

Emprego do *cell block* de agarose como método complementar no diagnóstico citológico de tumores mamários caninos

Employment of cell block of agarose as additional method in the cytological diagnosis of canine mammary tumors

Diogo Sousa Zanoni^I Silvia Regina Kleeb^{II} José Guilherme Xavier^{III}

RESUMO

Os tumores mamários são neoplasias comuns em diversas espécies, sendo os processos oncológicos de maior incidência em cães. A elevada frequência e agressividade desses processos justificam a busca de métodos diagnósticos e prognósticos rápidos, de custo reduzido e menor invasividade, visando a uma abordagem cirúrgica e terapêutica adequada. O presente estudo avaliou a adequação da utilização da técnica de *cell block* de agarose como método diagnóstico complementar aos esfregaços tradicionais no diagnóstico desses processos. Para tanto, foram obtidas 51 amostras citológicas de tumores mamários de 30 cadelas que passaram por excisão tumoral no HOVET-UMESP, comparando-se os resultados obtidos a partir dos esfregaços, de *cell blocks*, e de sua associação (esfregaços *cell blocks*⁻¹) com o diagnóstico histopatológico. Os melhores resultados foram obtidos mediante a associação dos métodos, reduzindo os resultados falso-negativos e elevando a correlação cito-histológica, reforçando a importância da citologia na rotina oncológica veterinária.

Palavras-chave: neoplasias mamárias, *cell block* de agarose, citologia, cães.

ABSTRACT

The breast tumors are common neoplasms in several species, with high incidence in dogs. The high frequency and aggressiveness of these cases justifies the search for rapid, low cost and less invasive diagnostic methods, seeking for surgical approach and appropriate therapy. This study evaluated the appropriateness of the use of the agarose *cell block* technique as a diagnostic tool to complement traditional smears in the diagnosis of these processes. Therefore, it was obtained 51 samples from 30 dogs with breast tumors that underwent tumoral excision at the HOVET-UMESP, comparing the results obtained from smears,

cell blocks, alone and in association (*smears cell blocks*⁻¹), with the histopathologic diagnosis. The best results were obtained with the association of smears and *cell block* analysis, reducing the false negative results and increasing the cyto-histological correlation, reinforcing the importance of the use of cytology in routine veterinary oncology.

Key words: breast tumors, agarose *cell block*, cytology, dogs.

INTRODUÇÃO

As neoplasias mamárias são frequentes em diversas espécies, incluindo cães, gatos, ratos, camundongos e humanos. Um exame cuidadoso das glândulas mamárias aparentemente normais de cadelas velhas pode revelar uma série de pequenas lesões, entre elas neoplasias em estágios iniciais de desenvolvimento (MISDORP et al., 1999).

Classicamente o meio diagnóstico mais utilizado nesses processos é a avaliação histopatológica, identificando-se sua natureza a partir de características microscópicas da neoformação. Embora um grande número de sistemas classificatórios para tumores mamários tenha sido desenvolvido, o mais empregado é o preconizado pela Organização Mundial de Saúde (MISDORP et al., 1999). Publicações recentes propõem um novo sistema classificatório, acrescentando subtipos histológicos aos já reconhecidos (CASSALI et al., 2011; GOLDSCHMIDT et al., 2011).

^IDepartamento de Patologia Investigativa e Comparada Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ), Universidade Estadual Paulista (UNESP), Distrito de Rubião Júnior, S/N, 18618-970, CP 585, Botucatu, SP, Brasil. E-mail: zanoni_19@hotmail.com. Autor para correspondência.

^{II}Curso de Medicina Veterinária, Faculdade da Saúde, Universidade Metodista de São Paulo (UMESP), São Bernardo do Campo, SP, Brasil.

^{III}Programa de Pós-graduação em Patologia Ambiental e Experimental, Universidade Paulista (UNIP), São Paulo, SP, Brasil.

