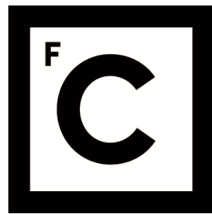


UNIVERSIDADE DE LISBOA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA ANIMAL



**Ciências**  
**ULisboa**

**Otimização e validação do método imunocitoquímico em lâminas previamente coradas com a coloração de May-Grünwald Giemsa em neoplasias do pulmão**

Ana Catarina Horta Maciel

**Mestrado em Biologia Humana e Ambiente**

Dissertação orientada por:  
Professor Doutor Francisco Pina Martins  
Professora Doutora Saudade André

## Agradecimentos

Em primeiro lugar gostaria de agradecer toda a paciência, esforço e dedicação dos meus orientadores, que foram sem dúvida um pilar para mim nesta etapa. Ao Professor Rúben Roque que foi incansável e ao qual agradeço imenso toda a ajuda que me deu. Ao Professor Francisco Pina-Martins que esteve sempre presente e me apoiou nos momentos mais difíceis e de maior dúvida. À Professora Saudade André por toda a sua dedicação e por toda a sua disponibilidade para me ajudar.

Não posso deixar de agradecer aos meus colegas e excelentes profissionais: à Teresa Pereira, ao João Matos, à Sónia Morgado, à Marta Mesquita, à Rita Fagulha, à Carla Pinheiro, à Vanessa Tavares. A todos o meu muito obrigada por toda a ajuda que me deram, por me terem facilitado em tantos dos meus pedidos e por me apoiarem incondicionalmente.

Aos meus pais, que foram o meu porto de abrigo em todos os momentos. Obrigada por me ensinarem a não desistir e continuar, mesmo quando as coisas não correm como gostaríamos. Amo-vos muito.

Gostaria ainda de agradecer à minha tia por todos os conselhos que me deu, por me ter ouvido nos momentos mais difíceis e por me ter apoiado durante esta jornada difícil e desafiante.

À minha Inês, que me ouviu todos os dias, que acompanhou de perto esta caminhada e que me ajudou a nunca desistir de terminar este árduo trabalho. Por fim, um muito obrigada a todos os meus amigos que tiveram muita paciência para mim e por toda a compreensão durante esta época.

Avô, espero que estejas orgulhoso de mim. Amo-te infinitamente.

## Resumo

**Introdução:** A citopatologia é uma área anatomopatológica utilizada para o diagnóstico de lesões benignas e malignas. A avaliação das amostras baseia-se nas características morfológicas celulares, coradas com colorações de rotina. A coloração de May-Grünwald Giemsa (MGG) é amplamente utilizada, através da coloração rápida para avaliação imediata das amostras para adequação de exames complementares a realizar. A análise morfológica das células nem sempre é suficiente para um diagnóstico definitivo, pelo que é necessária a aplicação de técnicas complementares como a imunocitoquímica (ICQ). Por vezes, as lâminas coradas com MGG podem ser únicas para a aplicação de ICQ. A aplicação desta técnica em amostras previamente coradas com MGG é descrita na literatura com resultados variáveis.

**Objetivos:** O presente estudo tem como objetivo a otimização e validação de protocolos ICQ em amostras citológicas coradas com MGG, para pesquisa dos antígenos citoqueratina AE1/AE3, antígeno leucocitário comum 45 (CD45) e fator de transcrição da tiroide (TTF-1). Também nos propomos avaliar a qualidade da técnica ICQ e calcular a sensibilidade e especificidade de cada soro.

**Materiais e métodos:** Utilizamos 30 amostras, 10 para cada soro e realizamos 3 protocolos: dois protocolos-padrão (citobloco e polietilenoglicol – PEG) e MGG. Posteriormente, efetuamos ICQ e para todas as lâminas foi avaliada a qualidade da técnica ICQ.

**Resultados:** Os protocolos otimizados para os soros CD45 e citoqueratina AE1/AE3 foram validados com valores de sensibilidade e especificidade de 100%. Por oposição, o protocolo relativo ao soro TTF-1 não foi validado, devido à sensibilidade ter sido de 40%. Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os protocolos citobloco e PEG para nenhum dos soros.

**Discussão e conclusão:** A prévia coloração por MGG não parece afetar a qualidade dos resultados ICQ para os soros CD45 e citoqueratina AE1/AE3, contrariamente ao soro TTF-1. Não encontramos falsos positivos, tendo sido estudada a positividade de todos os anticorpos estudados para diagnóstico definitivo.

**Palavras-Chave:** Citopatologia, May-Grünwald Giemsa, Imunocitoquímica.

## ***Abstract***

***Introduction:*** Cytopathology is an anatomopathological area of diagnosis, used to diagnose benign or malignant lesions. The evaluation of the samples is based on the morphological characteristics of the cells, stained with routine stains. May-Grünwald Giemsa (MGG) stain is widely used through rapid staining to evaluate samples to adequate complementary exams to realize. However, morphological analysis is not always sufficient for a complete diagnosis, so it is necessary to apply complementary techniques such as immunocytochemistry (ICC). In some cases, the MGG stained samples are unique to apply the ICQ technique. The application of this technique to samples previously stained with MGG is reported in the literature as possible, but with inconsistent results.

***Aims:*** The aim of this study is to optimize and validate the ICC protocols in cytological samples previously stained with MGG, to test for the antigens cytokeratin AE1/AE3, leukocyte common antigen 45 (CD45) and thyroid transcription factor (TTF-1). The quality of the ICC technique was also assessed, as was the calculation of the sensitivity and specificity of each serum.

***Materials and methods:*** We used 30 samples, 10 were used for each serum and 3 protocols were carried out: standard protocols (cellblock and polyethylene glycol - PEG) and MGG. ICC was subsequently applied, and the quality was evaluated for all the slides.

***Results:*** The optimized protocols for CD45 and cytokeratin AE1/AE3 serums were validated (sensitivity and specificity = 100%). In contrast, the optimized protocol for TTF-1 serum was not validated (sensitivity = 40%). It was not found statistical significant differences between cellblock and PEG protocols for every serums.

***Discussion and conclusion:*** It can be inferred that previous staining with MGG does not significantly affect the CD45 and cytokeratin AE1/AE3 immunocytochemical results. Although negatively affects the quality of TTF-1 immunocytochemical results. False positive cases were not found, and the positivity of studied antibodies was validated with definitive diagnosis.

***Keywords:*** May-Grünwald Giemsa, Immunocytochemistry, Cytopathology.

# Índice

1.	Introdução.....	1
2.	Contextualização Teórica .....	6
2.2.1.	Métodos imunocitoquímicos.....	8
2.2.2.	Fase pré-analítica: fatores interferentes .....	9
2.2.3.	Fase analítica: fatores interferentes .....	11
2.3.1.	CD45 (Antigénio leucocitário comum).....	12
2.3.2.	Pan-citoqueratina (clones AE1/AE3).....	13
2.3.3.	TTF-1.....	13
3.	Metodologia .....	14
3.5.1.	Desenho de estudo .....	15
3.5.2.	Fase I: Recolha e preparação de amostras citológicas.....	16
	Fase pré-analítica .....	16
3.5.3.	Fase II: Otimização de protocolos .....	23
3.5.4.	Fase III: Validação de protocolos e controlo de qualidade .....	30
4.	Resultados .....	32
4.1.1.	Avaliação da qualidade técnica.....	32
4.1.2.	Validação dos protocolos imunocitoquímicos – CD45.....	37
4.1.3.	Avaliação da sensibilidade e especificidade de diagnóstico – CD45.....	39
4.2.	TTF-1.....	40
4.2.1.	Avaliação da qualidade técnica – TTF-1.....	40
4.2.2.	Validação dos protocolos imunocitoquímicos – TTF-1.....	44
4.2.3.	Avaliação da sensibilidade e especificidade de diagnóstico – TTF-1.....	48
4.3.1.	Avaliação da qualidade técnica – Pan-citoqueratina AE1/AE3.....	49
4.3.2.	Validação dos protocolos imunocitoquímicos – Pan-citoqueratina AE1/AE3.....	53
4.3.3.	Avaliação da sensibilidade e especificidade de diagnóstico – Pan-citoqueratina AE1/AE3.....	57
5.	Discussão .....	58
6.	Conclusões.....	63
7.	Referências Bibliográficas .....	64
8.	Apêndices .....	70
8.1.1.	Cronograma das tarefas .....	70
8.1.2.	Orçamento do projeto.....	71
9.	Anexos .....	78

<b>9.7.1.</b>	<b>Análise Estatística Soro CD45.....</b>	<b>85</b>
<b>9.7.2.</b>	<b>Análise Estatística Soro TTF-1 .....</b>	<b>86</b>
<b>9.7.3.</b>	<b>Análise Estatística Soro Citoqueratina AE1/AE3 .....</b>	<b>87</b>

## Lista de Tabelas

<b>Tabela 3.1.</b> – Critérios de inclusão e exclusão do estudo .....	14
<b>Tabela 3.2.</b> – Classificação das variáveis em estudo .....	15
<b>Tabela 3.3.</b> – Tabela-resumo da comparação dos resultados entre protocolos .....	24
<b>Tabela 3.4.</b> – Protocolos imunocitoquímicos para otimização do soro TTF-1 .....	26
<b>Tabela 3.5.</b> – Tabela-resumo das amostras validadas .....	30
<b>Tabela 3.6.</b> – Grelha de avaliação utilizada para analisar os resultados da técnica ICQ .....	31
<b>Tabela 4.1.</b> – Distribuição das lâminas pertencentes ao soro CD45 por protocolo .....	32
<b>Tabela 4.2.</b> – Teste de <i>Shapiro-Wilk</i> para os três protocolos utilizados .....	36
<b>Tabela 4.3.</b> – Teste de <i>Wilcoxon</i> e aplicação de fator de correção FDR nos valores de <i>p-value</i> .....	37
<b>Tabela 4.4.</b> – Avaliação dos controlos positivos e negativos da lâmina e respetivo diagnóstico .....	39
<b>Tabela 4.5.</b> – Tabela de cálculo de sensibilidade e especificidade do soro CD45 .....	40
<b>Tabela 4.6.</b> – Distribuição das lâminas pertencentes ao soro TTF-1 por protocolo .....	40
<b>Tabela 4.7.</b> – Teste de <i>Shapiro-Wilk</i> para os três protocolos utilizados .....	44
<b>Tabela 4.8.</b> – Teste de <i>Wilcoxon</i> e aplicação de fator de correção nos valores de <i>p-value</i> .....	44
<b>Tabela 4.9.</b> – Avaliação da sensibilidade, especificidade e diagnóstico das lâminas .....	48
<b>Tabela 4.10.</b> – Tabela de cálculo de sensibilidade e especificidade do soro TTF-1 .....	49
<b>Tabela 4.11.</b> – Distribuição das lâminas pertencentes ao soro pan-citoqueratina AE1/AE3 por protocolo.....	48
<b>Tabela 4.12.</b> – Teste de <i>Shapiro-Wilk</i> para os três protocolos utilizados .....	53
<b>Tabela 4.13.</b> – Teste de <i>Wilcoxon</i> e aplicação de fator de correção nos valores de <i>p-value</i> .....	53
<b>Tabela 4.14.</b> – Avaliação da sensibilidade, especificidade e diagnóstico das lâminas .....	57
<b>Tabela 4.15.</b> – Tabela de cálculo de sensibilidade e especificidade do soro pan-citoqueratina AE1/AE3 .....	58
<b>Tabela 8.1.</b> – Cronograma das tarefas realizadas para o projeto de investigação .....	70
<b>Tabela 8.2.</b> – Orçamento do projeto .....	71
<b>Tabela 9.1.</b> – Protocolo do processamento histológico dos citoblocos .....	78
<b>Tabela 9.2.</b> – Protocolo da coloração Hematoxilina-Eosina .....	79
<b>Tabela 9.3.</b> – Protocolo da coloração MGG .....	79

## Lista de Figuras

<b>Figura 2.1.</b> – Amostra de líquido pleural corada com a coloração de MGG .....	7
<b>Figura 2.2.</b> – Esquema ilustrativo dos métodos imunocitoquímicos direto e indireto .....	8
<b>Figura 2.3.</b> – Esquema ilustrativo do kit de detecção <i>OptiView</i> DAB .....	8
<b>Figura 2.4.</b> – Fatores pré-analíticos possivelmente interferentes na preservação antigénica .....	9
<b>Figura 3.1.</b> – Fluxo de trabalho das amostras .....	16
<b>Figura 3.2.</b> –(A)Amostra citológica em contentor estéril.(B)Amostra citológica em saco de colheita ..	16
<b>Figura 3.3.</b> – Elaboração de uma lâmina por <i>cytospin</i> e colocação em citocentrífuga .....	17
<b>Figura 3.4.</b> – Coloração MGG BIO-DIFF Kit .....	17
<b>Figura 3.5.</b> – Amostra com escassa celularidade, corada com MGG rápida. (A): 40x; (B): 100x .....	18
<b>Figura 3.6.</b> – Amostra com elevada celularidade e preservação morfológica mantida. Amostra corada com coloração MGG rápida. (A): 40x. (B): 100x .....	18
<b>Figura 3.7.</b> – Distribuição das lâminas por amostra .....	19
<b>Figura 3.8.</b> – Protocolo-resumo de casa um dos tipos de <i>cytospins</i> .....	19
<b>Figura 3.9.</b> – Citobloco em cassete histológica .....	20
<b>Figura 3.10.</b> – Esquema-resumo das etapas da técnica histológica .....	20
<b>Figura 3.11.</b> – Centro de inclusão Leica TM 1150 .....	21
<b>Figura 3.12.</b> – Banho frio e banho-Maria .....	22
<b>Figura 4.13.</b> – Lâmina obtida por citobloco corada com a coloração H&E .....	22
<b>Figura 3.14.</b> – Método de preparação da lâmina MGG para ICQ .....	23
<b>Figura 3.15.</b> – Tabela-resumo da localização da imunomarcaçãõ de cada soro primário .....	23
<b>Figura 3.16.</b> – Otimização TTF-1 (Protocolo 1: Tempo de incubação de soro primário = 20') .....	26
<b>Figura 3.17.</b> – Otimização TTF-1 (Protocolo 2: Tempo de incubação de soro primário = 16') .....	27
<b>Figura 3.18.</b> – Otimização TTF-1 (Protocolo 3: RA = 8'; Hemat.= 4'; <i>Bluing</i> = 4') .....	27
<b>Figura 3.19.</b> – Otimização TTF-1 (Protocolo 4: RA = 20'; Hemat.= 4'; <i>Bluing</i> = 4') .....	27
<b>Figura 3.20.</b> – Otimização TTF-1 (Protocolo 5: RA = 20'; Hemat. = 8'; <i>Bluing</i> = 4') .....	29
<b>Figura 3.21.</b> – Otimização TTF-1 (Protocolo 6: RA = 36'; Hemat. = 8'; <i>Bluing</i> = 4') .....	29
<b>Figura 4.1.</b> – Preservação morfológica das lâminas pertencentes ao soro CD45 .....	33
<b>Figura 4.2.</b> – Intensidade de marcação das lâminas pertencentes ao soro CD45 .....	33
<b>Figura 4.3.</b> – Sensibilidade de marcação das lâminas pertencentes ao soro CD45, relativo à qualidade da técnica imunocitoquímica .....	34
<b>Figura 4.4.</b> – Especificidade de marcação das lâminas pertencentes ao soro CD45, relativo à qualidade da técnica imunocitoquímica .....	35
<b>Figura 4.5.</b> – Contraste das lâminas pertencentes ao soro CD45 .....	35

<b>Figura 4.6.</b> – Distribuição em caixa de cada um dos protocolos – soro CD45 .....	36
<b>Figura 4.7.</b> – Amostra 1: Líquido Pleural .....	38
<b>Figura 4.8.</b> – Amostra 2: Líquido Pleural .....	39
<b>Figura 4.9.</b> – Preservação morfológica das lâminas pertencentes ao soro TTF-1.....	41
<b>Figura 4.10.</b> – Intensidade de marcação das lâminas pertencentes ao soro TTF-1 .....	41
<b>Figura 4.11.</b> – Sensibilidade das lâminas pertencentes ao soro TTF-1, relativo à qualidade da técnica imunocitoquímica .....	42
<b>Figura 4.12.</b> – Especificidade das lâminas pertencentes ao soro TTF-1, relativo à qualidade da técnica imunocitoquímica .....	42
<b>Figura 4.13.</b> – Contraste das lâminas pertencentes ao soro TTF-1 .....	43
<b>Figura 4.14.</b> – Distribuição em caixa de cada um dos protocolos - Soro TTF-1 .....	43
<b>Figura 4.15.</b> – Amostra 1: Lâmina citobloco (Pontuação = 26) .....	45
<b>Figura 4.16.</b> – Amostra 1: Lâmina PEG (Pontuação = 26) .....	45
<b>Figura 4.17.</b> – Amostra 1: Lâmina MGG (Pontuação = 14) .....	46
<b>Figura 4.18.</b> – Amostra 2: Lâmina citobloco (Pontuação = 26) .....	47
<b>Figura 4.19.</b> – Amostra 2: Lâmina PEG (Pontuação = 27) .....	47
<b>Figura 4.20.</b> – Amostra 2: Lâmina MGG (Pontuação = 20) .....	48
<b>Figura 4.21.</b> – Preservação morfológica das lâminas pertencentes ao soro pan-citoqueratina AE1/AE3 .....	50
<b>Figura 4.22.</b> – Intensidade de marcação das lâminas pertencentes ao soro pan-citoqueratina AE1/AE3 .....	50
<b>Figura 4.23.</b> – Sensibilidade das lâminas pertencentes ao soro pan-citoqueratina AE1/AE3, relativo à qualidade da técnica imunocitoquímica .....	51
<b>Figura 4.24.</b> – Especificidade das lâminas pertencentes ao soro pan-citoqueratina AE1/AE3, relativo à qualidade da técnica imunocitoquímica .....	51
<b>Figura 4.25.</b> – Contraste das lâminas pertencentes ao soro pan-citoqueratina AE1/AE3 .....	52
<b>Figura 4.26.</b> – Distribuição em caixa de cada um dos protocolos – soro pan-citoqueratina AE1/AE3 .....	<b>52</b>
<b>Figura 4.27.</b> – Amostra 1: Lâmina Citobloco (Pontuação = 27) .....	54
<b>Figura 4.28.</b> – Amostra 1: Lâmina PEG (Pontuação = 25) .....	54
<b>Figura 4.29.</b> – Amostra 1: Lâmina MGG (Pontuação = 24) .....	55
<b>Figura 4.30.</b> – Amostra 2: Lâmina Citobloco (Pontuação = 26) .....	56
<b>Figura 4.31.</b> – Amostra 2: Lâmina PEG (Pontuação = 25) .....	56
<b>Figura 4.32.</b> – Amostra 2: Lâmina MGG (Pontuação = 21) .....	57
<b>Figura 8.1.</b> – HistoGel .....	71

<b>Figura 8.2.</b> – Cesto de cassetes para processamento histológico .....	72
<b>Figura 8.3.</b> – Processador Leica <sup>TM</sup> PELORIS 3 .....	72
<b>Figura 8.4.</b> – Reagentes do processamento histológico - Processador Leica <sup>TM</sup> PELORIS 3 .....	73
<b>Figura 8.5.</b> – Etapas da inclusão de um citobloco .....	73
<b>Figura 8.6.</b> – Bloco de parafina .....	74
<b>Figura 8.7.</b> – Micrótomo de corredeira LEICA SM 2000R .....	74
<b>Figura 8.8.</b> – Micrótomo de <i>Minot</i> LEICA RM 2255 .....	75
<b>Figura 8.9.</b> – Placa fria .....	75
<b>Figura 8.10.</b> – Realização de um corte histológico .....	76
<b>Figura 8.11.</b> – Colorador Sakura Tissue-Tek Prisma 6130 .....	76
<b>Figura 8.12.</b> – Ventana Benchmark .....	77
<b>Figura 9.1.</b> – Protocolo ICQ do soro primário CD45 para lâminas PEG .....	80
<b>Figura 9.2.</b> – Protocolo ICQ do soro primário CD45 para lâminas MGG .....	80
<b>Figura 9.3.</b> – Protocolo ICQ do soro primário CD45 para lâminas realizadas a partir de citobloco ....	81
<b>Figura 9.4.</b> – Protocolo ICQ do soro TTF-1 para lâminas PEG .....	82
<b>Figura 9.5.</b> – Protocolo ICQ do soro primário TTF-1 para lâminas MGG .....	82
<b>Figura 9.6.</b> – Protocolo ICQ do soro primário TTF-1 para lâminas realizadas a partir de citobloco ....	83
<b>Figura 9.7.</b> – Protocolo ICQ do soro primário pan-citoqueratina AE1/AE3 para lâminas PEG .....	84
<b>Figura 9.8.</b> – Protocolo ICQ do soro primário pan-citoqueratina AE1/AE3 .....	83
<b>Figura 9.9.</b> – Protocolo ICQ do citobloco para o soro primário pan-citoqueratina AE1/AE3 .....	85

## Lista de Abreviaturas

μL	Micrómetro
μm	Microlitro
ADC	Adenocarcinoma
CAAF	Citologia aspirativa por agulha fina
CAP	Colégio Americano de Patologistas
CD3	<i>Cluster of differentiation</i>
CD45	Antígeno leucocitário comum 45
CPC	Carcinoma pavimentocelular
DAB	3,3' – diaminobenzidina
FCoV	Coronavírus felino
FDR	Razão de falsos positivos
g	Força g
GFAP	Proteína fibrilar ácida glia
H&E	Hematoxilina e Eosina
H2O2	Peróxido de hidrogénio
Hemat.	Hematoxilina
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>
IARC	<i>International Agency for Research on Cancer</i>
ICQ	Imunocitoquímica
IHQ	Imunohistoquímica
IPOLFG	Instituto Português de Oncologia de Lisboa Francisco Gentil
LCR	Líquido cefalorraquidiano
LMA	Leucemia mieloide aguda
MGG	May-Grünwald Giemsa
MHCII	Complexo de histocompatibilidade <i>major</i> II
mL	Mililitro
MNF-116	Pan-citoqueratina MNF-116
MUM-1	Mieloma múltiplo 1
NeuN	Antígeno nuclear neural
°C	Graus Celsius
OMS	Organização Mundial de Saúde
PAP	Papanicolaou

PAX-5	<i>Paired box transcription factors</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PEG	Polietilenoglicol
RE	Recetores de estrogénios
ROSE	<i>Rapid on site evaluation</i>
TE	Tris-EDTA
TTF-1	Fator de transcrição da tiroide
W	Watt



# 1. Introdução

A Citologia, também designada Citopatologia é uma área da Anatomia Patológica que tem como objetivo o diagnóstico em células, aspiradas com agulha fina ou esfoliadas. Foi implementada e, posteriormente reconhecida, em meados dos séculos XVIII e XIX. No entanto, a padronização do método apenas foi verificada no final do século XX (Al-Abadi, 2011). Na contribuição para o desenvolvimento da Citopatologia ao longo dos anos, podem destacar-se algumas personalidades com impacto significativo. Provavelmente a maior referência é George Papanicolaou (1883-1962) (Kamal, 2022; Koss, 2006). A sua contribuição para a Citopatologia incluiu o reconhecimento da importância da fixação, o desenvolvimento de uma coloração específica (a coloração de Papanicolaou) e a sistematização de exemplos de células normais e neoplásicas obtidas através de esfregaços cérvico-vaginais (Kamal, 2022).

Atualmente, a Citologia/ Citopatologia, pelo facto de ser uma ciência com métodos padronizados, é utilizada para o diagnóstico de lesões benignas ou malignas de diversas etiologias e origens anatómicas, através da realização de exames de diagnóstico citológico (Al-Abadi, 2011; Santos et al., 2022). Destacam-se dois métodos de colheita de amostras maioritariamente utilizados a citologia aspirativa por agulha fina (CAAF) e citologia esfoliativa (Al-Abadi, 2011; Deepthi et al., 2022).

A citologia esfoliativa consiste num procedimento simples no qual, através de métodos como a esfoliação ou raspagem, são libertadas células de superfícies corporais (Leonardo & Bardales, 2020). Neste tipo de citologia podem destacar-se amostras provenientes de diversas origens anatómicas, como líquidos pleurais, peritoneais e líquidos cefalorraquidianos (LCR) (Al-Abadi, 2011; Koss, 2006).

Por outro lado, a CAAF consiste num procedimento médico, que recorre a uma agulha de calibre reduzido. É minimamente invasivo e de baixo custo (Deepthi et al., 2022). Através desta metodologia é possível uma avaliação precoce de benignidade ou malignidade pré-terapêutica (Taniuchi et al., 2022). A CAAF pode ser direta em lesões superficiais palpáveis ou guiada por métodos imagiológicos.

Para realizar uma avaliação imediata da amostra após a colheita, torna-se necessário recorrer a uma coloração rápida (de aproximadamente 30 segundos) para a análise em microscópio ótico das células presentes. A coloração tem como principal objetivo permitir a avaliação da composição celular das amostras, sendo a coloração de May-Grünwald Giemsa (MGG) a mais utilizada nesta avaliação (Deepthi et al., 2022).

Na maioria dos laboratórios de Citopatologia são utilizadas essencialmente duas colorações de rotina: a coloração de Papanicolaou (PAP) e a coloração de May-Grünwald Giemsa (MGG) (Dey, 2018). Estas colorações, por serem complementares, são utilizadas em conjunto (Krafts & Pambuccian, 2011). A diferença principal na utilização destas colorações é o tipo de fixação das amostras. As amostras coradas com PAP são fixadas em soluções alcoólicas (fixação química), enquanto as coradas com MGG fixam por secagem ao ar (fixação física) (Krafts & Pambuccian, 2011).

Frequentemente, é exigido um diagnóstico diferencial para caracterização das lesões e orientação terapêutica, sendo necessária a aplicação de técnicas complementares de diagnóstico como a imunocitoquímica (ICQ). Por diversas circunstâncias, nomeadamente a escassez da amostra obtida, a presença de lâminas coradas com MGG é a única amostra possível para diagnóstico, pelo que se torna imprescindível a aplicação da ICQ nessas lâminas.

A ICQ é uma ferramenta forte e sensível, indispensável para o diagnóstico e terapêutica de neoplasias, sendo que a sua aplicação requer níveis elevados de conhecimento teórico e de prática laboratorial (Tuffaha et al., 2018). Para a ICQ são utilizados anticorpos, também denominados soros

primários, como reagentes específicos, capazes de identificar os antígenos de interesse (Borges Ferro, 2014).

## 1.1. Estado da arte

Diversos estudos, como os que se encontram descritos abaixo, têm descrito que a aplicação de técnicas complementares como a ICQ em lâminas previamente coradas com MGG apresentam resultados inconsistentes.

