

Imunocitoquímica em citologia aspirativa do pulmão: comparação de quatro protocolos

Bruna Santos¹, Ruben Roque^{2,3}, Teresa Pereira³, Paula Mendonça², Saudade André³

1. Departamento de Anatomia Patológica, Hospital CUF Descobertas. Lisboa, Portugal. bruna_1996_santos@sapo.pt
2. Departamento das Ciências do Diagnóstico, Terapêutica e Saúde Pública, Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa, Instituto Politécnico de Lisboa. Lisboa, Portugal.
3. Departamento de Anatomia Patológica, Instituto Português de Oncologia Francisco Gentil, EPE. Lisboa, Portugal.

RESUMO: Introdução – A preservação a longo prazo de lâminas de citologia aspirativa por agulha fina (CAAF) é um requisito essencial nos laboratórios de citopatologia para a posterior realização de imunocitoquímica (ICQ). A ICQ contribui para um diagnóstico correto e completo, sendo essencial a preservação morfológica e antigénica a longo prazo para obter resultados confiáveis. Neste estudo pretende-se avaliar a imunoexpressão dos antígenos TTF1, p40 e cromogranina A em amostras de CAAF do pulmão retiradas do arquivo e coradas pelos métodos de: i) Papanicolaou (Pap); ii) May-Grünwald Giemsa (MGG); iii) preservadas em polietilenoglicol (PEG); e iv) processadas como citobloco (CB). **Métodos** – Foram selecionados do arquivo 24 exames de CAAF com diagnóstico de carcinoma primário do pulmão, com amostra processada por cada um dos protocolos em estudo (Pap, MGG, PEG e CB). Com base no diagnóstico foi realizada imunomarcagem com anticorpos primários anti-TTF1 (adenocarcinomas), anti-p40 (carcinomas pavimentocelulares) e anti-cromogranina A (carcinomas neuroendócrinos). A qualidade da imunomarcagem foi aferida por dois avaliadores independentes com recurso a uma escala, com classificação entre 0 e 27 pontos, e que compreende os parâmetros: preservação morfológica, intensidade da marcação específica, sensibilidade, especificidade e contraste. **Resultados** – A pontuação média obtida para os métodos Pap, MGG, PEG e CB foi de 21,58 ($\pm 4,54$), 11,79 ($\pm 1,88$), 22,25 ($\pm 5,30$), 26,31 ($\pm 1,21$) pontos, respetivamente. O CB conseguiu resultados superiores aos restantes protocolos em estudo ($p < 0,05$). Quando comparados os protocolos a par (*post-hoc* de Tuckey), os únicos que não apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre si foram Pap e PEG ($p = 0,814$). **Conclusões** – O CB é o protocolo de eleição para a realização de ICQ nas amostras e para os antígenos em estudo. Os métodos Pap e PEG apresentaram perda de imunomarcagem, podendo levar a resultados falso-negativos. O protocolo de MGG não obteve imunomarcagem em nenhuma amostra.

Palavras-chave: Imunocitoquímica; May-Grünwald Giemsa; Polietilenoglicol; Papanicolaou; Processamento.

Immunocytochemistry in lung fine needle aspiration cytology: comparison of four protocols

ABSTRACT: Background – Long-term preservation of fine-needle aspiration cytology slides is an essential requirement in cytopathology laboratories for the eventual performance of immunocytochemistry. ICQ contributes to a correct and complete diagnosis, considering that long-term morphological and antigenic preservation is essential to obtain reliable results. In this study, we intend to evaluate and compare the immunoexpression of TTF1, p40, and chromogranin A antigens in lung samples taken from the archive and stained with: i) Papanicolaou (Pap); ii) May-Grünwald Giemsa (MGG); iii) preserved in polyethylene glycol (PEG); and iv) processed as cell-block. **Methods** – Twenty-four fine needle aspiration cytology samples diagnosed as primary lung carcinoma with a sample processed by each of the protocols studied (Pap, MGG, PEG, and CB) were selected from the archive. Based on the diagnosis, immunostaining was performed with primary antibodies anti-TTF1 (adenocarcinomas), anti-p40 (squamous cell carcinomas), and

anti-chromogranin A (neuroendocrine carcinomas). The quality of immunostaining was evaluated by two independent observers using an evaluation grid (rated from 0 to 27 points) that comprises parameters as: morphological preservation, specific staining intensity, sensitivity, specificity, and contrast. **Results** – The mean values obtained for CB, PEG, Pap, and MGG protocols were 21.58 (± 4.54), 11.79 (± 1.88), 22.25 (± 5.30), 26.31 (± 1.21) points respectively. CB achieved better results when compared to other protocols under study ($p < 0.05$). When compared in pairs (Tuckey post-hoc) the only protocols that did not show statistically significant differences were Pap and PEG ($p = 0.0814$). **Conclusions** – Cell-block is the elected protocol to perform ICQ for the samples and antigens under study. The Pap and PEG protocols showed loss of immunostaining, which could lead to false-negative results. Immunostaining was not observed in any sample with MGG protocol.

Keywords: Immunocytochemistry; May-Grünwald Giemsa; Polyethyleneglycol; Papanicolaou; Sample processing.