A elevada frequência desses processos justifica a busca por métodos diagnósticos de custo reduzido, baixa invasividade e resultado mais rápido, viabilizando a abordagem cirúrgica e terapêutica. Embora a citologia cumpra essa função, persistem restrições relativas à sensibilidade do método (ALLEN et al., 1986; KULKARNI et al., 2000; HANDA et al., 2005; MASSERDOTTI, 2006; SANCHEZ & SELVAGGI, 2006; CASSALI et al., 2007). Estas se devem a limitações, como a perda das relações arquiteturais e o número restrito de lâminas a partir de uma colheita. Uma abordagem ainda pouco explorada em Medicina Veterinária vincula-se à realização do *cell block* de agarose (CBA), método originariamente proposto no processamento de amostras para microscopia eletrônica (YUAN&GULYAS, 1981; MULDER et al., 1997; SANCHEZ & SELVAGGI, 2006), que potencialmente otimiza a amostra citológica por possibilitar maior preservação arquitetural e por permitir a embocagem da amostra em parafina, com posterior processamento, à semelhança de uma amostra histológica, viabilizando o emprego de técnicas histoquímicas e imuno-histoquímicas complementares (MASSERDOTTI, 2006).

Neste estudo, foram utilizadas amostras citológicas de tumores mamários de cadelas, avaliando-se a adequação do uso do CBA como método diagnóstico complementar aos esfregaços tradicionais no diagnóstico desses processos.

MATERIAL E MÉTODOS

As amostras foram obtidas a partir da punção aspirativa por agulha fina (PAAF) e posterior excisão dos tumores mamários, presentes em cadelas atendidas no Hospital Veterinário da Universidade Metodista de São Paulo (HOVET-UMESP), procedendo-se sempre à indicação da mama amostrada, de forma a parearem-se amostras cito e histopatológicas da mesma formação.

Colheita de material para avaliação citológica: nos tumores mamários, realizou-se PAAF com agulhas de 22 gauge, acopladas a seringas de 10ml. Após movimentos retráteis do êmbolo para a formação de pressão negativa, a agulha foi direcionada para diferentes porções da massa. Com o êmbolo em repouso, foi retirada a agulha, desconectando-a da seringa. Em sequência, o êmbolo foi todo retraído, a agulha conectada novamente e, com um único e firme movimento, o êmbolo foi pressionado a fim de expulsar o material colhido junto a uma lâmina previamente limpa ou a um tubo cônico graduado.

Essa operação foi repetida quantas vezes foram necessárias, visando à obtenção de celularidade adequada.

Esfregaços: os esfregaços foram imediatamente fixados em álcool absoluto e corados pelo método panótico rápido.

Cell blocks de agarose: para a realização do CBA, acrescentou-se à amostra citológica álcool 70, alocando-se a amostra em tubo cônico graduado, procedendo-se centrifugação a 2000rpm durante 10 minutos. Retirou-se o sobrenadante acrescentando-se agarose líquida a 2%. Homogeneizou-se a amostra, realizando-se nova centrifugação a 2000rpm por 10 minutos. Em sequência, submeteu-se a amostra a um período de 10 minutos sob refrigeração, seguindo-se à retirada do material incluído em agarose, que passou por processamento histológico, inclusão em cassete com parafina, microtomia e bateria de coloração, utilizando-se o método de hematoxilina-eosina.

Avaliação citológica: o número de lâminas por caso foi variável. Em cada lâmina avaliaram-se: celularidade, relação núcleo/citoplasma, tamanho nuclear, padrão de distribuição da cromatina, número de nucléolos e morfologia nucleolar, mitoses atípicas, coesão e padrão de organização espacial entre as células.

Colheita de material para avaliação histopatológica: foram colhidas amostras cirúrgicas dos mesmos tumores mamários, fixadas em formol a 10% e embocadas em parafina, realizando-se cortes de aproximadamente 5µm, corados pelo método de hematoxilina-eosina e examinados ao microscópio óptico, permitindo a caracterização da neoplasia.

Classificação histopatológica: a formação foi classificada de acordo com o sistema proposto pela Organização Mundial de Saúde (MISDORP et al., 1999). Em associação, procedeu-se à gradação, de I a III, nos casos de neoplasmas malignos (KARAYANNOPOULOU et al., 2005).

Testes de validação da avaliação citológica: foram construídas tabelas de contingência 2x2 (BERQUÓ, 2001) para cada um dos métodos citológicos, esfregaços e CBAs, calculando-se sua sensibilidade e especificidade, considerando-se o resultado positivo ou negativo para malignidade, utilizando-se como parâmetro de referência o diagnóstico histopatológico.

