

HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE

RESIDÊNCIA MÉDICA EM CITOPATOLOGIA

Christiano Tomasso Silveira Ponzoni

**ASPIRADO TRANSBRÔNQUICO POR AGULHA GUIADO POR
ULTRASSONOGRAFIA ENDOBRÔNQUICA (EBUS - TBNA) COM O USO DE
“CELL BLOCK” COMO FERRAMENTA DIAGNÓSTICA EM PATOLOGIA
CIRÚRGICA**

Porto Alegre

2021

Christiano Tomasso Silveira Ponzoni

**ASPIRADO TRANSBRÔNQUICO POR AGULHA GUIADO POR
ULTRASSONOGRAFIA ENDOBRÔNQUICA (EBUS - TBNA) COM O USO DE
“CELL BLOCK” COMO FERRAMENTA DIAGNÓSTICA EM PATOLOGIA
CIRÚRGICA**

Trabalho de Conclusão produzido no programa de Residência Médica em Citopatologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, como requisito parcial para a obtenção do título de especialista em Citopatologia.

Orientadora: Profa. Dra Heloisa Jesse Folgierini
Co-Orientador: Vitor Barreto Santana, médico patologista

Porto Alegre

2021

CIP - Catalogação na Publicação

Ponzoni, Christiano Tomasso Silveira

Aspirado transbrônquico por agulha guiado por ultrassonografia endobrônquica (EBUS - BNA) com o uso de "cell block" como ferramenta diagnóstica em patologia cirúrgica / Christiano Tomasso Silveira Ponzoni. -- 2021.

44 f.

Orientador: Heloisa Jesse Folgierini.

Coorientador: Vitor Barreto Santana.

Trabalho de conclusão de curso (Especialização) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Patologia: Área de atuação - Citopatologia, Porto Alegre, BR-RS, 2021.

1. EBUS-TBNA. 2. Câncer de Pulmão. 3. Estadiamento Neoplásico. 4. Linfonodos hilares e mediastinais. 5. Emblocado celular. I. Folgierini, Heloisa Jesse, orient. II. Santana, Vitor Barreto, coorient. III. Título.

AGRADECIMENTOS

A produção deste trabalho foi um processo longo e cansativo, porém gratificante. Certamente, o apoio e o conhecimento técnico e científico de meus preceptores citopatologistas representou uma grande, significativa e considerável contribuição para a satisfatória execução desta tarefa. Além, de que graças aos ensinamentos das professoras Dra Heloísa Folgierini e Dra Marcia Graudenz e do médico patologista contratado Vitor Santana, pude aprimorar enormemente meus conhecimentos em patologia. Preciso agradecer aos meus colegas de residência em patologia, os médicos Joelson Tomedi, Hellen Werka, Bibiana Quatrin Tiellet e Ana Clara Derani, pela ajuda com formatação, inglês, ferramentas tecnológicas, revisão do texto, dicas de redação e estratégias de pesquisa, sugestões de tópicos e, principalmente, apoio nos momentos difíceis. E agradeço ao meu irmão Leonardo Ponzoni pela ajuda com o Libreoffice para a formatação e paginação finais. Também devo agradecer a paciência e o auxílio das funcionárias Rosicler Brackmann, Gisele Pandolfi e Izeti Pacheco em infindáveis discussões de lâminas que tivemos este último ano. E por fim ao apoio das funcionárias Liane Scheffler e Vera Lúcia Sievert, pelo bom trabalho na confecção de lâminas e emblocados celulares.

RESUMO

O Aspirado transbrônquico por agulha guiado por ultrassonografia endobrônquica (EBUS-TBNA) é uma nova ferramenta diagnóstica que possibilita a obtenção de material para o estadiamento mediastinal do câncer de pulmão, investigação de linfonodomegalias mediastinais por neoplasia ou condições benignas como sarcoidose e tuberculose. O EBUS-TBNA é uma modalidade diagnóstica minimamente invasiva, segura e considerada a mais apropriada para a obtenção de material diagnóstico em pacientes com carcinoma de pulmão avançado. Em conjunto com o uso de técnicas de emblocado celular (“cell block”) é possível utilizar o material das punções para realizar diversos testes diagnósticos auxiliares como colorações especiais, imuno-histoquímica e testes de biologia molecular. A biologia molecular, por sua vez, é um campo crescente na medicina e oferece tratamentos promissores para várias neoplasias, especialmente o câncer de pulmão. A mutação do EGFR e o rearranjo do ALK são as principais alterações genéticas encontradas no carcinoma de pulmão e oferecem possibilidades de drogas alvo com inquestionável impacto na sobrevivência dos pacientes, apesar de seu alto custo. A técnica de EBUS-TBNA desenvolve-se como a mais apropriada para o estadiamento do câncer de pulmão obtendo alta taxa de sucesso na obtenção de material biológico para fins diagnósticos e realização dos testes auxiliares necessários para definição das possibilidades terapêuticas. Neste trabalho, revisaram-se os aspectos técnicos quanto a equipamento e achados diagnósticos, evolução histórica, vantagens, segurança e complicações, uso da técnica de ultrassonografia endoscópica em outros órgãos. Revisaram-se também as técnicas para obtenção do emblocado celular e os aspectos mais pertinentes de biologia molecular aplicada ao câncer de pulmão.

Palavras-chave: EBUS-TBNA, Câncer de Pulmão, Estadiamento Neoplásico, Linfonodos hilares e mediastinais, Emblocado celular.

ABSTRACT

Transbronchial needle aspiration guided by endobronchial ultrasound (EBUS-TBNA) is a new diagnostic tool that allows collection of material for mediastinal lung cancer staging, investigation of mediastinal lymph node enlargement due to neoplasia or benign conditions such as sarcoidosis and tuberculosis. EBUS-TBNA is a minimally invasive, safe and considered the most appropriate diagnostic modality for obtaining diagnostic material in patients with advanced lung carcinoma. In conjunction with the use of cell block techniques, it is possible to use the material collected to perform various auxiliary diagnostic tests such as special stains, immunohistochemistry and molecular biology tests. Molecular biology is a growing field in medicine and offers promising treatments for several neoplasms, especially lung cancer. The EGFR mutation and ALK rearrangement are the main genetic changes found in lung carcinoma and provide possibilities for target drugs with an unquestionable impact on patient survival, despite their high cost. The EBUS-TBNA technique is developed as the most appropriate for lung cancer staging, resulting in a high rate of success in obtaining biological material for diagnostic purposes and carrying out the necessary auxiliary tests to define the therapeutic possibilities. In this work, the technical aspects were reviewed regarding equipment and diagnostic findings, historical evolution, advantages, safety and complications, use of the endoscopic ultrasound technique in other organs. It also reviewed the techniques for obtaining the cell block and the most relevant aspects of molecular biology applied to lung cancer.

Keywords: EBUS-TBNA, Lung cancer, Neoplasm staging, Mediastinal and hilar lymph nodes, Cell block.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Mapa de linfonodos regionais.....	10
Figura 2 - Ecobroncoscópico Olympus, com o balão de látex acoplado e inflado.....	11
Figura 3- Características sonográficas representativas da ultrassonografia endobrônquica (EBUS).	13
Figura 4- Minifórceps para a realização da biópsia intranodal por fórceps (IFB).....	14
Figura 5- Complicação rara: quebra da agulha.....	16
Figura 6 - Disseminação neoplásica pelo trajeto da agulha.	17
Figura 7 - A natureza complementar da ultrassonografia endobrônquica (EBUS) e da ultrassonografia endoscópica esofágica (EUS) para o estadiamento nodal.....	19
Figura 8 - Citologia preparada a partir de um aspirado por agulha fina guiado por ultrassonografia endoscópica mostrando um adenocarcinoma bem diferenciado, atipia nuclear leve, aglomeração nuclear e alguma dissociação de células (papanicolaou, X200).....	21
Figura 9 - Emblocado celular ("cell block") confeccionado a partir de um aspirado por agulha fina guiado por ultrassonografia endoscópica evidenciando glândulas malignas em um fundo de tecido necrótico e inflamatório (hematoxilina e eosina, x200).....	21
Figura 10 - A preparação do emblocado celular usando o método da coagulação tecidual é exibido.....	25
Figura 11- Exemplos de preparação de emblocado celular usando o método da autocoagulação tecidual.....	26
Figura 12- Etapas de procedimento do método da plasma-trombina para efusões simples.....	27
Figura 13- Etapas do método de ágar para preparação de emblocado celular.....	28
Figura 14- Passos básicos do sistema de emblocado celular automatizado Cellient.....	29
Figura 15 - Caso de adenocarcinoma de pulmão com determinação de ALK.....	35

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	7
2 O QUE É O EBUS-TBNA?.....	9
2.1 CARACTERÍSTICAS DO EQUIPAMENTO.....	10
2.2 CARACTERÍSTICAS DA AVALIAÇÃO ULTRASSONOGRÁFICA.....	11
2.3 ASPIRADO TRANSBRÔNQUICO POR AGULHA (TBNA) CONVENCIONAL.....	13
2.4 A BIÓPSIA INTRANODAL POR FÓRCEPS (IFB).....	13
2.5 VANTAGENS DO EBUS-TBNA.....	14
2.6 SEGURANÇA E COMPLICAÇÕES.....	15
2.7 USOS EM OUTROS ORGÃOS.....	16
3 CELL BLOCK.....	22
3.1 TÉCNICAS PARA CONFEÇÃO DE “CELL BLOCK”.....	23
3.2 LIMITAÇÕES APRESENTADAS PELOS “CELL BLOCK”.....	28
3.3 A EXPERIÊNCIA DO HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE COM O USO DA TÉCNICA DE “CELL BLOCK” PARA AUXÍLIO DIAGNÓSTICO EM CITOPATOLOGIA.....	30
4 USOS PARA IMUNO-HISTOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR.....	33
4.1 IMUNO-HISTOQUÍMICA PARA CARCINOMAS DE PULMÃO DE CÉLULAS NÃO-PEQUENAS.....	33
4.2 TESTES DE BIOLOGIA MOLECULAR PARA CARCINOMAS DE PULMÃO DE CÉLULAS NÃO-PEQUENAS.....	34
4.3 O CUSTO E A ACESSIBILIDADE ÀS TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO MOLECULAR E ÀS DROGAS ALVO.....	35
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	37
6 REFERÊNCIAS.....	38

1 INTRODUÇÃO

O câncer de pulmão permanece como o câncer mais comum do mundo, tanto em termos de novos casos (1,8 milhões de casos, 12,9% do total), quanto em mortes por neoplasia (1,6 milhões de mortes, 19,4% do total)¹. Na Europa, é o quarto câncer mais diagnosticado e a principal causa de morte por câncer². No Brasil, o câncer de pulmão é a principal causa de morte por câncer entre os homens e a segunda entre as mulheres³. Metástases para os linfonodos mediastinais são um dos fatores mais importantes em determinar a ressecabilidade e o prognóstico. O estadiamento mediastinal cuidadoso é essencial para identificar candidatos apropriados para a cirurgia e para evitar toracotomias fúteis em pacientes com doença avançada. Como o estadiamento radiológico é limitado em sensibilidade e especificidade, faz-se necessário amostrar os linfonodos mediastinais para confirmação de resultados anormais.

Tradicionalmente, a mediastinoscopia tem sido usada para a avaliação do mediastino, entretanto o aspirado transbrônquico por agulha guiado por ultrassonografia endobrônquica (EBUS-TBNA) oferece uma alternativa minimamente invasiva de diagnóstico. O EBUS-TBNA apresenta resultados comparáveis de sensibilidade, embora o valor preditivo negativo (e o tamanho da amostra) da mediastinoscopia seja maior. E o EBUS-TBNA também exige um treinamento mais complexo do broncoscopista⁴.

O uso do EBUS-TBNA ainda é pouco difundido no Brasil, mas já vem sendo introduzido na prática de hospitais universitários e apresenta resultados diagnósticos semelhantes aos observados em outros países⁵. Naturalmente, a implementação e difusão do EBUS-TBNA no Brasil exigirá planejamento; treinamento para profissionais médicos e de enfermagem; mudanças na estrutura física de unidades de saúde; protocolos operacionais; e uma estratégia de cobrança apropriada para o país⁶.

O uso do EBUS-TBNA segue a tendência da medicina moderna de buscar alternativas menos invasivas e menos onerosas, exigindo novas capacidades dos médicos inclusive os patologistas. A substituição dos espécimes cirúrgicos de linfadectomia mediastinal por materiais de punções aspirativas por agulha, usados para confeccionar esfregaços e emblocados celulares (“cell block”), aumenta a exigência da habilidade diagnóstica do patologista. Porém, também oferece o espaço para uma maior contribuição deste especialista nos processos de diagnóstico, tratamento e cuidados dos pacientes oncológicos, com sua consequente valorização.

Os resultados obtidos após a introdução desta nova técnica em termos de acurácia diagnóstica e segurança convencem os médicos que ela pode representar uma ferramenta de diagnóstico inovadora com vários avanços incluindo abordagem minimamente invasiva,

segura, custo-efetiva, com orientação em tempo real, larga capacidade de amostragem e possibilidade da realização de avaliação rápida no local (ROSE, rapid on-site evaluation, tema que exorbita o escopo deste trabalho). O EBUS-TBNA também adquiriu importância em casos em que procedimentos cirúrgicos são contraindicados ou desnecessários, como pacientes com comorbidades que aumentem o risco cirúrgico, e é mais apropriado para pacientes cuja doença não necessite de tratamentos cirúrgicos como linfomas, neoplasias de células germinativas ou câncer de pulmão metastático.