Introdução

O exame citopatológico pode ser utilizado para efetuar o diagnóstico de lesões, independentemente da sua localização anatômica e etiologia¹⁻². No caso das doenças oncológicas tem-se assistido à necessidade crescente da subclassificação de tumores e da determinação do estado de marcadores de prognóstico e preditivos, com tradução a nível da escolha da terapêutica. Neste campo as técnicas complementares de diagnóstico, nomeadamente imunocitoquímica, *hibridação in situ* e outras técnicas de biologia molecular têm desempenhado um papel crucial¹⁻². Relativamente à imunocitoquímica, a sua utilização é imprescindível no diagnóstico citopatológico³, sendo um método complementar sensível e específico que permite aumentar a acuidade diagnóstica através do uso de imunossoros dirigidos a antígenos de interesse, que permitem obter informações relevantes para uma correta avaliação das alterações celulares⁴⁻⁵. A fase pré-analítica condiciona a aplicação deste tipo de técnicas, sendo esta uma das fases problemáticas em citopatologia dado que, ao contrário do que acontece no campo da histopatologia, não é predominante o uso de um fixador ou método de processamento. Vários métodos são relatados na literatura e utilizados na rotina laboratorial para o processamento de amostras com vista à realização de técnicas de imunocitoquímica (ICQ), por exemplo esfregaços, *cytospins*, citologia de impressão, citologia em meio líquido ou citobloco (CB), métodos estes sujeitos a diversos tipos de fixação e preservados em diferentes condições⁶. A diversidade de fixadores e métodos de processamento dificulta a padronização e reprodutibilidade das técnicas, sendo uma das principais limitações da ICQ aplicada a amostras citológicas^{2,7-9}. A secagem ao ar com posterior criopreservação e a fixação em metanol com subsequente preservação em polietilenoglicol (PEG) são dois protocolos utilizados para preservação morfológica e antigénica das amostras, avaliados por vários autores como permitindo a obtenção de bons resultados^{6,10}. Alguns autores recorrem a preparações citológicas coradas para realização destas técnicas, sendo reportado que em amostras coradas com coloração de Papanicolaou (Pap) podem existir resultados falsos negativos, o que faz com que o método seja utilizado com reserva para diagnóstico¹¹⁻¹². Em relação à utilização de amostras coradas com coloração de May-Grünwald

Giemsa (MGG), dos poucos estudos publicados sobre a sua implicação na preservação de epítomos antigénicos sabe-se que está associada à diminuição de estruturas marcadas e menor intensidade de imunomarcação¹.

Nos carcinomas do pulmão as terapêuticas são selecionadas com base na diferenciação das neoplasias. A deteção dos antígenos *Thyroid transcription factor 1* (TTF1), p40 e cromogranina A permite, a par de características morfológicas, a caracterização das neoplasias como adenocarcinoma, carcinoma pavimentocelular e neoplasia neuroendócrina, respetivamente. Assim, é de extrema importância que as técnicas de imunocitoquímica sejam otimizadas e validadas de modo a permitirem resultados corretos¹³⁻¹⁴.

No presente estudo utilizam-se amostras de CAAF do pulmão submetidas a diferentes protocolos (Pap, MGG, PEG e CB) para realização de técnicas de imunocitoquímica. O CB, devido à similaridade de processamento com as amostras histológicas, é o método padrão descrito na literatura para realização de imunocitoquímica em citologia^{5-6,8-9}.

Objetivo

O objetivo deste estudo foi avaliar e comparar a imunorexpressão dos antígenos TTF1, p40 e cromogranina A em amostras de arquivo de CAAF do pulmão, processadas do seguinte modo: i) Papanicolaou (Pap); ii) May-Grünwald Giemsa (MGG); iii) polietilenoglicol (PEG); iv) citobloco (CB).

Métodos

Foram retirados do arquivo do Serviço de Anatomia Patológica do Instituto Português de Oncologia de Lisboa Francisco Gentil 24 exames de citologia aspirativa do pulmão, colhidos entre janeiro de 2016 e janeiro de 2018, com relatório anatomopatológico emitido e que cumprissem os seguintes critérios de seleção: possuir pelo menos um esfregaço corado com cada uma das colorações de rotina (Pap e MGG), um esfregaço fixado em metanol e preservado com PEG, e a amostra tivesse também sido processada como CB. Todas as amostras foram avaliadas quanto à celularidade (por observação microscópica) e consideradas representativas para realização de ICQ.

Os diagnósticos anatomopatológicos das amostras selecionadas foram: 10 adenocarcinomas (41,67%), sete carcinomas

pavimentocelulares (29,17%) e sete carcinomas de pequenas células (29,17%).