RESULTADOS

Foram coletadas 51 amostras de tumores mamários, provenientes de 30 cadelas atendidas e submetidas à PAAF e à mastectomia no Serviço

de Cirurgia do HOVET-UMESP. Procedeu-se ao processamento de amostras citológicas e teciduais no Laboratório de Histologia do HOVET-UMESP, realizando-se esfregaços, CBAs e cortes histológicos (Figura 1). A idade das cadelas variou de 2 a 14 anos, sendo a média etária de 9,7 anos. As principais raças acometidas foram: Poodle 33,33% (10), SRD (sem raça definida) 33,33% (10), Cocker 10% (3), Pinscher 6,66% (2), Dachshund 6,66% (2). Apenas um caso de animais de cada uma das raças Yorkshire, Pastor

Alemão e Rottweiler, correspondendo a 3,33% dos processos, foram avaliados. Os tumores mamários distribuíram-se nos pares torácico cranial (1,93% dos casos), torácico caudal (19,60% dos casos), abdominal cranial (7,84% dos casos), abdominal caudal (23,52% dos casos) e inguinal (47,05% dos casos).

A ampla maioria das amostras, 90% dos casos (46), apresentou malignidade, sendo 10% das amostras (5) benignas. As últimas envolveram 2 adenomastubulares simples e 1 cistadenomacilíndrico.