Em 2000, foi realizado um estudo em que foi avaliado o efeito do tipo de fixação na imunomarcção do soro primário citoqueratina AE1/AE3 (Shidham et al., 2000). Foram utilizadas 20 amostras de diversas origens anatómicas para realizar 2 blocos de parafina (amostras histológicas, utilizadas como padrão) e 14 amostras citológicas obtidas por raspagem (*imprint*). Das 14 amostras citológicas, 12 foram submetidas a fixação física (secagem ao ar) e as 2 restantes a fixação química (etanol 95%). Das 12 amostras sujeitas a fixação física, 6 foram reidratadas com diferentes soluções salinas e as restantes 6 não foram submetidas a esse processo. Deste modo, para além de ter sido avaliado o efeito da fixação na imunomarcção, foi ainda analisado o efeito da etapa de reidratação nas amostras sujeitas à secagem ao ar. Para a análise estatística foi analisada a proporção e intensidade de marcação, e, posteriormente comparadas as médias de cada um dos grupos em estudo. Foi realizado um *score* total para cada um dos grupos, de modo a comparar os dois parâmetros em conjunto entre grupos. Obtiveram um *score* mais elevado, as amostras fixadas por secagem ao ar e posteriormente hidratadas com formalina alcoólica (com 3.75 pontos, de um total máximo de 8 pontos). A análise da morfologia celular mostrou melhor preservação nas amostras secas ao ar, comparativamente às fixadas em etanol 95%.

Relativamente aos tipos de fixador, foi elaborado em 2004, um estudo comparativo entre quatro fixadores diferentes para compreender a influência de cada um deles na imunomarcção, utilizando o soro primário RE (Gong et al., 2004). Foram obtidos esfregaços por raspagem de amostras de origem mamária ( $N = 47$ ) que foram submetidos a quatro fixadores, sendo eles: método *Abbott* (sequência de fixadores: formol 10%, metanol e acetona; temperatura de  $- 20^{\circ}\text{C}$ ); formol 10% (temperatura ambiente); fixador Carnoy; secagem ao ar precedida do método *Abbott*. Como amostra-padrão foi utilizado um bloco de parafina para cada uma das amostras, de cada um dos fixadores. O soro primário RE é utilizado regularmente para determinar se um determinado carcinoma da mama tem ou não indicação terapêutica com bloqueadores dos recetores de estrogénios. Além de preditivo da terapêutica tem também valor prognóstico. Foi obtida expressão de RE em 36 (76.6%) das 47 amostras, tendo sido eleito como melhor fixador o método *Abbott*, que apresentou maior percentagem de concordância entre ICQ e IHQ. A especificidade deste soro foi de 100% em todos os fixadores utilizados, no entanto, a sensibilidade diferiu entre fixadores: método *Abbott* (88.9%); secagem ao ar precedida do método *Abbott* (79.4%); formol 10% (9.1%); fixador Carnoy (7.7%). Mais uma vez, torna-se possível concluir que o tipo de fixador pode ser um fator interferente na imunomarcção.

Como referido, a coloração MGG também se insere no grupo de fatores interferentes na imunomarcção, sendo esta um dos pontos fulcrais e com mais ambiguidade na área da Citologia e ICQ. Na literatura são escassos os artigos que abordam as possíveis causas para a inconsistência de resultados ICQ aquando de uma coloração prévia por MGG, no entanto os que se encontram disponíveis permitem retirar algumas conclusões importantes.

No estudo realizado em 2008 foram analisadas as diferenças entre resultados imunocitoquímicos utilizando diferentes tipos de fixação (Fulciniti et al., 2008). Para cada amostra ( $N = 144$ ), foram utilizadas três lâminas, sendo que duas delas foram fixadas fisicamente e a restante fixada quimicamente (através de fixação alcoólica). Foi utilizado um vasto painel de imunomarcadores

(nucleares, citoplasmáticos e membranares), de modo a compreender se uma determinada classe poderia ser mais, ou menos afetada pela fixação, relativamente aos resultados ICQ. Torna-se relevante referir que as lâminas submetidas a ICQ não foram previamente coradas com MGG e que, os resultados obtidos foram concordantes entre as duas metodologias de fixação. Conclui-se assim que sem a coloração prévia por MGG, o tipo de fixação não constitui um fator interferente na imunomarcação.

Em 2022, foi realizado um estudo retrospectivo no qual foram comparados os resultados imunocitoquímicos de quatro protocolos utilizados num laboratório de Citologia: citobloco, PEG, PAP e MGG (Santos et al., 2022). As amostras ( $N=24$ ) foram selecionadas e reuniu-se um total de 96 lâminas para análise. De cada amostra constava pelo menos uma lâmina corada com PAP, uma lâmina corada com MGG, uma lâmina preservada em PEG e um citobloco. Uma das limitações deste estudo incidiu no intervalo de tempo entre a realização da coloração e a aplicação da técnica ICQ, visto que as amostras corresponderam a uma janela temporal entre janeiro de 2016 e janeiro de 2018. A comparação dos protocolos teve por base uma grelha de avaliação da qualidade técnica ponderada, em que foi atribuído um *score* final a cada um dos protocolos. Foram realizados testes estatísticos para verificar a presença ou ausência de diferenças estatisticamente significativas entre os quatro protocolos em estudo.

Foram utilizados os seguintes soros primários: TTF-1, cromogranina A (marcador de diferenciação neuroendócrina) e p40 (utilizado para avaliar a diferenciação pavimentosa em carcinomas). O protocolo com maior valor de *score* final (determinado em 27 pontos) foi o citobloco (26.31), seguido do PEG (22.25), PAP (21.58) e, por fim MGG (11.79). Foram também comparados os protocolos em par, de modo a perceber entre que conjunto de protocolos existiria diferenças estatisticamente significativas. O único par de protocolos em que não foram verificadas diferenças foi o PAP e PEG ( $p\text{-value} = 0.814$ ). Quanto ao protocolo MGG, foi obtida uma média nula para a sensibilidade e o menor *score* para o parâmetro “intensidade de marcação”. Através deste estudo é possível inferir que a coloração MGG interfere negativamente na qualidade da ICQ, isto é, condicionando por vezes a interpretação correta dos resultados ICQ. No entanto, existem alguns autores que reportam resultados diferentes em relação à coloração com MGG.

Na área da veterinária, em 2019, foi elaborado um estudo com intuito de compreender quais os efeitos das etapas da fase pré-analítica das amostras na imunomarcação (Dörfelt et al., 2019). As amostras foram submetidas a diferentes protocolos, com a presença e/ou ausência de determinadas etapas, de modo a compreender o possível impacto destas na imunomarcação. Algumas das etapas em análise foram a coloração, descoloração e a remoção da lamela. Para cada amostra foi realizada uma lâmina corada com a coloração de Wright para a avaliação da morfologia das células. Foram utilizadas amostras veterinárias provenientes de tecido cerebral e linfóide de gato e porco, respetivamente. O estudo foi dividido em dois sub-estudos (A e B), sendo que o A analisou antígenos celulares e, o B analisou antígenos virais, nomeadamente, o coronavírus felino (FCoV). Os soros primários utilizados no sub-estudo A foram o *cluster of differentiation* (CD3), a proteína fibrilar ácida glia (GFAP) e o antígeno nuclear neural (NeuN). Os resultados obtidos no sub-estudo A demonstraram que a aplicação da coloração MGG não afetava a imunomarcação.

Também na vertente da veterinária, também em 2019, foi realizado um estudo em que foi comparada a qualidade imunocitoquímica de amostras coradas com colorações Romanowsky e amostras não coradas (Raskin et al., 2019). Para além desta comparação, os autores tinham ainda como objetivo otimizar os protocolos imunocitoquímicos para amostras coradas com colorações Romanowsky para os seguintes soros primários: CD3, CD20, *5 paired box transcription factors* (PAX-5), complexo de histocompatibilidade *major* II (MHCII), mieloma múltiplo 1 (MUM-1), lisozima, vimentina, citoqueratina e MELAN-A e, foram utilizadas amostras provenientes de tecido linfóide e de tecido não-linfóide. Foi verificada uma semelhança relativamente à imunomarcação que membranas, quer

citoplasmática entre as lâminas coradas e as lâminas não coradas, no entanto as lâminas sem coloração apresentaram uma intensidade mais elevada que as lâminas coradas. Relativamente à otimização dos protocolos, esta passou por alterações na diluição de cada um dos soros primários utilizados. Neste estudo concluiu-se que a presença de coloração interfere na imunomarcação sendo os parâmetros “intensidade de marcação” e, conseqüentemente, “sensibilidade” mais afetados. Apesar disso, os autores mencionam que as colorações Romanowsky podem ser utilizadas para a aplicação de ICQ com sucesso para o diagnóstico.

Em 2022, foi realizado outro estudo com o objetivo de avaliar a utilização de esfregaços sujeitos a secagem ao ar, aplicação de MGG e posterior aplicação de ICQ (Kushwaha et al., 2022). Foi criado um protocolo alternativo que englobava a descoloração das lâminas e posterior hidratação em solução salina. De modo a comparar a viabilidade deste protocolo foi feita uma comparação com o método de rotina (fixação química em metanol, aplicação da coloração e posterior ICQ). Foram estudados 40 casos, 25 (62.5%) de lesões da mama e os restantes 15 (37.5%) de hiperplasia linfóide reativa. Os soros primários testados foram o CD45 (para os casos de hiperplasia linfóide) e pan-citoqueratina (para os casos de lesões da mama). As lâminas foram observadas por dois patologistas e foi determinado o resultado global de cada uma. Posteriormente, cada esfregaço foi classificado de modo semi-quantitativo relativamente aos parâmetros intensidade, localização e uniformidade de marcação, contraste e presença de fundo. Foram aplicados testes estatísticos de forma a compreender a existência de diferenças estatisticamente significativas entre o protocolo de rotina e o protocolo proposto. Num total de 25 casos verificaram-se resultados imunocitoquímicos positivos para o soro pan-citoqueratina, tanto em lâminas fixadas fisicamente como quimicamente. Das lâminas secas ao ar, 76% apresentaram imunomarcação e 24% não. Das lâminas sujeitas a fixação química, 80% foram positivas e 20% negativas. Relativamente ao soro CD45, 100% das lâminas fixadas quimicamente foram positivas e, das lâminas secas ao ar somente 86% apresentaram imunomarcação. Os autores mencionaram que poderão existir, de facto, parâmetros da qualidade técnica ICQ que são afetados pelo tratamento pré-analítico. Um dos tópicos mencionados incide no facto das amostras estarem em contacto com o metanol, o que poderá eventualmente alterar a configuração do epítipo e, conseqüentemente afetar a deteção do mesmo. É de notar que os resultados obtidos foram ligeiramente melhores no soro CD45 relativamente à pan-citoqueratina e que os resultados do soro CD45 não diferiram nos dois tipos de fixação.

Neste seguimento, torna-se necessária a investigação deste tópico, de extrema importância para o diagnóstico e orientação terapêutica dos pacientes em que só existem amostras previamente coradas com MGG.

## **1.2. Questões da investigação**

- Será possível otimizar um protocolo imunocitoquímico para amostras citológicas previamente coradas com a coloração May-Grünwald Giemsa, para os anticorpos antigénio leucocitário comum 45 (CD45), fator de transcrição da tiroide (TTF-1) e citoqueratina AE1/AE3?
- Será possível validar os protocolos otimizados segundo as normas estabelecidas pelo Colégio Americano de Patologistas (CAP)?
- Quais serão os parâmetros mais afetados pela presença de coloração May-Grünwald Giemsa na qualidade da ICQ?

- A sensibilidade dos soros primários CD45, TTF-1 e citoqueratina AE1/AE3, em amostras citológicas, é afetada pela prévia coloração com MGG?

### **1.3. Objetivos**

A aplicação da técnica de imunocitoquímica em amostras previamente coradas com a coloração MGG é uma das ferramentas preponderantes no diagnóstico e prognóstico de amostras citológicas.

O principal objetivo da presente investigação incidiu na otimização e validação do protocolo imunocitoquímico para a detecção dos antígenos CD45, TTF-1 e citoqueratina AE1/AE3, em amostras de neoplasias do pulmão e de derrames de cavidades serosas (pleurais e peritoneais), coradas com coloração de May-Grünwald Giemsa. Para tal, foi necessário:

- Otimizar um protocolo imunocitoquímico que permita resultados exatos e precisos em amostras citológicas coradas com a coloração May-Grünwald Giemsa.
- Validar a técnica otimizada em amostras citológicas, com ênfase em amostras de carcinoma do pulmão.
- Avaliar se a coloração May-Grünwald Giemsa influencia a imunomarcagem consoante a sua localização celular (nuclear, citoplasmática ou membranar).
- Avaliar a qualidade da técnica imunocitoquímica em cada uma das lâminas realizadas e comparar os resultados entre os protocolos utilizados: com coloração May-Grünwald Giemsa, com fixação em PEG e em citobloco.

## 2. Contextualização Teórica

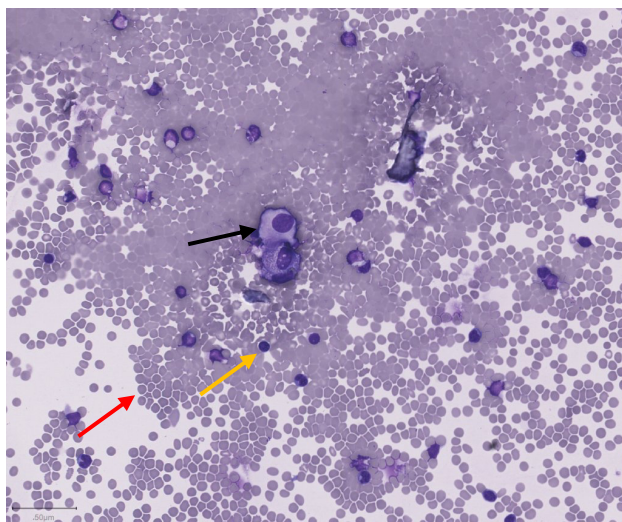
### 2.1. Coloração May-Grünwald Giemsa

A coloração MGG (**Figura 2.1**) tem-se tornado numa das colorações mais utilizadas na rotina de um Laboratório de Citologia. É particularmente utilizada para a avaliação de amostras provenientes de citologias aspirativas submetidas a uma fixação física (Deepthi et al., 2022; Piaton et al., 2016). É classificada como uma coloração neutra, por ser composta por um corante ácido e um corante básico (Dey, 2018; E. Boon & S. Drijver, 1986). O azure B é um corante ácido (catiônico) obtido através da desmetilação oxidativa do azul de metileno (Lew, 2012), encontrando-se presente no corante May-Grünwald. A eosina Y é um corante básico (aniônico) de cor rosada, composto por aniões móveis que se movem em solução para neutralizar os catiões fixos nas proteínas, encontrando-se presente no corante Giemsa (R. W. Horobin & Walter, 1987). A eosina Y cora as estruturas acidofílicas enquanto o corante azure B cora as estruturas basofílicas (R. W. Horobin & Walter, 1987).

A coloração MGG pertence a um conhecido e vasto grupo de colorações, o grupo de colorações Romanowsky em que se incluem as colorações de Leishmann, Giemsa e Wright (R. W. Horobin & Walter, 1987). O principal fator em comum das colorações do grupo Romanowsky é a policromasia das mesmas, isto é, a capacidade de corar estruturas com diferentes graus de intensidade (Bezrukov, 2017; R. W. Horobin & Walter, 1987). A esta característica dá-se o nome de efeito Romanowsky (Bezrukov, 2017), que por ocorrer um fenómeno de metacromasia, origina a cor roxa (Jörundsson et al., 1999).

Este efeito não é bem conhecido (Jörundsson et al., 1999) e existem várias teorias relativamente ao mecanismo que conduz à formação da cor roxa. Em 1983, Wittekind mencionou que o efeito Romanowsky não ocorreria sem ser na presença de dois corantes em simultâneo – azure B e eosina Y. O autor menciona ainda que a ocorrência do efeito Romanowsky depende fortemente de fatores externos à coloração, como o pré-tratamento a que a amostra foi submetida, nomeadamente o tipo de fixação (Wittekind, 1983).

Mais tarde, em 1987, avaliaram o efeito da coloração em esfregaços sanguíneos (R. W. Horobin & Walter, 1987) e, consideraram que não seria a presença de cor roxa que necessitava de explicação, mas sim a presença das cores azul e vermelho. Foram avaliados fatores como tempo e temperatura de coloração, composição do solvente, pH e concentração dos corantes, assim como o tipo de fixação. Os autores concluíram que variações nestes fatores conduziam a alterações na qualidade da coloração. Relativamente à formação de cor roxa – efeito Romanowsky – os autores mencionam que todas as estruturas celulares acabam por ficar coradas de roxo quando submetidas a maiores tempos de coloração. Neste estudo as amostras foram submetidas a tempos de coloração entre 30 segundos e 28 horas e verificou-se que todas as estruturas ficaram coradas de roxo nas amostras submetidas ao protocolo de 28 horas. A presença de precipitado nas lâminas poderá dever-se à concentração demasiado elevada do tampão ou, a uma temperatura elevada durante a coloração. Constataram ainda que os eritrócitos apresentavam basofilia em situações de pH mais elevado e, contrariamente, eosinofilia em situações de pH mais baixo.



**Figura 2.1.** - Amostra de líquido pleural corada com a coloração de MGG. **Legenda:** Seta preta (Célula mesotelial); Seta vermelha (Eritrócitos); Seta amarela (Linfócito) (Imagem da autora).

Uma das vantagens mais consideráveis da coloração MGG é o facto de ser indispensável na realização de exames extemporâneos (ROSE – *Rapid on site evaluation*), isto é, exames em que são recolhidas amostras do paciente e observadas microscopicamente no momento pelo citologista e/ou citotécnico (Wang et al., 2019). Desta forma é avaliada a qualidade e quantidade da amostra permitindo calcular se é ou não necessário colher maior quantidade de material e, é possível direcionar a amostra para os meios complementares indicados para o diagnóstico. Nestas situações é utilizada a coloração MGG rápida (por ser realizada em aproximadamente 30 segundos) (Krafts & Pambuccian, 2011). A utilização do ROSE é essencial para diminuir a existência de amostras insatisfatórias, por a avaliação da amostra ser realizada no momento da colheita (Krafts & Pambuccian, 2011). No entanto, se houver limitações na quantidade da amostra obtida e o diagnóstico se cingir somente às lâminas avaliadas em MGG, a realização de técnicas complementares como a ICQ, caso necessária, tem de ser aplicada nessas lâminas.

Por outro lado, a coloração MGG apresenta algumas limitações, nomeadamente a instabilidade e a ausência de padronização (Krafts & Pambuccian, 2011; Piaton et al., 2016). Vários autores assumem dificuldades em padronizar esta coloração devido a poder ser influenciada por inúmeros fatores. Uma das causas inerentes à instabilidade desta coloração é a presença de precipitado, que pode ser minimizada através de algumas condições, como a baixa concentração dos corantes, temperatura de coloração mais baixa e intervalos de tempo mais curtos entre a secagem ao ar e a coloração (R. Horobin, 2011). A coloração MGG apresenta ainda como desvantagens a presença de fundo, fator esse que poderá condicionar para a interpretação das células existentes na amostra, assim como a necessidade de troca e preparação de reagentes semanalmente (Belgaumi & Shetty, 2013).

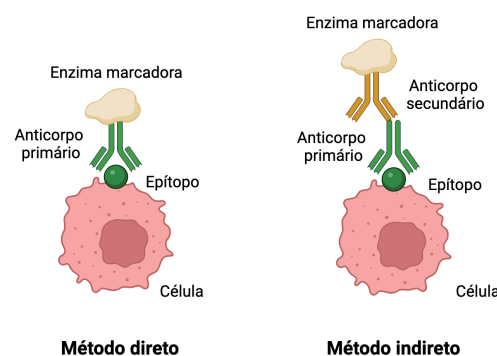
## 2.2. Imunocitoquímica

A ICQ utilizada em Citologia (Jain et al., 2019) inclui um conjunto de metodologias em que o principal objetivo incide na localização de um determinado epítipo de interesse (Borges Ferro, 2014). Esta técnica, quando aplicada em amostras histológicas é denominada por imunohistoquímica (IHQ).

### 2.2.1. Métodos imunocitoquímicos

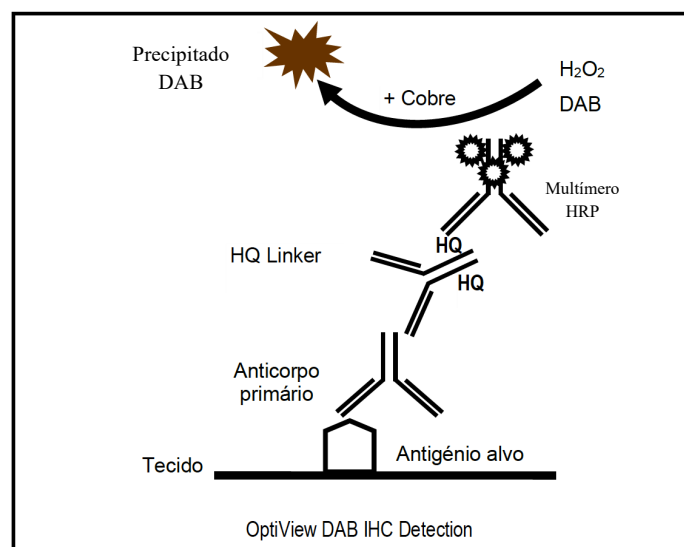
Os métodos imunocitoquímicos envolvem a interação entre um anticorpo e um antígeno (Borges Ferro, 2014). Um anticorpo é uma proteína que não possui cor própria, logo, para garantir que ocorreu a ligação com um antígeno torna-se necessário recorrer a algum tipo de detecção para que este possa ser visualizado (Borges Ferro, 2014). Assim, existem métodos que envolvem cor, fluorescência, entre outros (Borges Ferro, 2014).

Existem, essencialmente, dois métodos de detecção, o método direto e o método indireto (**Figura 2.2**). No método direto é utilizado apenas um anticorpo primário que se encontra acoplado à enzima marcadora, ou seja, existe uma ligação direta entre o antígeno e o anticorpo. Relativamente ao método indireto, são utilizados dois tipos de anticorpos (anticorpos primário e secundário), os anticorpos primários que estão em contacto direto com o antígeno e os secundários (acoplados ao marcador) que se encontram ligados aos anticorpos primários.



**Figura 2.2.** - Esquema ilustrativo dos métodos imunocitoquímicos direto e indireto. Adaptado de (Borges Ferro, 2014).

O método do micropolímero de enzimas (**Figura 2.3**) inclui-se nos métodos imunocitoquímicos indiretos e deteta anticorpos primários específicos de rato e coelho. Estes anticorpos encontram-se ligados a um antígeno em secções de tecido fixado em formol ou, por outro lado, amostras citológicas fixadas em metanol (Roche, 2020). A detecção do antígeno ocorre através de uma reação cromogénica visível através de microscopia ótica, em que a presença de cor castanha ocorre devido à precipitação de um produto enzimático (Roche, 2020).



**Figura 2.3.** - Esquema ilustrativo do kit de detecção *OptiView DAB* (Roche, 2020).

O antígeno alvo é detetado pelo anticorpo primário, que se liga ao antígeno originando uma ligação antígeno-anticorpo. O anticorpo primário é detetado por um anticorpo secundário específico, que se encontra acoplado a um anticorpo terciário marcado com enzimas *horseradish peroxidase* (HRP) (Roche, 2020). É através destas enzimas que ocorre a reação de precipitação, isto é, o peróxido de hidrogénio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) ao reagir com o cromogénio tetra-hidroclorato de 3,3' – diaminobenzidina (DAB) produz um precipitado de cor castanha, que é observado microscopicamente (Roche, 2020). A presença da cor castanha permite inferir a presença do antígeno alvo no tecido ou amostra citológica em estudo.

Esta técnica torna-se imprescindível, por permitir confirmar uma suspeita de diagnóstico, determinar a natureza primária ou secundária da lesão, o grau de diferenciação, prognóstico e, inclusive a proposta terapêutica a aplicar (Kanber et al., 2021; Moreau et al., 1998). Num estudo que avalia a utilidade da ICQ no diagnóstico citopatológico, numa série de casos de difícil diagnóstico, esta é considerada útil em 76% dos casos (Shield et al., 1996). Através desta técnica complementar torna-se possível a determinação do estado de biomarcadores de interesse, com impacto no diagnóstico e terapêutica do doente.

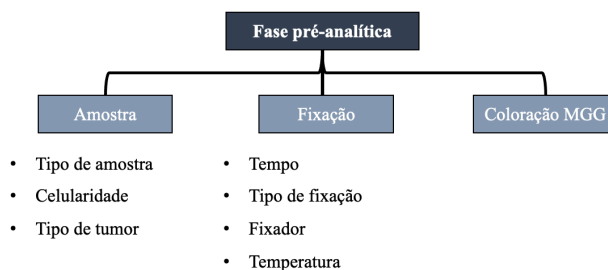
Ao contrário do que acontece com a Histopatologia, não existem protocolos técnicos consensuais sobre a aplicação de ICQ em amostras citológicas (Roy-Chowdhuri, 2020). Isto, em muito se deve à vasta quantidade de métodos de citopreparação e tipos de fixação a que as amostras são sujeitas (Kirbis et al., 2011). É sabido que esta variedade afeta a qualidade dos resultados imunocitoquímicos, ainda que este tópico não seja totalmente explorado e, devidamente investigado (Kirbis et al., 2011). A eficácia e consistência de resultados imunocitoquímicos podem ser condicionadas por inúmeros fatores pré-analíticos, analíticos e, inclusive pós-analíticos (Jain et al., 2019).

Assim, a ausência de protocolos padronizados para a aplicação de ICQ nestas amostras, constitui um dos principais desafios desta área de investigação (Kanber et al., 2021).

### 2.2.2. Fase pré-analítica: fatores interferentes

A fase pré-analítica, relativamente à execução do método imunocitoquímico, engloba todas as etapas a que a amostra é submetida, desde o seu processamento até à aplicação da coloração MGG, inclusive. Esta é considerada uma das fases mais problemáticas para a posterior aplicação de técnicas complementares, tendo em consideração os inúmeros possíveis fatores interferentes na preservação antigénica das amostras (Santos et al., 2022).

Através da **figura 2.4** é possível observar alguns desses fatores.



**Figura 2.4.** - Fatores pré-analíticos possivelmente interferentes na preservação antigénica. Adaptado de (DAKO, 2009).