Para a realização da ICQ foi utilizado um esfregaço de cada protocolo em estudo (Pap, MGG e PEG) e um corte histológico do CB, perfazendo um total de 96 lâminas de ICQ. Nas amostras com diagnóstico de adenocarcinoma foi realizada a imunomarcagem com anticorpo primário (Ac) anti-TTF1; nos carcinomas pavimentocelulares com Ac anti-p40 e nos carcinomas neuroendócrinos foi utilizado o Ac anti-Cromogranina A. A pesquisa destes antigénios é recomendada pela literatura¹³⁻¹⁴ e utilizada na rotina laboratorial para determinação da diferenciação de neoplasias do pulmão. A ICQ foi realizada nos meses de julho e agosto de 2018. No total foi pesquisado o antigénio TTF1 em 10 exames (perfazendo um total de 40 lâminas de ICQ: 10 em esfregaços corados com Pap, 10 corados com MGG, 10 preservados em PEG e 10 cortes de CB), p40 em sete exames (total de 28 lâminas) e cromogranina A (28 lâminas).

A metodologia do estudo e a caracterização da amostra encontram-se esquematizadas na Figura 1.

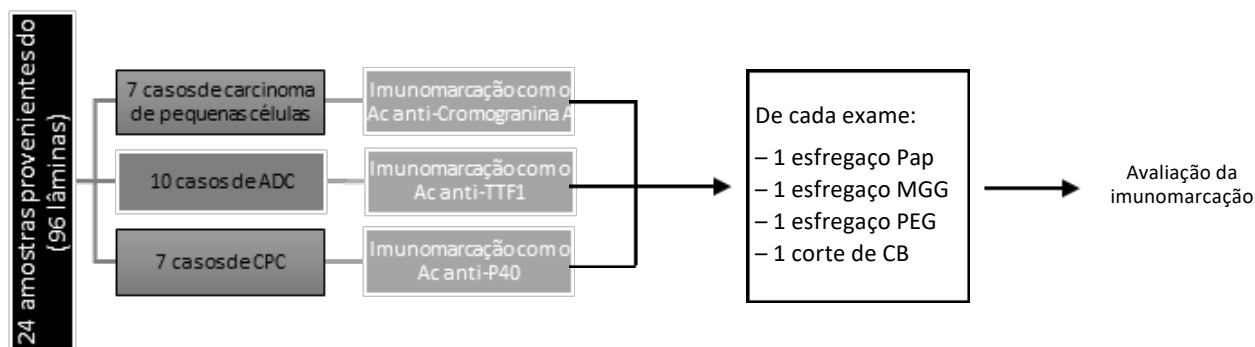


Figura 1. Esquema da metodologia de estudo e caracterização da amostra.

Os protocolos utilizados no estudo seguiram os procedimentos internos em utilização no Serviço de Anatomia Patológica do Instituto Português de Oncologia de Lisboa Francisco Gentil, otimizados e validados para diagnóstico citopatológico, descritos a seguir.

Os esfregaços corados por Pap foram fixados de forma imediata após a colheita em metanol absoluto, no mínimo durante 10 minutos, posteriormente foram corados utilizando o protocolo recomendado pelo fabricante (ThinPrep Stain; Hologic). Após a coloração, as lâminas foram montadas (Tissue-Tek Coverslipping Film; Sakura), observadas ao microscópio e arquivadas à temperatura ambiente. Para realização da ICQ, a lamela foi removida por imersão em acetona pura durante cinco minutos, seguida de imersão por um minuto em etanol 100%, 10 minutos em xilol e quatro minutos em etanol 100%, seguidos de hidratação. Permaneceram em solução tampão fosfato salino (PBS) até iniciar a fase analítica da técnica ICQ.

Os esfregaços corados com coloração de MGG secaram ao ar após colheita e foram corados com May-Grünwald's *eosine-methylene blue solution modified* (Sigma-Aldrich) e Giemsa's *azur eosin methylene blue solution* (Sigma-Aldrich), montados (Tissue-Tek Coverslipping Film; Sakura), observados ao microscópio e arquivados à temperatura ambiente. Para realização da ICQ as lâminas foram desmontadas em acetona pura durante 15 minutos e colocadas em PBS.

Os esfregaços preservados em PEG tiveram fixação imediata em metanol absoluto a 4 °C durante pelo menos 30 minutos. Posteriormente aplicaram-se duas ou três gotas de solução de PEG a 10% (Sigma P2402) nas lâminas húmidas, de forma a cobrir toda a área do esfregaço. Após a solidificação da solução, formando uma camada protetora sobre os esfregaços, as lâminas foram arquivadas à temperatura ambiente.

Antes da realização da técnica ICQ, o PEG foi removido por imersão das lâminas em etanol a 96% durante 10 minutos, seguido de hidratação até PBS.

As amostras de CB foram colhidas diretamente para formol tamponado a 10% e fixaram durante pelo menos 30 minutos. Por centrifugação obteve-se um sedimento celular, ao qual se adicionou HistoGel (Thermo Scientific). Após solidificação do gel, a amostra foi colocada numa cassete de histologia e processada e corada como uma biópsia. O CB foi arquivado à temperatura ambiente.

A ICQ foi realizada no equipamento Ventana BenchMark ULTRA, utilizando um kit de detecção DAB Universal *OptiView* (Ventana; ref. 760-700) para a detecção do antigénio p40 e *UltraView* (Ventana; ref. 760-500) para os antigénios TTF1 e cromogranina A. As características dos soros primários e protocolo utilizados para cada tipo de amostra em estudo podem ser observados na Tabela 1.