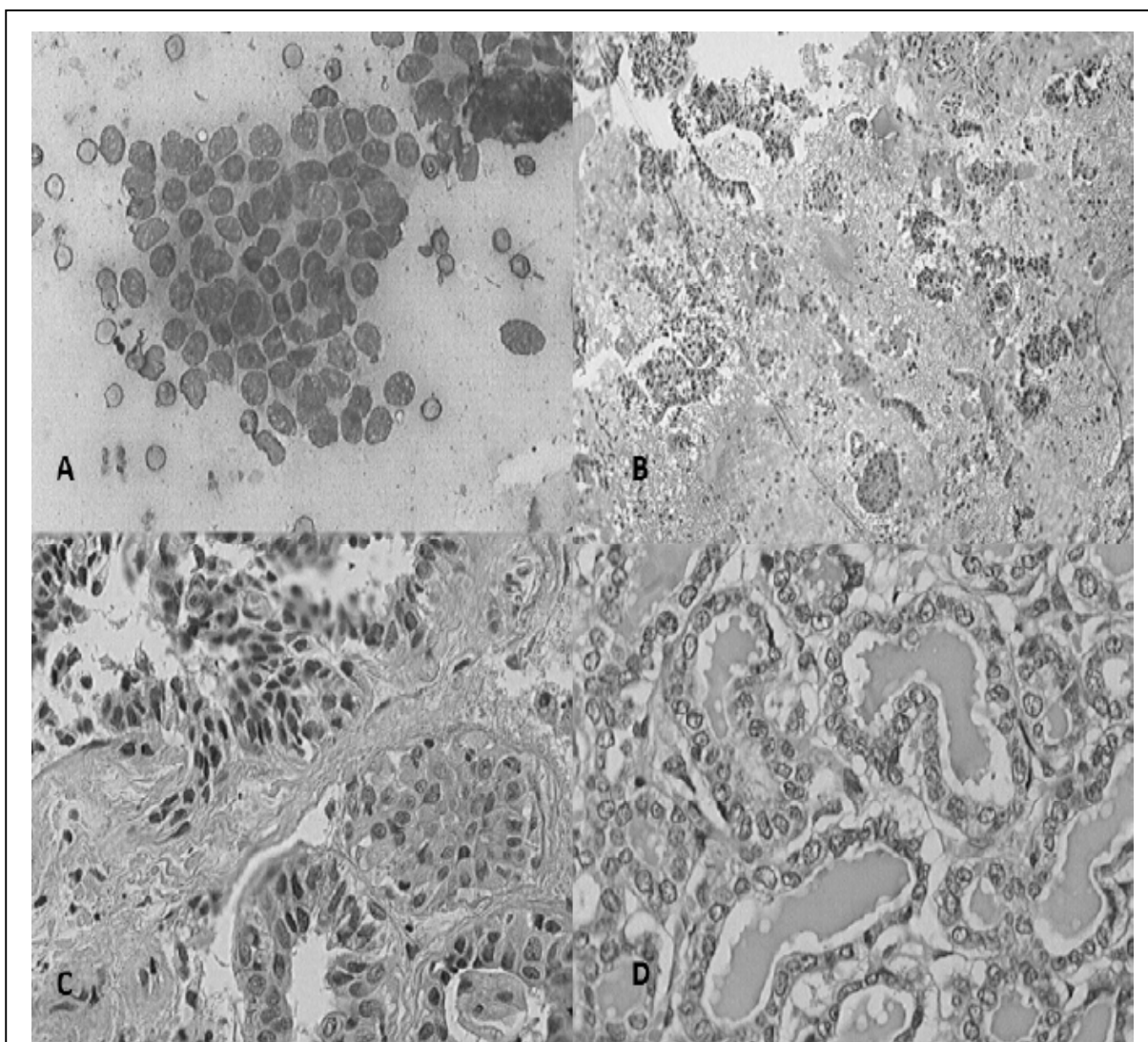


Figura 1—A: Fotomicrografia de citologia corada pelo método Panótico Rápido, evidenciando-se células cubóides, distribuídas em bloco coeso com discreto pleomorfismo, evidenciado por anisocitose, incremento na relação núcleo/citoplasma e leve anisocariose, obj.40x. B: Fotomicrografia de CBA, corado por H&E. Observa-se visão panorâmica da amostra, com a presença de pequenos blocos de células neoplásicas, com relativa preservação arquitetural, obj.4x. C: Fotomicrografia de CBA corado por H&E. Evidencia-se expansão da população epitelial de aspecto monomórfico, organizando-se em estruturas tubulares com estratificação, obj.40x. D: Fotomicrografia de corte histológico de nódulo mamário corado por H&E. Identifica-se expansão epitelial benigna caracterizada por hiper celularidade, associada a estruturas tubulares revestidas por epitélio cúbico simples de aspecto homogêneo, com frequente acúmulo luminal de secreto, obj.40x.

misto, 1 cistoadenomapapilífero simples e 1 hiperplasia mamária. Já dentre os neoplasias malignas, predominaram os carcinomas tubulares, com distribuição decrescente de lesões simples (17), complexas (12), complexas mistas (11) e simples mistas (3). Foram diagnosticados ainda três casos de carcinomas sólidos. Em relação ao grau de malignidade, predominaram as lesões de grau I, correspondendo a 60,8% (28) das lesões malignas, seguidas das lesões de grau II 39,2% (18).

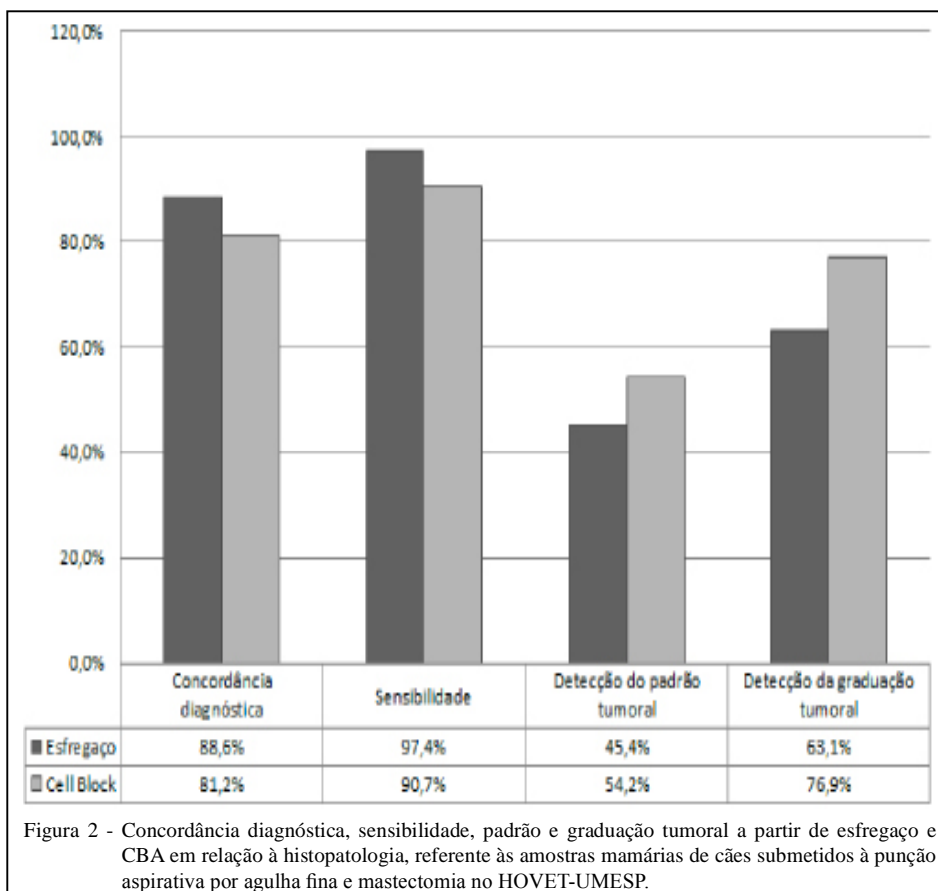
Considerando-se as amostras citológicas, a partir de esfregaços, foram diagnosticadas 42 lesões malignas e duas benignas, sendo sete amostras não representativas. A partir de CBAs, identificaram-se 44 lesões malignas e quatro benignas, sendo três amostras não representativas. Houve concordância diagnóstica, considerando-se a natureza do processo, em 88,6% dos casos (39/44) nos esfregaços e 81,2% (39/48) nos CBAs. A sensibilidade a partir dos esfregaços foi de 97,4% e dos CBAs 90,7%. Quando considerados em associação, esfregaço e CBA assumiram como definitivo o diagnóstico de maior severidade, identificando-se uma sensibilidade de