Assim, por avaliar a relevância desse cenário, seu impacto na saúde pública e nas práticas profissionais dos patologistas, foi decidido estudar, para a produção deste Trabalho de Conclusão de Residência, esse tema. Serão revisadas as características do EBUS-TBNA, associadas as técnicas para confecção de emblocados celulares, ferramenta necessária para realizar os estudos imuno-histoquímicos e de biologia molecular mais frequentemente aplicados no diagnóstico, estadiamento e tratamento do câncer de pulmão atualmente.

2 O QUE É O EBUS-TBNA?

O EBUS-TBNA é uma opção minimamente invasiva para o estadiamento do mediastino em casos suspeitos de câncer de pulmão do tipo não pequenas células. O aspirado por agulha fina guiado por ultrassonografia endoscópica esofágica foi desenvolvido nos anos 1980s para avaliação de neoplasias gastrointestinais. Devido à proximidade do esôfago com as estruturas mediastinais, a técnica foi adaptada para acessar linfonodos mediastinais. No entanto, a interferência da via aérea e a impossibilidade de acessar algumas estações estimularam o desenvolvimento do EBUS-TBNA. Entre as modificações incluem-se sondas menores e instrumentos compatíveis com o canal de trabalho⁷.

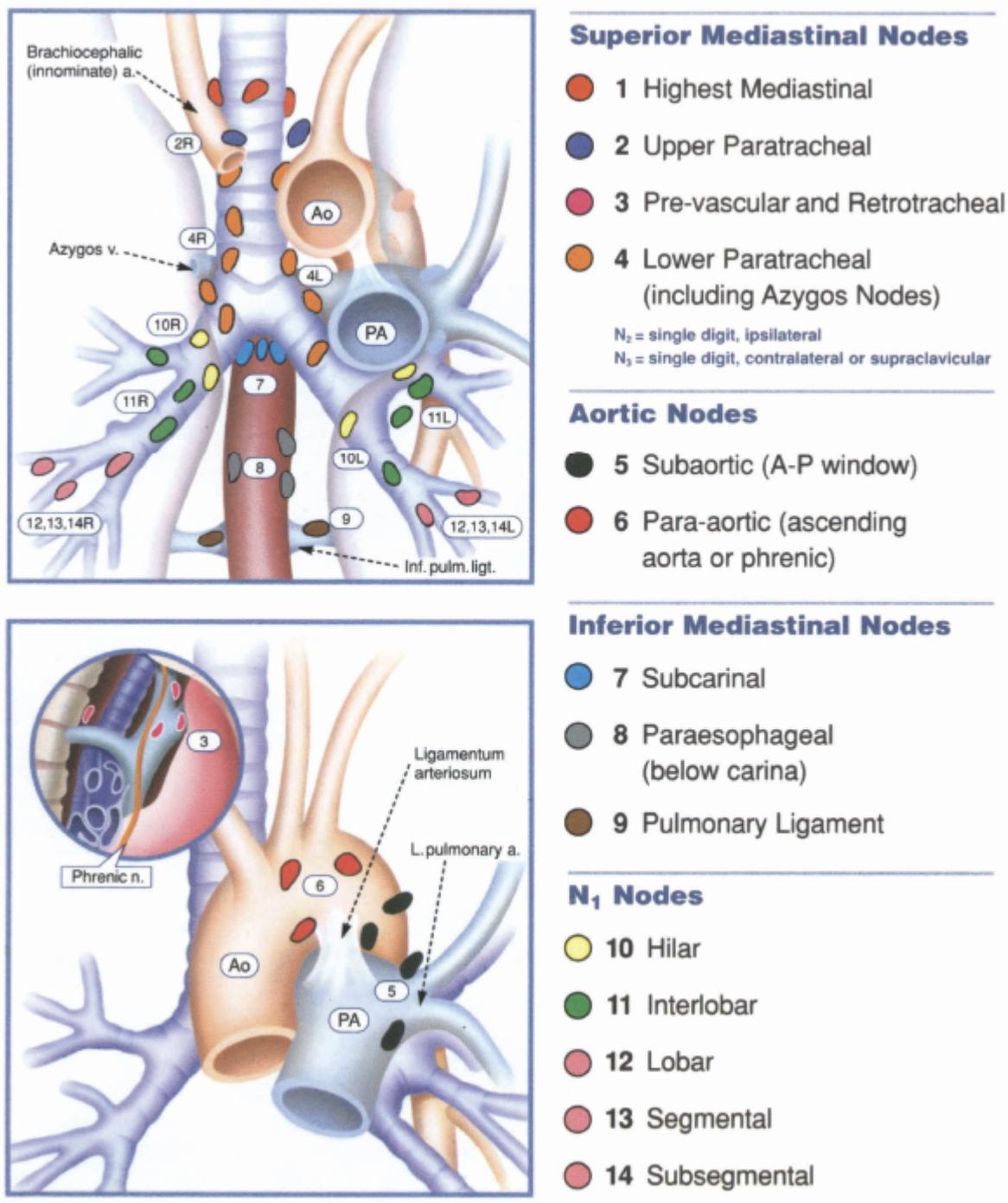
Antes da disponibilidade das técnicas endoscópicas minimamente invasivas o estadiamento era feito por vias cirúrgicas: a mediastinoscopia cervical e a mediastinotomia anterior [Figura 1]. Este estadiamento é importante porque o envolvimento de linfonodos mediastinais correlaciona-se com metástases extratorácicas⁸.

O ganho diagnóstico do EBUS-TBNA está relacionado aos nódulos mediastinais e hilares localizados imediatamente adjacentes à traqueia e às vias aéreas mais largas. Estes compreendem as estações 2L, 2R, 4L, 4R e estação 7. Apenas a ultrassonografia endobrônquica pode amostrar tecido dos nódulos hilares (estação 10) e dos nódulos intrapulmonares (estações 11 e 12)⁹.

O EBUS-TBNA também é usado para investigação de linfadenopatias mediastinais inexplicadas acessíveis pelas vias aéreas maiores, incluindo condições benignas como sarcoidose e tuberculose. Outro uso, também, é como ferramenta de pesquisa para a amostragem para bancos de tecido, visando estudos posteriores.

Observa-se que o procedimento de EBUS-TBNA exige um treinamento mais complexo dos profissionais médicos e da equipe de apoio, e o equipamento, bem como sua manutenção, e as agulhas apresentam alto custo⁷. Assim, o principal obstáculo para a difusão da técnica é o financiamento do treinamento dos operadores, da aquisição do equipamento e de seus insumos.

Figura 1 - Mapa de linfonodos regionais.



Fonte: Mountain e Dresler, 1997.

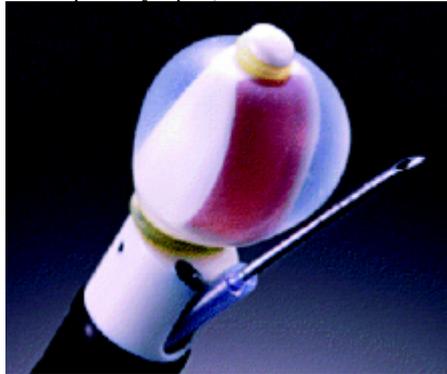
2.1 CARACTERÍSTICAS DO EQUIPAMENTO

O sistema é dedicado para o EBUS-TBNA, tendo um diâmetro distal de 6,3-6,9 mm (dependendo da marca) e um canal de trabalho de 2 mm, capaz de acomodar uma agulha de 19G à 22G. A visão broncoscópica é oblíqua e não frontal. A sonda de ultrassom está integrada a extremidade distal. A função doppler do sistema provê a identificação de

estruturas vasculares, garantindo maior segurança durante a aspiração. A função “picture-in-picture” do processador do broncoscópico permite a exibição lado a lado das imagens broncoscópica e ultrassonográfica na mesma tela⁶.

A sonda localizada na extremidade distal do sistema deve ser inserida dentro de um balão de látex. Durante o procedimento, este balão deve ser inflado com água destilada no momento da visualização ultrassonográfica da estrutura que será aspirada⁶ [Figura 2].

Figura 2 - Ecobroncoscópico Olympus, com o balão de látex acoplado e inflado.



Fonte: Figueiredo, et al., 2013.

A agulha de EBUS-TBNA é dedicada, descartável e específica para o sistema usado. Ela apresenta ondulações na extremidade distal que possibilitam sua visualização no ultrassom. Com a agulha, tem uma seringa a vácuo e uma válvula dedicada que conecta a agulha ao canal de trabalho do sistema EBUS⁶.

2.2 CARACTERÍSTICAS DA AVALIAÇÃO ULTRASSONOGRÁFICA

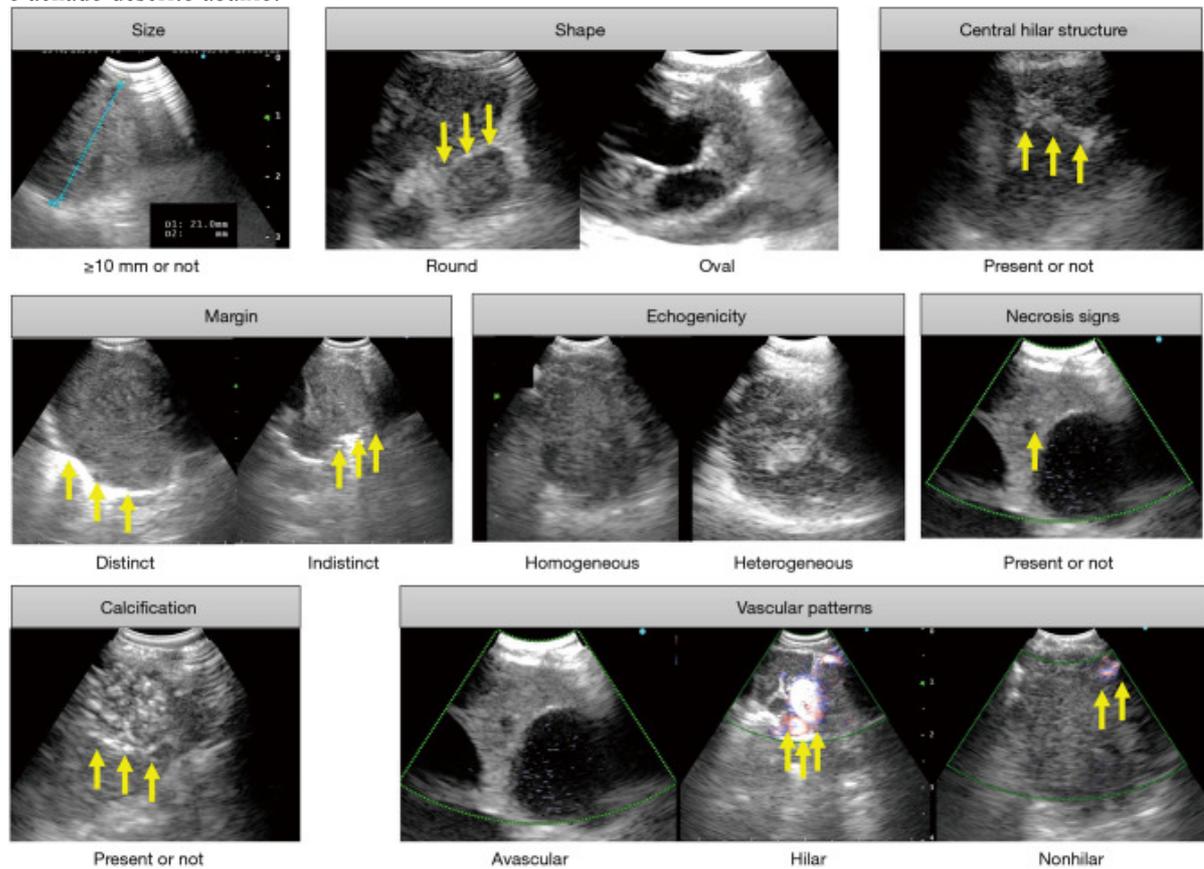
O equipamento ultrassonográfico usado para o procedimento de EBUS-TBNA é capaz de detectar pequenos linfonodos a partir de 2 mm, que não são visíveis em exames de tomografia computadorizada. Linfonodos a partir de 3 mm no menor eixo podem ser puncionados sobre orientação ultrassonográfica em tempo real. A avaliação cuidadosa das características ultrassonográficas dos linfonodos ajudam a predizer a presença de metástase, orientando a realização de aspiração por agulha em linfonodos suspeitos ou evitando biópsias desnecessárias naqueles com aspecto benigno.

Os linfonodos devem ser caracterizados ultrassonograficamente quanto a pelo menos seis aspectos: (1) menor eixo (medida maior ou menor que 1,0 cm), (2) forma (oval ou redonda), (3) margens (distintas ou indistintas), (4) ecogenicidade (homogênea ou

heterogênea), (5) presença ou ausência de estrutura hilar central e (6) presença ou ausência de sinais de necrose de coagulação. A forma é definida a partir da razão entre o maior e o menor eixo, se menor que 1,5 é redondo, se maior é oval. As margens são avaliadas em relação à diferença de ecogenicidade entre o linfonodo e a estrutura de tecido conjuntivo ao redor. Se forem claramente visualizadas bordas hiperecoicas em mais de 50% da margem, ela é definida como distinta, se, por outro lado, não for clara é indistinta. A presença de estrutura hilar central é definida como uma área linear, plana e hiperecoica no centro do linfonodo. O sinal de necrose de coagulação é a presença de uma área hipoecoica, sem fluxo sanguíneo, dentro do linfonodo.

Estudos consideram fatores preditivos de metástase nodal mais significativos a forma redonda, margem distinta, ecogenicidade heterogênea e presença de sinais de necrose de coagulação¹⁰. Por outro lado, são consideradas características de benignidade a forma oval, margens indistintas, ecogenicidade homogênea e ausência de sinais de necrose de coagulação¹¹. Outros estudos sugerem avaliar também aspectos como presença de calcificação, padrão de entrelaçamento com o tecido conjuntivo adjacente, que poderia indicar disseminação extracapsular, e o padrão vascular, classificado como avascular, hilar e não-hilar, este último sendo considerado suspeito para metástase¹²[Figura 3].