A avaliação da imunomarcagem obtida foi efetuada por observação microscópica das amostras, realizada por dois avaliadores independentes, na qual se avaliou a qualidade da técnica ICQ de acordo com a grelha de avaliação apresentada na Tabela 2¹⁵, compreendendo os seguintes parâmetros: preservação da morfologia (PM), intensidade da marcação específica (IM), sensibilidade (S), especificidade (E) e contraste (C). A cada parâmetro (avaliado de 0 a 3 pontos) foram aplicados fatores de ponderação, permitindo uma maior contribuição dos parâmetros mais importantes para a pontuação final. Foi permitida uma discrepância máxima de um valor para cada parâmetro entre os avaliadores. Caso a diferença fosse superior, a lâmina era reavaliada.

Tabela 1. Detalhe dos anticorpos primários utilizados no estudo

Anticorpo Primário (Clone)	Fabricante	Referência	Protocolo Diluição/ Recuperação Antigénica		
			MGG	Pap e PEG	CB
Cromogranina A (DAK-A3)	DAKO	M0869	1:10/ 20 min CC1	1:50/ 8 min CC1	1:200/ 24 min CC1
p40 (policlonal)	Biocare Medical	ACI 3030B	1:50/ 32 min CC1	1:100/ 8 min CC1	1:100/ 56 min CC1
TTF1 (8G7G3/1)	DAKO	M3575	1:50/ 20 min CC1	1:150/ 8 min CC1	1:300/ 56 min CC1

Legenda: MGG = Coloração de MGG; Pap = Coloração de Pap; PEG = Esfregaços preservados em PEG; CB = Cortes histológicos de citobloco; min = Minutos; CC1 = Cell conditioning 1 buffer (Ventana).

Tabela 2. Grelha de avaliação utilizada para analisar os resultados da técnica ICQ

Pontos	Preservação morfológica	Intensidade de marcação	Sensibilidade	Especificidade	Contraste
0	Amostra não preservada, invalida a avaliação	Ausência de marcação	Marcação de 0% a 10% do alvo	Marcação de estruturas não alvo que invalida a avaliação	Coloração com deficiências que invalidam a avaliação
1	Ausência moderada de preservação, que não invalida a avaliação	Marcação com intensidade fraca	Marcação de 11% a 50% do alvo	Marcação moderada de estruturas não alvo que não invalida a avaliação	Coloração com deficiências moderadas que não invalidam a avaliação
2	Ausência ligeira de preservação, que não invalida a avaliação	Marcação com intensidade moderada	Marcação de 51% a 90% do alvo	Marcação ligeira de estruturas não alvo que não invalida a avaliação	Coloração com deficiências ligeiras que não invalidam a avaliação
3	Preservação morfológica mantida	Marcação com intensidade forte	Marcação de 91% a 100% do alvo	Ausência de marcação de estruturas não alvo	Coloração que incrementa a visualização da marcação
Fator de ponderação	1	3	2	2	1

A pontuação final de cada lâmina foi obtida aplicando a seguinte fórmula de cálculo: $(1 \times PM) + (3 \times IM) + (2 \times S) + (2 \times E) + (1 \times C)$. A pontuação final assumiu valores entre 0 (piores resultados possíveis) e 27 pontos (melhores resultados possíveis).

Para análise dos dados recolhidos, tendo em conta que para a avaliação dos protocolos em estudo foram efetuadas 192 avaliações, assumiu-se que a amostra se aproxima de uma distribuição normal de acordo com o Teorema do Limite Central¹⁶.

As pontuações obtidas na avaliação da qualidade da ICQ foram analisadas utilizando estatística descritiva e o teste One Way ANOVA para um valor de significância de 5% com

recurso ao SPSS v. 22.0 (SPSS Inc., Chicago-IL, USA). Posteriormente foi realizado um teste estatístico *post-hoc* (teste de Tukey), de modo a especificar as diferenças estatisticamente significativas entre grupos.

No planeamento e desenvolvimento deste estudo foram observados os valores éticos aplicáveis, sendo as amostras utilizadas para fins estritamente investigacionais e o seu uso não comprometeu ou interferiu no diagnóstico dos doentes. Foi mantido o anonimato de todos os participantes. O estudo foi submetido e obteve parecer favorável do Conselho de Ética da Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa (referência CEESTE/SL-Nº.67-2018).

Resultados

Obtiveram-se 96 lâminas de ICQ avaliadas por dois observadores, correspondendo a 192 avaliações.

Na qualidade global da imunomarcção (avaliada numa escala de 0 a 27 pontos), os melhores resultados são obtidos em CB (média de $26,31 \pm 1,21$ pontos), seguido pelo PEG (média

de $22,25 \pm 5,30$ pontos) e Pap (média de $21,58 \pm 4,54$ pontos). A média de pontuação obtida em MGG é de $11,79 \pm 1,88$ pontos (cf. Tabela 3). Esta tendência também pode ser observada na Figura 2, na qual se destaca a consistência de resultados, perto do limite superior, obtidos no CB. O PEG e Pap apresentam uma amplitude interquartil semelhante, obtendo o primeiro pontuação média mais elevada.