## Amostras

Existem vários tipos de amostras diferentes, quer seja em termos de origem anatómica, quer em termos de celularidade (havendo amostras com maior e menor abundância celular). As amostras recebidas podem ser benignas ou malignas. Quando se trata de uma amostra de neoplasia maligna as características condicionam a aplicação das técnicas complementares.

## Fixação

A fixação é uma etapa crucial na fase pré-analítica tendo como principal objetivo a preservação morfológica de células, tecidos e de epítomos. Por outro lado, a fixação também pode ser considerada uma das principais causas para uma imunomarcagem fraca (Borges Ferro, 2014). Os processos de fixação podem variar entre laboratórios. Existem diversos estudos que demonstram resultados otimizados utilizando diferentes tempos e temperaturas de fixação, assim como diferentes fixadores (Bertram et al., 2018; Fulciniti et al., 2008; Gong et al., 2004). Uma fixação em excesso ou em défice pode causar danos na preservação da morfologia celular, podendo originar a presença de artefactos, lise celular e rotura nuclear e/ou membranas (Jörundsson et al., 1999). Consequentemente a estas alterações morfológicas ao nível celular, torna-se expectável a alteração e/ou ausência de imunomarcagem tendo em conta a destruição das estruturas que idealmente seriam marcadas.

Em Citologia são utilizados essencialmente dois métodos de fixação, a fixação física e a fixação química (Shidham et al., 2000). A secagem ao ar é o tipo de fixação física mais utilizado em âmbito laboratorial para amostras citológicas, sendo que fatores como o tempo e temperatura de secagem são importantes a considerar. Após o período de secagem ao ar, as amostras podem assumir duas possibilidades, sendo elas a pós-fixação química (recorrendo à imersão da lâmina em metanol) ou a congelação (como método de armazenamento, caso as amostras não sejam utilizadas no momento do processamento) (Pinheiro et al., 2015). Estas últimas, quando necessárias, são colocadas à temperatura ambiente e posteriormente fixadas em metanol. Alguns autores mencionam que a antigenicidade é mantida nas amostras quando congeladas em temperaturas entre os  $-20^{\circ}\text{C}$  (graus Celsius) e os  $-70^{\circ}\text{C}$  (Pinheiro et al., 2015).

Existe ainda uma metodologia de fixação, denominada por preservação em polietilenoglicol (PEG), que consiste numa fixação imediata da amostra em metanol refrigerado ( $4^{\circ}\text{C}$ ) durante aproximadamente 30 minutos e, posterior aplicação da solução PEG à temperatura ambiente (Pinheiro et al., 2015). Esta solução, à temperatura ambiente, cria uma espécie de película protetora sobre a amostra (obtida por esfregação ou citocentrifugação) que permite o armazenamento das amostras à temperatura ambiente sem perda de antigenicidade. A preservação de amostras em PEG é considerada um protocolo fiável para a realização de ICQ em amostras citológicas (Srebotnik Kirbis et al., 2021). Num estudo comparativo entre diferentes protocolos, em que foi avaliada a qualidade da técnica ICQ, os dois protocolos com pontuação mais elevada foram o citobloco em 1º lugar, seguindo-se o PEG (Santos et al., 2022).

Relativamente ao citobloco, é utilizado como fixador o formol a 10% tamponado. O citobloco é utilizado em Citologia para mimetizar os fragmentos histológicos impregnados em parafina, posteriormente cortados e corados com os mesmos métodos utilizados em Histopatologia (Krogerus & Kholová, 2018). Segundo diversos estudos, o citobloco apresenta resultados consistentes na aplicação da técnica ICQ para diversos soros primários (Krogerus & Kholová, 2018; Santos et al., 2022; Satturwar et al., 2019). No presente estudo o citobloco, assim como o PEG foram considerados os padrões da análise e interpretação de amostras citológicas.

## Coloração MGG

A aplicação da coloração MGG constitui um fator pré-analítico consideravelmente interferente na qualidade da ICQ. As amostras sujeitas a ICQ e, previamente coradas com MGG são fixadas fisicamente através da secagem ao ar e, posteriormente em metanol (fixação química).

Como referido anteriormente, em certas ocasiões, as lâminas coradas com MGG são a única amostra possível para diagnóstico, pelo que se torna inerente a aplicação de técnicas complementares nas mesmas. Diversos estudos têm comprovado que a aplicação de técnicas complementares como a ICQ em lâminas previamente coradas com MGG apresentam resultados inconsistentes (Dörfelt et al., 2019; Raskin et al., 2019; Santos et al., 2022). A razão desta inconsistência de resultados ainda não se encontra claramente descrita na literatura, no entanto, é possível considerar como fatores interferentes:

- **Variação da composição química dos reagentes:** ao longo do tempo os reagentes vão sofrendo alterações químicas que poderão modificar, conseqüentemente, a ligação entre o corante e as moléculas da amostra;
- **Instabilidade dos reagentes:** ao serem expostos ao ar e às partículas contaminantes existentes neste, os reagentes poderão perder estabilidade e, dessa forma não apresentarem resultados precisos e exatos entre si (Piaton et al., 2016).

### 2.2.3. Fase analítica: fatores interferentes

A fase analítica refere-se à aplicação da técnica ICQ em si. A técnica é composta por várias etapas, algumas delas cruciais para obter uma lâmina com um resultado imunocitoquímico de melhor qualidade. Em todos os protocolos podem ser feitas alterações quer a nível de tempos (incubação de reagentes, por exemplo), concentração (relativamente à diluição dos soros primários) ou, até mesmo temperatura de incubação. As etapas essencialmente sujeitas a este tipo de alterações são o tempo de recuperação antigénica, o tempo de incubação e a diluição do soro primário.

Num estudo realizado em 2012, os autores reuniram 64 esfregaços e submeteram-nos a um conjunto de protocolos imunocitoquímicos em que foram alterados parâmetros como a diluição dos soros primários, o tempo da recuperação antigénica (assim como a potência do micro-ondas utilizado para a realização da mesma), o tipo de tampão e o seu pH (Beraki et al., 2012). As amostras foram previamente coradas com colorações Romanowsky – Diff-Quik e MGG. Os soros primários em estudo foram: Ki-67, RE (receptores de estrogénios), progesterona, citoqueratina, MNF-116 (pan-citoqueratina MNF-116) e E-caderina.

Para todos os soros primários foi obtida imunomarcação máxima (+++) nas amostras coradas com MGG, nos protocolos que utilizaram o tampão Tris-EDTA (TE) com pH = 9. Todos os soros primários apresentaram uma diluição de 1:100 à exceção da E-caderina, com uma diluição de 1:30. Todos os soros necessitaram de um aumento na concentração relativamente à concentração utilizada na rotina laboratorial ICQ e IHQ. Assim, torna-se perceptível o impacto que pequenas alterações nos protocolos podem ter no resultado imunocitoquímico.

## 2.3. Carcinoma do pulmão

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), o carcinoma do pulmão é a causa de morte mais prevalente a nível mundial, tendo ocorrido em 2020 cerca de 1,80 milhões de mortes (World Health Organization, 2023). O carcinoma do pulmão, ao longo dos anos, tem vindo a ser cada vez mais associado à exposição de fatores de risco, sendo o fumo do tabaco o mais prevalente (Koss, 2006). O

tabaco é composto por vários elementos classificados como carcinogênicos pela Agência Internacional de Pesquisa do Cancro (IARC). Alguns destes elementos são o formaldeído, o benzeno e alguns metais como o cádmio e o cobalto (Centers for Disease Control and Prevention et al., 2010).

O carcinoma do pulmão pode ser classificado como uma doença ocupacional. A exposição contínua a determinadas substâncias, como os asbestos, pode ser uma das causas para a manifestação da doença, embora esteja classicamente associada ao mesotelioma (tumor da pleura) (Koss, 2006; Noonan, 2017). Os tumores do pulmão podem ser classificados, de um modo geral, em dois grupos: tumores de pequenas células e tumores de não pequenas células (Travis, 2002).

Os tumores de pequenas células são semelhantes a células basais ou de reserva e são considerados mais agressivos, assumindo um pior prognóstico. Por outro lado, os tumores de não pequenas células podem subdividir-se em:

- Carcinomas pavimentocelulares (CPC), que apresentam diferenciação pavimentosa;
- Adenocarcinomas (ADC), que apresentam padrões glandulares;
- Carcinomas de grandes células (Travis, 2002).

O diagnóstico das neoplasias do pulmão, geralmente, é realizado recorrendo primeiramente à avaliação da sintomatologia do paciente. Posteriormente são realizados exames radiológicos de modo a orientar e direcionar o clínico para a localização exata do tumor. Após identificação radiológica, é realizada biópsia e/ou citologia, idealmente com o exame extemporâneo como acima mencionado (ROSE). A sensibilidade deste na determinação adequada de diagnósticos de neoplasias pulmonares é de 97.5%, segundo um estudo realizado em 2021 (Yuan et al., 2021).

Após ser realizado o exame extemporâneo, as amostras são processadas para diagnóstico. A utilização da imunohistoquímica na diferenciação de tumores pulmonares foi introduzida em 2015, pela OMS, sendo atualmente considerada imprescindível (Yatabe et al., 2019). Existem atualmente inúmeros painéis imunocitoquímicos que permitem a diferenciação entre as neoplasias do pulmão mais comuns. Os mais comuns são o soro primário CD45 que permite a identificação de células linfóides, TTF-1 que permite a identificação de adenocarcinomas do pulmão e, por fim a citoqueratina AE1/AE3 que permite a identificação de células epiteliais.

### **2.3.1. CD45 (Antigénio leucocitário comum)**

O CD45 (antigénio leucocitário comum) (Fenu & Maracaja, n.d.; Rheinländer et al., 2018), corresponde a uma família de cinco ou mais glicoproteínas de elevada peso molecular, entre 180 a 220 quiloDalton (kDa), presentes na superfície da maioria dos leucócitos humanos (incluindo monócitos, linfócitos e eosinófilos), mas ausente em eritrócitos e plaquetas (Fenu & Maracaja, n.d.; Rheinländer et al., 2018).

A imunexpressão de CD45 está associada processos patológicos e não patológicos (S. Zheng & Epstein, 2021). Permite identificar gânglios linfáticos, processos inflamatórios, quadros clínico-patológicos de disfunção das células T e B, doenças autoimunes infecciosas, leucemias e linfomas (Al Barashdi et al., 2021; S. Zheng & Epstein, 2021).

Este antigénio assume uma localização membranar, pelo que a sua expressão se confirma pela presença de cor castanha na membrana das células (Fenu & Maracaja, n.d.).

### 2.3.2. Pan-citoqueratina (clones AE1/AE3)

A pan-citoqueratina AE1/AE3 marca um antígeno epitelial membranar e é comumente identificado como marcador epitelial (Thompson, 2013). É um filamento intermédio, essencial na componente do citoesqueleto, que se encontra envolvido na manutenção da morfologia celular. Consiste numa mistura de dois clones – AE1 e AE3 – de anticorpos monoclonais anti-citoqueratina (Van Bockstal, n.d.). Este soro permite a deteção de um conjunto de citoqueratinas de baixo e alto peso molecular (Van Bockstal, n.d.). O clone AE1 deteta as citoqueratinas 10, 14, 15, 16 e 19, enquanto o clone AE3 deteta as citoqueratinas 1,2,3,4,5,6, 7 e 8 (Badzio, 2019). Nenhum dos clones é capaz de detetar a presença de citoqueratinas 17 e 18 (Van Bockstal, n.d.).

O antígeno AE1/AE3 é expresso em células epiteliais não neoplásicas do pulmão, como as células brônquicas, assim como nas células mesoteliais da pleura. Em lesões neoplásicas, encontra-se expresso em todos os tipos de carcinomas (neoplasias epiteliais malignas), incluindo em todos os carcinomas do pulmão (Cell Marque, n.d.).

### 2.3.3. TTF-1

TTF-1 ou fator de transcrição tiroideu 1 é um fator de transcrição pertencente à família de genes Nkx-2 (Ulici & Wang, n.d.). Regula o desenvolvimento humano, crescimento celular e encontra-se preferencialmente expresso na tiroide, pulmão e estruturas cerebrais (Messaritakis et al., 2017; Ulici & Wang, n.d.). Este soro possui uma marcação nuclear e, encontra-se expresso numa elevada percentagem de adenocarcinomas pulmonares (Moldvay et al., 2004). Assim, a imunomarcagem positiva para TTF-1 torna possível diferenciar adenocarcinomas de origem pulmonar de metástases de adenocarcinomas de outras origens anatómicas, com exceção de metástases de carcinomas primitivos da tiroide.

## 2.4. Validação de protocolos imunocitoquímicos

Para qualquer metodologia utilizada a nível laboratorial, devem ser garantidas as condições mínimas de qualidade dos resultados obtidos, assim como a garantia da reprodutibilidade. Em cada laboratório torna-se inerente a necessidade de validação de protocolos, quer sejam estes de um método de processamento de amostras, de uma coloração ou de uma técnica imunocitoquímica.

O Colégio Americano de Patologistas (CAP) é uma entidade que integra uma equipa multidisciplinar constituída por vários profissionais de saúde que visam estabelecer *guidelines* para a validação de determinados métodos laboratoriais. As boas práticas laboratoriais exigem que sejam estabelecidos protocolos otimizados para os diversos parâmetros, nomeadamente a concentração do soro primário, recuperação antigénica e método de deteção, relativamente à ICQ (Satturwar et al., 2019). A validação de um método requer uma otimização prévia assim como uma análise da sensibilidade e especificidade do mesmo (Satturwar et al., 2019). A sensibilidade, por definição, é a probabilidade condicional de um teste ser positivo dado que o indivíduo é doente (Cunha et al., 2011). Por oposição, a probabilidade condicional de um teste ser negativo dado que o indivíduo é não-doente define-se por especificidade (Cunha et al., 2011).

Relativamente às condições de validação de um soro primário (ou anticorpo), segundo as normas implementadas pela CAP, torna-se necessário atingir pelo menos 90% de sensibilidade isto é, existir pelo menos 90% de concordância entre o novo protocolo e o padrão (Satturwar et al., 2019). Caso esta percentagem não seja atingida é necessário investigar qual o possível motivo para a baixa percentagem de concordância (Satturwar et al., 2019). Para cada validação são necessárias pelo menos

10 amostras, sendo que na mesma amostra podem encontrar-se células-positivas e células-negativas para um determinado anticorpo (College of American Pathologists, 2014).

### 3. Metodologia

#### 3.1. Classificação do estudo

O presente projeto de investigação pode ser classificado como sendo um estudo experimental não randomizado, descritivo, não probabilístico por conveniência (Nedel & Silveira, 2016).

##### Justificação do tipo de estudo

- **Experimental:** o investigador assume controlo direto nas condições a que a população em estudo é sujeita (Nedel & Silveira, 2016). Neste tipo de estudos existe um grupo controlo (amostras padrão – citobloco e PEG – sujeitas a ICQ) e um grupo de estudo (amostras coradas com MGG e posterior aplicação de ICQ).
- **Não randomizado:** as amostras incluídas no estudo não são selecionadas aleatoriamente, mas sim intencionalmente pelo investigador. As amostras selecionadas para o presente estudo foram somente líquidos pleurais e peritoneais com presença de neoplasia pulmonar ou outros derrames das cavidades serosas com presença de metástases pulmonares;

#### 3.2. Método de amostragem e critérios de inclusão e exclusão

Selecionámos 30 amostras de derrames provenientes de cavidades serosas. Cada uma das amostras foi processada e foram verificados alguns parâmetros para a inclusão ou exclusão das mesmas no estudo. Torna-se relevante mencionar que para todas as amostras incluídas no estudo foi tido em consideração a eventual necessidade de recorrer às mesmas para a realização de técnicas complementares para o diagnóstico do paciente. Foram excluídos os casos em que o volume das amostras era reduzido ou perto do limite necessário para a atribuição do diagnóstico.

Os critérios de inclusão e exclusão encontram-se descritos na **tabela 3.1**, abaixo apresentada.

**Tabela 3.1.** - Critérios de inclusão e exclusão do estudo.

<i>Critérios</i>	<i>Inclusão</i>	<i>Exclusão</i>
<b><i>Percentagem celular</i></b>	Moderada a abundante (> 10 células por campo)	Escassa (< 10 células por campo)
<b><i>Preservação morfológica celular</i></b>	Mantida	Ausente
<b><i>Intervalo entre data de colheita e processamento</i></b>	Igual ou inferior a dois dias	Superior a dois dias

#### 3.3. Identificação de variáveis em estudo

Uma variável de investigação consiste numa entidade que varia o seu valor e/ou significado (Kaliyadan & Kulkarni, 2019). A existência de uma variável num projeto de investigação é crucial, visto que é através desta que se torna possível a operacionalização de conceitos e tratamento estatístico dos dados obtidos (Kaliyadan & Kulkarni, 2019).

A classificação das variáveis em estudo encontra-se na tabela abaixo apresentada – **Tabela 3.2**.

**Tabela 3.2.** - Classificação das variáveis em estudo.

<i>Tipo de variável</i>	<i>Descrição da variável</i>	<i>Classificação</i>	<i>Escala de medida</i>
<b><i>Variável independente</i></b>	Coloração May-Grünwald Giemsa	Qualitativa	Nominal (booleana)
<b><i>Variáveis dependentes (Grelha de classificação)</i></b>	Preservação morfológica	Qualitativa	Ordinal
	Intensidade de marcação	Qualitativa	Ordinal
	Sensibilidade da qualidade ICQ	Qualitativa	Ordinal
	Especificidade da qualidade ICQ	Qualitativa	Ordinal
	Contraste	Qualitativa	Ordinal
<b><i>Variáveis dependentes (Avaliação da sensibilidade e especificidade)</i></b>	Pontuação global da lâmina	Quantitativa	Ordinal
	Sensibilidade de diagnóstico	Quantitativa	Contínua
	Especificidade de diagnóstico	Quantitativa	Contínua

### **3.4. Considerações éticas e legais**

Ao longo do desenvolvimento do presente estudo tivemos em consideração os valores éticos, que aplicamos em todos os momentos respeitantes ao trabalho em questão. A ética assume uma importância crucial na investigação científica, sendo que deve ser aplicada desde o início da elaboração do projeto até ao cessar do mesmo (Yip et al., 2016).

Para a elaboração da presente investigação foram utilizadas amostras de doentes, armazenadas no Instituto Português de Oncologia de Lisboa Francisco Gentil (IPOLFG), e em nenhum momento o diagnóstico citológico das amostras foi colocado em causa. Tivemos em consideração o volume necessário para o diagnóstico de cada amostra, individualmente, para a decisão das amostras incluídas ou não no estudo. É importante mencionar que não foi utilizada qualquer informação dos doentes, além do diagnóstico. Toda a investigação foi acompanhada e orientada por profissionais qualificados na área da Anatomia Patológica, que garantiam o cumprimento das normas e o trabalho foi submetido à Comissão de Ética do Instituto e aprovado pela mesma.

### **3.5. Planeamento do estudo**

#### **3.5.1. Desenho de estudo**

O desenho de estudo tem como objetivo tornar claros todos os passos realizados desde a receção das amostras no laboratório até à análise das lâminas obtidas.

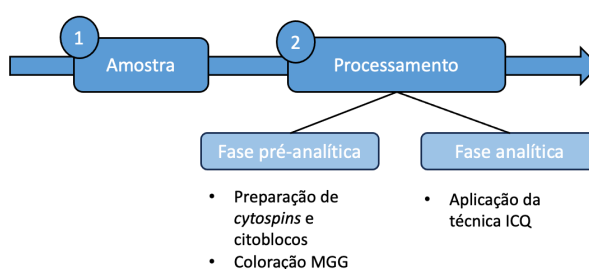
No **Apêndice 1** encontra-se o cronograma das atividades realizadas, assim como o orçamento do projeto.

O projeto foi estruturado de forma a otimizar e validar a técnica ICQ em lâminas coradas com MGG, pelo que o mesmo se subdividiu em três fases:

- **Fase I:** Recolha e preparação de amostras citológicas
- **Fase II:** Otimização dos protocolos
- **Fase III:** Validação dos protocolos e controlo de qualidade

### 3.5.2. Fase I: Recolha e preparação de amostras citológicas

Foram utilizadas amostras provenientes de derrames das cavidades serosas, incluindo líquidos pleurais e peritoneais. Este tipo de amostras pode ser colhido para recipientes, podendo o seu volume variar entre 60 até 2000 mililitros (mL). As amostras são sujeitas a um conjunto de etapas, como demonstrado pelo esquema da **figura 3.1**. Depois da amostra ser recebida no laboratório de citopatologia, segue-se o seu processamento, sendo que este se pode subdividir em duas fases: fase pré-analítica e fase analítica.

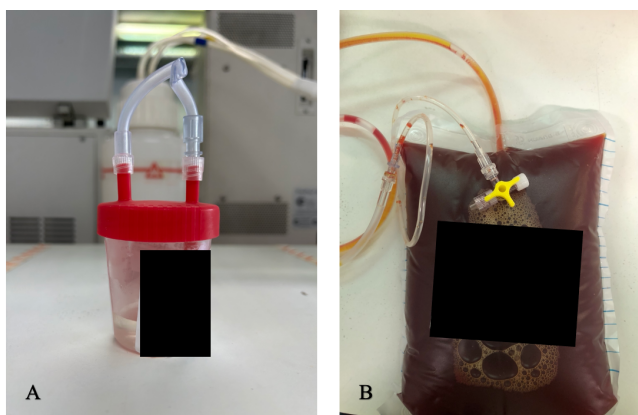


**Figura 3.1.** – Fluxo de trabalho das amostras.

#### Fase pré-analítica

A fase pré-analítica inicia-se na receção da amostra e termina na aplicação da coloração MGG. As amostras ao serem recebidas no laboratório seguiram um fluxo de trabalho consoante o resultado pretendido, que pode ser a obtenção de *cytospins* ou de citoblocos.

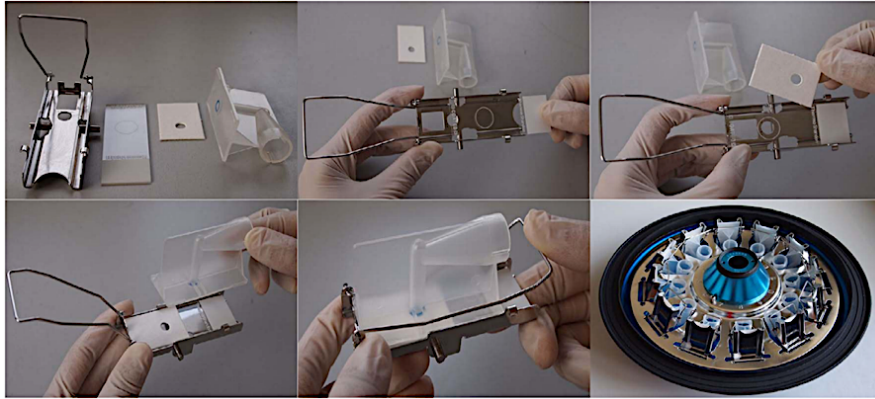
As amostras foram retiradas do saco ou contentor de colheita (**Figura 3.2A e 3.2B**), filtradas e colocadas em tubos de centrifuga devidamente identificados. A filtração foi realizada de modo a reter os possíveis coágulos existentes nas amostras, que poderiam eventualmente interferir na citocentrifugação. O volume de amostra colocado em cada tubo de *Falcon* variou entre 30 mL e 50 mL, para a realização de *cytospins* e de citoblocos, respetivamente.



**Figura 3.2.** - (A) Amostra citológica em contentor estéril. (B) Amostra citológica em saco de colheita. **Nota:** Foram colocadas barras pretas de modo a proteger a identidade do paciente (Imagem da autora).

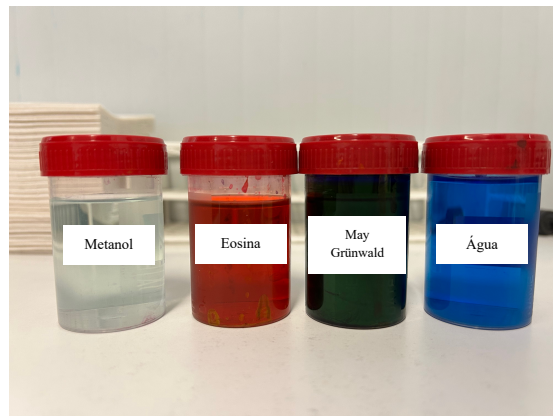
## Preparação de *cytospins*

Para a realização das lâminas por citocentrifugação foram utilizados citofunil acoplados a uma lâmina de vidro (**Figura 3.3**). Em cada citofunil foram colocados até 500  $\mu\text{L}$  (microlitros) de amostra previamente centrifugada (325 g, 5 minutos). A amostra, ao ser citocentrifugada, permite que ocorra uma deposição das células na lâmina de vidro, para que ao ser removido o citofunil, seja obtido o *imprint* de células na lâmina de vidro.



**Figura 3.3** - Elaboração de uma lâmina por *cytospin* e colocação em citocentrífuga (L.-H. Zheng et al., 2016).

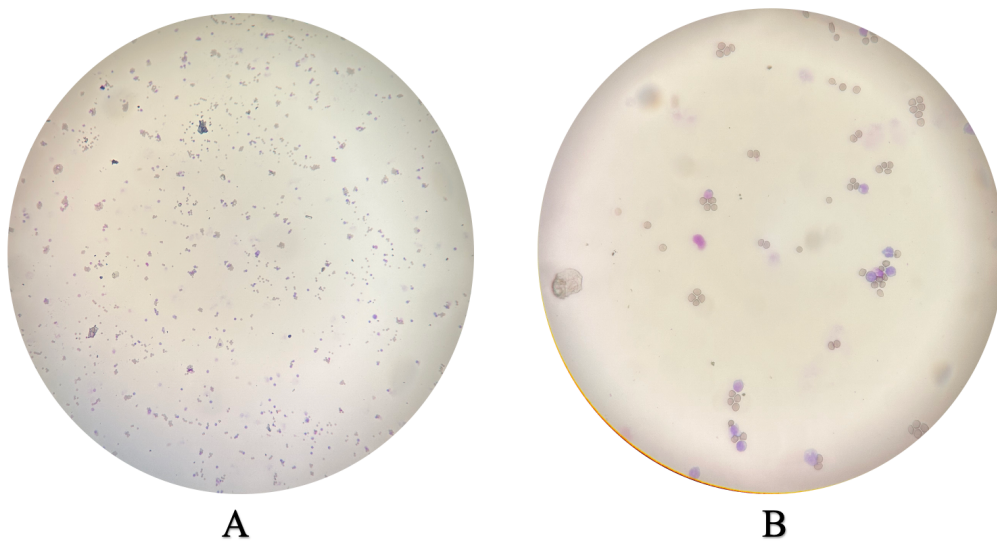
De modo a garantir a viabilidade da amostra foi realizada uma lâmina por *cytospin* que foi posteriormente corada com a coloração rápida de MGG. Esta é uma coloração de aproximadamente 30 segundos constituída por quatro reagentes (**Figura 3.4**). Nesta lâmina foram avaliados parâmetros como a celularidade por campo assim como a morfologia celular. Este passo acabou por ser considerado uma etapa de rastreamento das amostras, visto que só após a observação microscópica da lâmina foi decidido se a mesma seria ou não processada.