97,7%. A capacidade de detecção do padrão tumoral foi observada em 45,4% (20/44) dos esfregaços e em 54,2% (26/48) dos CBAs. Já para a graduação tumoral, evidenciou-se concordância em 63,1% entre grau histológico e o sugerido pelo esfregaço, e de 76,9% entre grau histológico e CBA (Figura 2).

O percentual de amostras não representativas foi de 13,7% em esfregaços e 5,9% em CBAs. Associando-se os dois métodos, a representatividade das amostras atingiu 94,1% dos casos.

DISCUSSÃO

A PAAF é um procedimento rápido, barato e seguro, apresentando injúria tecidual mínima, não havendo necessidade de se proceder à anestesia do animal, permitindo a obtenção de resultados confiáveis na maioria dos casos, prestando-se, em especial, ao diagnóstico diferencial entre lesões inflamatórias e neoplásicas e, nas últimas, entre lesões de natureza benigna e maligna (ZUCCARI, 2001; MASSERDOTTI, 2006).



Os arranjos celulares são fundamentais na avaliação de cortes histológicos, porém as amostras citológicas não refletem com exatidão esses parâmetros. Raramente, uma descrição citológica elucida sobre a arquitetura da lesão, limitando-se a informações celulares isoladas (MASSERDOTTI, 2006). Contudo, a disposição das células nas amostras citológicas, quando colhidas e preparadas apropriadamente, pode mimetizar o arranjo destas nos cortes histológicos. A embocagem da amostra citológica, conforme referido no método de CBA, frequentemente preserva características arquitetônicas teciduais, como arranjo tubular ou estratificado dentro de uma população celular, ou mesmo explícitas relações entre populações celulares distintas, neoplásicas ou não, contribuindo para o diagnóstico (RAFAGA et al., 1984; ROFAGHA & SHECKET, 2002). Além disso, o CBA é indicado em casos com limitação de amostragem, decorrentes de características anatômicas ou de particularidades lesionais, permitindo a maximização de informações a partir do restrito material disponível (KULKARNI et al., 2000; ZANONI et al., 2012). No entanto, a literatura contém poucos relatos sobre a utilidade do método aplicado à rotina oncológica canina.

