant Cytol Histol*, 11(4):219-24.
- Badalament, R.A., Hermansen, D.K., Kimmel, M., Gay, H., Herr, H.W., Fair, W.R., et al. (1987). The sensitivity of bladder wash flow cytometry, bladder wash cytology, and voided cytology in detection of bladder carcinoma. *Cancer*, 60:1423-1427.
- Bancroft, J.D., & Gamble, M. (2008). *Theory and practice of histological techniques: Fixation of tissues* (6th ed.). Edinburgh: Churchill Livingstone. p.53-71.
- Bignold, L.P. (2002). Hypothesis for the influence of fixatives on the chromatin patterns of interphase nuclei, based on shrinkage and retraction of nuclear and perinuclear structures. *Br J Biomed Sci*, 59(2):105-13
- Brown, F.M. (2000). Urine cytology. It is still the gold standard for screening? *Urol Clin North Am*, 27(1): 25-37.
- Delfour, C., Roger, P., Bret, C., Berthe, M.L., Rochaix, P., Kalfa, N., et al. (2006). RCL2, a new fixative, preserves morphology and nucleic acid integrity in paraffin-embedded breast carcinoma and microdissected breast tumor cells. *J Mol Diagn*, 8(2):157-69.
- Demay, R.M. (2007). *Practical principles of cytopathology*. Chicago: ASCP. p. 95
- Gazziero, A., Guzzardo, V., Aldighieri, E., & Fassina, A. (2009). Morphological quality and nucleic acid preservation in cytopathology. *JCP*, 62: 429-34.
- Grégoire, M., Fradet, Y., Meyer, F., Têtu, B., Bois, R., Bédard, G., et al. (1997). Diagnostic accuracy of urinary cytology, and deoxyribonucleic acid flow cytometry and cytology on bladder washings during follow-up for bladder tumors. *J Urol*, 157(5):1660-4.
- Hermansen, D.K., Melamed, M.R., Coon, J.S., Weinstein, R.S., White, R.D., Deitch, A.D., et al. (1989). Ethanol fixation of bladder irrigation specimens for flow cytometric analysis. A multiinstitutional study from the bladder cancer flow cytometry network. *Cancer*, 63(9):1780-3.
- Jamur, M.C., & Oliver, C. (2010). Cell fixatives for immunostaining. *Methods Mol Biol*, 588:55-61.
- Junqueira, L.C., & Carneiro, J. (2004). *Histologia Básica*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. p.2.
- Lassalle, S., Hofman, V., LLie, M., Gavric-Tanga, V., Brest, P., Havet, K., et al. (2009). Assesment of morphology, antigenicity, and nucleic acid integrity for diagnostic thyroid pathology using formalin substitute fixatives. *Thyroid Cancer and Nodule*, 19(11):1239-249
- Lindberg, L.G., & Ohlin, B. (1978). Specimen fixation in urinary cytology. *Acta Cytol*, 22(3):142-5.
- Solomon, D. & Nayer, R. (2004). *The Bethesda System for Reporting Cervical Cytology* (2nd ed.). New York: Springer. p. 116-118, 141-144, 147-150
- Stanta, G., Pozzi, M.S., Petrera, F., et al. (2006). A novel fixative improves opportunity of nucleic acids and proteomic analysis in human archive's tissues. *Diagn Mol Pathol*, 15:115-23.
- Têtu, B. (2009). Diagnosis of urothelial carcinoma from urine. *Mod Pathol*, 22 Suppl 2:S53-9.
- The International Agency for Research on Cancer (IARC). (2004). IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Formaldehyde, 2-Butoxyethanol and 1-tert-Butoxy-2- propanol. Vol 88.