Figura 3- Características sonográficas representativas da ultrassonografia endobrônquica (EBUS). Seta mostra o achado descrito abaixo.



Fonte: Yamamichi, et al., 2020.

2.3 ASPIRADO TRANSBRÔNQUICO POR AGULHA (TBNA) CONVENCIONAL

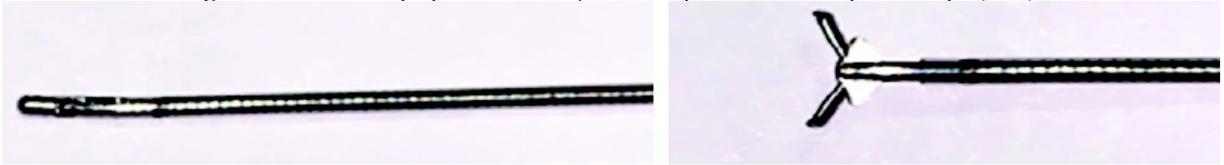
A técnica de TBNA foi primeiramente proposta na década de 80 do século passado, ainda com o uso de broncoscopia rígida¹³. Guiada por imagens estáticas de tomografia computadorizada e dependente do conhecimento anatômico para realizar as punções “às cegas”, tende a ser menos utilizada para o estadiamento do câncer de pulmão por apresentar baixa sensibilidade¹⁴. Mas pode ser usada como uma alternativa de menor custo e menor exigência de treinamento, por tanto mais facilmente adotável por pneumologistas, para a investigação de outras doenças pulmonares como sarcoidose e tuberculose.

2.4 A BIÓPSIA INTRANODAL POR FÓRCEPS (IFB)

Considerada um metodologia complementar ao EBUS-TBNA, a biópsia intranodal por fórceps (EBUS-IFB), foi desenvolvida para atender a demanda pela aquisição de tecidos e mais material tumoral para os testes diagnósticos largamente empregados em biologia

molecular e sequenciamento genético de nova geração¹⁵. A técnica utiliza o mesmo broncoscópio padrão para EBUS, a agulha de TBNA e um minifórceps [Figura 4] de 1,0 mm.

Figura 4- Minifórceps para a realização da biópsia intranodal por fórceps (IFB).



Fonte: Cheng, et al., 2019.

Em seguida a realização do EBUS-TBNA, a mucosa da via aérea é perfurada 4 ou 5 vezes no mesmo ponto, usando a agulha de EBUS-TBNA guiada pelo ultrassom. Isto criará um defeito na mucosa da via aérea, bem como um caminho para a introdução do minifórceps dentro do linfonodo almejado. Uma vez dentro da lesão alvo o minifórceps é aberto e espécimes de biópsia são coletados e podem ser processados como biópsia rotineiras¹⁵.

2.5 VANTAGENS DO EBUS-TBNA

O uso do EBUS-TBNA como método de estadiamento do câncer de pulmão tem demonstrado maior sensibilidade, especificidade e acurácia em relação às outras alternativas diagnósticas disponíveis. A possibilidade de coleta de material biológico para confirmação diagnóstica, sua maior precisão e seu caráter mais seguro o tornam o procedimento de escolha em relação ao estadiamento radiológico, por tomografia computadorizada e tomografia por emissão de pósitrons; o aspirado transbrônquico por agulha (TBNA) convencional e a mediastinoscopia.

Estudos comparando o EBUS-TBNA ao estadiamento radiológico por tomografia computadorizada e tomografia por emissão de pósitrons demonstraram superioridade diagnóstica em sensibilidade (92,3% vs 76,9% e 80%, respectivamente), especificidade (100% vs 55% e 70%, respectivamente) e acurácia (98% vs 61% e 73%, respectivamente) no estadiamento pré-operatório em pacientes com câncer de pulmão potencialmente operável⁷. Essa superioridade é devida a possibilidade de identificar linfonodos, menores que 10 mm, não visualizáveis por tomografia, além da possibilidade de coletar material biológico para confirmação do diagnóstico¹⁶.

O EBUS-TBNA apresenta acurácia diagnóstica superior ao TBNA convencional nas estações paratraqueais (2 e 4), nas hilares (10) e interlobares (11), acessíveis por ambas as

técnicas (84% vs 58%)⁷, exceto na estação subcarinal (7), na qual são semelhantes (86% vs 74%)⁷. O uso da visão direta da lesão alvo no momento da amostra permite a coleta de mais material e a identificação de vasos, evitando sua perfuração, reduz as complicações⁷.

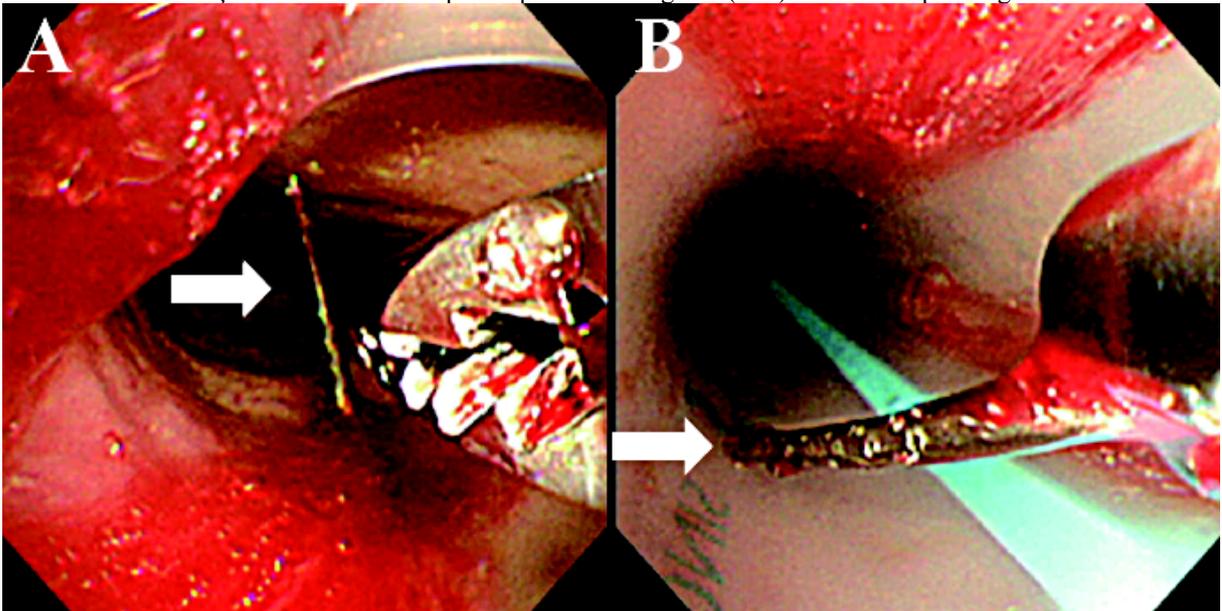
Em relação a mediastinoscopia, podemos observar que o procedimento de EBUS-TBNA é mais seguro e menos invasivo, é um procedimento ambulatorial, geralmente usando sedação consciente (midazolam) e anestesia local, sem necessidade de anestesia geral ou internação prolongada. Desvantagens importantes da mediastinoscopia são o risco de 1-2% de complicações importantes, o risco de 0,5% de complicações maiores, inclusive morte, a cicatriz cervical e a fibrose cicatricial do mediastino. Isso ocorre porque é necessário extensas dissecações de tecidos adjacentes aos grandes vasos, e o risco de hemorragia sempre existe. A mediastinoscopia também não consegue avaliar as estações hilares, algo útil para o diagnóstico de sarcoidose e tuberculose. Por fim, a mediastinoscopia é um procedimento mais demorado, levando cerca de 2 à 3 horas em centros de referência contra uma média de 30 minutos para o EBUS-TBNA feito por operadores experientes⁷.

2.6 SEGURANÇA E COMPLICAÇÕES

EBUS-TBNA é tolerado tão bem quanto a broncoscopia flexível, com um risco similar de complicações. É, portanto, um procedimento seguro e minimamente invasivo quando realizado por um operador experiente em um paciente apropriado. Existem registros raros de pneumomediastino, pneumotórax e hemomediastino, mas uma radiografia de tórax não é feita de rotina após o procedimento. Complicações infecciosas também tem sido raramente reportadas^{17,18}. A taxa de complicações do procedimento é de cerca de 1,4%¹⁷. Não se observa diferença significativa da incidência de complicações em pacientes maiores de 70 anos daqueles mais jovens¹⁹.

Uma complicação incomum, mas que os broncoscopistas devem estar alerta, é a quebra da ponta da agulha de aspiração dentro da via aérea. A ponta pode ser recuperada com o uso da broncoscopia flexível [Figura 5], mas a complicação é potencialmente severa caso a agulha mova-se para um brônquio periférico, ou seja engolida²⁰.

Figura 5- Complicação rara: quebra da agulha. **(A)** A ponta quebrada da agulha (seta) e o fórceps "alligator". **(B)** Remoção bem sucedida da ponta quebrada da agulha (seta) com o fórceps "alligator".



Fonte: Uchimura, et al., 2019.

Por causa do risco de sangramento para o mediastino, não se deve fazer amostragem de linfonodos mediastinais de pacientes em uso de varfarina (INR deve ser menor que 1,4, idealmente) ou clopidogrel (ambos devem ser descontinuados por uma semana antes do procedimento), ou que tenham desordens conhecidas da coagulação ou da função plaquetária. O paciente tem que estar em condições clínicas suficientes para realizar uma broncoscopia flexível e poder ficar deitado reto. Em caso de infarto do miocárdio, o procedimento deve ser postergado por no mínimo seis semanas.

É contraindicado na presença de isquemia miocárdica, arritmias ou hipoxemia severa ao decúbito. Por outro lado, assim como a broncoscopia flexível, se somente o controle sintomático e cuidados paliativos são propostos, então o procedimento não é apropriado simplesmente para confirmar um diagnóstico clínico.

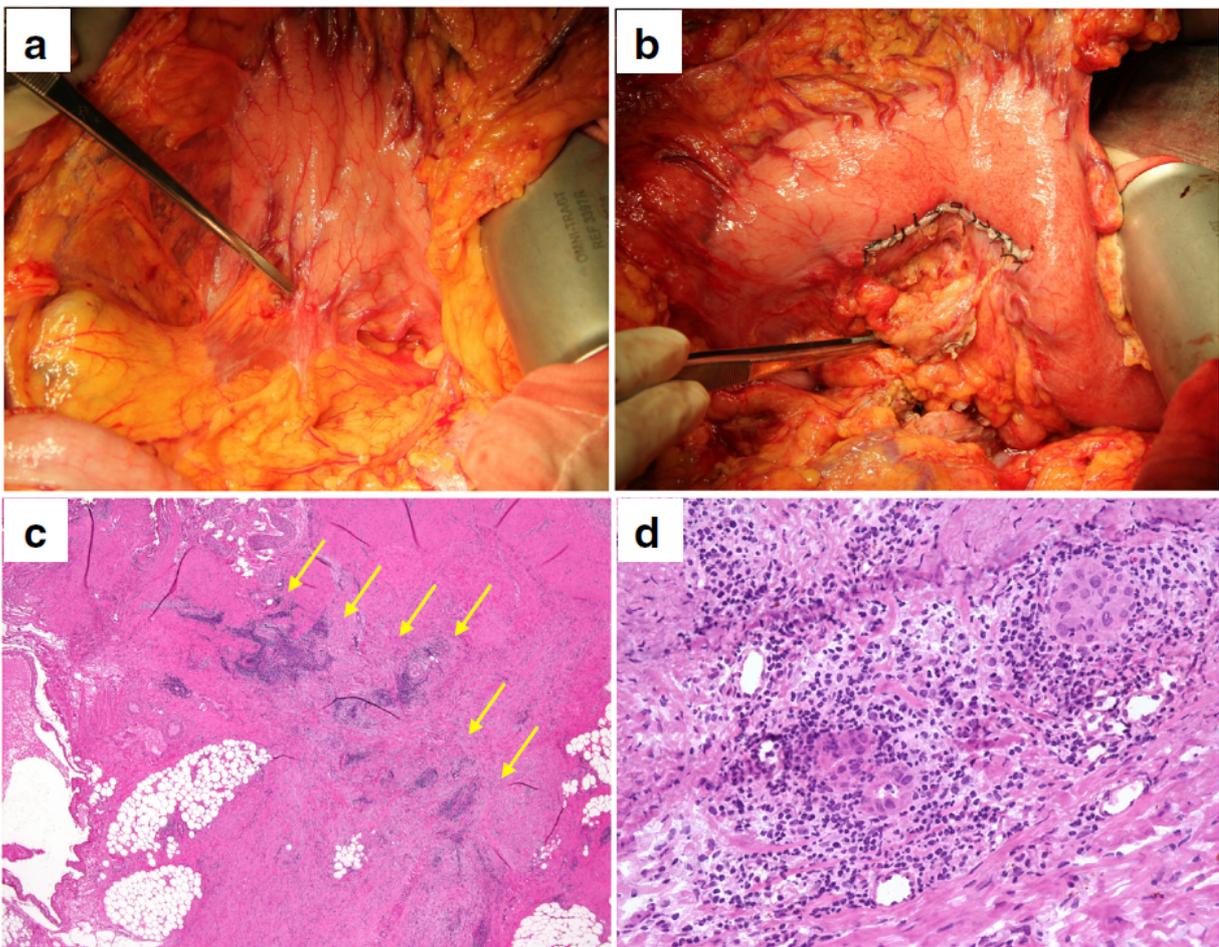
2.7 USOS EM OUTROS ORGÃOS

O uso da ultrassonografia endoscópica para coleta de material biológico tem sido empregada para o diagnóstico de neoplasias em outras topografias. Praticamente qualquer órgão localizado próximo a uma víscera oca do trato gastrointestinal permite a punção aspirativa guiada por ecografia, ou pela via endoscópica alta, ou pela via colonoscópica, destacando-se lesões esofágicas, hepáticas, em glândulas adrenais e pancreáticas.