Neste estudo, houve convergência em relação à benignidade ou malignidade da lesão, comparando-se diagnóstico histopatológico e por esfregaços em 88,6% e entre histopatológico e CBA em 81,2% dos casos. Um fator importante na avaliação citológica de tumores mamários vincula-se à grande heterogeneidade morfológica nesses processos, facilmente confirmada em amostras histopatológicas, nas quais se observa, em uma mesma formação, áreas com aspectos díspares, como sítios hiperplásicos em paralelo a nódulos neoplásicos, assim como territórios com padrão misto. Assim, a variação de resultados, associada à superposição de achados entre amostras histopatológicas e citopatológicas, ultrapassa a limitação das formas de representação do processo, envolvendo também a diversidade de conteúdos dentro da lesão, sendo fundamental o cuidado de representar em separado amostras de diferentes mamas.

Identificou-se um percentual de amostras não representativas de 13,7% e 5,9%, respectivamente, em esfregaços e CBAs. Associando-se os dois métodos, 94,1% das amostras citológicas mostraram-se representativas. Em relação à sensibilidade dos métodos, identificaram-se valores superiores relacionados aos esfregaços, tendo sido comprometido o cálculo da especificidade pelo pequeno número de casos benignos avaliados. Neste

estudo, a associação das técnicas conferiu maior representatividade às amostras, além de preservar sua sensibilidade, contribuindo para o diagnóstico (ROFAGHA & SHECKET, 2002; MANSY et al., 2006; ARDENGH et al., 2008). ROFAGA, et al. (1984) relatam, em um estudo de 85 casos, que 55% dos diagnósticos dos esfregaços originais foram melhorados após o *cell block* ser examinado, sendo que a sensibilidade do *cell block* variou de 60% a 86%, dependendo do tipo e tamanho da amostra, tipo de espécimes e técnica citológica empregada. Já KUO et al. (2004) conduziram um estudo sobre citodiagnóstico de tumor no fígado e mostraram que a análise combinada do exame citológico juntamente com o *cell block* no diagnóstico de tumor no fígado apresentou 85,1% de sensibilidade e especificidade de 98,7% quando comparado com a citologia isolada, exibindo sensibilidade de 88,4% e especificidade de 97,4%.

Outro aspecto a ser destacado é a limitada utilidade das amostras citológicas como referência para a graduação tumoral, posto que esta envolve, além de elementos citológicos, dados arquiteturais. Nesse quesito, evidenciou-se uma concordância em 63,1% entre grau histológico e o sugerido pelo esfregaço e de 76,9% entre grau histológico e CBA, indicando a superioridade do último método em preservar resquícios da distribuição espacial dos componentes da lesão. Tal fato é corroborado pelos dados deste estudo, mostrando uma concordância dos CBAs com o exame histopatológico, em relação ao padrão tumoral, superior à observada na comparação entre esfregaços e histopatológicos (54,2% e 45,4%, respectivamente), estando em consonância com a literatura (MANSY, 2004; KARAYANNOPOULOU et al., 2005; ISTVANIC et al., 2007; NODA et al., 2010). KERN E HEBER (1986) estudaram 393 casos de preparação com *cell block*. Em 273 (69,5%), os resultados foram confirmatórios e em 103 (26,3%) casos o *cell clock* forneceu informações adicionais para o diagnóstico.

A celularidade da amostra citológica é um item a ser considerado, pois, muitas vezes, a limitada representatividade da amostra determina o insucesso diagnóstico. Tal fato parece particularmente verdadeiro quando vinculado a neoplasias de estrutura complexa, como alguns processos mamários que reúnem elementos epiteliais, mioepiteliais e focos metaplásicos. Nossos achados evidenciam, assim como o relatado em literatura (ISTVANIC et al., 2007; NODA et al., 2010), um relativo ganho diagnóstico com o emprego do CBA nessas lesões. SHIVAKUMARSWAMY et al (2012)

descreveram que houve aumento da celularidade e detalhes morfológicos com o uso do *cell block*, também preservação arquitetural, grupos com arranjo papilífero e tridimensional, além de preservação citoplasmática e nuclear, membrana celular intacta e detalhes de cromatina.

Embora o diagnóstico numa amostra de citologia permita adequado detalhamento celular, muitas vezes, ferramentas adjuvantes, como imunohistoquímica (IHQ) e testes moleculares, são necessários para fins de diagnóstico e prognóstico. Nessas circunstâncias, ganha maior interesse o emprego de CBA, por permitir o armazenamento de amostra viável para exames complementares (LIU et al., 2007; HANLEY et al., 2009).