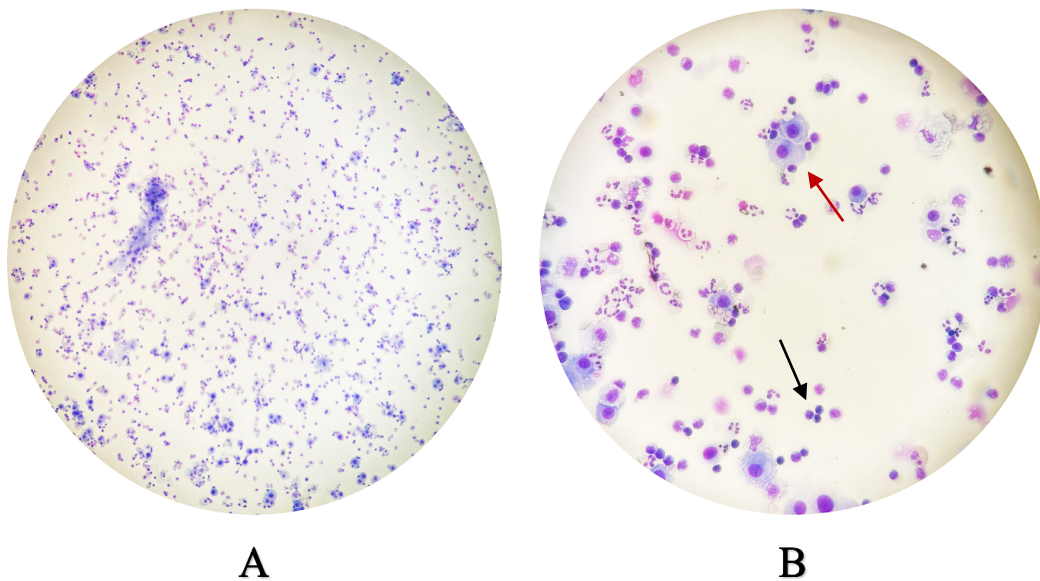
**Figura 3.4** - Coloração MGG BIO-DIFF Kit (Imagem da autora).

Nas **figuras 3.5 e 3.6** observam-se duas amostras diferentes e de qualidade oposta. Na figura 3.5 observa-se uma amostra com escassa celularidade. Por vezes, a escassa celularidade pode advir da lise celular. A lise celular pode ocorrer devido a fatores tais como a temperatura e o tempo de armazenamento das amostras. Alguns estudos mencionam que estes dois fatores podem ser considerados como potenciais interferentes da fase pré-analítica no processamento destas amostras citológicas (Antonangelo et al., 2012; Ikeda et al., 2020). Nos casos em que as amostras se encontravam nestas condições foram excluídas do estudo.

Por oposição, na figura 3.6 observa-se uma amostra com elevada celularidade e com boa preservação morfológica celular. Por campo, são observadas células mesoteliais, assim como linfócitos. Nestes casos, deu-se seguimento ao processamento destas amostras.

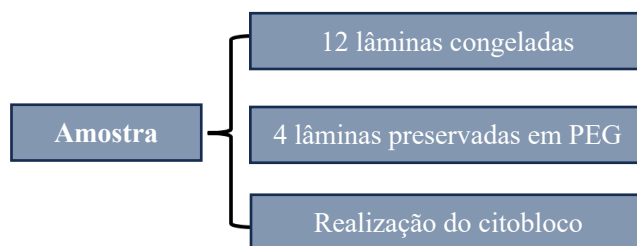


**Figura 3.5.** – Amostra com escassa celularidade, corada com MGG rápida. (A): 40x; (B): 100x (Imagem da autora).



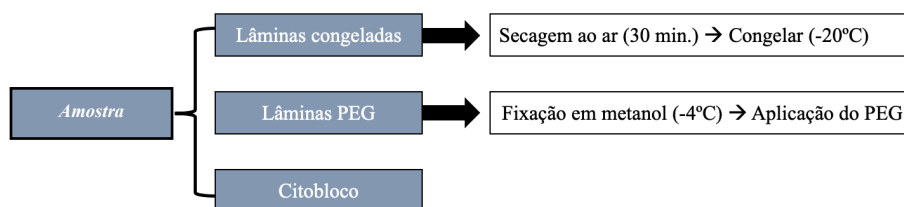
**Figura 3.6.** - Amostra com elevada celularidade e preservação morfológica mantida. Amostra corada com coloração MGG rápida. (A): 40x. (B): 100x; **Legenda:** Seta preta (linfócitos); Seta vermelha: (células mesoteliais) (Imagem da autora).

Após ter sido realizado o controlo de qualidade das amostras, isto é, após ter sido verificado se as amostras cumpriam ou não os critérios de inclusão no estudo seguiu-se o seu processamento. Para cada amostra foram realizadas 16 lâminas e um citobloco (**Figura 3.7**). Das 16 lâminas, 12 foram congeladas (após o processo de fixação) e as restantes 4 foram preservadas com a solução PEG.



**Figura 3.7.** - Distribuição das lâminas por amostra.

As lâminas obtidas que tiveram como destino a congelação (denominadas na **Figura 3.8** como “Lâminas congeladas”) foram submetidas a uma secagem ao ar, durante pelo menos 30 minutos à temperatura ambiente. A temperatura ambiente durante o tempo de secagem não foi controlada. Por outro lado, as lâminas preservadas em PEG, não foram secas ao ar, mas sim fixadas em metanol (a uma temperatura de - 4°C) no frigorífico, durante pelo menos 30 minutos. Após esta fixação foi aplicada a solução de PEG por cima de toda a lâmina e, esta foi deixada a secar à temperatura ambiente.



**Figura 3.8.** - Protocolo-resumo de cada um dos tipos de *cytopins*.

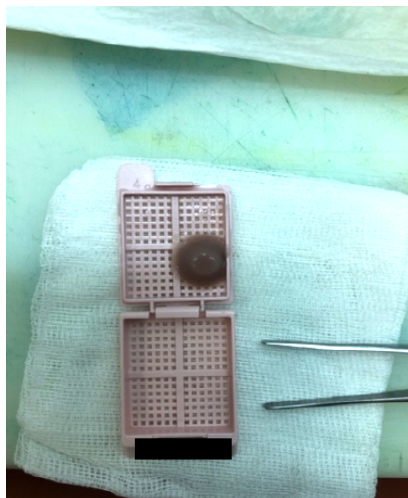
## Preparação de citoblocos

O processamento dos citoblocos foi efetuado recorrendo ao kit HistoGel da casa comercial *Thermo Scientific* (**Apêndice 2 – Figura 8.1**). Para a preparação dos citoblocos foi realizado um protocolo diferente, quando comparado com o da preparação dos *cytopins* porque este é processado como uma amostra histológica.

Para a realização dos citoblocos, retirámos do contentor ou saco de amostra, aproximadamente 50 mL para um tubo de *Falcon* e centrifugámos a 1300 g, durante 5 minutos. De seguida, o sobrenadante foi descartado e, ao sedimento foram adicionados 30 mL de formol tamponado 10%, assim como duas gotas de hematoxilina (corante de cor arroxeada). A adição de hematoxilina permitiu que o cone posteriormente formado fosse mais facilmente visível.

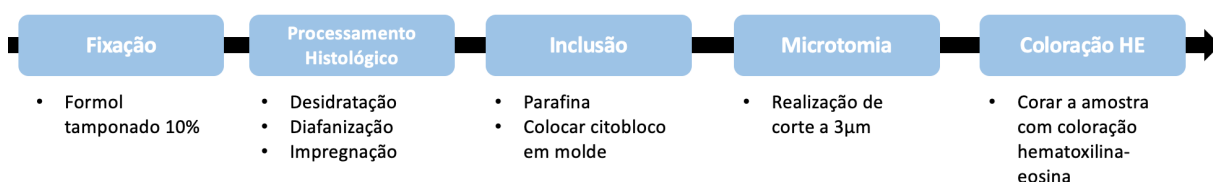
Após esta etapa, a amostra existente no tubo de *Falcon* foi novamente centrifugada (1300 g, 5 minutos). De seguida, procedeu-se à decantação e inversão do tubo, de modo a retirar a maior quantidade de formol possível. Para que a amostra tivesse consistência, foi necessário adicionar um composto denominado HistoGel. Este composto à temperatura ambiente encontra-se sólido, mas depois de aquecido no micro-ondas, em banho-maria, durante 45 segundos a 750W (Watt), apresenta-se no estado líquido. Foram adicionadas entre 2 a 3 gotas deste composto, conforme o tipo de amostra, de para que este solidificasse. O processo de solidificação é acelerado ao colocar das amostras no congelador (- 20°C), durante 5 minutos. Por fim a amostra foi retirada do tubo e colocada numa cassette (**Figura 3.9**), imersa em formol.

As amostras foram fixadas em formol tamponado 10%, tendo sido posteriormente colocadas no processador *Leica Peloris*<sup>TM</sup> III (**Apêndice 2 - Figuras 8.3 e 8.4**), programado no protocolo detalhado no **Anexo 1 (Tabela 9.1)**.



**Figura 3.9.** - Citobloco em cassete histológica. (**Nota:** Foi colocada uma barra preta na identificação da amostra de forma a proteger a identidade do paciente) (Imagem da autora).

No final da fase pré-analítica do citobloco, as amostras foram processadas (**Apêndice 2 - Figura 8.2**), de forma a seguirem a técnica histológica (**Figura 3.10**).



**Figura 3.10.** - Esquema-resumo das etapas da técnica histológica.

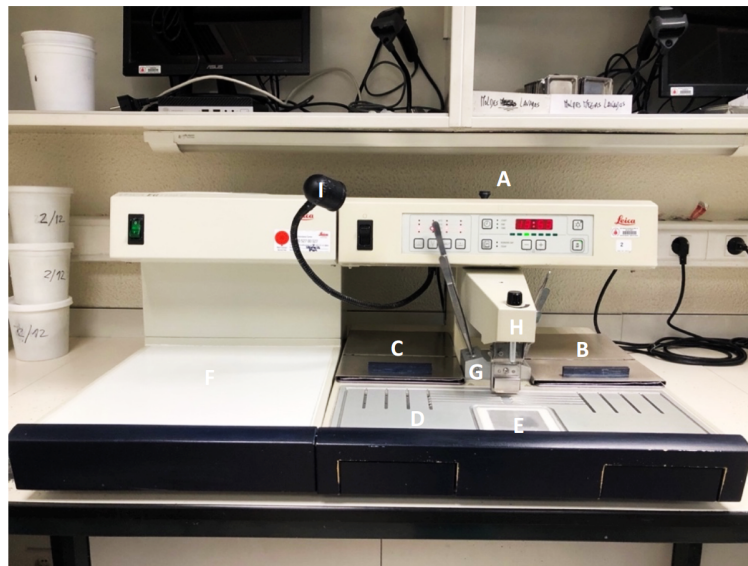
O processamento histológico integra três fases: desidratação, diafanização e impregnação. A etapa da desidratação, como o nome indica, consiste na remoção da água dos tecidos, através da imersão das amostras em álcoois de concentração crescente – 70%, 95% e 100%.

Segue-se a etapa da diafanização (ou clarificação), que se baseia essencialmente na remoção do agente desidratante, visto que o meio de suporte – a parafina – não é miscível com o mesmo (Suvarna et al., 2013). O reagente utilizado nesta etapa é o xileno (ou xilol), visto que possui solubilidade com o agente desidratante e, simultaneamente, com o meio de suporte (Suvarna et al., 2013).

A impregnação consiste na penetração de parafina no tecido para preencher os espaços vazios anteriormente ocupados pelo xileno (Suvarna et al., 2013). A parafina irá impedir a distorção celular e preservar a estrutura tecidual (Suvarna et al., 2013).

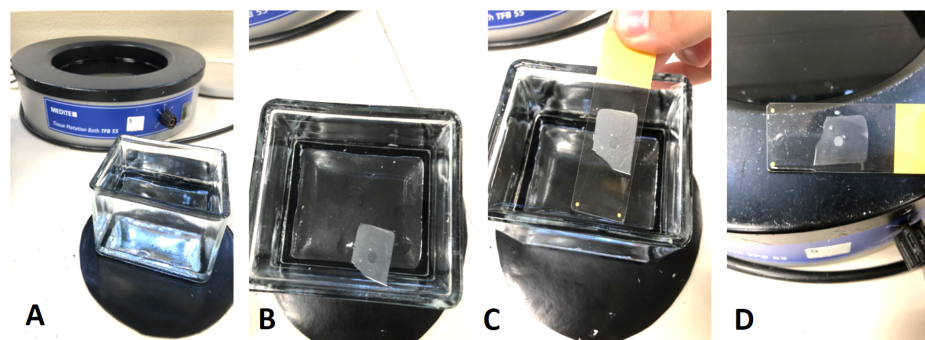
A inclusão é a fase que sucede o processamento histológico, e tem como principal objetivo a inclusão de um fragmento (neste caso, o cone previamente descrito) impregnado num bloco de parafina. A inclusão é realizada num aparelho específico para esse fim (**Figura 3.11**), que é composto por vários componentes. Os cestos com cassetes encontram-se imersos em parafina (no estado líquido) enquanto é realizada a inclusão de cada uma das cassetes.

O processo inicia-se pela remoção da cassete do cesto e à sua abertura. Posteriormente é selecionado o molde adequado e neste é colocada uma pequena quantidade de parafina até o fundo do mesmo ficar coberto. O fragmento deve ser orientado da forma correta, visto que a orientação é um ponto-chave para que seja possível observar a área de interesse. O fragmento, após ter sido orientado, deve ser calcado com o auxílio de uma pinça, aquando da colocação do molde na pequena superfície fria para que a parafina solidifique. Quando terminada a inclusão, a cassete referente ao fragmento incluído deverá ser colocada por cima do molde e, este deverá ficar na placa fria até a parafina estar totalmente solidificada. Após a parafina se encontrar totalmente solidificada o molde pode ser retirado e o bloco está finalizado. Para tornar mais perceptível todas as etapas da inclusão, encontram-se figuras ilustrativas de todos os passos no **Apêndice 2 – Figura 8.5**.



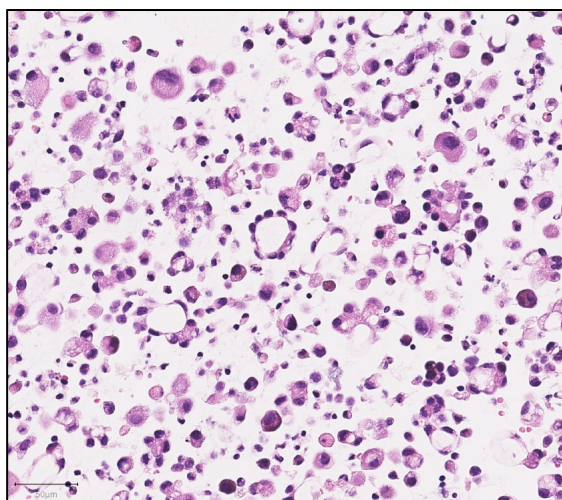
**Figura 3.11.** - Centro de inclusão Leica TM 1150. **Legenda:** (A) Depósito de parafina; (B) Depósito de parafina para cestos com cassetes; (C) Depósito para moldes; (D) Placa quente; (E) Pequena superfície fria; (F) Placa fria; (G) Pontos quentes para pinças; (H) Torneira de parafina; (I) Luz (Imagem da autora).

A etapa que se segue é a microtomia que, por definição, consiste na remoção de cortes finos e regulares do bloco embebido em parafina (**Apêndice 2 – Figura 8.6**) (Suvarna et al., 2013). Os cortes devem ser finos e translúcidos e, para tal são necessários equipamentos que permitam executar esta operação, que se designam por micrótomos. Podem destacar-se dois tipos de micrótomos: de corredeira (**Apêndice 2 - Figura 8.7**) e de *Minot* (**Apêndice 2 - Figura 8.8**). Os blocos ao serem submetidos ao corte devem estar gelados, pelo que é utilizada uma placa fria (**Apêndice 2 - Figura 8.9**). O corte, idealmente, deverá ter uma espessura compreendida entre 3-4  $\mu\text{m}$  (Micrómetro) (**Apêndice 2 – Figura 8.10**) para que seja possível observar corretamente as diferentes camadas celulares (Suvarna et al., 2013). O corte é colocado com o auxílio de uma pinça ou pincel num banho de água fria e, posteriormente num banho-maria (**Figura 3.12**), com uma temperatura entre os 53°C e os 60°C. Desta forma, o corte fica então aderente à lâmina de vidro e está pronto para ser submetido à etapa de coloração e/ou ICQ.



**Figura 3.12.** – Banho frio e banho-Maria. **Legenda:** (A) Banho de água fria (à frente) e banho Maria (atrás). (B) Corte histológico em banho de água fria. (C) Colocação do corte na lâmina adesivada. (D) Corte histológico adesivado à lâmina após banho-Maria (Imagem da autora).

Assim como no processamento dos *cytospins*, também para as lâminas do citobloco, foi relevante avaliar a morfologia das células contidas no corte (**Figura 3.13**) e realizar uma lâmina corada com a coloração Hematoxilina-Eosina (H&E) (**Anexo 2 – Tabela 9.2**). Nos casos em que o corte não estava devidamente realizado foi repetido. Nos casos em que a morfologia celular não se encontrava devidamente mantida, foi utilizado como padrão somente a lâmina PEG.



**Figura 3.13.** – Lâmina obtida por citobloco corada com a coloração H&E (Imagem da autora).

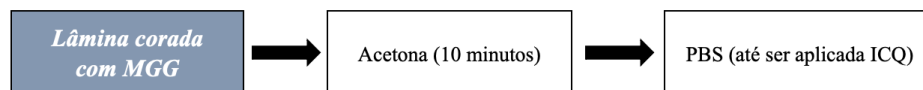
## Coloração May-Grünwald Giemsa

A coloração MGG foi realizada no aparelho *Sakura Tissue-Tek Prisma 6130 & Film 4740 Slide Stainer Fil Coverslipper Workstation* (**Apêndice 3 – Figura 8.11**). O protocolo de coloração MGG utilizado encontra-se em anexo (**Anexo 3 – Tabela 9.3**). As lâminas, depois de coradas foram montadas, recorrendo a uma película de filme, de modo a preservar a amostra na lâmina e evitar a sua degradação ou perda.

## Preparação das lâminas para ICQ

As amostras coradas necessitaram de uma preparação prévia para poderem ser sujeitas à técnica ICQ (**Figura 4.14**). Deste modo, o primeiro passo a ser realizado foi a remoção do *film*, de forma a expor a amostra. Esta remoção foi realizada através da imersão das lâminas numa tina de vidro com acetona, durante 10 minutos, sendo que ao terceiro minuto o *film* foi retirado com o auxílio de uma




pinça. Posteriormente, as lâminas foram imersas em PBS (*phosphate buffered saline*), uma solução salina que evita a lise e plasmólise celular, possivelmente causada por osmose. As lâminas permaneceram nesta solução até serem colocadas no equipamento automatizado para a realização de ICQ.



**Figura 3.14.** - Método de preparação da lâmina MGG para ICQ.

### **Fase analítica**

A fase analítica englobou a aplicação da técnica ICQ em amostras previamente coradas pela coloração MGG. A técnica ICQ foi realizada no equipamento automatizado Ventana Benchmark (**Apêndice 4 – Figura 8.12**). O método de detecção utilizado foi o *ultraView Universal DAB Detection Kit* da casa comercial Roche. Foram utilizados os soros CD45, TTF-1 e citoqueratina AE1/AE3, de modo a analisar a potencial interferência na coloração MGG nas diferentes localizações celulares: membranar, nuclear e citoplasmática, respetivamente (**Figura 3.15**).

Soro primário	Localização morfológica da imunomarcação		
	 Nuclear	 Citoplasmática	 Membranar
TTF-1	X		
CD45			X
Citoqueratina AE1/AE3		X	

**Figura 3.15.** - Tabela-resumo da localização da imunomarcação de cada soro primário.

### **3.5.3. Fase II: Otimização de protocolos**

Numa fase inicial da otimização de protocolos, tornou-se relevante avaliar a influência da coloração MGG na qualidade da técnica ICQ. Para compreender se os corantes constituintes da coloração MGG possuíam alguma influência individual na qualidade dos resultados ICQ, foram elaborados seis protocolos.

Dos seis protocolos, dois (Protocolos de citobloco e PEG) foram utilizados como protocolos-padrão, sendo eles o citobloco e a preservação em PEG, respetivamente. As diferenças entre os protocolos numerados de 3 a 6 incidiu na remoção dos corantes constituintes da coloração MGG, sendo que o protocolo 3 incluiu a coloração MGG completa. Os protocolos testados foram os seguintes:

- **Protocolo 1 (Padrão 1):** Fixação em formol + realização de citobloco;
- **Protocolo 2 (Padrão 2):** Fixação imediata em metanol (pelo menos 30 minutos) + preservação em PEG;
- **Protocolo 3:** Secagem ao ar (pelo menos 30 minutos) + pós-fixação em metanol (10 minutos) + coloração MGG;
- **Protocolo 4:** Secagem ao ar (pelo menos 30 minutos) + pós-fixação em metanol (10 minutos);
- **Protocolo 5:** Secagem ao ar (pelo menos 30 minutos) + pós-fixação em metanol (10 minutos) + coloração somente com o corante de May-Grünwald;
- **Protocolo 6:** Secagem ao ar (pelo menos 30 minutos) + pós-fixação em metanol (10 minutos) + coloração somente com o corante Giemsa.

Estas testagens foram realizadas utilizando o soro primário CD45, visto ser, de entre todos os soros em estudo, o mais acessível relativamente à disponibilidade de amostras, dado que todas as amostras em estudo tinham células linfóides. As amostras foram coradas com a coloração MGG (através da coloração rápida) para uma análise primária da qualidade relativamente à percentagem de celularidade, preservação morfológica e presença de células-alvo. Após esta análise realizaram-se 5 lâminas e 1 citobloco, para cada uma das amostras. Cada uma das 5 lâminas correspondeu aos protocolos numerados de 2 a 6, respetivamente. Por fim, foi aplicada a técnica ICQ com o protocolo detalhado no **Anexo 4 – Figura 9.2**.

As amostras foram analisadas microscopicamente, por dois avaliadores, e tendo por base os parâmetros da grelha de classificação mencionada na **tabela 3.6**, no entanto, foram somente realizadas análises comparativas entre os protocolos. Os resultados obtidos nesta primeira fase de otimização encontram-se abaixo na **tabela 3.3**.

**Tabela 3.3.** - Tabela de resultados da comparação.

	<b>Protocolo 3</b>	<b>Protocolo 5</b>
<b>Protocolo 5</b>	A lâmina correspondente ao protocolo 5 apresentou maior percentagem de marcação	
<b>Protocolo 6</b>	A lâmina correspondente ao protocolo 6 apresentou maior percentagem de marcação	A lâmina correspondente ao protocolo 6 apresentou ligeiramente uma maior percentagem

As lâminas obtidas pelos protocolos 1 e 2 apresentaram resultados ICQ satisfatórios, como seria esperado, no entanto de entre os protocolos-teste (de 3 a 6), aquele que apresentou resultados ICQ de melhor qualidade foi o protocolo 4. Apesar deste protocolo ter apresentado melhores resultados ICQ, o mesmo não pode ser utilizado na rotina laboratorial devido à necessidade de uma prévia avaliação morfológica das células, avaliação essa, que só é possível através da coloração MGG. Dos restantes protocolos (5 e 6), verificou-se uma maior percentagem de marcação (sensibilidade) quando foi retirado um dos corantes. Entre os dois corantes constituintes da coloração MGG, aquele que permitiu uma maior percentagem de marcação das células-alvo foi o corante Giemsa.

Apesar de terem sido verificados melhores resultados ICQ, relativamente à percentagem de marcação, nos protocolos com apenas um dos corantes, foram considerados os restantes parâmetros da grelha de classificação e foi selecionado o protocolo 3 como aquele que permitia uma melhor avaliação morfológica das células e, simultaneamente um melhor resultado ICQ. Torna-se relevante ter em consideração não só a qualidade dos resultados ICQ, como também a própria avaliação morfológica das células numa primeira fase. Deste modo a utilização do protocolo 3 permite obter resultados com maior detalhe nuclear e citoplasmático, acoplado a uma melhor interpretação de resultados ICQ ainda que com menor qualidade quando comparados com os protocolos 5 e 6.

Estas testagem serviram apenas de orientação para a otimização detalhada dos protocolos para cada um dos soros primários e, para verificar a possível interferência da coloração MGG na qualidade dos resultados ICQ. Após a análise destes resultados, o protocolo 3 foi utilizado tanto para a fase de otimização de cada um dos soros, como para a fase de validação dos mesmos.

A nomenclatura utilizada para os protocolos das otimizações de cada um dos soros foram independentes entre si, pelo que para cada soro foram utilizadas

## Otimização do soro CD45

O CD45 foi o primeiro soro a ser otimizado tendo em consideração os resultados obtidos através das testagens anteriormente descritas. O tempo de fixação química (metanol, durante 10 minutos) foi um dos parâmetros alterados relativamente ao protocolo inicial, porque na rotina laboratorial a fixação em metanol tinha a duração de 15 minutos. Também, para a garantir o controlo do tempo de fixação, a fixação passou a ser realizada numa tina de vidro ao invés de no colorador automático. Relativamente aos protocolos imunocitoquímicos não foram realizadas alterações em relação aos que se encontram no **Anexo 4**.

## Otimização do soro TTF-1

O TTF-1 foi um soro consideravelmente mais complexo de ser otimizado comparativamente ao soro CD45. Para esta otimização foram aplicadas as mesmas condições de fixação do soro CD45, mas foram aplicadas alterações nos protocolos imunocitoquímicos em vários parâmetros, como:

1. Tempo de recuperação antigénica
2. Tempo de incubação do soro primário
3. Tempo de aplicação de hematoxilina e *bluing*

Foram elaboradas alterações tanto nos protocolos das lâminas PEG como das lâminas coradas com MGG. Para as lâminas PEG foram testados dois protocolos e para as lâminas MGG foram testados quatro protocolos, que se observam na **tabela 3.4** e cuja descrição se encontra no **Anexo 5**.