Complicações maiores são raras e as menores, são muitas vezes as mesmas relacionadas ao procedimento de endoscopia alta, ou aquelas imediatamente após o procedimento como sedação excessiva e hipóxia, ou tardias, como dor de garganta, dor abdominal e náuseas e vômitos²¹.

Existe o risco de disseminação de células neoplásicas pelo trajeto da agulha [Figura 6]. Esta é uma complicação encontrada em poucos casos de grandes casuísticas de punções e biópsias percutâneas e, visto que o trajeto na biópsia ou punção endoscópica é menor, o risco também deve ser menor. Porém, alguns poucos casos já foram relatados²².

Figura 6 - Disseminação neoplásica pelo trajeto da agulha. **(a)** Achado intraoperatório de pequena massa rígida detectada na parede gástrica posterior, como indicado pelo fórceps. **(b)** Ressecção parcial da parede gástrica posterior. **(c)** O espécime do estômago parcialmente ressecado mostrava um adenocarcinoma distribuído linearmente na camada muscular gástrica (setas amarelas) (hematoxilina e eosina, imagem da lupa). **(d)** Os aspectos do tumor no estômago eram similares àqueles do câncer pancreático primário, indicando uma sementeira de células neoplásicas no trajeto da agulha a partir da neoplasia pancreática (hematoxilina e eosina).



Fonte: Matsui, et al., 2019.

No esôfago, o câncer geralmente apresenta-se com graus variáveis de invasão e dano a mucosa, entretanto, raramente, existem lesões que não atingem a mucosa, vendo-se apenas

projeções de submucosa ou estreitamentos esofágicos. Nesses casos, o exame ultrassonográfico permite identificar lesões presentes nas camadas internas, mas que não são visualizáveis e acessíveis pelos métodos convencionais de biópsia pela superfície mucosa²³. Além disso, o método permite o estadiamento nodal mais acurado²⁴, informação importante para o planejamento cirúrgico.

Um outro uso importante do exame endoscópico esofágico que deve ser destacado é o seu uso em complementaridade à ultrassonografia endobrônquica para um estadiamento mediastinal mais completo. O ganho diagnóstico do EBUS-TBNA está relacionado aos nódulos mediastinais e hilares localizados imediatamente adjacentes à traqueia e às vias aéreas mais largas. Estes compreendem as estações 2L, 2R 4L, 4R e estação 7. Apenas a ultrassonografia endobrônquica pode amostrar tecido dos nódulos hilares (estação 10) e dos nódulos intrapulmonares (estações 11 e 12)⁹.

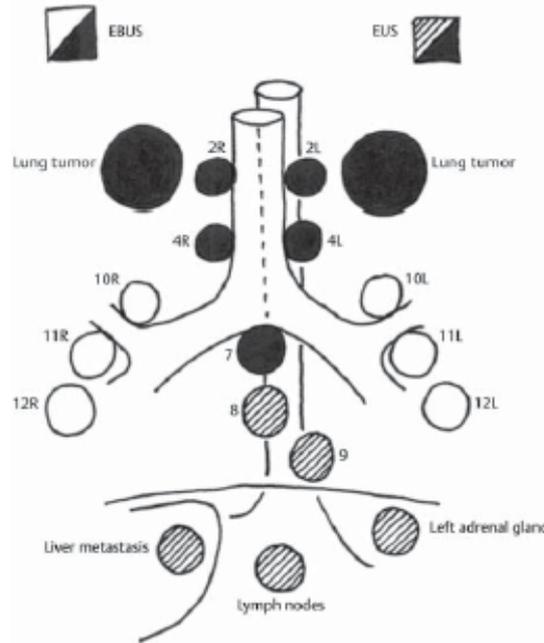
No que lhe concerne, a ultrassonografia endoscópica esofágica pode acessar as seguintes localizações relevantes para o diagnóstico e estadiamento do câncer de pulmão: tumores próximos do esôfago; linfonodos mediastinais nas estações 2L e 4L (linfonodos paratraqueais esquerdos superiores e inferiores); estação 7 (nodo subcarinal); estações 8 e 9 (nódulos localizados no mediastino inferior); e estruturas localizadas abaixo do diafragma, ou seja, linfonodos retroperitoneais próximos à aorta e ao tronco celíaco, e tumores no lobo hepático esquerdo e glândula adrenal esquerda. As estações 2R e 4R (paratraqueais à direita) são difíceis de alcançar, pois, a traqueia fica entre o transdutor e o linfonodo, limitando a visualização nesta área. A visualização e posterior amostragem pode ser possível em casos selecionados com linfonodos alargados (>2,0 cm)⁹.

As estações 5 e 6 podem ser visualizadas pela ultrassonografia endoscópica esofágica, mas raramente podem ser amostradas sem a transfixação da artéria pulmonar ou da aorta. Estas estações são predominantemente afetadas por tumores no lobo superior esquerdo e o método de escolha para o estadiamento destas estações é a cirurgia torácica videoassistida. As regiões hilares e intrapulmonares (estações 10, 11 e 12) não podem ser acessadas pela ultrassonografia endoscópica esofágica, mas, como já foi dito acima, são acessíveis pela ultrassonografia endobrônquica. A combinação destas duas técnicas garante virtualmente a amostragem de todas as estações nodais⁹[Figura 7].

No fígado, para o diagnóstico de lesões hepáticas suspeitas, geralmente opta-se pela realização de biópsias percutâneas guiadas por tomografia computadorizada ou ecografia, mas também pode-se realizar biópsias pela via transjugular ou por ressecção cirúrgica. Entretanto, a via endoscópica emerge como uma alternativa interessante, apresentando acesso a diferentes

locais do fígado e menor incidência de complicações²⁵, especialmente as hemorrágicas, potencialmente fatais em pacientes que muitas vezes apresentam distúrbios de coagulação.

Figura 7 - A natureza complementar da ultrassonografia endobrônquica (EBUS) e da ultrassonografia endoscópica esofágica (EUS) para o estadiamento nodal.



Fonte: Vilmann, et al., 2015.

Nas glândulas adrenais, o desenvolvimento das modernas técnicas de imagem (tomografia computadorizada e ressonância nuclear magnética) levaram ao aumento da identificação de massas adrenais. A maioria dessas lesões encontradas incidentalmente costumam ser adenomas não-funcionantes, porém uma pequena porcentagem é composta de lesões metastáticas. Entretanto, a maioria das massas adrenais identificadas no estadiamento de pacientes com câncer são lesões metastáticas, mais comumente de pulmão, mama, estômago e rim, assim como melanomas e linfomas. A sensibilidade e a acurácia das técnicas de imagem atuais são insuficientes para diferenciar massas benignas das malignas, sendo necessário biopsiar os casos suspeitos de malignidade. Contudo, as técnicas percutâneas tradicionalmente usadas para amostragem das glândulas adrenais, muitas vezes, trazem material não-diagnóstico e estão associadas a eventos adversos. Assim, a punção aspirativa por agulha fina, guiada por ultrassonografia endoscópica das adrenais oferece um método minimamente invasivo e acurado, com um perfil de baixo risco²⁶. Quanto aos aspectos técnicos, observa-se que a adrenal esquerda é acessada pela via transgástrica e a adrenal direita, pela via transduodenal.

No pâncreas, o ultrassom endoscópico provê uma visualização excelente, tanto da cabeça e processo uncinado, através do duodeno, bem como do corpo e cauda a partir do estômago. Ele tem se mostrado um método altamente sensível para a detecção de massas pancreáticas, superior à ultrassonografia extracorpórea e à tomografia computadorizada, especialmente em lesões menores que 2,0 cm. Porém, apesar de sensível, o ultrassom endoscópico apresenta limitada habilidade para diferenciar entre massas inflamatórias e câncer.

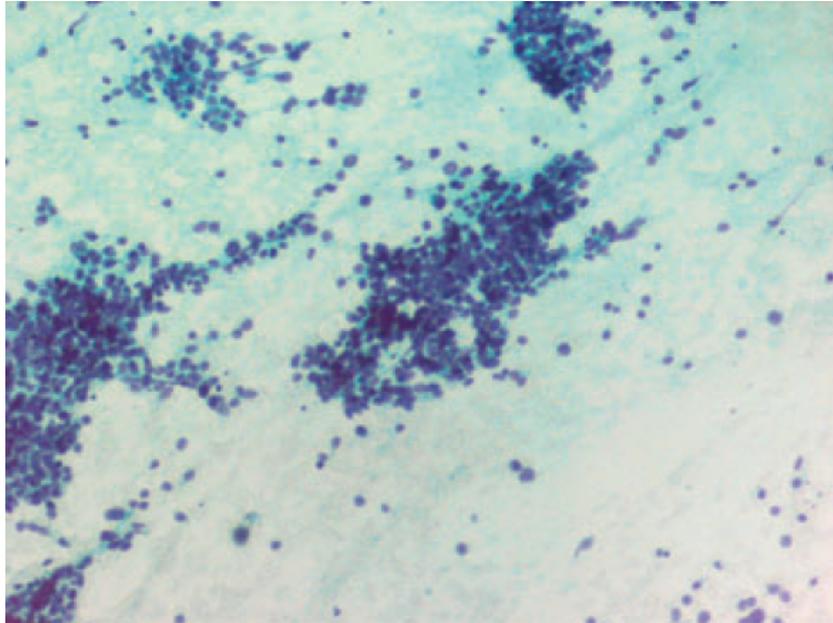
Entretanto, o manejo correto de pacientes com lesões pancreáticas depende do diagnóstico correto e diferenciar as malignas das benignas é muito importante. Lesões malignas tem mau prognóstico e a melhor chance de sobrevivência do paciente é a ressecção cirúrgica imediata. Pacientes com tumores irresssecáveis também precisam de amostragem tumoral para definir o diagnóstico e o tratamento quimioterápico. Por outro lado, o diagnóstico de uma lesão benigna previne morbidade adicional devido a procedimentos terapêuticos desnecessários.

O material da lesão pode ser preparado de duas formas: ou como um esfregaço [Figura 8] de células obtidas por aspirado e colocadas em uma lâmina para interpretação citológica, ou em secções de um emblocado celular (“cell block”) [Figura 9] fixado em formalina para interpretação histológica. A escolha depende da quantidade e qualidade do material, mas, em geral, opta-se pelo emprego das duas técnicas em conjunto, para aumentar a acurácia diagnóstica, devido a ambos possuírem características que se complementam.

Entre as complicações, além das também observadas nos demais procedimentos de endoscopia alta, pode-se citar a pancreatite aguda. O quadro em geral tem intensidade leve, respondendo ao manejo clínico e ocorre em menos de 4% dos pacientes²¹.

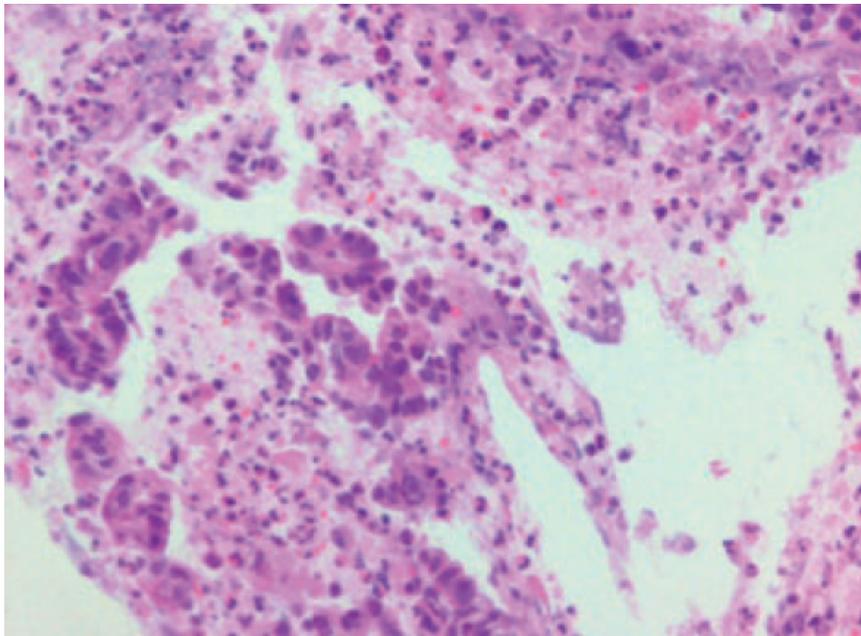
A literatura demonstra que a citologia e as secções de emblocado celular (“cell block”) tem um alto desempenho na avaliação de lesões pancreáticas sólidas com taxas de 75-95% de sensibilidade e 88-100% de especificidade^{21,27,28}. Assim é bem aceito que antes de referir pacientes para cirurgia ou terapia oncológica, um aspirado por agulha fina guiado por ultrassonografia endoscópica deve ser considerado como a melhor estratégia terapêutica.

Figura 8 - Citologia preparada a partir de um aspirado por agulha fina guiado por ultrassonografia endoscópica mostrando um adenocarcinoma bem diferenciado, atipia nuclear leve, aglomeração nuclear e alguma dissociação de células (papanicolaou, X200).



Fonte: Kopelman, et al., 2011.

Figura 9 - Embocado celular ("cell block") confeccionado a partir de um aspirado por agulha fina guiado por ultrassonografia endoscópica evidenciando glândulas malignas em um fundo de tecido necrótico e inflamatório (hematoxilina e eosina, x200).



Fonte: Kopelman, et al., 2011.