Tabela 3. Estatística descritiva para os resultados da qualidade global da ICQ

Protocolo	Média	Desvio-padrão	Mediana	Moda	Mínimo	Máximo
Pap	21,58	4,54	23	24	9	27
PEG	22,25	5,30	24	27	8	27
MGG	11,79	1,88	12	12	5	15
CB	26,31	1,21	27	27	22	27

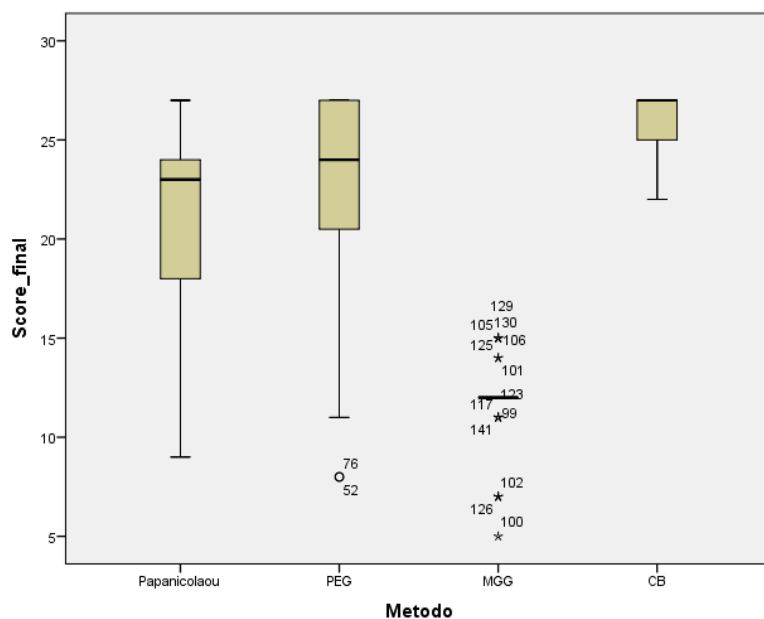


Figura 2. Resultados obtidos para a qualidade da ICQ.

Os protocolos apresentam resultados com diferenças estatisticamente significativas entre si ($p=0,000$, teste One-Way ANOVA). Comparando os protocolos a par, utilizando o *post-hoc* de Tukey, a única dupla para a qual as diferenças não são estatisticamente significativas são os protocolos PEG e Pap ($p=0,814$).

A análise dos resultados por parâmetro de avaliação (avaliados numa escala de 0 a 3 pontos) revela que, para

a preservação da morfologia, os protocolos de Pap e CB atingem valor máximo, sendo a média de três pontos. Para a intensidade da marcação, sensibilidade e contraste os melhores resultados são obtidos em CB, seguido pelo PEG e Pap. Na especificidade o melhor resultado foi obtido pelo MGG (2,88 de pontuação média), seguido pelo CB, Pap e PEG (cf. Tabela 4).

Tabela 4. Média e desvio-padrão da pontuação obtida para cada parâmetro, por protocolo

Protocolo	Preservação da morfologia	Intensidade da marcação	Sensibilidade	Especificidade	Contraste
Pap	2,92 (\pm 0,28)	2,15 (\pm 0,99)	2,06 (\pm 1,06)	2,63 (\pm 0,70)	2,73 (\pm 0,68)
PEG	3,00 (\pm 0,00)	2,15 (\pm 1,07)	2,35 (\pm 1,06)	2,56 (\pm 0,71)	2,97 (\pm 0,14)
MGG	2,79 (\pm 0,58)	0,13 (\pm 0,33)	0,00 (\pm 0,00)	2,94 (\pm 0,34)	2,81 (\pm 0,53)
CB	3,00 (\pm 0,00)	2,85 (\pm 0,36)	3,00 (\pm 0,00)	2,85 (\pm 0,36)	3,00 (\pm 0,00)

Nas Figuras 3 a 5 observam-se fotografias que ilustram os resultados obtidos. Todas as fotografias sob a mesma

referência correspondem ao mesmo exame, o que permite comparar o desempenho de cada protocolo.