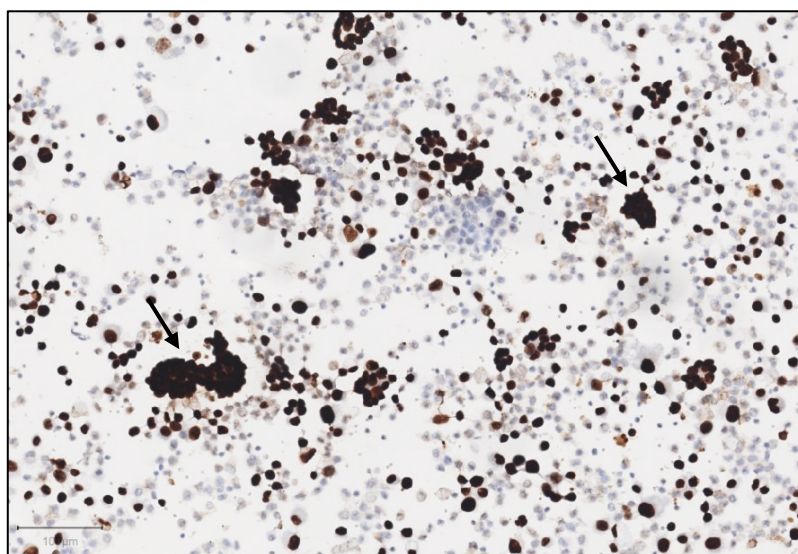
Esta otimização foi realizada recorrendo somente a uma amostra, de modo a compreender os efeitos de cada variável sem alterar a componente celular.

**Tabela 3.4.** - Protocolos imunocitoquímicos para otimização do soro TTF-1.

<i>Protocolo</i>	<i>Tipo de amostra</i>	<i>Tempo de incubação de soro primário</i>	<i>Tempo de recuperação antigénica</i>	<i>Tipo de tampão</i>	<i>Temperatura</i>	<i>Tempo de hematoxilina/bluing</i>
<b>1</b>	PEG	20'	8'	CC1	94°C	12' / 8'
<b>2</b>	PEG	16'	8'	CC1	94°C	12' / 8'
<b>3</b>	MGG	28'	8'	CC1	96°C	4' / 4'
<b>4</b>	MGG	28'	20'	CC1	96°C	4' / 4'
<b>5</b>	MGG	28'	20'	CC1	96°C	8' / 4'
<b>6</b>	MGG	28'	36'	CC1	96°C	8' / 4'

Nas figuras 3.16 – 3.21 encontram-se campos microscópicos das lâminas resultantes de cada uma das alterações realizadas, sendo possível observar as diferenças consideráveis em cada uma delas.

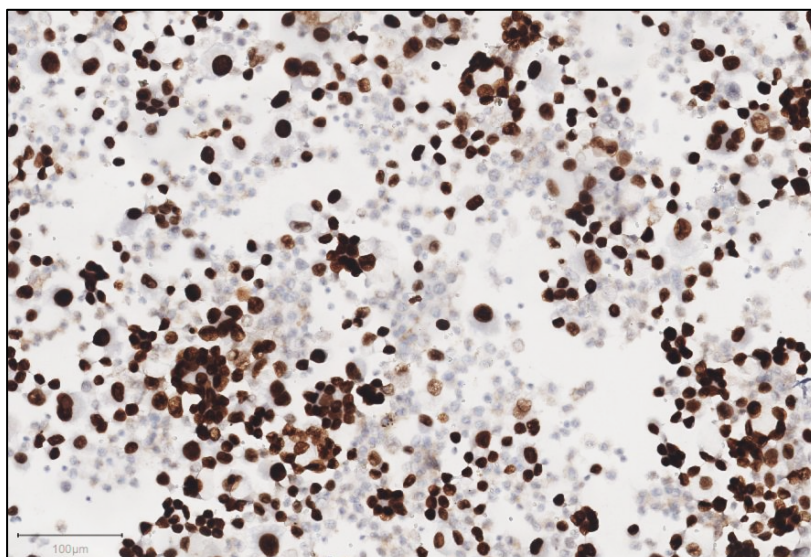
No protocolo inicial para as lâminas PEG, o tempo de incubação do soro primário era de 20 minutos, no entanto, ao analisar vários campos da lâmina, verificaram-se diversos grupos celulares com aspeto semelhante aos que se encontram na **figura 3.16**. Os agregados celulares (identificados com as setas pretas) apresentaram imunomarcação de intensidade forte. Apesar de a intensidade ter sido considerada como forte esta comprometia de certa forma a análise individual das células.



**Figura 3.16.** - Otimização TTF-1 (Protocolo 1: Tempo de incubação de soro primário = 20'). **Legenda:** Setas pretas (Agregados celulares de intensidade forte) (Imagem da autora).

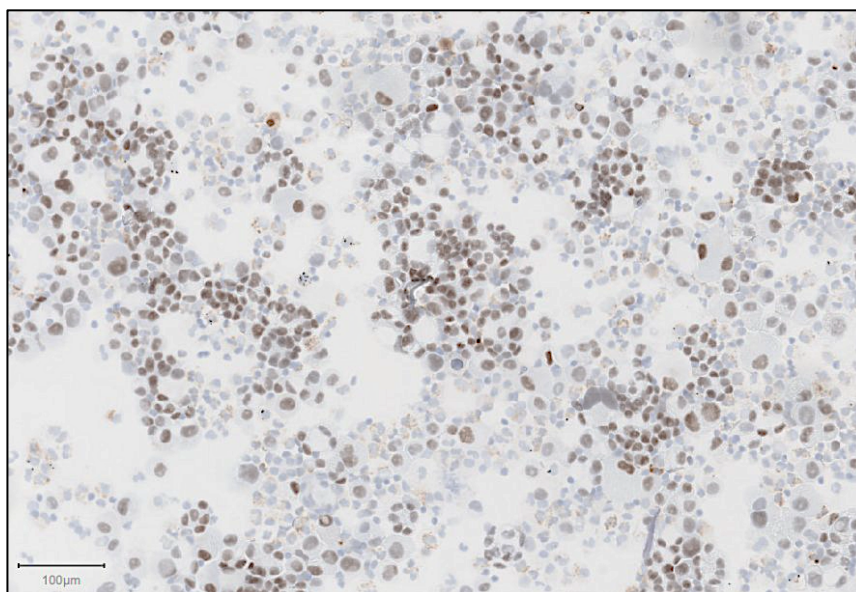
Tendo em conta este facto, foi colocada a hipótese a redução do tempo de incubação do soro primário de 20 para 16 minutos, tendo sido obtida a lâmina da **figura 3.17**.

Foi possível observar uma diminuição ligeira da intensidade de marcação e, conseqüentemente uma melhor individualização celular. Verificaram-se alguns agregados celulares, sendo que nestes foi possível identificar os contornos nucleares, o que não acontecia na lâmina anteriormente analisada.



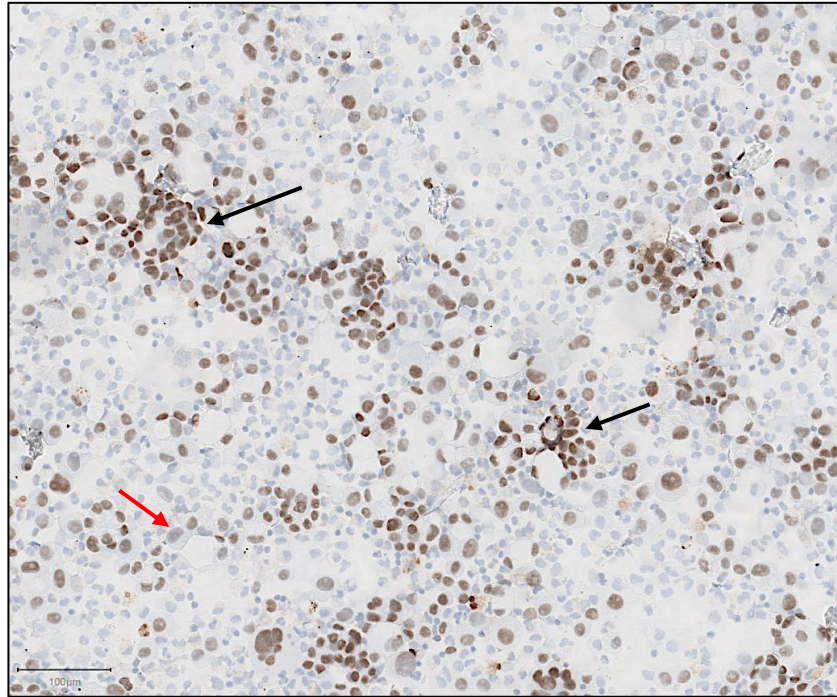
**Figura 3.17.** - Otimização TTF-1 (Protocolo 2: Tempo de incubação de soro primário = 16') (Imagem da autora).

Na **figura 3.18** observa-se o resultado imunocitoquímico do protocolo inicial para lâminas MGG. Observámos que a intensidade dos núcleos variava entre fraca a moderada, sendo possível confirmar a expressão de TTF-1 nas células presentes. Constatámos que o contraste estava fraco (quanto à sua intensidade), pelo que a diferenciação entre as células positivas e negativas para TTF-1 poderia ser mais difícil, quando as primeiras apresentavam intensidade mais fraca.



**Figura 3.18** - Otimização TTF-1 (Protocolo 3: Protocolo 3: RA = 8'; Hemat. = 4'; *Bluing* = 4') (Imagem da autora).

Tendo estes fatores em conta foi alterado o tempo de recuperação antigénica, de modo a compreender se a intensidade da imunomarcação se alterava. Ao observar a **figura 3.19** verificou-se, de facto, um aumento considerável relativamente à intensidade da imunomarcação.

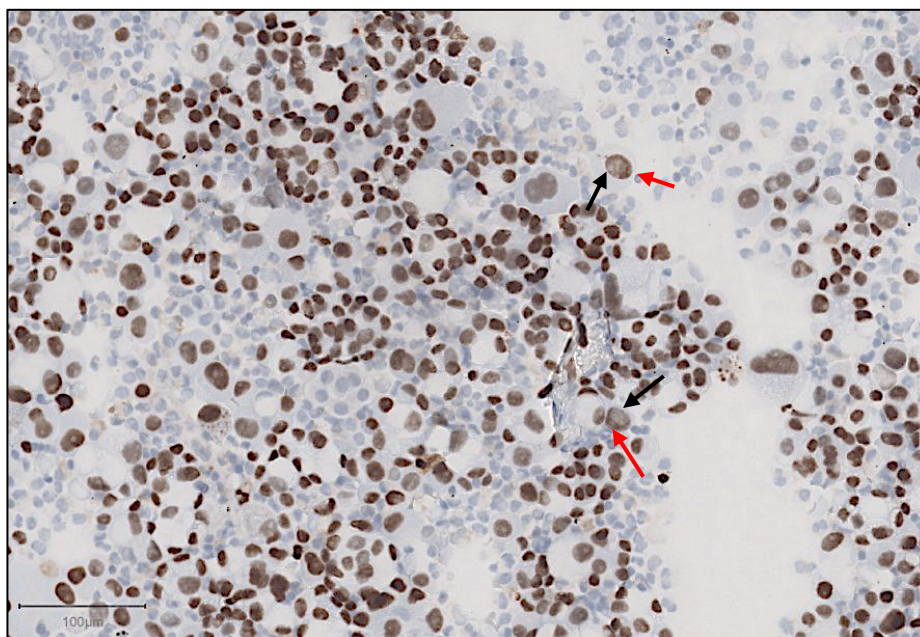


**Figura 3.19** - Otimização TTF-1 (Protocolo 4: RA = 20'; Hemat. = 4'; *Bluing* = 4'). **Legenda:** **Setas pretas** (Grupos celulares com intensidade de marcação mais forte); **Seta vermelha** (Grupo celular com intensidade mais fraca) (Imagem da autora).

Apesar de a imunomarcação não ser homogénea por campo (existiam grupos celulares com intensidade mais fraca e outros com intensidade mais forte), por campo, existiu um aumento na percentagem de células com intensidade mais forte comparativamente ao protocolo anterior. Mais uma vez, o contraste foi considerado fraco (relativamente à sua intensidade), pelo que se colocou em hipótese efetuar alterações quanto ao tempo de incubação de hematoxilina. Torna-se relevante mencionar que o tempo de recuperação antigénica foi mantido devido aos resultados acima apresentados.

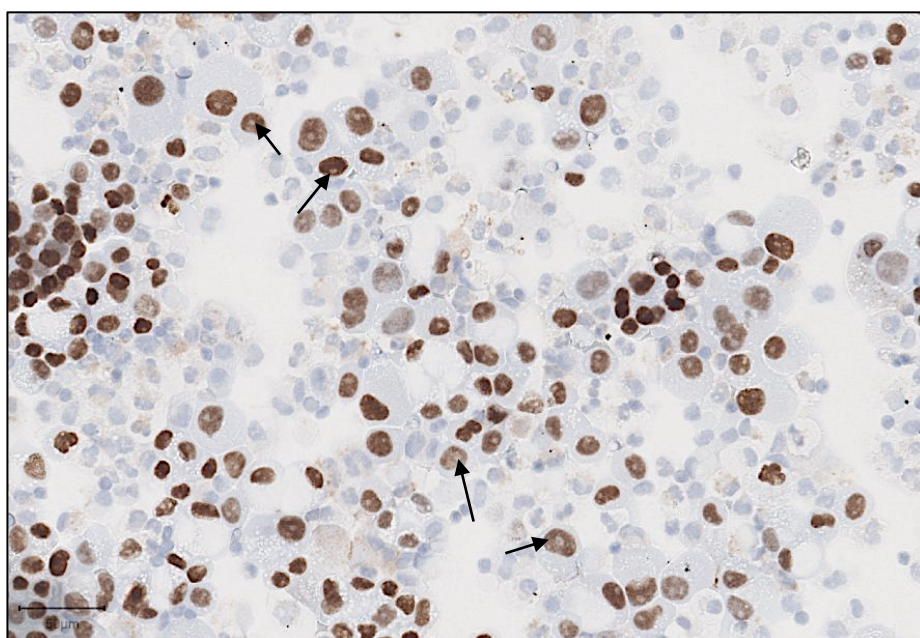
Após a alteração no tempo de incubação de hematoxilina foi obtida a lâmina representada pela **figura 3.20**. O tempo de hematoxilina foi aumentado para o dobro (passando de 4 para 8 minutos) e, verificou-se um aumento da intensidade do contraste. O facto de o contraste ter ficado mais forte, permitiu evidenciar a intensidade de marcação dos núcleos castanhos.

Sabendo que o protocolo PEG apresenta melhores resultados imunocitoquímicos que o protocolo MGG, neste caso, os resultados dos dois protocolos quase se assemelham. A intensidade de marcação tornou-se muito evidente e mais homogénea e, as alterações no contraste permitiram, de facto, um resultado imunocitoquímico muito melhor. Torna-se ainda relevante mencionar que dentro da própria célula, a imunomarcação é heterogénea, visto que é possível destacar alguns núcleos com marcação mais intensa (assinalado com setas vermelhas) em determinadas zonas do que outras (assinalados com setas pretas).



**Figura 3.20.** - Otimização TTF-1 (Protocolo 5: RA = 20'; Hemat. = 8'; *Bluing* = 4'). **Legenda:** Setas pretas (Zonas nucleares com imunomarcção de intensidade mais fraca); Setas vermelhas (Zonas nucleares com imunomarcção de intensidade mais forte) (Imagem da autora).

Como forma de avaliar qual a tolerância máxima das células, relativamente ao tempo de recuperação antigénica, foi elaborado mais um protocolo em que se mantiveram as condições acima mencionadas (relativamente ao tempo de hematoxilina), tendo sido somente alterado o tempo de recuperação antigénica de 20 para 36 minutos. Os resultados obtidos encontram-se na **figura 3.21**.



**Figura 3.21.** - Otimização TTF-1 (Protocolo 6: RA = 36'; Hemat. = 8'; *Bluing* = 4'). **Legenda:** Setas pretas (Marcas da perda da morfologia nuclear) (Imagem da autora).

Foram obtidos resultados razoáveis para a avaliação e interpretação do resultado imunocitoquímico, no entanto, verificou-se a presença de pequenas inclusões em alguns dos núcleos (entenda-se por inclusões, os pequenos espaços brancos arredondados em alguns dos núcleos,

assinalados pelas setas pretas), derivadas da perda da morfologia nuclear. Apesar de se ter verificado imunomarcação, a percentagem de células positivas foi relativamente menor comparada com a lâmina submetida ao protocolo anterior.

Avaliando estes resultados, assim como os parâmetros avaliados na qualidade da técnica foi escolhido o protocolo 5 como o que obteve melhores resultados.

### Otimização do soro pan-citoqueratina AE1/AE3

O soro pan-citoqueratina AE1/AE3, assim como o soro TTF-1, também sofreu algumas alterações no protocolo. Mais uma vez, foram realizadas alterações nas lâminas PEG como nas lâminas MGG. Os protocolos utilizados na rotina sofreram algumas modificações nomeadamente:

- Temperatura;
- Tempo de incubação de soro primário;
- Tempo de incubação do reagente *option*;

A descrição dos protocolos encontra-se no **Anexo 6**.

#### 3.5.4. Fase III: Validação de protocolos e controlo de qualidade

Nesta fase foram aplicados os protocolos otimizados na fase anterior às amostras previamente processadas e armazenadas. Para cada soro foram utilizadas dez amostras, cada uma com três tipos de lâminas: citobloco, PEG e MGG (**Tabela 3.5**).

Foram reunidas pelo menos 10 amostras para cada soro de modo aos protocolos poderem ser validados pelas normas do CAP (Fitzgibbons et al., 2014). Como mencionado anteriormente, em algumas das amostras não foi possível a realização de citobloco, pelo que foi utilizado como padrão alternativo, as amostras conservadas em PEG.

**Tabela 3.5.** - Tabela-resumo das amostras validadas.

Soro	Número de amostras	Tipo de amostras			Total de lâminas
		Citobloco	PEG	MGG	
<b>CD45</b>	10	n = 5	n = 10	n = 10	25
<b>TTF-1</b>	10	n = 4	n = 10	n = 10	24
<b>Pan-citoqueratina AE1/AE3</b>	10	n = 7	n = 10	n = 10	27
<b>Total de lâminas analisadas</b>					<b>76</b>

### 3.6. Avaliação das lâminas

As lâminas obtidas foram avaliadas em relação à qualidade técnica. Para proceder a esta avaliação, todas as lâminas foram observadas microscopicamente por três avaliadores independentes, que se regeram por uma grelha de classificação (Ferro, 2019) com os seguintes parâmetros (**Tabela 3.6**): preservação morfológica, intensidade de marcação, sensibilidade, especificidade e contraste.

A cada uma das lâminas foi atribuída uma pontuação final, de modo a avaliar a qualidade da lâmina a nível quantitativo e cada um dos parâmetros em estudo assumiu um fator de ponderação diferente.

No entanto, como é possível observar através da grelha de avaliação abaixo apresentada, a cada pontuação corresponde uma classificação qualitativa, pelo que a avaliação global será baseada na conversão das pontuações numéricas nas classificações qualitativas.

**Tabela 3.6.** - Grelha de avaliação utilizada para analisar os resultados da técnica ICQ (Ferro, 2019).

<b>Pontos</b>	<b>Preservação morfológica</b>	<b>Intensidade de marcação</b>	<b>Sensibilidade</b>	<b>Especificidade</b>	<b>Contraste</b>
<b>0</b>	Amostra não preservada, invalidada 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
<b>1</b>	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
<b>2</b>	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
<b>3</b>	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
<b>Fator de ponderação</b>	1	3	2	2	1

Para cada um dos soros foi verificada a interferência da coloração MGG na sensibilidade e especificidade do soro primário utilizado. Esta avaliação tornou-se possível pela utilização de lâminas-padrão que permitiram verificar a concordância e/ou discordância entre as lâminas-teste (coradas com MGG) e as lâminas-padrão (citobloco e PEG).

### **3.7. Tratamento Estatístico**

A análise estatística englobou a realização de estatística descritiva dos dados de cada um dos soros individualmente e a realização de testes não paramétricos. Primeiramente foi calculada uma pontuação final para cada uma das lâminas, tendo por base os pontos atribuídos relativamente à qualidade técnica, com a aplicação dos fatores de ponderação. As pontuações foram organizadas por

soro primário, assim como por protocolo (citobloco, PEG e MGG) e foi avaliada a normalidade da distribuição dos dados, através do teste *Shapiro-Wilk*.

Para que fosse possível o cálculo da sensibilidade e especificidade de cada um dos soros foi necessário comparar as amostras coradas com MGG com o padrão (citobloco e PEG). De modo a verificar a ausência de diferenças significativas entre os protocolos “citobloco” e “PEG” foi aplicado um teste não-paramétrico – teste de *Wilcoxon*. Tendo em conta a dimensão da amostra e, de forma a tornar os resultados mais robustos foi aplicado um fator de correção – fator de correção de FDR (razão de falsos positivos) - aos valores de *p-value* obtidos pelo teste de *Wilcoxon*. Deste modo foi possível compreender a influência da coloração MGG na imunomarcação através do cálculo da sensibilidade e especificidade de cada um dos soros.

A análise estatística do projeto foi realizada recorrendo ao *software R Studio 2021.09.0* e os gráficos recorrendo ao *software Microsoft Office Excel*. Os *scripts* elaborados encontram-se no **Anexo 7**.

## 4. Resultados

Os resultados são apresentados por soro primário (CD45, TTF-1 e pan-citoqueratina AE1/AE3), segundo a seguinte ordem:

1. Avaliação da qualidade técnica
2. Validação dos protocolos imunocitoquímicos
3. Avaliação da sensibilidade e especificidade do soro primário aplicado

### 4.1. CD45

#### 4.1.1. Avaliação da qualidade técnica

Foram realizadas 25 lâminas para o soro primário CD45, cuja distribuição se encontra na tabela abaixo (**Tabela 4.1**).

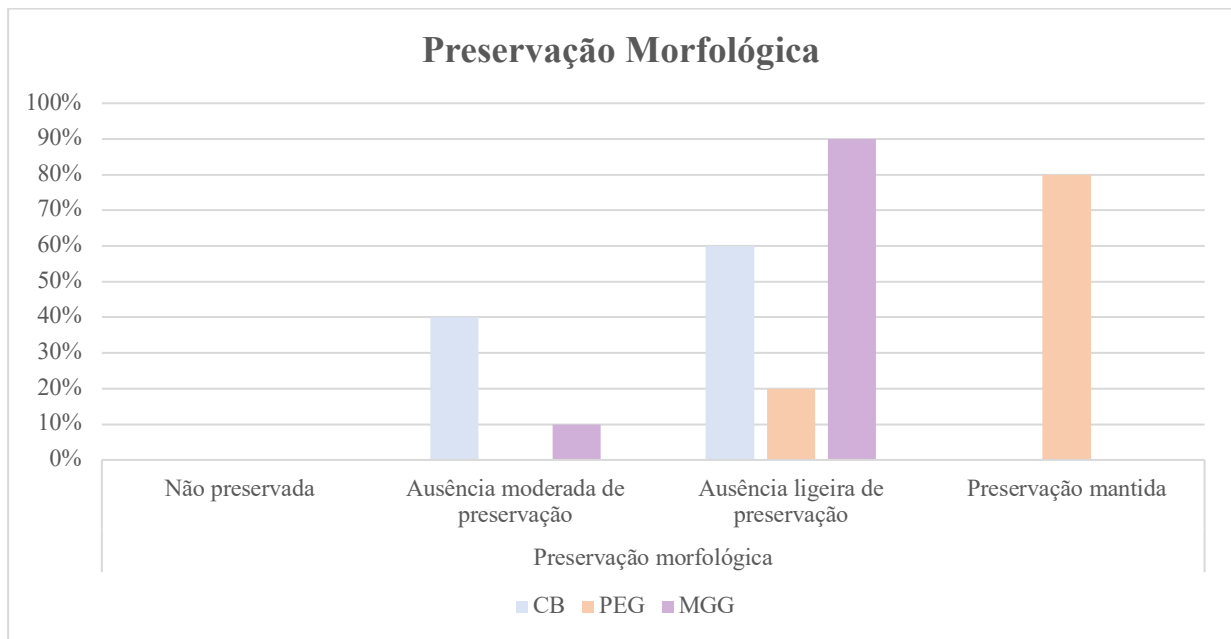
**Tabela 4.1** - Distribuição das lâminas pertencentes ao soro CD45 por protocolo.

	<i>N</i>
<b><i>Citobloco</i></b>	5
<b><i>PEG</i></b>	10
<b><i>MGG</i></b>	10
<b>Total</b>	<b>25</b>

As lâminas obtidas foram observadas microscopicamente por três avaliadores independentes e foram atribuídos pontos, numa escala de 0 a 3, segundo a grelha de classificação (Ferro, 2019) acima mencionada. No final, foi aplicado um fator de ponderação a cada um dos somatórios e foi obtido uma pontuação final (0-27), de modo a avaliar a qualidade técnica geral de cada uma das lâminas. Para cada um dos parâmetros analisados na grelha de classificação foi elaborado um gráfico de barras em que se observa a distribuição das lâminas pelas diferentes pontuações.

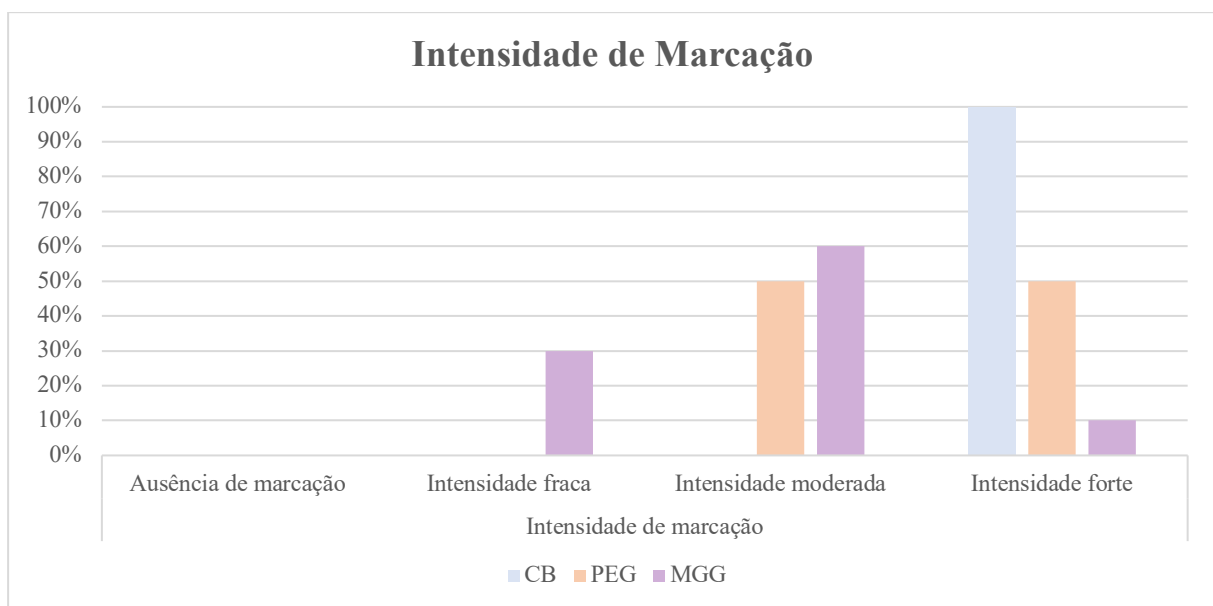
Na **figura 4.1** é possível verificar que nenhuma das amostras apresentou ausência total de preservação morfológica. Analisando por protocolo, é possível inferir que o protocolo que apresentou

melhores resultados de preservação morfológica foi o PEG, visto que as suas classificações se cingiram às duas pontuações mais elevadas da grelha de classificação.