3 CELL BLOCK

“Cell Blocks” ou emblocados celulares são versões incluídas em parafina de espécimes citológicos comparáveis a tecidos fixados em formalina e incluídos em parafina de espécimes de patologia cirúrgica. Eles permitem vários estudos auxiliares que ampliam a interpretação citopatológica, incluindo a possibilidade da realização de testes moleculares e imuno-histoquímicos. Os emblocados celulares também são reconhecidos por sua semelhança com a histologia, inclusive com potencial para identificação de características arquiteturais similares àquelas observadas em cortes histológicos, especialmente na presença de fragmentos de tecido. Por exemplo, a presença de queratinização, pérolas córneas, pontes intercelulares, células de formas bizarras, citoplasma denso, necrose são características associadas a diferenciação escamosa. Da mesma forma, características arquiteturais (lençóis, agregados, ácinos e papilas) e celulares (citoplasma espumoso, rendado ou vacuolado; fendas intranucleares; inclusões intranucleares e nucléolos) podem favorecer o diagnóstico de adenocarcinoma²⁹.

Além disso, os emblocados celulares permitem a confecção de múltiplos cortes para testes auxiliares, como colorações especiais, imuno-histoquímica e diagnósticos moleculares³⁰. Vários avanços em outros ramos da medicina elevam a conscientização da utilidade dos emblocados celulares. Existe uma forte tendência para o uso clínico de procedimentos minimamente invasivos. Não apenas eles são menos invasivos que as alternativas cirúrgicas, como podem ser realizados ambulatorialmente com menos recursos. Para pacientes com suspeita de câncer de pulmão em particular, o aspirado por agulha fina guiado por ultrassonografia endobrônquica pode prover o diagnóstico e o estadiamento simultaneamente. Com as possibilidades dos procedimentos minimamente invasivos e a ênfase concorrente em medicina personalizada e diagnósticos moleculares, o tamanho do espécime fornecido tem diminuído enquanto a informação requerida a partir da amostra tem aumentado. Assim, apenas o diagnóstico morfológico não é mais suficiente.

A identificação de novos marcadores preditivos e prognósticos faz o manejo dos pacientes ser ditado pela combinação de aspectos morfológicos e de resultados de testes auxiliares, especialmente para pacientes com câncer de pulmão. Eles não são apenas usados para escolhas terapêuticas, mas também representam os padrões correntes de cuidado. Para pacientes com câncer localmente avançado ou metastático, espécimes citopatológicos, como fluidos pleurais ou peritoneais ou aspirados por agulha fina, podem ser a única fonte de material diagnóstico sobre o qual decisões terapêuticas são tomadas e a seleção para ensaios

clínicos é determinada. Além disso, os emblocados celulares servem como uma fonte de material adicional, de forma que as preparações diagnósticas, como os esfregaços, não precisam ser comprometidos para testagens auxiliares, o que do contrário poderia ter implicações médico-legais.

Assim como os blocos histológicos fixados em parafina, os emblocados celulares permitem a preservação do espécime por longo tempo e o arquivamento de DNA para futuros estudos diagnósticos e pesquisa. Os cortes histológicos de emblocados celulares também provêm de material fixado em formalina tamponada, na qual a maioria dos ensaios moleculares tem sido otimizados e validados em espécimes de patologia cirúrgica. Logo, podem ser processados como cortes de material parafinado, sendo facilmente integrados aos métodos existentes para histoquímica, imuno-histoquímica e testes moleculares com resultados similares aos obtidos pelos espécimes cirúrgicos.

Apesar das numerosas vantagens dos emblocados celulares, a quantidade de células deles é inconsistente e varia largamente. Essa variabilidade muitas vezes traz resultados sub-ótimos, um problema especialmente importante para a realização de testes moleculares. Geralmente, variáveis pré-analíticas como aquisição inadequada de amostra, espécime necrótico, triagem inapropriada, habilidade técnica inconsistente, e técnicas não padronizadas contribuem para diminuir a qualidade e celularidade dos emblocados celulares³¹. Essa variabilidade costuma frustrar as expectativas dos patologistas, particularmente aqueles praticantes da citopatologia que esperam realizar um arranjo crescente de testes auxiliares em espécimes citológicos cada vez menores, mas provendo resultados satisfatórios para guiar decisões terapêuticas³². Também é importante lembrar que a rotina de preparação de emblocados celulares aumenta significativamente a carga de trabalho, o custo operacional e o tempo de processamento das amostras no laboratório³³.

3.1 TÉCNICAS PARA CONFECÇÃO DE “CELL BLOCK”

Existem várias técnicas para confeccionar o emblocado celular³⁴, o protocolo básico permanece o mesmo em todos os métodos, incluindo uma etapa de concentração celular seguida pelo processamento como se fosse um tecido de biópsia histológica.

Tradicionalmente, o emblocado celular é preparado pela coleta de várias lavagens com agulha a partir de um espécime obtido de uma punção aspirativa por agulha fina e então concentrando a solução por centrifugação para formar um “pellet” celular. Este “pellet” celular então é enrijecido usando plasma-trombina ou gel-agarose, transferido para um cassete

histológico, fixado em formalina tamponada a 10% e posteriormente processado em um bloco de parafina. Apesar deste método ser bem-sucedido em muitos casos, a eficiência da recuperação celular nem sempre é ótima, variando entre 60% à 90%³⁵. Vários fatores contribuem para a perda de material celular durante o preparo do emblocado celular. O espécime da punção aspirativa por agulha fina é diluído no meio líquido e uma porcentagem substancial de células isoladas permanece no fluido sobrenadante após a centrifugação e são descartadas. Além disso, os “pellets” celulares formados pela centrifugação são frágeis e fragmentam-se facilmente em pequenas partes e perdem-se durante o processamento.

Os métodos mais frequentemente usados serão descritos brevemente abaixo:

Método da lavagem com solução salina normal: o método comumente usado para preparação do emblocado celular é a lavagem da agulha de aspiração com 20-30 ml de solução salina normal, centrifugação imediata ou coleta do material em meio RPMI (Roswell Park Medical Institute) para futura centrifugação e coleta do material para processamento como uma biópsia de tecido. Alternativamente, a lavagem pode ser feita diretamente com 10 ml de formalina e preparado para os meios histológicos rotineiros.³⁵

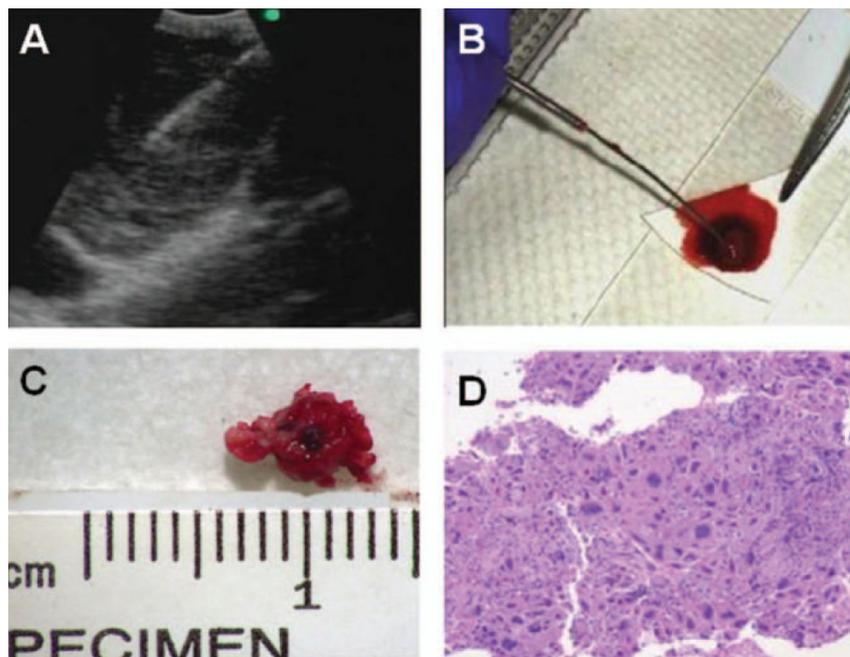
Método da coagulação tecidual: este método é usado para aumentar a celularidade em cortes histológicos do emblocado celular, sem diluir o material em solução salina, permitindo a coagulação da mistura de tecido e sangue se formar no lúmen da agulha. Assim que o coágulo flui para fora da ponta da agulha, é coletado em um pedaço de papel filtro e seco ao ar. O coágulo é levemente seco ao ar de modo a preservar a morfologia celular e não pode ser usado para avaliação da amostra no local [Figura 10]. O coágulo então é transferido para a formalina e depois processado no laboratório de histologia. Essa técnica é considerada superior à técnica convencional de lavagem quanto à recuperação de material celular e prevenção de perda de material diagnóstico. Além disso, não há diferenças identificáveis quanto a caracterização nuclear e citoplasmática das células ou quanto a resultados de imunohistoquímica³⁶.

Uma variação deste método é a técnica do autocoágulo, ou seja, ao invés de despejar o material para que ele coagule em papel filtro, o que pode ser trabalhoso, difícil de manusear e gerar sujeira, o material é despejado diretamente no tubo plástico para secar ao ar e formar o coágulo, e então a formalina ou o meio RPMI (Roswell Park Medical Institute) é adicionado³⁷. [Figura 11]

Método da plasmina-trombina ou do coágulo de trombina: o emblocado celular pode ser preparado a partir do “pellet” de qualquer suspensão celular centrifugada pela adição de plasma e trombina para aglomerar o material celular em um coágulo [Figura 12]. A

imprevisibilidade da formação do coágulo e do tamanho do coágulo e do tamanho do coágulo podem causar uma concentração desigual de células, problema que pode ser minimizado pela agitação contínua durante a formação do coágulo para dispersar equilibradamente a população celular na malha de fibrina. Algumas formas comerciais disponíveis dos reagentes de tromboplastina preparadas com cérebro ou pulmão de coelho podem conter células epiteliais, que podem levar, ainda que raramente, a interpretação incorreta. Porém, este problema pode ser resolvido pela escolha de tromboplastina livre de células. Mesmo assim, os problemas associados a essa técnica são mínimos e se tornam insignificantes na comparação com os resultados alcançados³⁵.

Figura 10 - A preparação do embocado celular usando o método da coagulação tecidual é exibido. **(A)** Imagem de ultrassonografia endobrônquica de linfonodo da estação 7 (subcarinal) mostrando um adenocarcinoma pouco diferenciado metastático. **(B)** O tecido coagulado é mostrado sobre o papel filtro. **(C)** O tamanho real do tecido coagulado é mostrado. **(D)** Coloração de hematoxilina e eosina do corte histológico obtido do embocado celular por coagulação tecidual da amostra do mesmo linfonodo mostrado nos painéis A à C, com um adenocarcinoma pouco diferenciado, metastático é mostrado (X200).

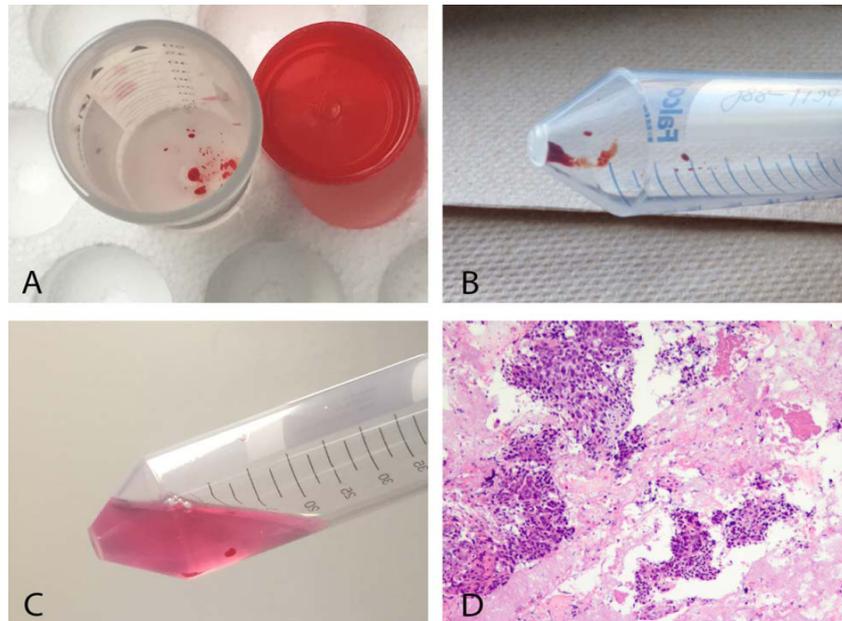


Fonte: Yung, et al., 2012.

Implantação em ágar e outros métodos: as dificuldades para recuperar e processar pequenos fragmentos de tecido resultaram em métodos que usam adjuvantes celulares, tais como ágar, Histogel, albumina gelatinosa, amido pré-gelatinizado, espuma gelatinosa, entre outros métodos menos práticos. Em princípio, os sedimentos concentrados são apoiados em uma substância como o ágar ou o Histogel [Figura 13]. O ágar solidifica em temperatura abaixo de 50° C e esta propriedade é utilizada para formar o “pellet” celular. O botão celular é

então incluído em parafina após processamento como um espécime histopatológico³⁵.

Figura 11- Exemplos de preparação de emblocado celular usando o método da autocoagulação tecidual. **(A e B)** Exemplos de coágulos sanguíneos naturalmente formados pela secagem ao ar nos tubos. **(C)** Adição da solução de meio RPMI (Roswell Park Memorial Institute) para destacar os coágulos sanguíneos do fundo ou da parede do tubo de teste. **(D)** corte histológico do emblocado celular demonstrando células tumorais implantadas dentro do coágulo sanguíneo (hematoxilina e eosina, X100).