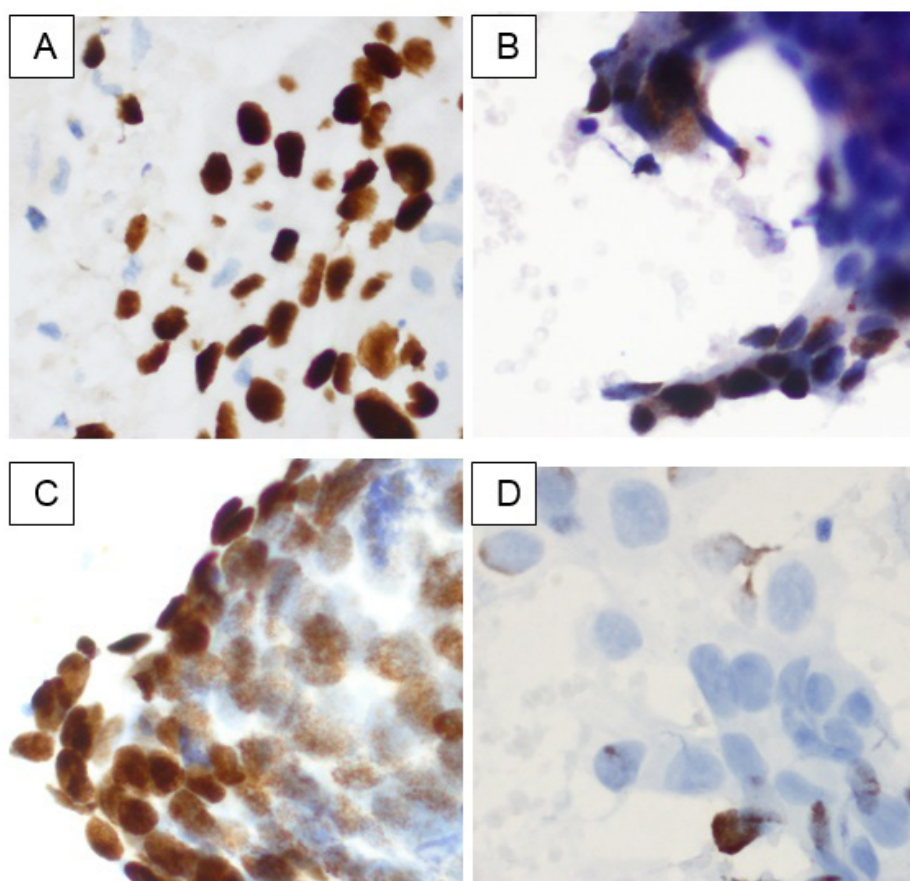


Figura 3. Imunoexpressão nuclear do antígeno p40 numa amostra de carcinoma pavimentocelular (objetiva 40x). A – CB com ótima preservação morfológica, com intensidade de marcação forte em 91% a 100% das células alvo, ausência de marcação das estruturas não alvo e contraste que incrementa a visualização da marcação. B – Pap: apesar da intensidade da marcação ser forte, observa-se uma diminuição da quantidade de estruturas marcadas (sensibilidade) com marcação de 11% a 50% das células alvo. C – PEG com intensidade de marcação moderada e detecção de 91% a 100% das células alvo. D – Esfregaço MGG com intensidade de marcação fraca em 0% a 10% das células alvo.

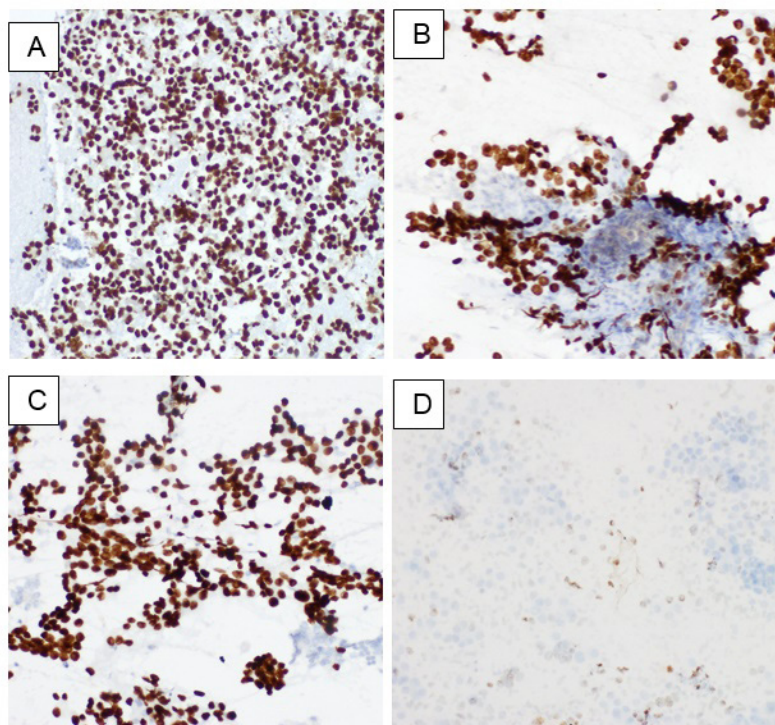


Figura 4. Amostra constituída por células de adenocarcinoma do pulmão com expressão de TTF1 (objetiva 10x). A – CB com ótima preservação morfológica, com intensidade de marcação forte em 91% a 100% das células alvo, ausência de marcação de estruturas não alvo e contraste que incrementa a visualização da marcação. B (Pap) e C (PEG) – Observam-se resultados sobreponíveis aos do CB. D (MGG) – Observa-se uma diminuição drástica da intensidade e especificidade da marcação, sendo esta fraca e presente em apenas 0% a 10% das células alvo.