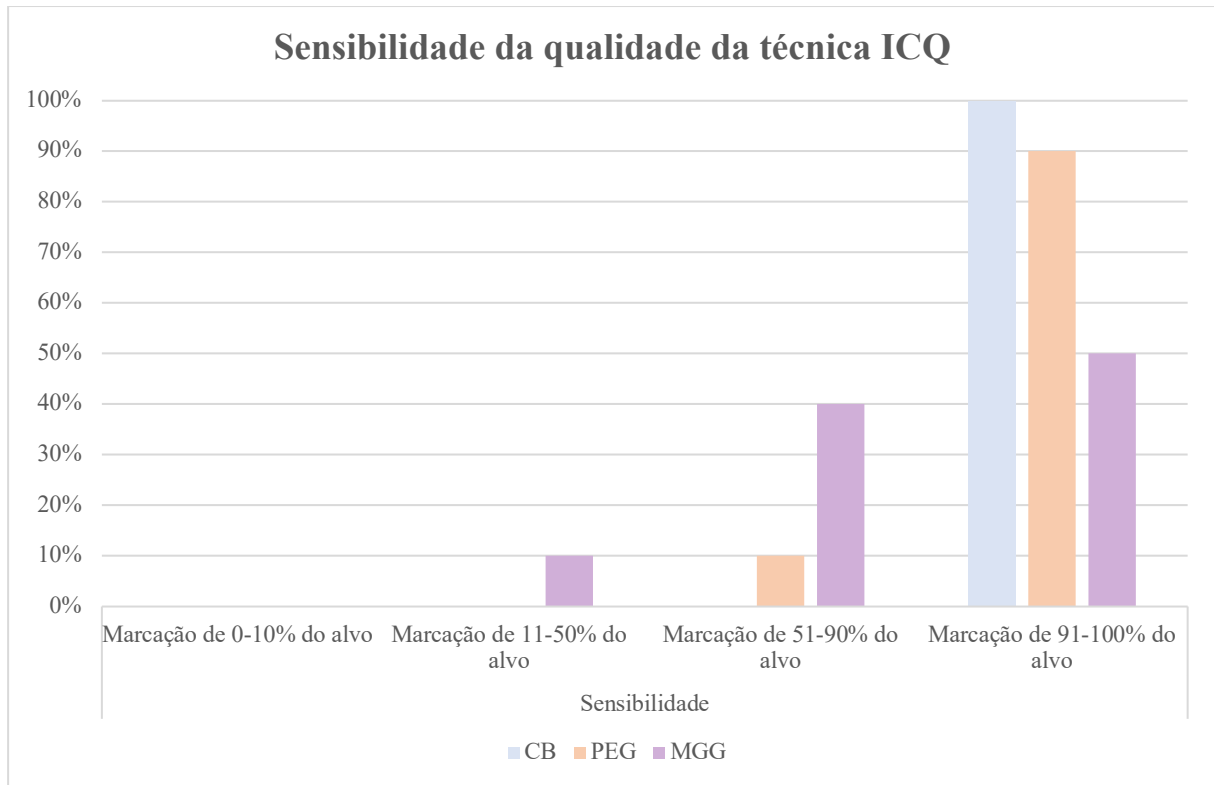
**Figura 4.1** - Preservação morfológica das lâminas pertencentes ao soro CD45.

Através da **figura 4.2** verifica-se que todas as lâminas obtidas através do citobloco apresentaram intensidade forte. Por outro lado, as lâminas MGG variaram entre intensidade fraca, moderada e forte, sendo que somente 10% ( $N = 1$ ) das amostras apresentaram intensidade forte.



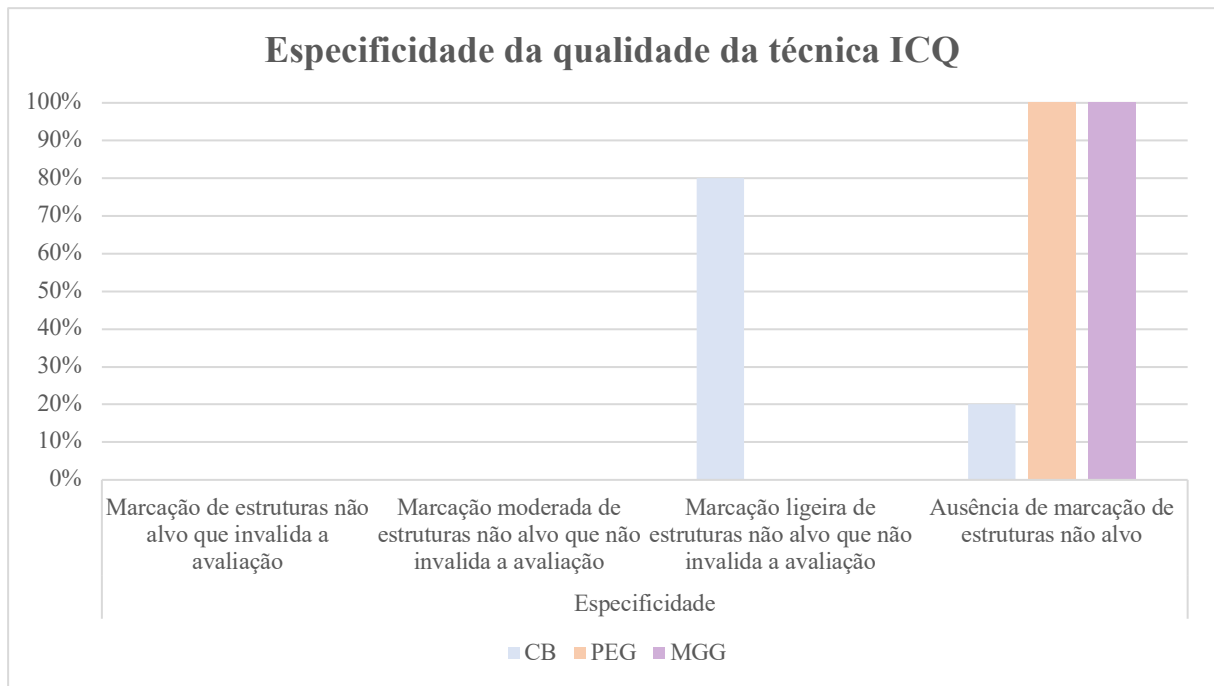
**Figura 4.2.** – Intensidade de marcação das lâminas pertencentes ao soro CD45.

Relativamente à sensibilidade da qualidade da técnica ICQ (**Figura 4.3**) é possível verificar que não se obteve nenhuma amostra com marcação de células alvo igual ou inferior a 10%. Mais de 50% das amostras totais apresentaram marcação de células alvo entre 91 e 100%.



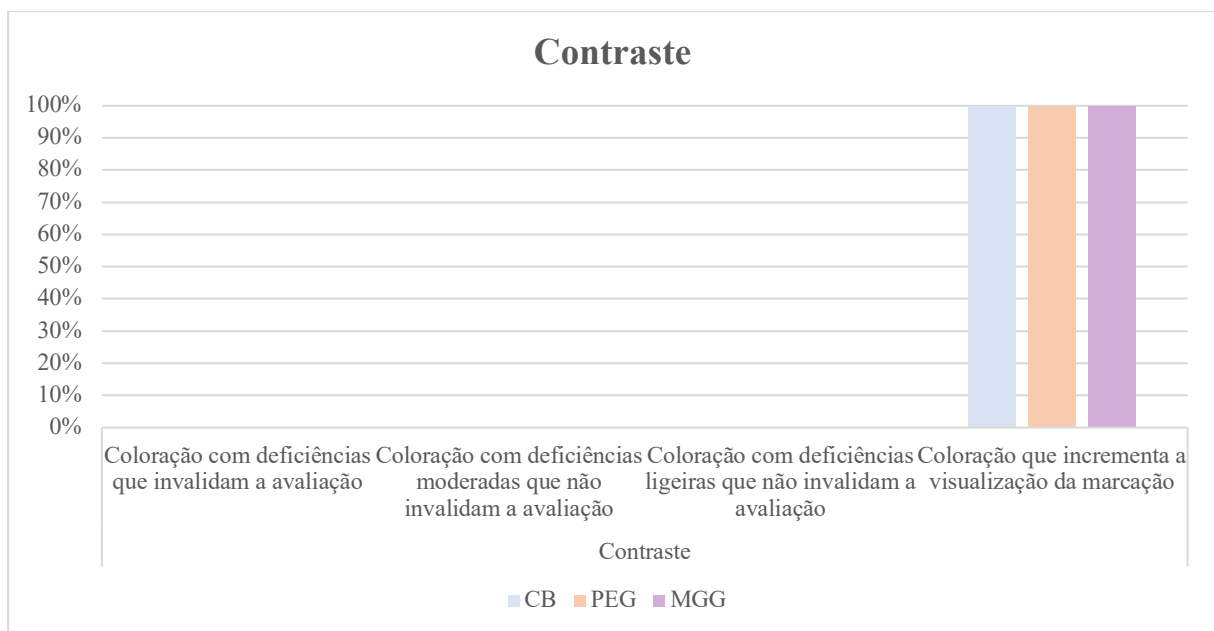
**Figura 4.3.** – Sensibilidade de marcação das lâminas pertencentes ao soro CD45, relativo à qualidade da técnica imunocitoquímica.

Tanto as lâminas PEG como MGG apresentaram pontuação máxima para a especificidade de marcação, não apresentando marcação de estruturas não alvo (**Figura 4.4**).



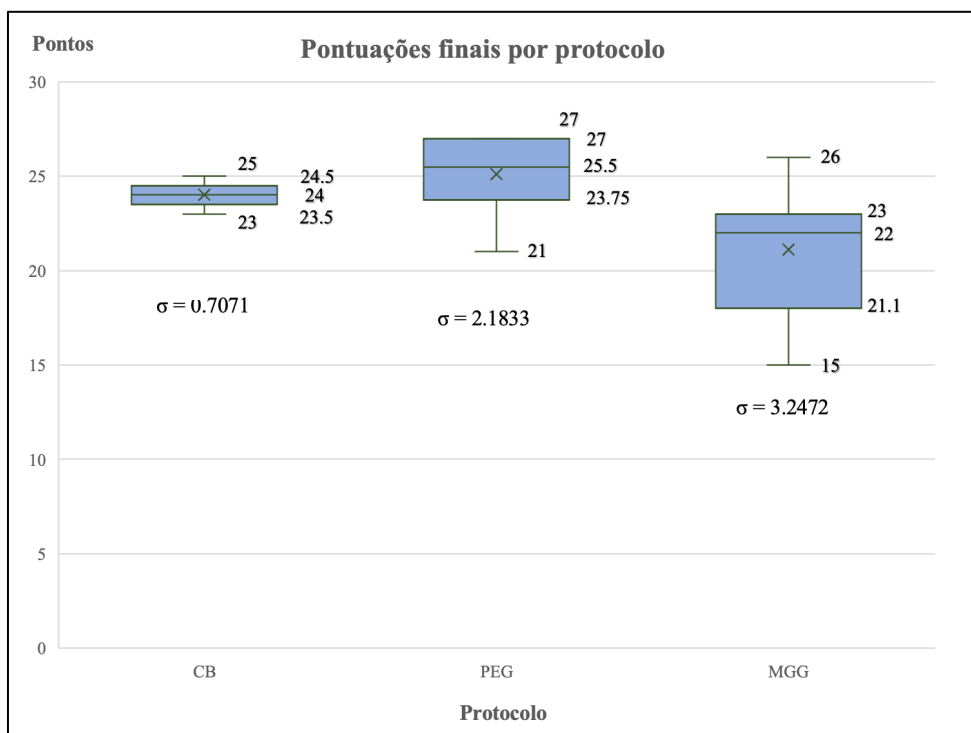
**Figura 4.4** - Especificidade de marcação das lâminas pertencentes ao soro CD45, relativo à qualidade da técnica imunocitoquímica.

Por fim, analisando o parâmetro “contraste” é possível inferir que 100% das lâminas de todos os protocolos apresentaram pontuação máxima (**Figura 4.5**).



**Figura 4.5.** - Contraste das lâminas pertencentes ao soro CD45.

De forma a avaliar a distribuição das pontuações finais (após a aplicação do fator de ponderação), foi realizado um gráfico de distribuição em caixa para cada um dos protocolos (**Figura 4.6**).



**Figura 4.6.** – Distribuição em caixa de cada um dos protocolos – soro CD45.

Analisando o gráfico acima verifica-se que o protocolo que apresentou maior valor de pontuação média foi o PEG, seguindo-se o citobloco e por fim o MGG. O protocolo MGG foi aquele que apresentou maior valor de desvio padrão, o que traduz a presença de resultados heterogêneos, relativamente à sua distribuição. Por oposição, as pontuações finais obtidas no protocolo do citobloco apresentaram menor variação entre elas. Relativamente às pontuações mínimas e máximas atingidas, o protocolo MGG apresentou o menor valor mínimo e, por outro lado, o protocolo PEG apresentou o maior valor máximo.

Foi testada a normalidade da distribuição dos dados, recorrendo ao teste *Shapiro-Wilk* (Tabela 4.2), sendo que se recorreu a este teste – teste não paramétrico – devido à dimensão da amostra ( $N = 25$ ). Os valores de *p-value* permitem rejeitar a hipótese nula nas lâminas pertencentes aos protocolos “Citobloco” e “MGG” ( $p\text{-value} > 0.05$ ), mas não nas lâminas sujeitas ao protocolo “PEG”.

**Tabela 4.2** - Teste de *Shapiro-Wilk* para os três protocolos utilizados.

	<i>W</i>	<i>p-value</i>
<b>Citobloco</b>	0.88349	0.3254
<b>PEG</b>	0.80863	0.01846
<b>MGG</b>	0.92184	0.3726

Na tabela 4.3 encontram-se os resultados dos testes de *Wilcoxon*, que permitem avaliar se há diferenças significativas entre as pontuações obtidas por cada par de protocolos (“Citobloco e PEG”; “Citobloco e MGG”; “PEG e MGG”). Analisando os valores de *p-value* verificam-se diferenças significativas entre os protocolos “Citobloco e MGG” assim como entre os protocolos “PEG e MGG”. Por oposição, não foram verificadas diferenças estatisticamente significativas entre os protocolos “Citobloco e PEG”.

**Tabela 4.3.** – Teste de *Wilcoxon* e aplicação de fator de correção FDR nos valores de *p-value*.

<b>Protocolos em comparação</b>	<b><i>W</i></b>	<b><i>p-value</i></b>	<b><i>p-value</i> após fator de correção</b>
<b><i>Citobloco/PEG</i></b>	17	0.3329	0.332900
<b><i>Citobloco/MGG</i></b>	43	0.02817	0.042255
<b><i>PEG/MGG</i></b>	12	0.003872	0.011616

#### **4.1.2. Validação dos protocolos imunocitoquímicos – CD45**

A **figura 4.7** reúne três (**4.7A**, **4.7B** e **4.7C**) campos microscópicos representativos de cada um dos protocolos, respetivamente, citobloco, PEG e MGG. Todas as figuras são representativas de um dos líquidos pleurais utilizados – amostra 1.

Na **figura 4.7A** observa-se uma percentagem relativa de células que apresentaram imunomarcação de intensidade forte. Apesar de a intensidade de marcação ser forte, torna-se relevante referir que algumas células pareceram apresentar não só marcação membranar, como também marcação citoplasmática. Isto poderá ser justificado por se tratar de amostras citológicas, nas quais as células não estão seccionadas (como na histologia), assim toda a superfície da célula marca.

Pode ainda verificar-se que em alguns grupos – nomeadamente o grupo central – não foi possível observar com clareza os limites de algumas das células que apresentam imunomarcação, pelo facto das células se encontrarem demasiado agrupadas, havendo assim sobreposição celular.

Relativamente à sensibilidade, verificou-se que todos os linfócitos apresentaram imunomarcação. Quanto à especificidade, observaram-se células mesoteliais que não expressaram CD45, o que está de acordo com o expectável. Por fim, relativamente ao contraste, é possível concluir que este se encontrou adequado, visto ser possível diferenciar as células positivas das negativas.

Analisando a lâmina PEG da mesma amostra (**Figura 4.7B**), verificou-se uma melhoria considerável relativamente à preservação morfológica. As células encontraram-se consideravelmente mais dispersas quando comparadas com o citobloco, no entanto a imunomarcação foi menos intensa. Por outro lado, nesta lâmina foi possível verificar com mais clareza a marcação membranar, contrariamente à lâmina correspondente ao citobloco.

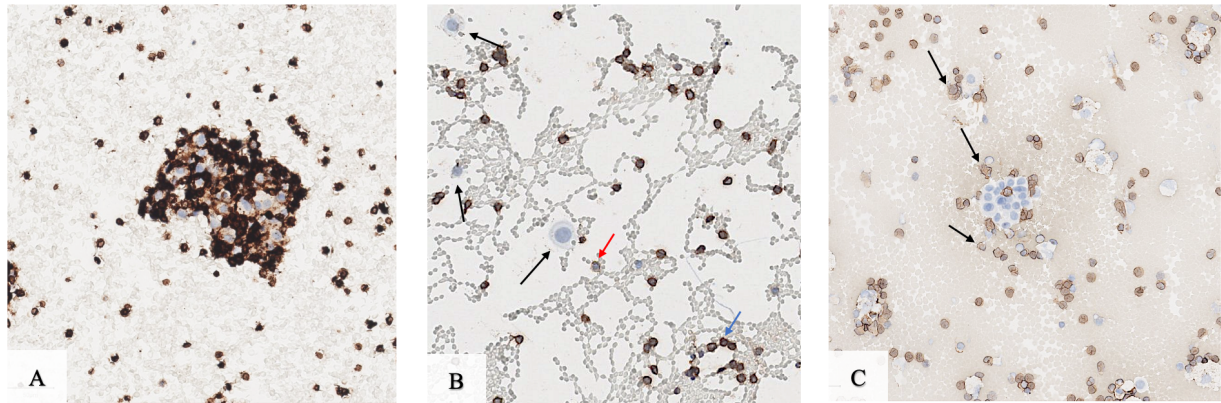
Verificam-se duas células mesoteliais neste campo (assinaladas com as setas pretas) que não expressaram CD45, o que mais uma vez, se encontra de acordo com o expectável. Desta forma, atribuiu-se ao parâmetro “especificidade” o valor máximo. O mesmo aconteceu para o parâmetro “sensibilidade”, visto haver expressão em todos os linfócitos presentes. Torna-se relevante mencionar que alguns linfócitos apresentaram imunomarcação mais fraca (célula representada pela seta vermelha) do que outros (células representadas pela seta azul). Pode assim afirmar-se que apesar de sensível, a imunomarcação para CD45 não é homogénea para todas as células.

Relativamente à lâmina MGG (**Figura 4.7C**) da amostra 1 é possível inferir que esta, das três, foi a que apresentou menor pontuação. Uma das particularidades que se destacou foi a presença de um fundo hemático mais evidente, quando comparado com as duas lâminas acima descritas. No entanto, a presença deste não invalidou a avaliação da lâmina nem a interpretação dos resultados imunocitoquímicos.

Verificaram-se vários grupos de células mesoteliais com ausência de imunomarcação, o que permitiu atribuir o valor máximo no parâmetro “especificidade”. Por outro lado, as células positivas – linfócitos – apresentaram expressão para CD45 sendo que, mais uma vez, a imunomarcação foi

considerada heterogênea. Como mencionado anteriormente, considera-se a imunomarcção heterogênea visto que existiram células com imunomarcção mais forte do que outras.

Por fim, analisando a preservação morfológica, as células encontraram-se menos bem preservadas quando comparadas com as da lâmina PEG. Isto porque algumas das células (assinaladas com setas pretas) se encontravam lisadas ou com perda da morfologia original.

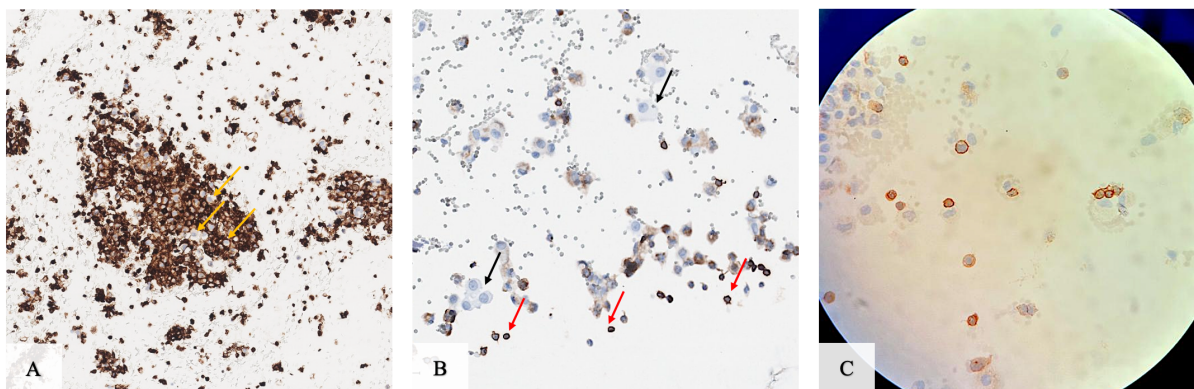


**Figura 4.7.** –Amostra 1: Líquido pleural. **4.7A:** Lâmina citobloco (Pontuação = 24); **4.7B:** Lâmina PEG (Pontuação = 27); **4.7C:** Lâmina MGG (Pontuação = 23). **Legenda:** **4.7B (Setas pretas:** células mesoteliais; **Seta vermelha:** linfócito com intensidade de marcação mais fraca; **Seta azul:** conjunto de linfócitos com intensidade de marcação mais forte); **4.7C (Setas pretas:** células lisadas ou com perda da morfologia original) (Imagem da autora).

À semelhança da amostra 1, também na lâmina obtida a partir do citobloco (**Figura 4.8A**) da amostra 2 se observou uma elevada percentagem de células com imunomarcção de intensidade forte. Quanto à preservação morfológica, também na amostra 2, as células apresentaram uma ausência moderada da preservação que não invalidou a avaliação. Por fim, verificou-se que as células alvo (linfócitos) apresentaram marcação, contrariamente às células não alvo (células de núcleo azul no interior do grupo central – assinalado com setas vermelhas). Deste modo, tanto a sensibilidade como a especificidade nesta lâmina obtiveram pontuação máxima.

A lâmina PEG da amostra 2 (**Figura 4.8B**) apresentou células-alvo com imunomarcção de intensidade moderada (assinaladas pela seta vermelha) e células não-alvo com ausência de marcação (células mesoteliais – assinaladas pelas setas pretas). As células apresentaram ausência ligeira de preservação morfológica no entanto, comparativamente à amostra A, apresentaram uma melhor preservação morfológica.

Por fim, a lâmina MGG da amostra 2 encontra-se representada na **figura 4.8C**. As células encontram-se com ausência ligeira de preservação morfológica, no entanto, com marcação de intensidade moderada. Os parâmetros “sensibilidade”, “especificidade” e “contraste” apresentaram pontuação máxima. A pontuação global da lâmina MGG foi a mesma que a lâmina PEG.



**Figura 4.8.** – Amostra 2: Líquido pleural. **4.8A:** Lâmina citobloco (Pontuação = 25); **4.8B:** Lâmina PEG (Pontuação = 23); **4.8C:** Lâmina MGG (Pontuação = 23). **Legenda:** **4.8A** (Setas amarelas: células não alvo); **4.8B** (Setas pretas: células não alvo; Setas vermelhas: células alvo) (Imagem da autora).

### 4.1.3. Avaliação da sensibilidade e especificidade de diagnóstico – CD45

A avaliação da sensibilidade e especificidade foi realizada através da observação microscópica das lâminas por três avaliadores independentes, sendo que o diagnóstico foi validado por uma médica anatomopatologista. Foram analisadas todas as lâminas, sendo que os pontos fulcrais da análise incidiram nas células positivas e negativas para o antígeno. Desta forma foi possível calcular tanto a sensibilidade como a especificidade.

Analisando a tabela abaixo apresentada (**Tabela 4.4**), é possível inferir que 100% das lâminas foram consideradas como positivas para CD45.

**Tabela 4.4.** - Avaliação dos controles positivos e negativos da lâmina e respetivo diagnóstico.

<i>Protocolo</i>	<i>Controlo Positivo</i>		<i>Controlo Negativo</i>		<i>Diagnóstico</i>	
	<i>Positivo</i>	<i>Negativo</i>	<i>Positivo</i>	<i>Negativo</i>	<i>Positivo</i>	<i>Negativo</i>
<b>CB</b>	5	0	0	5	5	0
<b>PEG</b>	10	0	0	10	10	0
<b>MGG</b>	10	0	0	10	10	0

De modo a comparar o impacto da coloração MGG nas lâminas sujeitas a ICQ, foram comparados os protocolos “MGG” com os protocolos padrão (citobloco e PEG). Foram utilizados como padrão os protocolos citobloco e PEG, visto não ter havido diferenças significativas entre as pontuações globais de ambos, nem discrepâncias entre os resultados de cada amostra. Assim, foi possível o cálculo da sensibilidade e especificidade, isto é, foi possível avaliar o impacto que a coloração MGG possui na sensibilidade e especificidade no soro CD45.

Através da **tabela 4.5** verifica-se que tanto a sensibilidade como a especificidade do soro CD45 foram de 100%, uma vez que todas as lâminas coradas com MGG positivas, foram positivas nas lâminas-padrão, assim como todas as lâminas negativas (MGG) foram negativas nas lâminas-padrão.