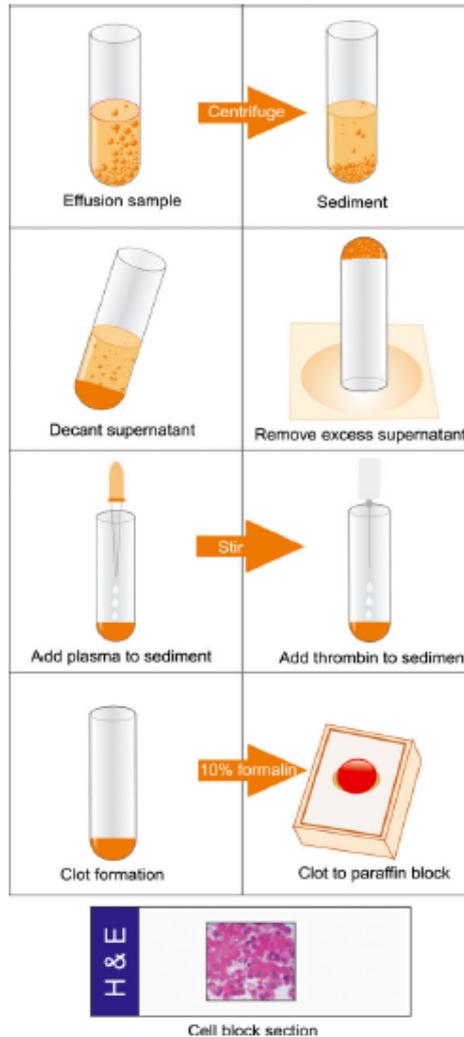
Fonte: Shi, et al., 2018.

Observa-se que além do processo de aquecimento ser inconveniente e tedioso, ele pode gerar artefatos se o resfriamento não for adequado. Os principais artefatos são vacúolos exagerados, citoplasma denso, fragmentação do citoplasma e redução do volume celular.

Sistemas Automatizados: para reduzir a demanda por trabalho intensivo e minimizar a variabilidade de resultados relacionada a diferentes graus de habilidade dos técnicos de citologia, vêm-se desenvolvendo alternativas automatizadas e menos dependentes de trabalho manual, entre estas, o sistema Cellient é o mais comumente utilizado. O sistema Cellient funciona através de filtração assistida por vácuo. O sistema automaticamente recupera pequenos fragmentos de tecido de um “container” para o espécime e rapidamente os entrega em parafina, pronta para cortes histológicos em menos de uma hora [Figura 14]. O benefício proposto para este sistema é aumentar o ganho celular de amostras citológicas com baixa celularidade^{30,35}. Entretanto, os estudos não têm visto um aumento significativo do ganho celular em comparação com as técnicas tradicionais de emblocado celular. Além disso, por utilizar um fixador a base de metanol pode apresentar resultados falso negativos em alguns marcadores imuno-histoquímicos, como o receptor de progesterona. Como uma tecnologia

nova, seu emprego ainda passa pela necessidade de validação de resultados. Outras principais desvantagens do método são o alto custo de aquisição ou “leasing” do equipamento e a impossibilidade de confeccionar mais de um embocado celular simultaneamente por máquina³⁵.

Figura 12- Etapas de procedimento do método da plasma-trombina para efusões simples.

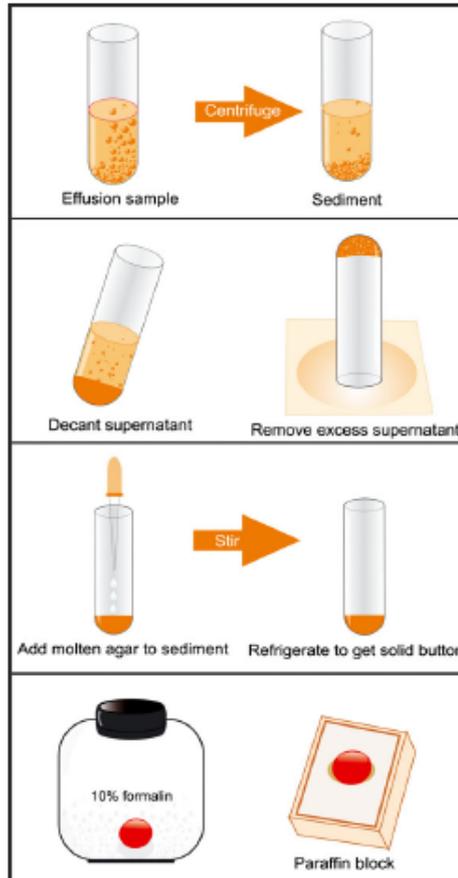


Fonte: Jain, et al., 2014.

Outro aspecto importante a ser avaliado é a escolha do fixador para ao embocado celular, visto que existe uma vasta gama disponível. Os principais são a formalina e os fixadores alcoólicos, como etanol, metanol, isopropanol ou misturas destes. A formalina é largamente utilizada, não necessitando de equipamentos ou reagentes especiais e apresenta resultados conhecidos em morfologia e imuno-histoquímica, embora as técnicas para a extração de DNA em material fixado em formalina sejam mais complexas e obtenham resultados menos satisfatórios. Por outro lado, embora marcadores imuno-histoquímicos e

análises moleculares possam ser realizados em amostras fixadas em álcool, o laboratório precisa validar os testes apropriadamente para evitar resultados falsos, especialmente na imuno-histoquímica³⁵.

Figura 13- *Etapas do método de ágar para preparação de embocado celular.*



Fonte: Jain, et al., 2014.

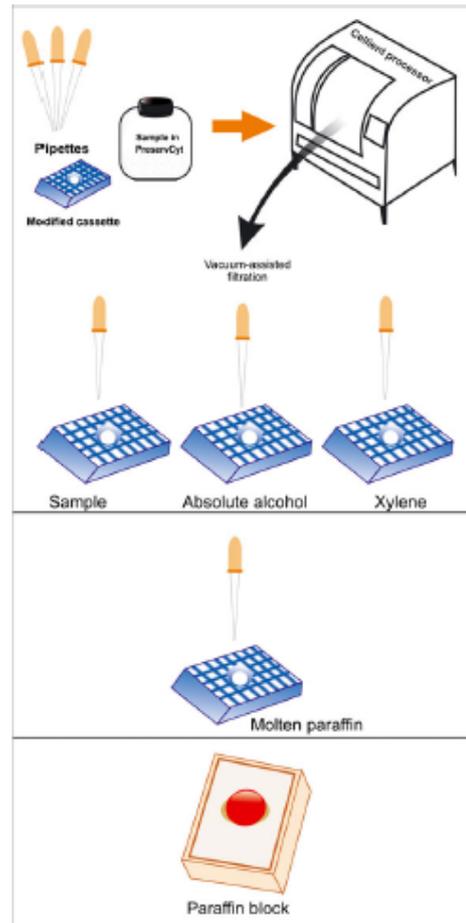
Convém citar um fixador que utiliza uma mistura de etanol e formalina (nove partes de etanol a 100% e uma parte de formaldeído a 40%), também conhecido como NAFS (Nathan Alcohol Formalin Substitute). Seu uso tem obtido bons detalhes citológicos semelhantes à coloração de Papanicolaou, bons resultados em imuno-histoquímica, mas com menor risco de toxicidade durante o processamento³⁸.

3.2 LIMITAÇÕES APRESENTADAS PELOS “CELL BLOCK”

A maior desvantagem apresentada pela técnica de embocado celular é o atraso no diagnóstico, devido ao aumento no tempo de processamento. Excesso de material é necessário para obter um “pellet” celular de boa qualidade, o que nem sempre é possível, especialmente

em órgãos de localização profunda.

Figura 14- Passos básicos do sistema de embocado celular automatizado Cellient.



Fonte: Jain, et al., 2014.

O risco de perder material citológico durante o processamento do espécime ou durante o corte do bloco de parafina, devido ao pequeno tamanho da amostra, é outro problema. Observa-se que nem todas as amostras são apropriadas para preparação de embocado celular, um volume significativo de embocados celulares preparados carecem de celularidade tumoral suficiente para a futura realização de testes auxiliares.

A maioria das técnicas de embocado celular são demandantes de trabalho intensivo: o seu uso restrito é possível em todos os laboratórios, porém a adoção do embocado celular como prática rotineira pode ser difícil devido à falta de mão-de-obra, especialmente em contextos de recursos limitados. Os métodos automatizados, além de caros, por usarem outros fixadores que não a formalina, precisam de mais estudos para a validação em imunohistoquímica e testes moleculares. Finalmente, em comparação com a citologia tradicional de

esfregaços, o método de emblocado celular implica um custo extra para o manejo do paciente^{34,35}.

3.3 A EXPERIÊNCIA DO HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE COM O USO DA TÉCNICA DE “CELL BLOCK” PARA AUXÍLIO DIAGNÓSTICO EM CITOPATOLOGIA

No Hospital de Clínicas de Porto Alegre, até recentemente, a técnica de emblocado celular era empregada majoritariamente como parte da investigação de nódulos de tireoide de pacientes atendidos na Unidade de Tireoide do Centro de Pronto Diagnóstico Ambulatorial (CPDA). A técnica era, e ainda é, realizada em materiais coletados por punção aspirativa por agulha fina guiadas por ultrassonografia.

Imediatamente após a aspiração, seis lâminas citológicas são preparadas para cada paciente, quatro são secas ao ar e coradas, no local, pela técnica de MGG (May-Grünwald-Giemsa) e as outras duas são fixadas rapidamente em etanol 96%, para posterior coloração pela técnica de Papanicolaou. O aspirado hemorrágico residual na seringa é despejado em um frasco vazio, permite-se a sua coagulação por 1 à 5 segundos e, então, o frasco é preenchido com formalina tamponada a 10% para fixação do material. Este procedimento é realizado no mesmo ambiente em que foi realizada a punção. Posteriormente, já no laboratório, os coágulos são avaliados quanto ao seu volume, os grandes são transferidos para papel filtro, colocados em cassetes histológicos e fixados em formalina por 24 horas. Se os coágulos forem pequenos ou imperceptíveis, o material é transferido para um tubo de teste e submetido a centrifugação, 600 rpm por 30 minutos. O “pellet” celular obtido após a centrifugação é, também, transferido para papel filtro, colocado em cassete histológico, fixado em formalina por 24 horas. Depois, ambos são submetidos ao mesmo processamento rotineiramente utilizado para inclusão em parafina e corte, como qualquer outra biópsia³⁹.

Claramente, percebemos que está sendo aplicado um método semelhante aos métodos de autocoagulação previamente descritos. Essa estratégia funciona com bons resultados por causa que a tireoide é um órgão altamente vascularizado e as punções costumam ser acompanhadas de razoável quantidade de sangue. A avaliação da contribuição dos emblocados celulares para aumentar a eficiência diagnóstica dos exames de tireoide no Hospital de Clínicas de Porto Alegre já foi estudada. Em acompanhamento de um período de 22 meses (março de 2012 a dezembro de 2013), 358 pacientes com nódulos de tireoide foram submetidos a punção aspirativa por agulha fina guiada por ultrassonografia, destes, 328

(91,6%) tiveram suas amostras analisadas através de esfregaços citológicos, conforme descrito, e também, por emblocados celulares. Destaca-se que não foram observadas diferenças significativas de gênero, idade média ou tamanho do nódulo, entre os pacientes com emblocado celular confeccionado e aqueles sem este.

A comparação entre as taxas de insatisfatoriedade entre as duas técnicas, citologia e emblocado celular, mostrou uma redução significativa na taxa de insatisfatoriedade (17,1% vs. 4,3%, $p < 0,001$)³⁹. No geral, o número de casos que teve o diagnóstico alterado após a análise do emblocado celular foi de 44/328 (13,4%). A maioria dos casos pertencia à categoria Bethesda I – insatisfatório – (40/44 ou 91%) e, foi alterada para a categoria Bethesda II – benigno – (36/44 ou 81%), ou menos frequentemente, para a categoria Bethesda III – atípicas de significado indeterminado – (4/44 ou 9%). Dois casos da categoria Bethesda II (2/44 ou 4,5) foram alterados para a categoria Bethesda III. Um caso, da categoria Bethesda III (1/44 ou 2,2%) foi alterado para a categoria Bethesda II.

Apenas um caso, originalmente classificado na categoria Bethesda II pelo exame da citologia, tornou-se categoria Bethesda VI – compatível com neoplasia – após a análise do emblocado celular. Neste caso a cirurgia foi indicada pelo médico assistente depois que o estudo do emblocado celular revelou fragmentos papilares com atipia nuclear e pseudoinclusões nucleares, sugestivas de carcinoma papilar de tireoide. Subsequentemente, o exame anatomopatológico diagnosticou carcinoma papilar³⁹. Assim, o trabalho calculou que a acurácia diagnóstica do exame em conjunto de citologia e emblocado celular aumenta de 91% examinando somente a citologia, para 94% com o exame de ambos.³⁹

Atualmente, a equipe da citologia vem estendendo o rol de materiais que são submetidos a técnica de emblocado celular previamente descrita. Essa ampliação é motivada tanto pela necessidade dos citopatologistas explorarem essa ferramenta para superar dificuldades diagnósticas encontradas nos esfregaços convencionais, quanto por demandas diagnósticas específicas das equipes médicas assistentes.

Embora ainda não se tenha feito estudos voltados para quantificar o impacto da técnica de emblocado celular no rendimento diagnóstico dos exames do laboratório, é perceptível que o resultado é, quantitativamente, inferior ao obtido nos exames de tireoide. Observa-se que o método depende, além de uma celularidade moderada a alta, das próprias propriedades coagulativas das amostras, que costumam ser insuficientes ou praticamente ausentes em muitos dos líquidos que o laboratório recebe. Por exemplo, lavados broncoalveolares estão diluídos em soro no próprio ato da coleta, punções líquóricas tem celularidade extremamente escassa e amostras de urina também são diluídas. Estes materiais não produzem resultados

minimamente satisfatórios com a técnica disponível.