CONCLUSÃO

A utilização do CBA em complemento aos esfregaços eleva a representatividade da amostra e a sensibilidade do método citológico, reforçando a utilização da citologia no diagnóstico de formações mamárias caninas.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho obteve suporte financeiro – CNPq (Processo: 105788/2008-2).

COMITÊ DE ÉTICA E BIOSSEGURANÇA

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP-UMESP) e está registrado com o protocolo n. 223-08.

REFERÊNCIAS

- ALLEN, S.W. et al. Cytologic differentiation of benign from malignant canine mammary tumors. **Veterinary Pathology**, v.23, p.649-655, 1986. Disponível em: <<http://vet.sagepub.com/content/23/6/649.full.pdf>>. Acesso em: 27 nov. 2011. doi: 10.1177/030098588602300601.
- ARDENGH, C.J. et al. Cell block technique and cytological smears for the differential diagnosis of pancreatic neoplasms after endosonography-guided fine-needle aspiration. **Acta Gastroenterologica Latinoamericana**, v.38, p.246-251, 2008.
- BERQUÓ, E.S. et al. **Bioestatística**. 2.ed.São Paulo: Editora Pedagógica e Universitária, 2001.350p.
- CASSALI, G.D. et al. Evaluation of accuracy of fine needle aspiration cytology for diagnosis of canine mammary tumours: comparative features with human tumours. **Cytopathology**, v.18, p.191-196, 2007. Disponível em: <<http://vet.sagepub.com/content/23/6/649.full.pdf>>. Acesso em: 27 nov. 2011. doi: 10.1177/030098588602300601.
- CASSALI, G.D. et al. Consensus for the diagnosis, prognosis and treatment of canine mammary tumors. **Brazilian Journal of Veterinary Pathology**, v.4, p.153-180, 2011. Disponível em: <<http://vet.sagepub.com/content/23/6/649.full.pdf>>. Acesso em: 27 nov. 2011. doi: 10.1111/j.1365-2303.2007.00412.x.
- GOLDSCHMIDT, M. et al. Classification and grading of canine mammary tumors. **Veterinary Pathology**, v.48, p.117-131, 2011. Disponível em: <<http://vet.sagepub.com/content/48/1/117.full.pdf+html>>. Acesso em: 27 nov. 2011. doi: 10.1177/0300985810393258.
- HANDA, U. et al. Fine needle aspiration cytology in the diagnosis of bone lesions. **Cytopathology**, v.16, p.59-64, 2005. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2303.2004.00200.x/pdf>>. Acesso em: 05 ago. 2008. doi: 10.1111/j.1365-2303.2004.00200.x.
- HANLEY, K.Z. et al. Immunohistochemical detection of estrogen receptor, progesterone receptor, and human epidermal growth factor receptor 2 expression in breast carcinomas. **Cancer Cytopathology**, v.117, p.279-288, 2009. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cncy.20034/pdf>>. Acesso em: 27 nov. 2011. doi: 10.1002/cncy.20034.
- ISTVANIC, S. et al. Cell blocks of breast FNAS frequently allow diagnosis of invasion or histological classification of proliferative changes. **Diagnostic Cytopathology**, v.35, p.263-269, 2007. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/dc.20630/pdf>>. Acesso em: 29 out. 2009. doi: 10.1002/dc.20630.
- KARAYANNOPOULOU, M. et al. Histological grading and prognosis in dogs with mammary carcinomas: Application of a human grading method. **Journal of Comparative Pathology**, v.133, p.246-252, 2005. Disponível em: <http://ac.eis-cdn.com/S0021997505000654/1-s2.0-S0021997505000654-main.pdf?_tid=59ce71c4-2d04-11e2-a8d7-00000aacb35e&acdnat=1352750928_e643d6c682a883e0977226949686e0e4>. Acesso em: 29 out. 2009. doi: 10.1016/j.jcpa.2005.05.003.
- KERN, W.M.; HABER, M. Fine needle aspiration mini biopsies. **Journal of Clinical Cytology and Cytopathology**. n.30, p.403-408, 1986.
- KULKARNI, M.B. et al. Scrape cell-block technique for fine needle aspiration cytology smears. **Cytopathology**, v.11, p.79-184, 2000. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.1365-2303.2000.00249.x/pdf>>. Acesso em: 15 mar. 2009. doi: 10.1046/j.1365-2303.2000.00249.x.
- KUO, F. Y. et al. Fine needle aspiration cytodagnosis of liver tumors. **Journal of Clinical Cytology and Cytopathology**, n.48, p.142-148, 2004.
- LIU, H. et al. Immunohistochemical detection of p16INK4a in liquid-based cytology specimens on cell block sections. **Cancer Cytopathology**, v.111, p.74-82, 2007. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cncr.22577/pdf>>. Acesso em: 15 mar. 2009. doi: 10.1002/cncr.22577.
- MANSY, S.S. Agarose cell block: innovated technique for the processing of urine cytology for electron microscopy examination. **Ultrastructural Pathology**, v.28, p.15-21, 2004.
- MANSY, S.S. et al. Value of the innovated technique agarose cell block in improving the sensitivity of urine cytology in cases of bladder carcinoma. **Ultrastructural Pathology**, v.30, p.379-385, 2006.