**Tabela 4.5** - Tabela de cálculo de sensibilidade e especificidade de diagnóstico do soro CD45.

		<b>Padrão (Citobloco e PEG)</b>	
		<i>Positivos</i>	<i>Negativos</i>
<b>Resultado ICQ das lâminas coradas com MGG</b>	<i>Positivo</i>	10	0
	<i>Negativo</i>	0	10

## 4.2. TTF-1

Foram realizadas 24 lâminas para o soro primário TTF-1, cuja distribuição se encontra na tabela abaixo (**Tabela 4.6**).

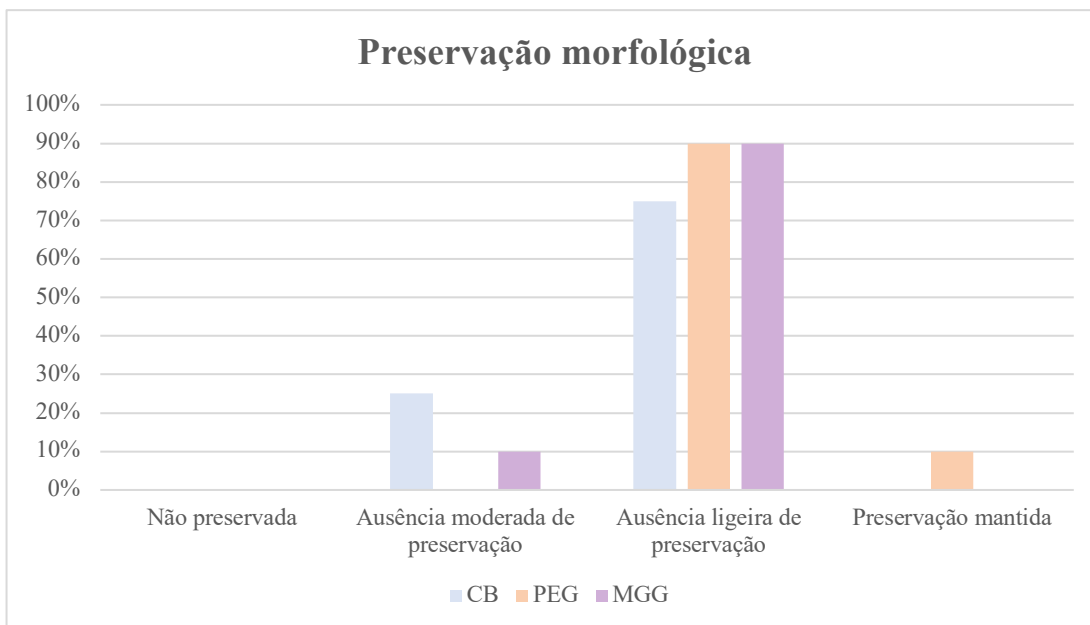
**Tabela 4.6** - Distribuição das lâminas pertencentes ao soro TTF-1 por protocolo.

	<i>N</i>
<b><i>Citobloco</i></b>	4
<b><i>PEG</i></b>	10
<b><i>MGG</i></b>	10
<b>Total</b>	<b>24</b>

### 4.2.1. Avaliação da qualidade técnica – TTF-1

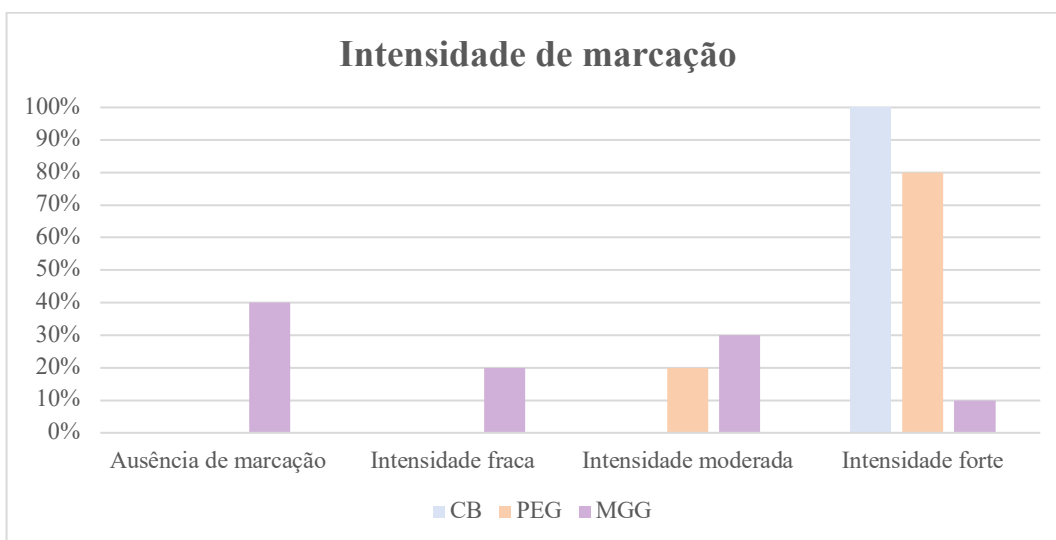
As lâminas obtidas foram observadas microscopicamente e a cada uma delas foram atribuídas pontuações finais. Para cada um dos parâmetros analisados na grelha de classificação foi elaborado um gráfico de barras em que se observa a distribuição das lâminas pelas diferentes pontuações.

Na **figura 4.9** estão representados os resultados obtidos relativamente ao parâmetro “preservação morfológica”. Das 24 lâminas totais, 87.5% foram classificadas como “ausência ligeira de preservação morfológica”.



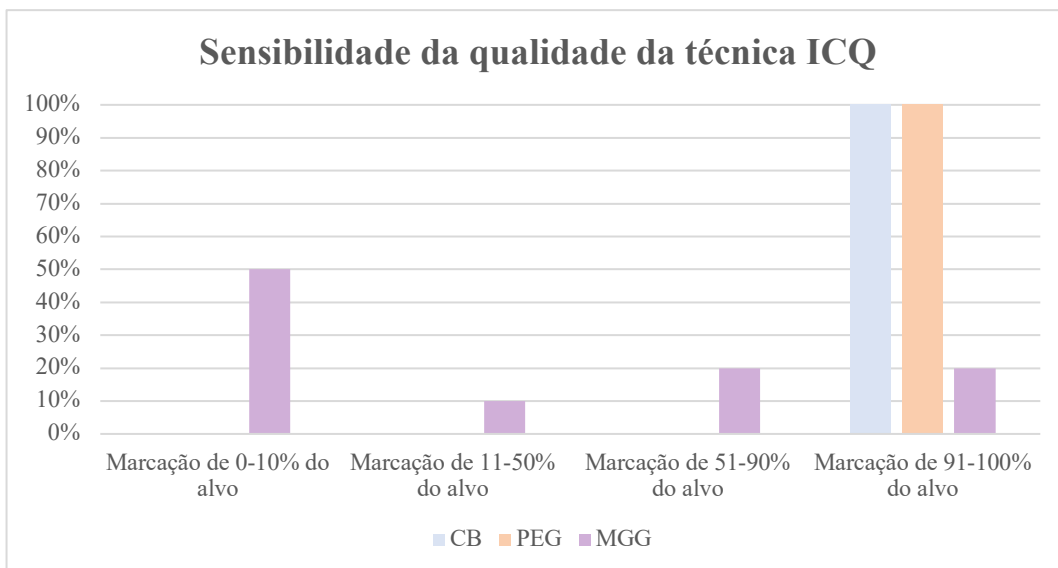
**Figura 4.9.** – Preservação morfológica das lâminas pertencentes ao soro TTF-1.

Relativamente à intensidade (**Figura 4.10**), verificou-se uma ampla distribuição das classificações deste parâmetro. O protocolo MGG enquadrou-se em todas as classificações, sendo que atingiu a classificação máxima em 10% das lâminas ( $N = 1$ ) e 40% delas ( $N = 4$ ) não apresentaram marcação.



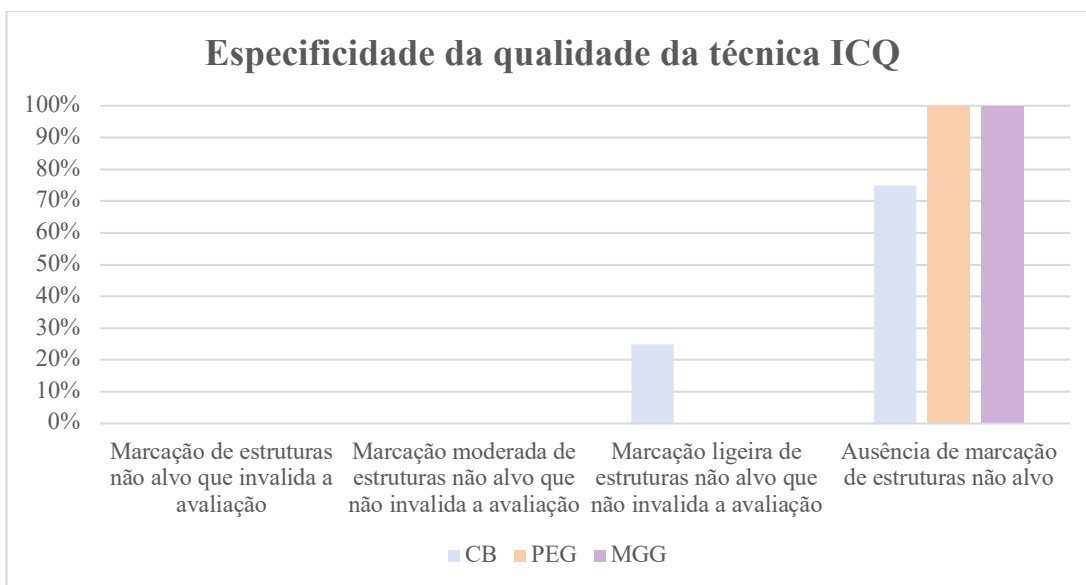
**Figura 4.10.** - Intensidade de marcação das lâminas pertencentes ao soro TTF-1.

O parâmetro sensibilidade (**Figura 4.11**) foi um dos mais afetados na avaliação da qualidade técnica das lâminas MGG. Neste protocolo verificou-se uma percentagem de células-alvo marcadas inferior a 10%, em 50% das lâminas totais ( $N = 5$ ). Os restantes protocolos assumiram pontuação máxima em todas as lâminas.



**Figura 4.11.** – Sensibilidade das lâminas pertencentes ao soro TTF-1, relativo à qualidade da técnica imunocitoquímica.

Analisando o parâmetro da especificidade (**Figura 4.12**), verificou-se que 95.8% das lâminas foram avaliadas com a classificação máxima.



**Figura 4.12.** - Especificidade das lâminas pertencentes ao soro TTF-1, relativo à qualidade da técnica imunocitoquímica.

Por fim, analisando o parâmetro do contraste (**Figura 4.13**), 100% das lâminas obtidas pelo citobloco foram avaliadas com a classificação máxima.

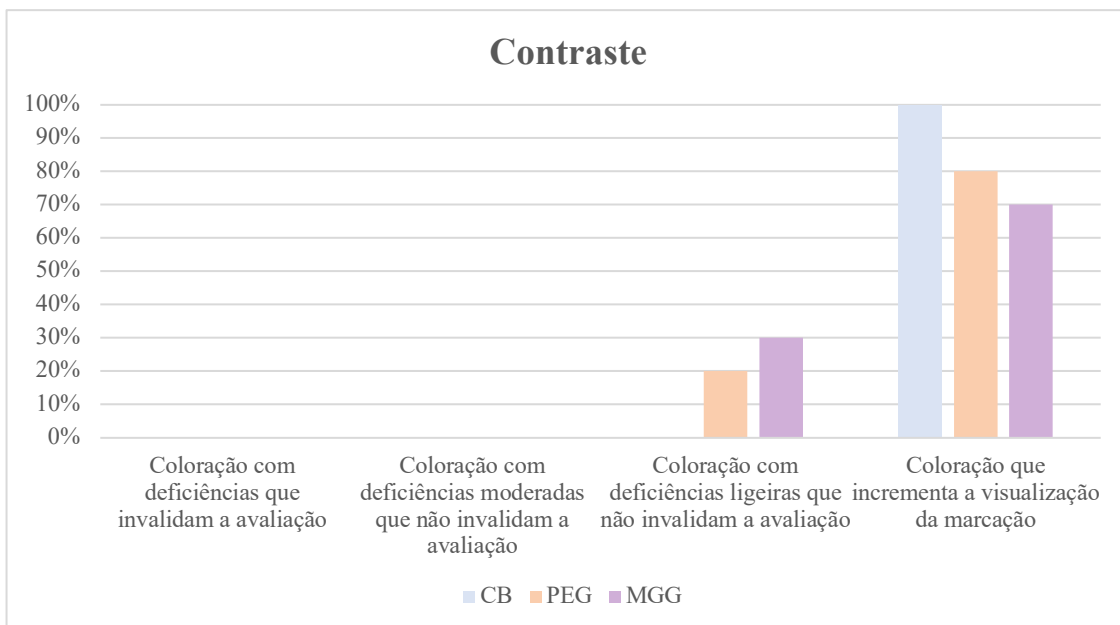


Figura 4.13. – Contraste das lâminas pertencentes ao soro TTF-1.

A figura 4.14 permite inferir que protocolo que apresentou maior valor de pontuação média foi o PEG (25.3 pontos), seguindo-se o citobloco (com uma diferença de somente 0.05 pontos) e, por fim o MGG (16.1 pontos). Mais uma vez, o protocolo MGG foi aquele que apresentou maior valor de desvio padrão, o que retrata a presença de resultados heterogêneos, relativamente à sua distribuição. Por oposição, as pontuações finais obtidas no citobloco foram as que apresentaram menor variação entre elas. Relativamente às pontuações mínimas e máximas atingidos, o protocolo MGG apresentou o menor valor mínimo e, por outro lado, o PEG apresentou o maior valor máximo, assim como sucedeu no soro primário CD45.

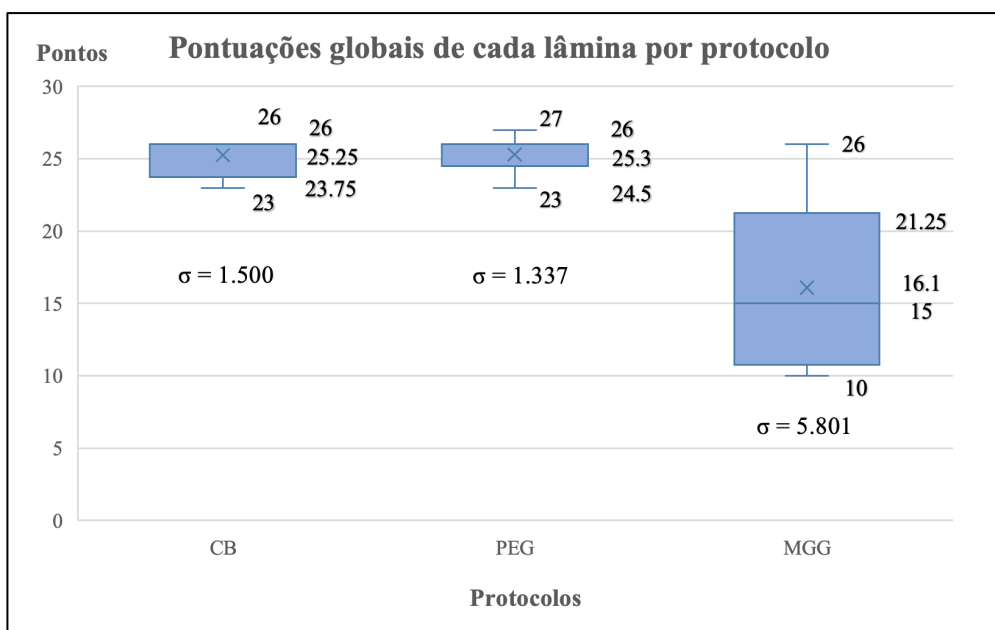


Figura 4.14. - Distribuição em caixa de cada um dos protocolos - Soro TTF-1.

Foi analisada a distribuição dos dados, recorrendo ao teste *Shapiro-Wilk* (Tabela 4.7). Analisando os valores de *p-value* é possível inferir que as pontuações obtidas com o protocolo MGG não diferem significativamente de uma distribuição normal (*p-value* > 0.05), contrariamente ao protocolo do citobloco e PEG.

**Tabela 4.7** - Teste de *Shapiro-Wilk* para os três protocolos utilizados.

	<i>W</i>	<i>p-value</i>
<b><i>Citobloco</i></b>	0.6298	0.001241
<b><i>PEG</i></b>	0.8134	0.0211
<b><i>MGG</i></b>	0.8940	0.1881

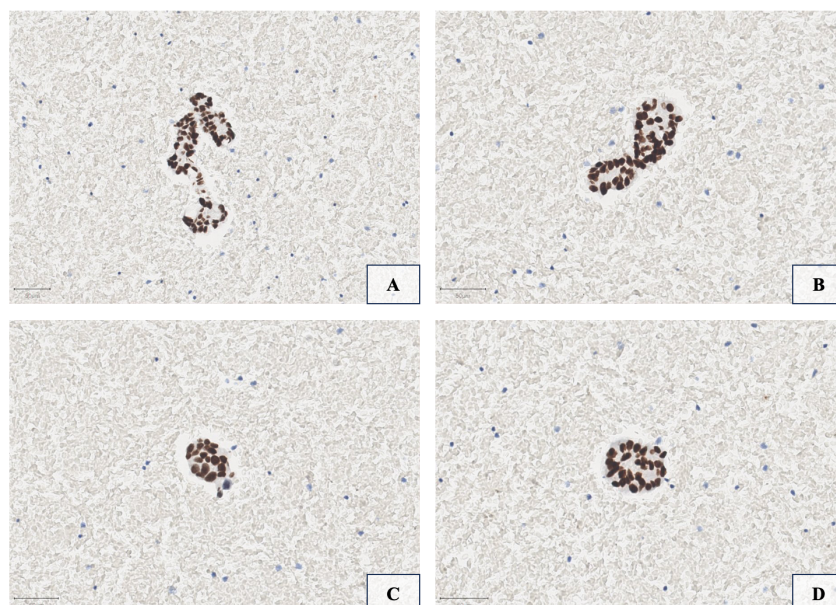
Na **tabela 4.8** encontram-se os resultados dos testes de *Wilcoxon*, usados para testar se existem diferenças significativas entre cada par de pontuações globais obtidas para cada protocolo (“Citobloco e PEG”; “Citobloco e MGG”; “PEG e MGG”). Analisando os valores de *p-value* verificaram-se diferenças significativas entre os protocolos “Citobloco e MGG” assim como entre os protocolos “PEG e MGG”. Por oposição, não foram verificadas diferenças estatisticamente significativas entre os protocolos “Citobloco e PEG”.

**Tabela 4.8.** – Teste de *Wilcoxon* e aplicação de fator de correção nos valores de *p-value*.

<b>Protocolos em comparação</b>	<i>W</i>	<i>p-value</i>	<i>p-value</i> após fator de correção
<b><i>Citobloco/PEG</i></b>	20.5	1.000	1.000
<b><i>Citobloco/MGG</i></b>	37.5	0.01483	0.02224
<b><i>PEG/MGG</i></b>	6.5	0.0009695	0.002908

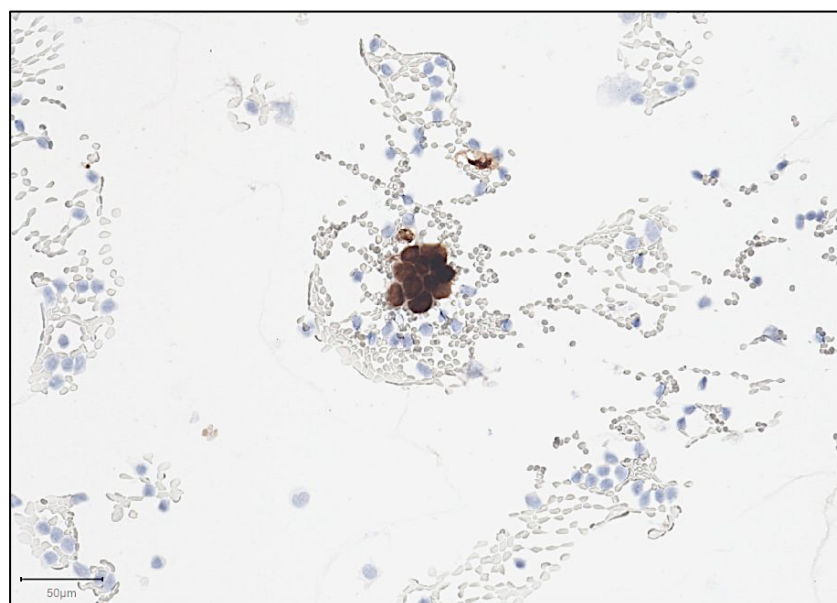
#### **4.2.2. Validação dos protocolos imunocitoquímicos – TTF-1**

A **figura 4.15** ilustra uma das amostras obtidas com o soro TTF-1, mais especificamente a lâmina do citobloco. Como é possível observar, existe um fundo hemorrágico acompanhado da presença de alguns linfócitos (células azuis). No centro de cada uma das figuras (**4.15A**, **4.15B**, **4.15C** e **4.15D**) verificam-se agregados celulares com a presença de imunomarcagem de intensidade forte.



**Figura 4.15.** - Amostra 1: Lâmina citobloco (Pontuação = 26) (Imagem da autora).

Na **figura 4.16** é possível observar os resultados obtidos na lâmina PEG da amostra 1. Verificaram-se pequenos agrupamentos celulares com presença de marcação ao longo de toda a lâmina, semelhantes ao apresentado neste campo. A intensidade de marcação era forte à semelhança da lâmina do citobloco.



**Figura 4.16** - Amostra 1: Lâmina PEG (Pontuação = 26) (Imagem da autora).

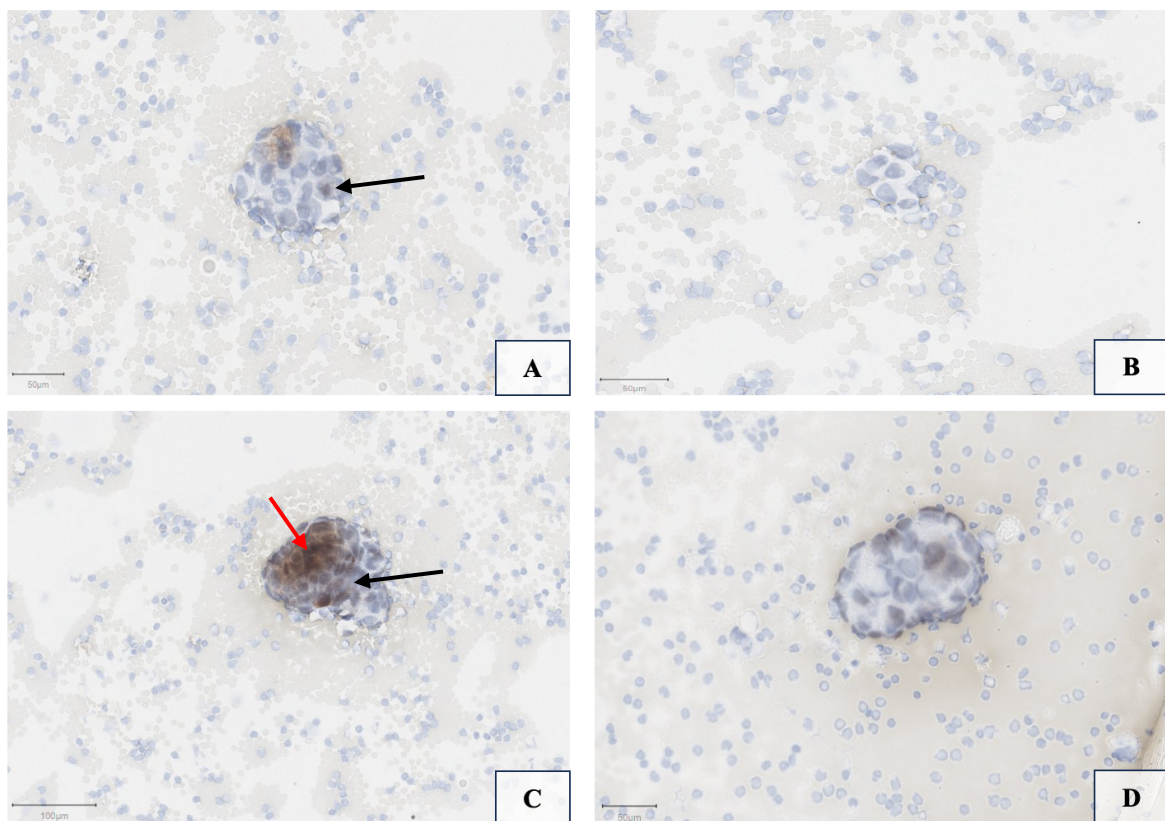
A **figura 4.17** ilustra a heterogeneidade da imunomarcção no protocolo MGG. Todos os grupos celulares representados na figura (**4.17A**, **4.17B**, **4.17C** e **4.17D**) são representativos de células com aspectos citológicos compatíveis com malignidade. Esta amostra possuía como diagnóstico adenocarcinoma do pulmão, que possui como características celulares a formação de agregados celulares e um aumento da relação núcleo/citoplasma.

Tanto na **figura 4.17A** como na **figura 4.17B**, observa-se um agregado celular com ausência de imunomarcção, no entanto, como foi mencionado anteriormente, as células são consideradas como sendo células-alvo, pelo que deveriam apresentar imunomarcção. Na figura 4.17A verifica-se a

presença de um núcleo (assinalado com a seta preta) que parece apresentar imunomarcacão focal, no entanto, ao observar microscopicamente e utilizando o parafuso micrométrico é perceptível que se trata de uma sobreposição nuclear. A figura 4.17B também não apresenta qualquer marcação, sendo que é visível que se trata de um agregado celular que deveria expressar TTF-1, devido às suas características celulares.