Por outro lado, espécimes com algum grau de contaminação hemática ou purulenta costumam produzir resultados melhores. Felizmente, em várias efusões serosas neoplásicas costuma-se observar características sanguinolentas, sendo estes espécimes os que apresentam melhores resultados tanto em termos de formação do “pellet” celular para melhor processamento histológico, como em quantidade de material celular tumoral para a realização de estudos imuno-histoquímicos e testes moleculares. Convém lembrar, entretanto, que espécimes excessivamente hemorrágicos podem produzir “pellets” adequados para a inclusão e corte histológicos, mas não apresentarem celularidade epitelial ou mesenquimal adequadas para diagnóstico, constituídos exclusivamente por numerosas hemácias e plaquetas, além de outros elementos hemáticos como ocasionais neutrófilos ou linfócitos. Ou seja, líquidos de ascite, derrames pleurais ou pericárdicos apresentando a famosa coloração amarelo-citrino não produzem um “pellet” adequado, mesmo após duas ou três repetições do processo de centrifugação.

Mesmo com todas essas dificuldades para sua adequada obtenção, o emblocado celular vem oportunizando um auxílio importante, mesmo que em casos isolados. A confirmação de neoplasia em casos que o esfregaço é inconclusivo; a definição de sítio primário, através de estudo imuno-histoquímico, em emblocados celulares de derrames pleurais ou ascíticos neoplásicos em pacientes que não podem ser submetidos a investigações mais invasivas (inclusive a determinação do sítio primário em um caso de paciente com derrame pleural metastático cuja lesão e seu caráter neoplásico eram ignorados e que não poderia prosseguir a investigação por ter evoluído a óbito); um emblocado celular de um paciente com carcinoma de pulmão que foi utilizado para testes moleculares por causa que as biópsias cirúrgicas de tecido tumoral coletadas não ofereciam celularidade adequada; entre outras, foram situações que demonstraram a utilidade diagnóstica da técnica, não só para os citopatologistas, mas também para as equipes assistenciais clínicas e cirúrgicas. Mesmo assim, em muitos casos, por conhecer as dificuldades técnicas e a necessidade de tempo para confeccionar o emblocado celular, as equipes assistentes optam por prosseguir a investigação por meios mais invasivos, principalmente com o objetivo de acelerar a obtenção do diagnóstico.

Infelizmente, a confecção de emblocados celulares não pode se tornar rotina por motivos de ordem financeira também. O SUS e os convênios pagam pelo emblocado celular, cujo processamento demanda um trabalho complexo e bastante demorado, o mesmo valor pago por uma biópsia cujo processamento é extremamente simples e rápido, demandando muito menos esforço.

4 USOS PARA IMUNO-HISTOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR

A grande maioria dos pacientes com carcinoma de pulmão de células não-pequenas (NSCLC) não requer dissecação cirúrgica por causa do estágio avançado em que a doença está no surgimento de sintomas ou outros achados clínicos que levantem a suspeita e possibilitem a investigação para o diagnóstico. Por esta razão, os únicos espécimes disponíveis para estes pacientes são frequentemente representados por pequenas amostras citológicas ou microbiópsias histológicas. Por outro lado, um diagnóstico acurado e preciso (isto é, o reconhecimento se é benigno ou maligno, se lesão primária ou metastática, e o subtipo do NSCLC), junto a determinação dos marcadores preditivos, é mandatório para a seleção do tratamento. Ou seja, a principal preocupação é maximizar a coleta de informações do espécime disponível.

Embora fazer diagnósticos em amostras pequenas possa ser fácil (em casos com características morfológicas de adenocarcinoma ou carcinoma de células escamosas), em muitos casos de câncer pouco diferenciados ou indiferenciados, a morfologia não permite uma classificação mais precisa e o termo, desencorajado, carcinoma de pulmão de células não pequenas, sem outras especificações precisa ser usado. Entretanto, os avanços terapêuticos requerem uma precisa subtipagem histológica. Nesses casos o uso de imuno-histoquímica é recomendada, pois, alguma diferenciação residual escamosa ou adenoide pode permitir o refinamento diagnóstico.

4.1 IMUNO-HISTOQUÍMICA PARA CARCINOMAS DE PULMÃO DE CÉLULAS NÃO-PEQUENAS

Vários biomarcadores e algoritmos diagnósticos tem sido descritos e sugeridos para a subtipagem do NSCLC, mas observa-se que o uso de um pequeno painel de 2 a 4 marcadores (TTF1, Napsin A, p40 e CK5/6 ou CK7) reduzem largamente a proporção de casos em que o diagnóstico da subtipagem pode ser definido⁴⁰. Esta é uma redução importante, pois se sabe que os carcinomas pouco diferenciados morfológicamente com um perfil imuno-histoquímico de adenocarcinoma apresentam a mesma sobrevivência geral que os demais casos de adenocarcinoma⁴¹. Estudos demonstram que emblocados celulares produzidos com material obtido por EBUS-TBNA tem fornecido material suficiente para a obtenção do subtipo histológico bem como para a realização dos testes moleculares⁴².

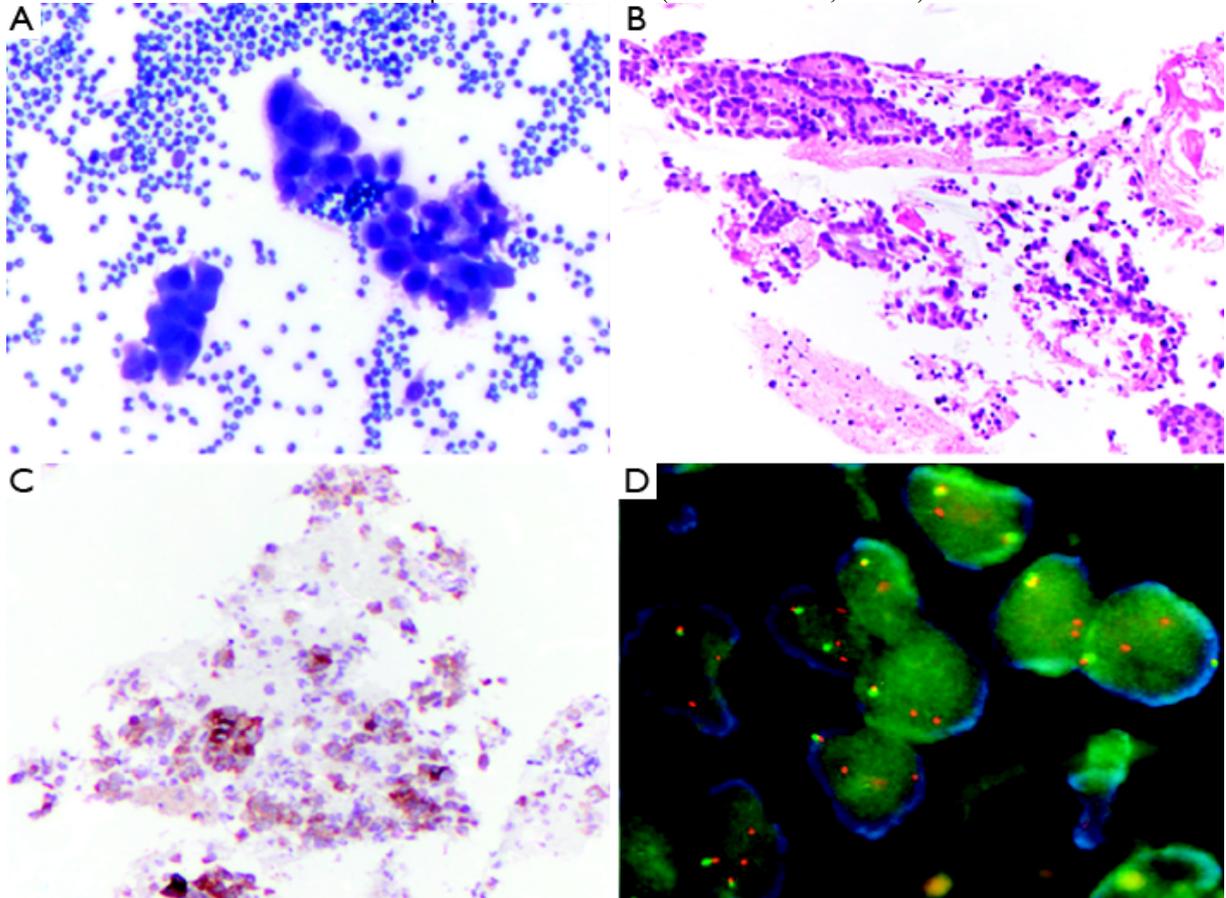
4.2 TESTES DE BIOLOGIA MOLECULAR PARA CARCINOMAS DE PULMÃO DE CÉLULAS NÃO-PEQUENAS

Além disso, o aumento na precisão da caracterização do perfil molecular do câncer de pulmão tem levado a descoberta de vários genes que podem ser alvos de drogas. É uma questão de fato, pacientes com mutações oncogênicas que receberam terapia alvo tem maior sobrevida do que aqueles que não receberam ou que não possuíam mutações identificáveis nos testes empregados. Entretanto, sabe-se que após um período inicial de resposta à terapia, a neoplasia desenvolve mecanismos de resistência, através de novas alterações genéticas⁴³. Atualmente, já se observa que agentes com alvo em moléculas específicas ou células de sinalização de cascatas moleculares, como os inibidores da tirosinaquinase do receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) e os inibidores da quinase do linfoma anaplásico (ALK), já se tornaram padrão no tratamento dos pacientes com carcinoma de pulmão avançado.

A terapia de primeira linha com inibidores da tirosinaquinase do EGFR (erlotinib, gefitinib e afatinib, entre outros) significativamente prolongam a sobrevivência livre de progressão de doença e estão associados a maior taxa de resposta tumoral, quando comparados à quimioterapia, em pacientes com mutação para EGFR⁴⁴. Resultados similares tem sido relatados com terapias de inibidores do ALK (crizotinib, ceritinib e alectinib, entre outros), para pacientes com rearranjo do ALK⁴⁴ [Figura 15].

A taxa de adequação do EBUS-TBNA para análise molecular depende de alguns fatores: pequeno tamanho da amostra, necrose tumoral, amostragem de micrometástases nodais e contaminação de amostras com sangue ou células brônquicas. Porém, vários estudos têm demonstrado que a maioria das análises moleculares podem ser feitas rotineiramente de amostras obtidas por EBUS-TBNA com taxas de sucesso entre 89-98%⁴².

Figura 15 - Caso de adenocarcinoma de pulmão com determinação de ALK. **(A)** Esfregaço do espécime mostrando células epiteliais neoplásicas arranjadas em estruturas pseudo-papilares (MGG, X200). **(B)** Imagem do embocado celular exibindo grande quantidade de tecido neoplásico de adenocarcinoma (hematoxilina e eosina, X100). **(C)** Imuno-histoquímica para ALK mostrando maioria de células com escore de intensidade moderado (2+) e algumas células com intensidade alta (3+) (Imunocoloração, X200). **(D)** rearranjo do ALK foi confirmado pela análise do FISH (FLUOrocromo, X1000).



Fonte: Righi, et al., 2017.

4.3 O CUSTO E A ACESSIBILIDADE ÀS TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO MOLECULAR E ÀS DROGAS ALVO

Numericamente, observa-se que em muitos países, inclusive de terceiro mundo, tem-se difundido o acesso aos testes moleculares, variando de 43%, Brasil, até 85%, Taiwan⁴⁴. Entretanto, identifica-se significativa variação nos padrões de tratamento e desfechos de sobrevivência⁴⁵.

Os tratamentos sistêmicos com drogas alvo estão integradas ao cuidado clínico do câncer e apresentam comprovado efeito terapêutico. Mas seu alto custo, que pode superar cem mil dólares norte-americanos por ano, por paciente, aliados a alta prevalência das doenças e a expansão das indicações implicam um custo cada vez mais elevado. Este custo tem alto

impacto na sustentabilidade dos sistemas de saúde e, naqueles países que não oferecem um sistema de saúde acessível para a população, nas finanças pessoais dos pacientes⁴⁶.

Assim, o alto custo das novas terapias implicam um importante obstáculo para garantir o acesso equitativo dos testes moleculares e das drogas alvo para o máximo de pacientes que delas possam se beneficiar. Enfrentar a desigualdade de acesso e garantir a sustentabilidade dos sistemas de saúde, ou minorar o impacto nas finanças pessoais dos pacientes, é um desafio a ser superado pelo esforço conjunto da classe médica, empresas, pacientes e gestores, e cuja solução ainda não é vislumbrada no horizonte.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O câncer de pulmão é uma das neoplasias mais frequentes e mais agressivas, sendo normalmente diagnosticado em estádios avançados quando os tratamentos cirúrgicos são fúteis e até nocivos. O uso do EBUS-TBNA, por sua vez, é um método coerente com os novos paradigmas da medicina atual, que busca diagnósticos e tratamentos com intervenções menos invasivas, com menor custo e mais seguras, sendo assim o mais adequado para o diagnóstico e estadiamento do câncer de pulmão. As principais dificuldades para a popularização da técnica são de ordem financeira, ou seja, o pagamento adequado dos profissionais envolvidos, a compra e manutenção da aparelhagem e a compra de insumos, especialmente as agulhas.

O número de testes, imuno-histoquímicos e de biologia molecular, aplicáveis ao carcinoma de pulmão é crescente, transformando a prática do patologista, que deverá obter mais resultados diagnósticos e moleculares, com cada vez menos material. Nesse contexto, o uso do EBUS-TBNA e do embocado celular pode satisfazer essa exigência com segurança e eficiência. Entretanto, como já foi discutido no texto, o alto custo das novas drogas impede um acesso igualitário a elas. Portanto, essa deve ser uma preocupação não só da classe médica como de toda a sociedade.