- MASSERDOTTI, C. Architectural patterns in cytology: correlation with histology. **Veterinary Clinical Pathology**, v.35, p.388-396, 2006. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1939-165X.2006.tb00154.x/pdf>>. Acesso em: 16 mar. 2009. doi: 10.1111/j.1939-165X.2006.tb00154.x.
- MISDORP, W. et al. Histological classification of the mammary tumors of the dog and the cat. In: WHO. **International histological classification tumors of domestic animals**. Washington, DC: AFIP, 1999. p.59.
- MULDER, A.B. et al. A simple procedure for in situ immunolabeling embedding and sectioning of layers of cultured endothelial and smooth muscle cells for both light and electron microscopy. **Biotechnic&Histochemistry**, v.72, p.45-48, 1997.
- NODA, Y. et al. Diagnostic efficacy of the cell block method in comparison with smear cytology of tissue samples obtained by endoscopic ultrasound-guided fine-needle aspiration. **Journal of Gastroenterology**, v.45, p.868-875, 2010. Disponível em: <http://download.springer.com/static/pdf/28/art%253A10.1007%252Fs00535-010-0217-5.pdf?auth66=1352753357_c209b37f9938d2505a7897157408e5d1&ext=.pdf>. Acesso em: 27 nov. 2011. doi: 10.1177/030098588602300601.
- ROFAGHA, S.K.; SHECKET, M.V. Diagnostic value, feasibility, and validity of preparing cell blocks from fluid-based gynecologic cytology specimens cancer. **Cancer Cytopathology**, v.96, p.204-209, 2002. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cncr.10716/pdf>>. Acesso em: 20 abr. 2009. doi: 10.1002/cncr.10716.
- ROFAGA, S.K. et al. Role of the cell block in fine needle aspirations. **Journal of Clinical Cytology and Cytopathology**, n.28, p.630-631, 1984.
- SANCHEZ, N.; SELVAGGI, S.M. Utility of cell blocks in the diagnosis of thyroid aspirates diagnostic. **Cytopathology**, v.34, n.2, p.89-92, 2006. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/dc.20385/pdf>>. Acesso em: 20 abr. 2009. doi: 10.1002/dc.20385.
- SHIVAKUMARSWAMY, U. et al. Diagnostic utility of the cell block method versus the conventional smear study in pleural fluid cytology. **Journal of Cytology**, v.29, p.11-15, 2012. Disponível em: <http://www.jcytol.org/temp/JCytol29111-5794636_160546.pdf>. Acesso em: 27 nov. 2011. doi: 10.4103/0970-9371.93210.
- YUAN, L.C.; GULYAS, B.J. An improved method for processing single cells for electron microscopy utilizing agarose. **Anatomical Record**, v.201, p.273-281, 1981.
- ZANONI, D.S. et al. Agarose cell block technique as a complementary method in the diagnosis of fungal osteomyelitis in a dog. **Open Veterinary Journal**, v.2, p.19-22, 2012.
- ZUCCARI, D.A.P.C. et al. Correlação entre a citologia aspirativa por agulha fina e a histologia no diagnóstico de tumores mamários de cadelas. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.38, p.38-41, 2001. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/bjvras/v38n1/9673.pdf>>. Acesso em: 27 nov. 2011. doi: 10.1177/030098588602300601.