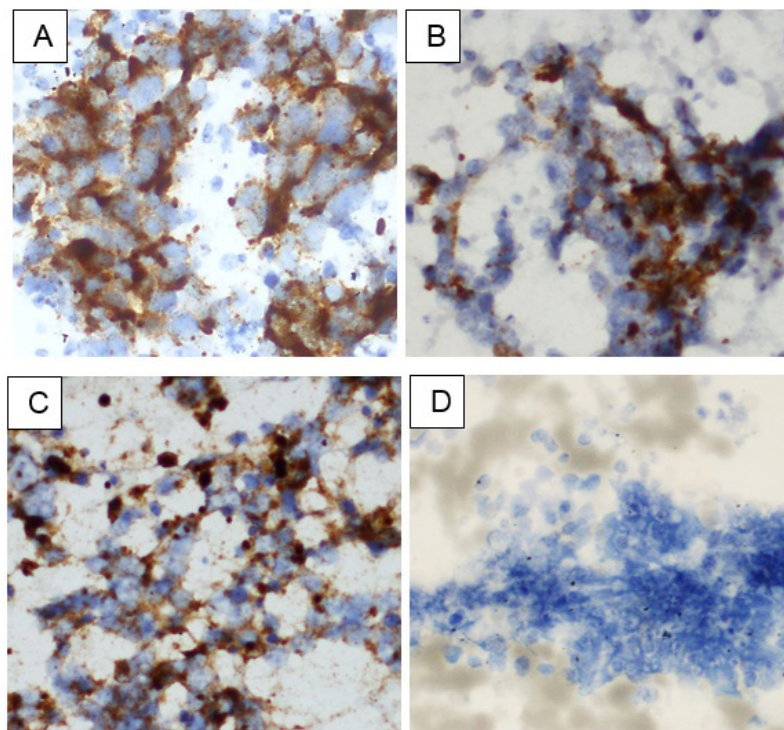


Figura 5. Amostra de carcinoma com diferenciação neuroendócrina do pulmão, com expressão do antígeno cromogranina A (objetiva 40x). A – CB com ótima preservação morfológica, intensidade de marcação forte em 91% a 100% das células alvo, ausência de marcação inespecífica e contraste que incrementa a visualização da marcação. B (Pap) e C (PEG) – Observam-se os mesmos resultados sobreponíveis aos obtidos em CB. D – MGG ausência de imunomarcação.

Discussão

Os melhores resultados foram obtidos pela ICQ realizada em CB com obtenção de 26,31 pontos em 27,00 possíveis na média da avaliação global. Os resultados deste protocolo são superiores, e com diferenças estatisticamente significativas, em relação aos restantes. Também foi o protocolo que teve pontuação mais alta em todos os parâmetros de avaliação, com exceção da especificidade. Nos parâmetros individuais o menor valor médio obtido foi de 2,85 pontos em 3,00 possíveis (para a intensidade da marcação e especificidade). Estes resultados corroboram o CB como método padrão para a realização da ICQ. Por ter condições pré-analíticas e analíticas sobreponíveis às das amostras histológicas é tido como o método preferencial para realização de técnicas complementares^{4,8}.

Dos protocolos realizados em esfregaços, o PEG é o que apresenta melhores resultados (média de 22,25 pontos em 27,00 possíveis). Apesar de o resultado da pontuação média ser superior ao protocolo Pap, as diferenças entre os dois não são estatisticamente significativas. Nos parâmetros individuais obtém a pontuação máxima de 3,00 pontos na preservação morfológica e de 2,97 pontos para o contraste. No que toca à marcação específica obteve 2,15 pontos para a intensidade e 2,35 para a sensibilidade. Estes resultados estão de acordo com outros estudos, em que as amostras fixadas com metanol e preservadas com PEG revelaram resultados superiores,¹⁰ concretamente no que concerne à preservação morfológica, intensidade de marcação e contraste⁶. Na literatura, este protocolo é referido como sendo o preferencial para realização de ICQ em esfregaços, uma vez que a fixação imediata das lâminas em metanol absoluto e a subsequente aplicação de PEG garantem a preservação morfológica e dos epítomos antigénicos^{6-7,17}.

O protocolo Pap obteve uma pontuação média final de 21,58 pontos, sendo que o parâmetro individual em que obteve piores resultados foram a intensidade de marcação com 2,15 pontos e na quantidade de estruturas marcadas com 2,06 pontos em 3,00 possíveis. A perda de antigenicidade pode ser explicada por estas amostras serem submetidas a um processamento mais complexo, com passagem por elevado número de reagentes e ainda serem sujeitas a um processo de desmontagem, cujo impacto individual na antigenicidade é difícil de identificar. Outros autores também relatam um decréscimo da qualidade da imunomarcação em amostras coradas com Papanicolaou¹².

O protocolo MGG obteve resultados claramente inferiores para a deteção antigénica por ICQ, dado que a média dos parâmetros sensibilidade e intensidade de marcação é de 0,00 e 0,13 pontos, respetivamente. Apesar de nos restantes parâmetros os resultados serem aceitáveis, um protocolo que não permita a deteção do antigénio de interesse não pode ser utilizado para diagnóstico. Estes resultados são inferiores aos obtidos por outros autores que relatam a diminuição da intensidade e especificidade da marcação nestas amostras¹.

O tempo decorrido entre a colheita e a realização da ICQ não foi igual para todas as amostras, podendo este intervalo de tempo ir até dois anos de diferença. Este foi um fator não

controlado pelos autores e que pode interferir com os resultados obtidos. Apesar de alguns autores afirmarem que o PEG permite obter resultados confiáveis e reprodutíveis ao nível da ICQ, mesmo após 12 meses de arquivo,¹⁸ no presente estudo a amostragem foi até aos 24 meses após colheita.