Certamente, as demandas das equipes assistentes do Hospital de Clínicas de Porto Alegre estimularão esforços para a introdução de novas técnicas para a confecção do embocado celular que contemplem as dificuldades atualmente enfrentadas principalmente quanto a tempo de processamento, demanda de mão-de-obra, melhor rendimento em amostras com menor celularidade e aplicabilidade em líquidos que não possuam propriedades coagulativas próprias. Ao mesmo tempo, o embocado celular necessitará de codificação própria nas tabelas de procedimentos médicos, visando o pagamento proporcional ao seu custo e à economia em procedimentos mais invasivos que sua aplicação permite. Essa medida é essencial para justificar o investimento em técnicas mais rápidas e confiáveis, não só em hospitais universitários, mas também em laboratórios de patologia privados.

Entre as possibilidades de trabalhos futuros que o desenvolvimento desta pesquisa nos permitiu enxergar, podemos citar a avaliação do ganho diagnóstico obtido no Hospital de Clínicas de Porto Alegre, com a ampliação da confecção e uso de embocados celulares. Outro trabalho importante é avaliar impacto da avaliação rápida no local (ROSE) em diferentes cenários de coleta de materiais diagnósticos para citologia.

6 REFERÊNCIAS

1. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer*. 2015;136(5):E359-E386. doi:10.1002/ijc.29210
2. Ferlay J, Steliarova-Foucher E, Lortet-Tieulent J, et al. Cancer incidence and mortality patterns in Europe: Estimates for 40 countries in 2012. *Eur J Cancer*. 2013;49(6):1374-1403. doi:10.1016/j.ejca.2012.12.027
3. Malta DC, Abreu DMX de, Moura L de, Lana GC, Azevedo G, França E. Trends in corrected lung cancer mortality rates in Brazil and regions. *Rev Saude Publica*. 2016;50:1-9. doi:10.1590/S1518-8787.2016050006209
4. Naur TMH, Konge L, Nayahangan LJ, Clementsen PF. Training and certification in endobronchial ultrasound-guided transbronchial needle aspiration. *J Thorac Dis*. 2017;9(7):2118-2123. doi:10.21037/jtd.2017.06.89
5. Figueiredo VR, Cardoso PFG, Jacomelli M, et al. Endobronchial ultrasound-guided transbronchial needle aspiration for lung cancer staging: early experience in Brazil. *J Bras Pneumol*. 2015;41(1):23-30. doi:10.1590/S1806-37132015000100004
6. Figueiredo VR, Jacomelli M, Rodrigues AJ, Canzian M, Cardoso PFG, Jatene FB. Current status and clinical applicability of endobronchial ultrasound-guided transbronchial needle aspiration. *J Bras Pneumol*. 39(2):226-237. doi:10.1590/s1806-37132013000200015
7. Medford ARL, Bennett JA, Free CM, Agrawal S. Endobronchial ultrasound guided transbronchial needle aspiration. *Postgrad Med J*. 2010;86(1012):106-115. doi:10.1136/pgmj.2009.089391
8. Mountain CF, Dresler CM. Regional Lymph Node Classification for Lung Cancer Staging. *Chest*. 1997;111(6):1718-1723. doi:10.1378/chest.111.6.1718
9. Vilmann P, Clementsen PF, Colella S, et al. Combined endobronchial and oesophageal endosonography for the diagnosis and staging of lung cancer: European society of gastrointestinal endoscopy (ESGE) Guideline, in cooperation with the European respiratory society (ERS) and the European society of tho. *Eur Respir J*. 2015;46(1):40-60. doi:10.1183/09031936.00064515
10. Fujiwara T, Yasufuku K, Nakajima T, et al. The utility of sonographic features during endobronchial ultrasound-guided transbronchial needle aspiration for lymph node staging in patients with lung cancer: A standard endobronchial ultrasound image classification system. *Chest*. 2010;138(3):641-647. doi:10.1378/chest.09-2006
11. Fujiwara T, Nakajima T, Inage T, et al. The combination of endobronchial elastography and sonographic findings during endobronchial ultrasound-guided transbronchial

- needle aspiration for predicting nodal metastasis. *Thorac Cancer*. 2019;10(10):2000-2005. doi:10.1111/1759-7714.13186
12. Yamamichi T, Kakihana M, Nitta Y, et al. F-18 fluorodeoxyglucose uptake in lymph nodes and sonographic features on endobronchial ultrasonography predict lymph node metastasis in lung cancer patients. *J Thorac Dis*. 2020;12(10):5420-5429. doi:10.21037/jtd-20-1888
 13. Wang KP, Marsh BR, Summer WR, Terry PB, Erozan YS, Baker RR. Transbronchial Needle Aspiration for Diagnosis of Lung Cancer. *Chest*. 1981;80(1):48-50. doi:10.1016/S0012-3692(16)37690-5
 14. Holty JEC, Kuschner WG, Gould MK. Accuracy of transbronchial needle aspiration for mediastinal staging of non-small cell lung cancer: A meta-analysis. *Thorax*. 2005;60(11):949-955. doi:10.1136/thx.2005.041525
 15. Cheng G, Mahajan A, Oh S, Benzaquen S, Chen A. Endobronchial ultrasound-guided intranodal forceps biopsy (EBUS-IFB)—technical review. *J Thorac Dis*. 2019;11(9):4049-4058. doi:10.21037/jtd.2019.08.106
 16. Yasufuku K, Nakajima T, Motoori K, et al. Comparison of endobronchial ultrasound, positron emission tomography, and CT for lymph node staging of lung cancer. *Chest*. 2006;130(3):710-718. doi:10.1378/chest.130.3.710
 17. Eapen GA, Shah AM, Lei X, et al. Complications, consequences, and practice patterns of endobronchial ultrasound-guided transbronchial needle aspiration: Results of the AQuIRE Registry. *Chest*. 2013;143(4):1044-1053. doi:10.1378/chest.12-0350
 18. Asano F, Aoe M, Ohsaki Y, et al. Complications associated with endobronchial ultrasound-guided transbronchial needle aspiration: A nationwide survey by the Japan Society for Respiratory Endoscopy. *Respir Res*. 2013;14(1):4-6. doi:10.1186/1465-9921-14-50
 19. Evison M, Crosbie PAJ, Martin J, et al. EBUS-TBNA in elderly patients with lung cancer: Safety and performance outcomes. *J Thorac Oncol*. 2014;9(3):370-376. doi:10.1097/JTO.0000000000000085
 20. Uchimura K, Yamasaki K, Hirano Y, et al. The successful removal of a broken needle as an unusual complication of endobronchial ultrasound-guided transbronchial needle aspiration (EBUS-TBNA): A case report and literature review. *J UOEH*. 2019;41(1):35-40. doi:10.7888/juoeh.41.35
 21. Eloubeidi MA, Chen VK, Eltoun IA, et al. Endoscopic Ultrasound-Guided Fine Needle Aspiration Biopsy of Patients with Suspected Pancreatic Cancer: Diagnostic Accuracy and Acute and 30-Day Complications. *Am J Gastroenterol*. 2003;98(12):2663-2668. doi:10.1016/S0002-9270(03)01699-X
 22. Matsui T, Nishikawa K, Yukimoto H, et al. Needle tract seeding following endoscopic

- ultrasound-guided fine-needle aspiration for pancreatic cancer: A report of two cases. *World J Surg Oncol*. 2019;17(1):1-8. doi:10.1186/s12957-019-1681-x
23. Pan H, Zhou XX, Zhao F, Lou G. The diagnosis of intramural esophageal squamous cell carcinoma without mucosal invasion using endoscopic ultrasound-guided fine needle aspiration biopsy: A case report. *Medicine (Baltimore)*. 2020;99(27):e21099. doi:10.1097/MD.00000000000021099
 24. Kundu U, Weston B, Lee J, Hofstetter W, Krishnamurthy S. Evolving role of endoscopic ultrasonography-guided fine-needle aspiration in tumor staging and treatment of patients with carcinomas of the upper gastrointestinal tract. *J Am Soc Cytopathol*. 2014;3(1):29-36. doi:10.1016/j.jasc.2013.09.002
 25. Sbeit W, Kadah A, Mahamid M, Pellicano R, Mari A, Khoury T. A state-of-the-art review on the evolving utility of endoscopic ultrasound in liver diseases diagnosis. *Diagnostics*. 2020;10(8):1-15. doi:10.3390/diagnostics10080512
 26. Martinez M. Role of endoscopic ultrasound fine-needle aspiration evaluating adrenal gland enlargement or mass. *World J Nephrol*. 2014;3(3):92. doi:10.5527/wjn.v3.i3.92
 27. Kopelman Y, Marmor S, Ashkenazi I, Fireman Z. Value of EUS-FNA cytological preparations compared with cell block sections in the diagnosis of pancreatic solid tumours. *Cytopathology*. 2011;22(3):174-178. doi:10.1111/j.1365-2303.2010.00766.x
 28. Ryozaawa S, Kitoh H, Gondo T, et al. Usefulness of endoscopic ultrasound-guided fine-needle aspiration biopsy for the diagnosis of pancreatic cancer. *J Gastroenterol*. 2005;40(9):907-911. doi:10.1007/s00535-005-1652-6
 29. Loukeris K, Vazquez MF, Sica G, et al. Cytological cell blocks: Predictors of squamous cell carcinoma and adenocarcinoma subtypes. *Diagn Cytopathol*. 2012;40(5):380-387. doi:10.1002/dc.21519
 30. Saqi A. The state of cell blocks and ancillary testing: Past, present, and future. *Arch Pathol Lab Med*. 2016;140(12):1318-1322. doi:10.5858/arpa.2016-0125-RA
 31. Saqi A, Yeager KJ. Novel disposable cell block processing device and method for high cellular yield. *Cancer Cytopathol*. 2019;127(5):316-324. doi:10.1002/ency.22133
 32. Crapanzano JP, Heymann JJ, Monaco S, Nassar A, Saqi A. The state of cell block variation and satisfaction in the era of molecular diagnostics and personalized medicine. *Cytojournal*. 2014;11:7. doi:10.4103/1742-6413.129187
 33. Nambirajan A, Jain D. Cell blocks in cytopathology: An update. *Cytopathology*. 2018;29(6):505-524. doi:10.1111/cyt.12627
 34. Shidham VB. CellBlockistry: Chemistry and art of cell-block making – A detailed review of various historical options with recent advances. *Cytojournal*. 2019;16:12. doi:10.4103/cytojournal.cytojournal_20_19
 35. 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):356-371. doi:10.1111/cyt.12174
36. Yung RCW, Otell S, Illei P, et al. Improvement of cellularity on cell block preparations using the so-called tissue coagulum clot method during endobronchial ultrasound-guided transbronchial fine-needle aspiration. *Cancer Cytopathol*. 2012;120(3):185-195. doi:10.1002/cncy.20199
 37. Shi Y, Chiaffarano J, Yee-Chang M, et al. Self-clotting method improves cell block preparation. *Cancer Cytopathol*. 2018;126(3):190-199. doi:10.1002/cncy.21950
 38. Nathan NA, Narayan E, Smith MM, Horn MJ. Cell block cytology: Improved preparation and its efficacy in diagnostic cytology. *Am J Clin Pathol*. 2000;114(4):599-606. doi:10.1309/G035-P2MM-D1TM-T5QE
 39. de Cristo AP, Goldstein HF, Faccin CS, Maia AL, Graudenz MS. Increasing diagnostic effectiveness of thyroid nodule evaluation by implementation of cell block preparation in routine US-FNA analysis. *Arch Endocrinol Metab*. 2016;60(4):367-373. doi:10.1590/2359-3997000000180
 40. Whithaus K, Fukuoka J, Prihoda TJ, Jagirdar J. Evaluation of napsin A, cytokeratin 5/6, p63, and thyroid transcription factor 1 in adenocarcinoma versus squamous cell carcinoma of the lung. *Arch Pathol Lab Med*. 2012;136(2):155-162. doi:10.5858/arpa.2011-0232-OA
 41. Righi L, Valalà T, Rapa I, et al. Impact of non-small-cell lung cancer-not otherwise specified immunophenotyping on treatment outcome. *J Thorac Oncol*. 2014;9(10):1540-1546. doi:10.1097/JTO.0000000000000271
 42. Righi L, Franzi F, Montarolo F, et al. Endobronchial ultrasound-guided transbronchial needle aspiration (EBUS-TBNA)-from morphology to molecular testing. *J Thorac Dis*. 2017;9(Suppl 5):S395-S404. doi:10.21037/jtd.2017.03.158
 43. Vatrano S, Righi L, Vavalá T, et al. Molecular and Histological Changes in Post-Treatment Biopsies of Non-Squamous Non-Small Cell Lung Cancer: A Retrospective Study. *Target Oncol*. 2016;11(2):157-166. doi:10.1007/s11523-015-0383-8
 44. Lee DH, Tsao MS, Kambartel KO, et al. Molecular testing and treatment patterns for patients with advanced non-small cell lung cancer: PivOTAL observational study. *PLoS One*. 2018;13(8):1-19. doi:10.1371/journal.pone.0202865
 45. Norris RP, Dew R, Sharp L, et al. Are there socio-economic inequalities in utilization of predictive biomarker tests and biological and precision therapies for cancer? A systematic review and meta-analysis. *BMC Med*. 2020;18(1):1-12. doi:10.1186/s12916-020-01753-0
 46. Dranitsaris G, Zhu X, Adunlin G, Vincent MD. Cost effectiveness vs. affordability in the age of immuno-oncology cancer drugs. *Expert Rev Pharmacoeconomics Outcomes*

Res. 2018;18(4):351-357. doi:10.1080/14737167.2018.1467270