Para estudos futuros sugere-se alargar a análise à deteção de outros antigénios, como o *Programmed Death Ligand 1* (PDL1), utilizado na primeira linha da seleção de terapêutica em neoplasias do pulmão. O estudo da preservação antigénica, para cada protocolo, relacionado com o tempo após colheita, também seria pertinente.

Deste estudo resulta a consolidação da recomendação do uso do CB para a realização de ICQ em citologia de neoplasias do pulmão, nomeadamente para pesquisa dos antigénios TTF1, p40 e cromogranina A. Quando o CB não está disponível, o uso de esfregaços em PEG e Pap são os protocolos que produzem melhores resultados; no entanto, é importante considerar que existe um decréscimo de qualidade da imunomarcação, com possibilidade de perda de intensidade e diminuição da sensibilidade. Esfregaços corados com MGG não foram adequados, neste estudo, para a realização de ICQ.

Referências bibliográficas

- Beraki E, Olsen TK, Sauer T. Establishing a protocol for immunocytochemical staining and chromogenic in situ hybridization of Giemsa and Diff-Quick prestained cytological smears. *Cytojournal*. 2012;9(8).
- Schmitt F, Cochand-Priollet B, Toetsch M, Davidson B, Bondi A, Vielh P. Immunocytochemistry in Europe: results of the European Federation of Cytology Societies (EFCS) inquiry. *Cytopathology*. 2011;22(4):238-42.
- Koss LG, Melamed MR. Epithelial lesions of the oral cavity, larynx, trachea, nasopharynx, and paranasal sinuses. In: Koss' diagnostic cytology and its histopathologic bases (Vol. I). 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2005. p. 714-37. ISBN 9780781719285
- Flens MJ, van der Valk P, Tadema TM, Huysmans AC, Risse EK, van Tol GA, et al. The contribution of immunocytochemistry in diagnostic cytology: comparison and evaluation with immunohistology. *Cancer*. 1990;65(12):2704-11.
- Fowler LJ, Lachar WA. Application of immunohistochemistry to cytology. *Arch Pathol Lab Med*. 2008;132(3):373-83.
- Pinheiro C, Roque R, Adriano A, Mendes P, Praça M, Reis I, et al. Optimization of immunocytochemistry in cytology: comparison of two protocols for fixation and preservation on cytospin and smear preparations. *Cytopathology*. 2015;26(1):38-43.
- Kirbis IS, Maxwell P, Fležar MS, Miller K, Ibrahim M. External quality control for immunocytochemistry on cytology samples: a review of UK NEQAS ICC (cytology module) results. *Cytopathology*. 2011;22(4):230-7.
- Skoog L, Tani E. Immunocytochemistry: an indispensable technique in routine cytology. *Cytopathology*. 2011;22(4):215-29.

9. Maxwell P, Salto-Tellez M. Validation of immunocytochemistry as a morphomolecular technique. *Cancer Cytopathol.* 2016;124(8):540-5.
10. Maxwell P, Patterson AH, Jamison J, Miller K, Anderson N. Use of alcohol fixed cytopins protected by 10% polyethylene glycol in immunocytology external quality assurance. *J Clin Pathol.* 1999;52(2):141-4.
11. Hudock JA, Hanau CA, Christen R, Bibbo M. Expression of estrogen and progesterone receptors in cytologic specimens using various fixatives. *Diagn Cytopathol.* 1996;15(1):78-83.
12. Krishnamurthy S, Dimashkieh H, Patel S, Sneige N. Immunocytochemical evaluation of estrogen receptor on archival Papanicolaou-stained fine-needle aspirate smears. *Diagn Cytopathol.* 2003;29(6):309-14.
13. Hammar S, Dacic S. Immunohistology of lung and pleural neoplasms. In: Dabbs DJ, editor. *Diagnostic immunohistochemistry: theranostic and genomic applications.* 4th ed. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2013. p. 286-478. ISBN 9781455744619
14. French C. Respiratory tract and mediastinum. In: Cibas ES, Ducatman BS, editors. *Cytology: diagnostic principles and clinical correlates.* 4th ed. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2014. p. 59-104. ISBN 9781455744626
15. Ferro AB. Immunohistochemistry results assessment: a scale based semiquantitative approach - The Global Immunohistochemistry Score (GIS). In: Delić K, editor. *An essential guide to immunohistochemistry: cell biology research progress.* Nova Science Publishers; 2019. p. 47-71.
16. Marôco J. *Análise estatística com o SPSS statistics.* 6^a ed. Pêro Pinheiro: Report Number; 2014. ISBN 9789899676343
17. DeLellis RA, Hoda RS. Immunohistochemistry and molecular biology in cytological diagnosis. In: Koss LG, Melamed MR, editors. *Koss' diagnostic cytology and its histopathologic bases (Vol. II).* 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2005. p. 1635-73. ISBN 9780781719285
18. Kirbis IS, Praça MJ, Roque RR, Košuta T, André S, Flezar MS. Preservation of biomarkers immunoreactivity on cytopins protected with polyethylene glycol. *Cytopathology.* 2020;32(1):84-91.

Conflito de interesses

Os autores declaram não possuir quaisquer conflitos de interesse.

Artigo recebido em 10.11.2020 e aprovado em 01.09.2021