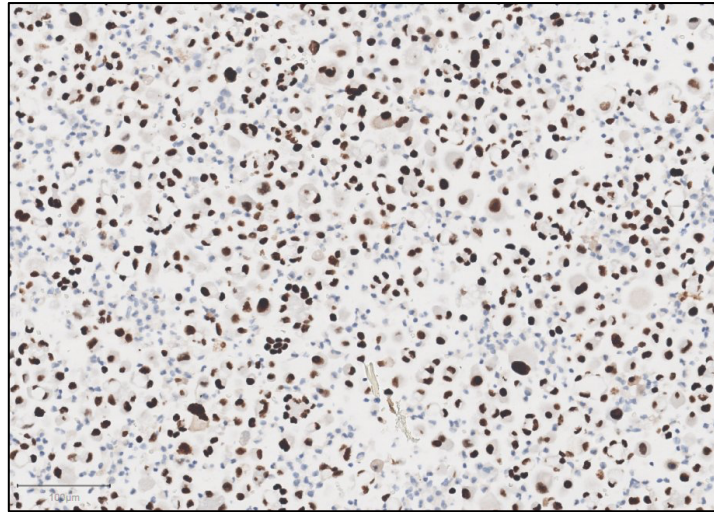
Nas figuras 4.17C e 4.17D observa-se imunomarcacão, apesar de as percentagens e intensidades de marcação serem diferentes. Na figura 4.17C verifica-se imunomarcacão num pequeno grupo de células (assinalado com a seta preta), sendo esta focal. Por outro lado, no mesmo agregado celular existe uma zona de marcação inespecífica (assinalado com a seta vermelha) que se pode confundir com marcação específica devido às características celulares, no entanto, o facto de não ser uma marcação nuclear permite diferenciar este tipo de marcação. Por fim, analisando a figura 4.17D, verifica-se também nesta um agregado celular com células que expressam TTF-1, existindo núcleos centrais que apresentam marcação focal e, por outro lado, núcleos que se moldam à periferia do agregado celular.

Nesta amostra é possível verificar a heterogeneidade de marcação do soro TTF-1 na mesma lâmina, tendo sido verificado grupos celulares com presença e ausência de imunomarcacão. Desta forma é possível inferir que na mesma lâmina o tipo de imunomarcacão difere entre grupos celulares. Os resultados imunocitoquímicos no soro TTF-1 foram heterogêneos, como foi possível verificar na amostra anteriormente apresentada. No entanto, nem todas as amostras se comportaram da mesma forma, pelo que foi selecionada mais uma amostra para demonstrar a diversidade de resultados.



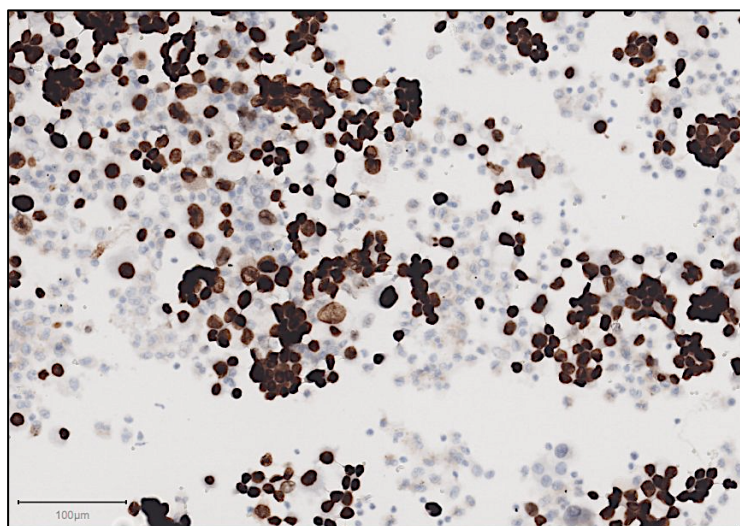
**Figura 4.17.** - Amostra 1: Lâmina MGG (Pontuação = 14). **Legenda:** 4.17A (Seta preta: sobreposição nuclear que se assemelha a imunomarcacão focal); 4.17C (Seta preta: conjunto de células que apresenta imunomarcacão; Seta vermelha: marcação inespecífica) (Imagem da autora).

A **figura 4.18** representa mais uma das amostras obtidas para o soro TTF-1, mais concretamente a lâmina obtida pelo citobloco. A intensidade de marcação apresentou-se forte. O contraste permitiu uma avaliação adequada da lâmina em estudo.



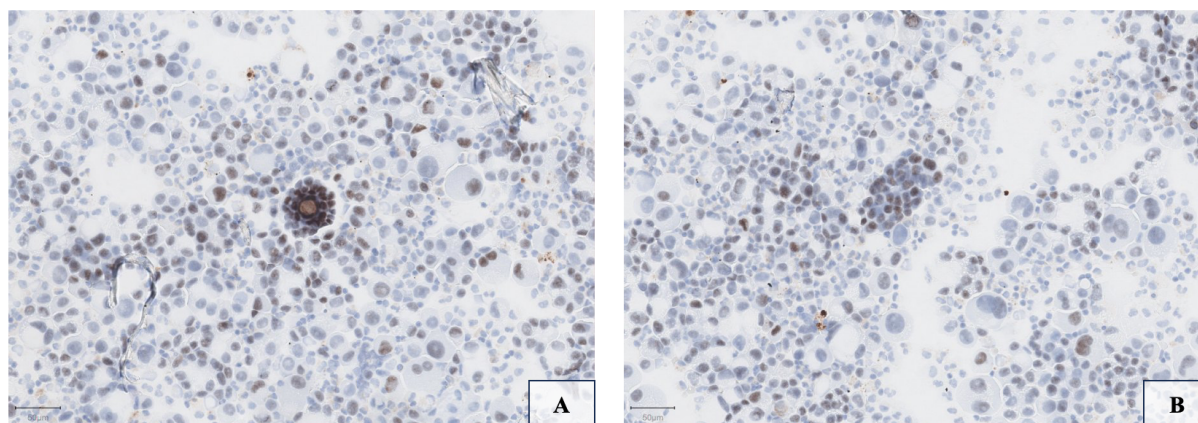
**Figura 4.18.** - Amostra 2: Lâmina citobloco (Pontuação = 26) (Imagem da autora).

A **figura 4.19** representa a lâmina PEG da amostra 2, que obteve a pontuação global máxima. Verificou-se a presença de preservação morfológica das células, acompanhada de intensidade de marcação forte. Observaram-se células não-alvo com ausência de expressão de TTF-1, como expectável, e, por outro lado uma percentagem elevada de células-alvo com imunomarcação. Esta foi a amostra em que a lâmina PEG obteve a melhor avaliação global.



**Figura 4.19.** - Amostra 2: Lâmina PEG (Pontuação = 27) (Imagem da autora).

Por fim, analisando a lâmina MGG da amostra 2, verificou-se através da **figura 4.20** que os resultados diferiram da amostra anteriormente apresentada. Nesta amostra verificou-se uma percentagem de células-alvo que expressam o antígeno TTF-1 mais elevada (entre 51% a 90%) comparativamente à amostra 1.



**Figura 4.20.** - Amostra 2: Lâmina MGG (Pontuação = 20) (Imagem da autora).

Em resumo, verificou-se que as lâminas obtidas no soro TTF-1 apresentaram diversidade de resultados imunocitoquímicos, no entanto as alterações realizadas no protocolo das lâminas PEG foi homogêneo em todas as amostras. O mesmo não aconteceu no protocolo MGG.

### 4.2.3. Avaliação da sensibilidade e especificidade de diagnóstico – TTF-1

Analisando a **tabela 4.9**, é possível inferir que para o soro TTF-1 foram obtidas amostras com discrepâncias entre protocolos. Foram verificadas 6 discrepâncias entre protocolos, sendo que existiu marcação nos protocolos citobloco e PEG e, ausência de marcação no protocolo MGG.

**Tabela 4.9** - Avaliação da sensibilidade, especificidade e diagnóstico das lâminas.

<i>Protocolo</i>	<i>Controlo Positivo</i>		<i>Controlo Negativo</i>		<i>Diagnóstico</i>	
	<i>Positivo</i>	<i>Negativo</i>	<i>Positivo</i>	<i>Negativo</i>	<i>Positivo</i>	<i>Negativo</i>
<b>CB</b>	4	0	0	4	4	0
<b>PEG</b>	10	0	0	10	10	0
<b>MGG</b>	4	6	0	10	4	6

Para verificar o impacto da coloração MGG na ICQ, comparámos os protocolos MGG com os protocolos-padrão (citobloco e PEG). Foram utilizados como padrão os protocolos citobloco e/ou PEG, visto não ter havido diferenças significativas entre as pontuações globais de ambos. Assim, foi possível o cálculo da sensibilidade e especificidade, isto é, foi possível avaliar o impacto que a coloração MGG possui na sensibilidade e especificidade.

Através da **tabela 4.10** verificou-se que a sensibilidade do soro TTF-1 foi de 40% e a especificidade de 100%. Verificou-se que a coloração MGG afeta de forma significativa a sensibilidade do soro TTF-1, no entanto, a especificidade não é afetada.

**Tabela 4.10.** - Tabela de cálculo de sensibilidade e especificidade de diagnóstico do soro TTF-1.

		<b>Padrão (Citobloco e PEG)</b>	
		<i>Positivos</i>	<i>Negativos</i>
<b>Resultado ICQ das lâminas coradas com MGG</b>	<i>Positivo</i>	4	0
	<i>Negativo</i>	6	10

### **4.3. Pan-citoqueratina AE1/AE3**

#### **4.3.1. Avaliação da qualidade técnica – Pan-citoqueratina AE1/AE3**

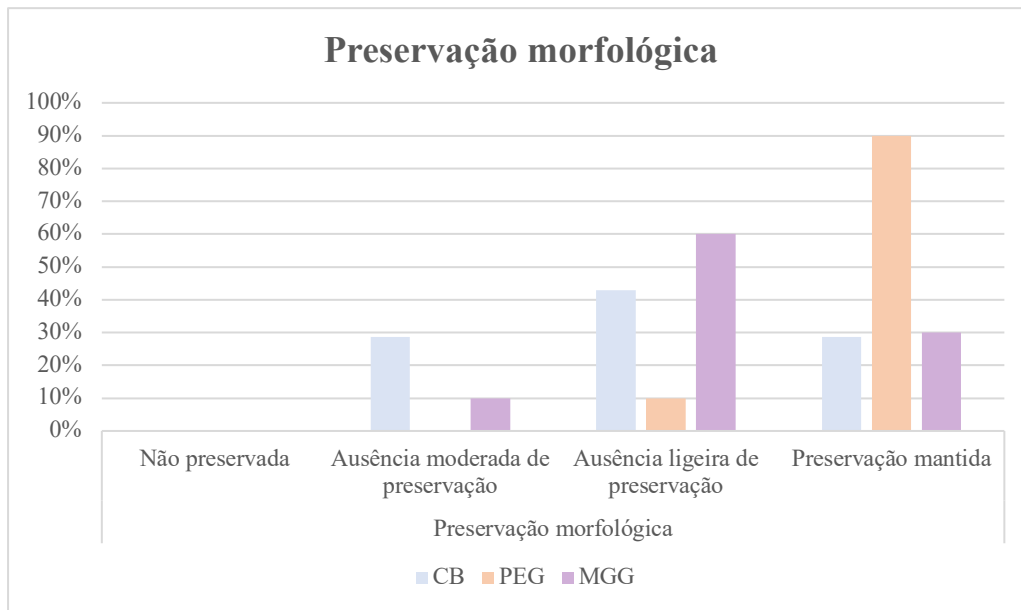
Foram realizadas 27 lâminas para o soro primário pan-citoqueratina AE1/AE3, sendo que a distribuição das mesmas se encontra na tabela abaixo (**Tabela 4.11**).

**Tabela 4.11.** - Distribuição das lâminas pertencentes ao soro pan-citoqueratina AE1/AE3 por protocolo.

	<i>N</i>
<b>Citobloco</b>	7
<b>PEG</b>	10
<b>MGG</b>	10
<b>Total</b>	27

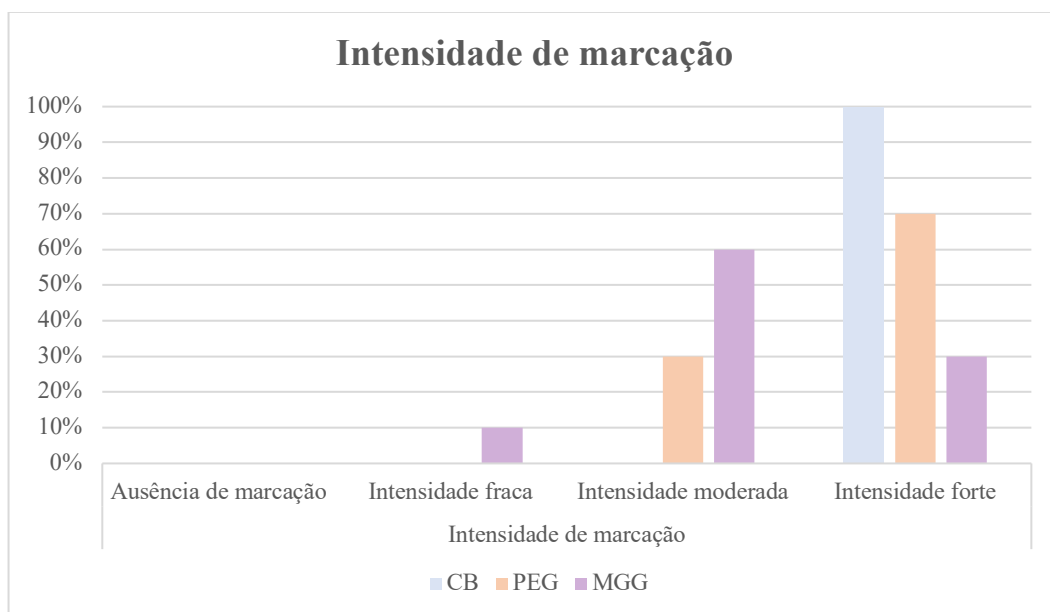
Os resultados da qualidade técnica das lâminas obtidas pelo soro pan-citoqueratina AE1/AE3 foram avaliados e devidamente organizados, de modo a compreender se a coloração MGG poderia afetar de algum modo algum dos parâmetros considerados na grelha de avaliação.

A **figura 4.21** apresenta os resultados referentes à preservação morfológica. É possível observar que os três protocolos atingiram a pontuação máxima, sendo que as lâminas PEG atingiram a pontuação máxima em 90% das lâminas totais.



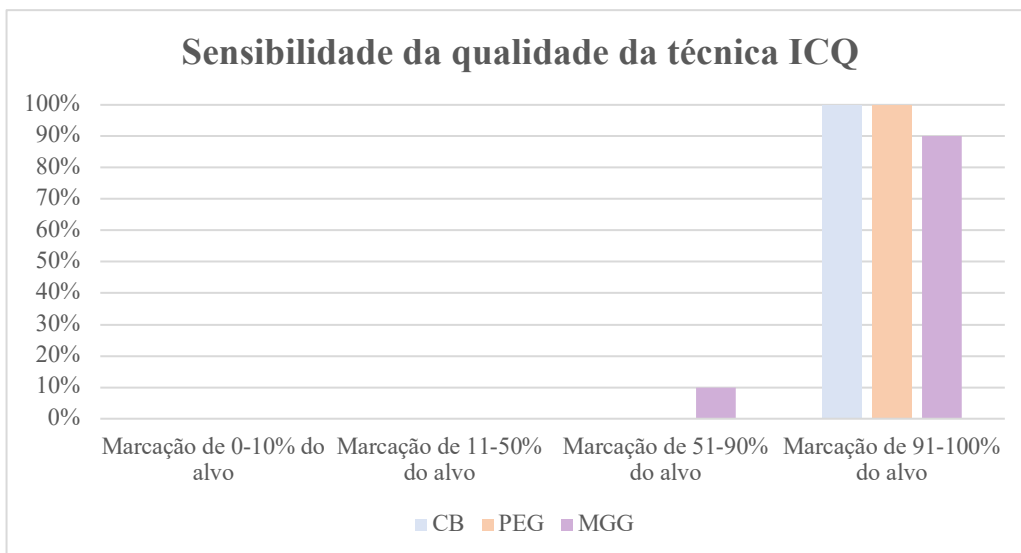
**Figura 4.21.** - Preservação morfológica das lâminas pertencentes ao soro pan-citoqueratina AE1/AE3.

A intensidade de marcação das lâminas obtidas pelo soro pan-citoqueratina AE1/AE3 está representada na **figura 4.22**. Todas as lâminas apresentaram imunomarcação, sendo que as lâminas obtidas pelo citobloco apresentaram intensidade forte em todas as amostras.



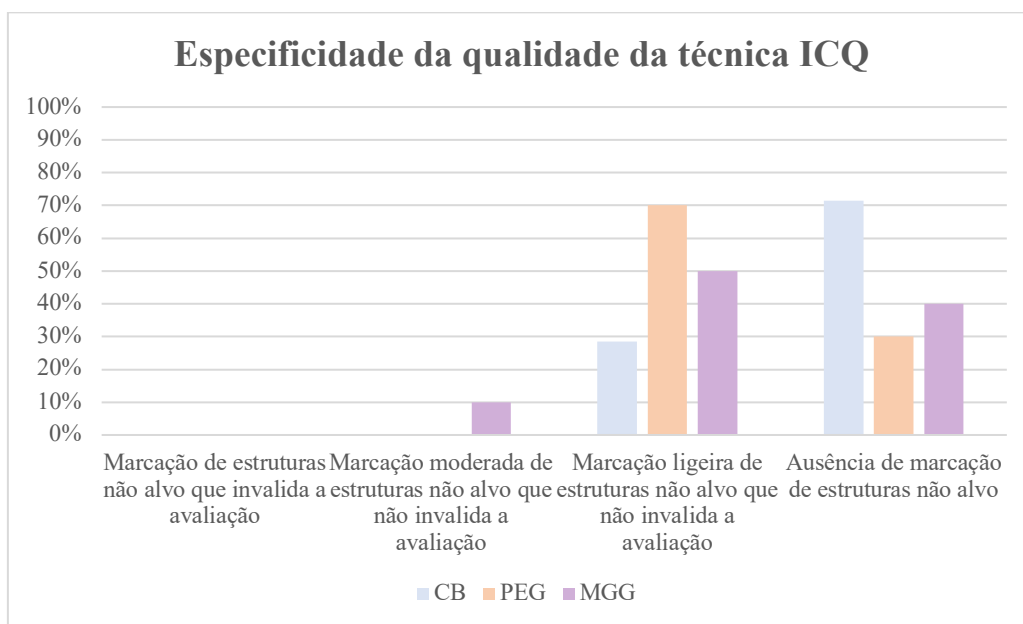
**Figura 4.22.** - Intensidade de marcação das lâminas pertencentes ao soro pan-citoqueratina AE1/AE3.

A sensibilidade de todas as lâminas foi superior a 50%, podendo esta ser verificada através da **figura 4.23**. Todas as lâminas obtidas pelo citobloco apresentaram sensibilidade máxima, assim como 90% das lâminas MGG.



**Figura 4.23.** - Sensibilidade das lâminas pertencentes ao soro pan-citoqueratina AE1/AE3, relativo à qualidade da técnica imunocitoquímica.

A **figura 4.24** representa o parâmetro “especificidade”. No gráfico verificamos que o protocolo MGG foi aquele em que 10% dos resultados apresentaram uma menor pontuação.



**Figura 4.24.** - Especificidade das lâminas pertencentes ao soro pan-citoqueratina AE1/AE3, relativo à qualidade da técnica imunocitoquímica.

Por fim, através da **figura 4.25** verificou-se que 100% das lâminas totais apresentaram pontuação máxima para o parâmetro “contraste”.

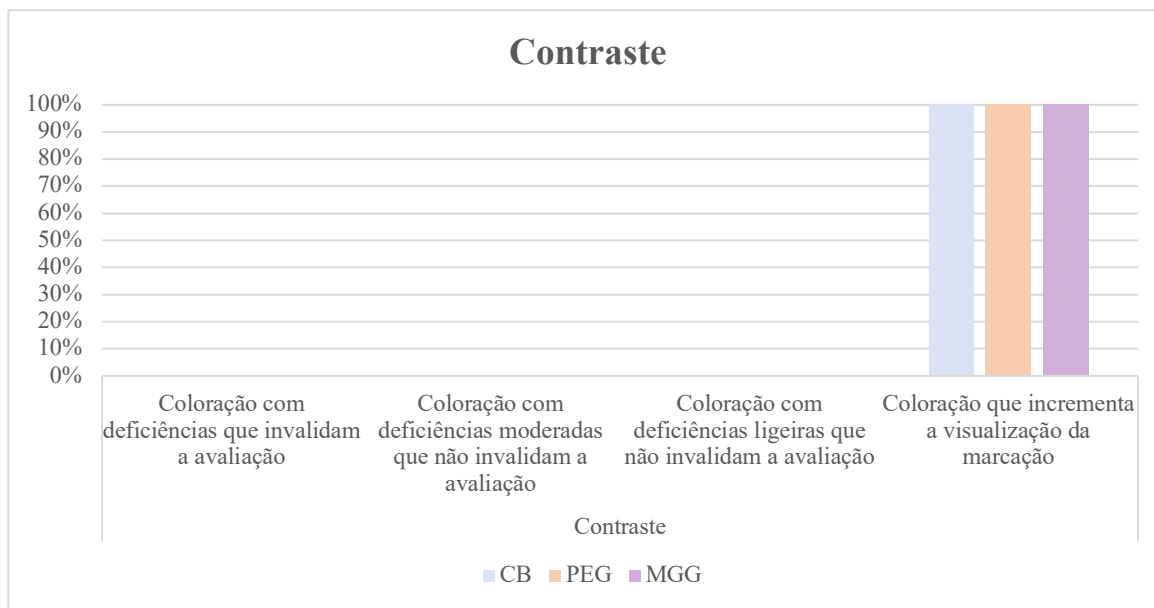


Figura 4.25. - Contraste das lâminas pertencentes ao soro pan-citoqueratina AE1/AE3.

A aplicação de estatística descritiva dos dados permitiu retirar algumas conclusões (Figura 4.26). Para o soro pan-citoqueratina AE1/AE3, o protocolo que apresentou uma pontuação global média mais elevada foi o citobloco (média = 25.43), seguido do PEG (média = 24.50) e, por fim o MGG (média = 22.20). Assim como nos soros anteriores, o protocolo MGG foi aquele que apresentou uma maior distribuição dos dados, pelo que apresentou um maior valor de desvio padrão. Tanto os protocolos do citobloco, como do PEG apresentaram o maior valor máximo possível, sendo que o MGG apresentou o menor valor mínimo de entre todos.

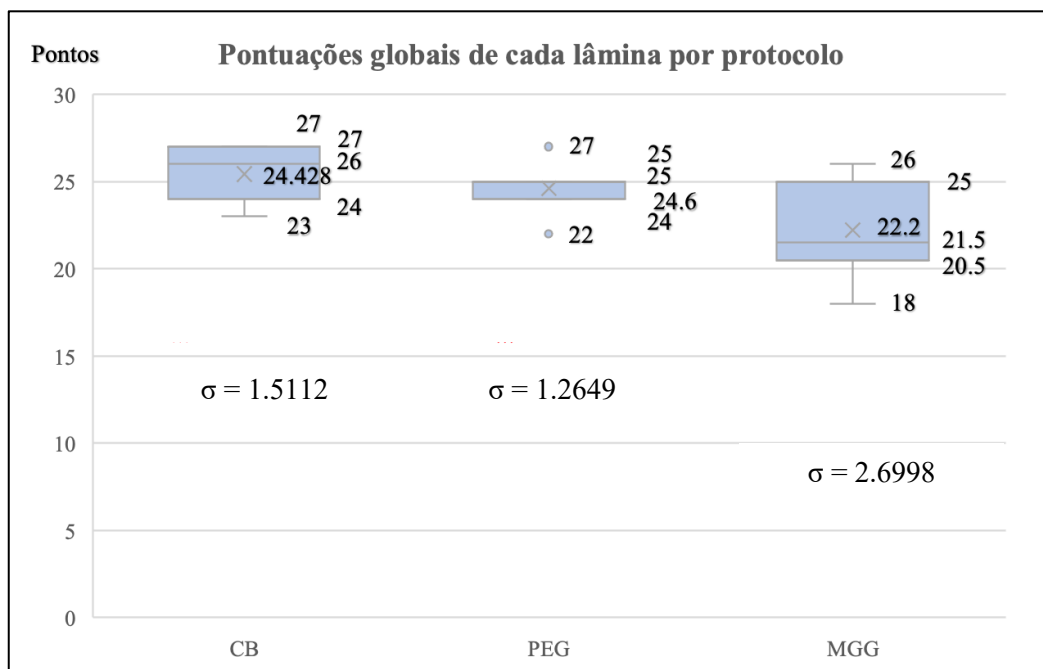


Figura 4.26. - Distribuição em caixa de cada um dos protocolos – soro pan-citoqueratina AE1/AE3.

De um modo geral, todas as avaliações globais das lâminas para este soro foram superiores a 20 pontos, à exceção de duas lâminas (ambas lâminas obtidas pelo protocolo MGG). Também para este soro foi analisada a distribuição normal dos dados, recorrendo ao teste *Shapiro-Wilk* (Tabela 4.12).

Analisando os valores de *p-value* é possível inferir que as lâminas pertencentes todos os protocolos assumem uma distribuição normal (*p-value* > 0.05).

**Tabela 4.12** - Teste de *Shapiro-Wilk* para os três protocolos utilizados.

	<i>W</i>	<i>p-value</i>
<b><i>Citobloco</i></b>	0.9151	0.4324
<b><i>PEG</i></b>	0.8676	0.09382
<b><i>MGG</i></b>	0.9344	0.4930

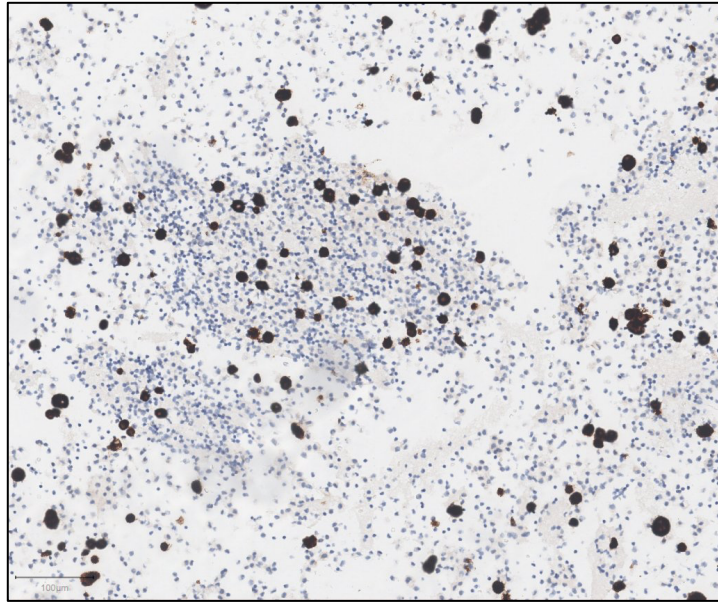
Na **tabela 4.13** verificamos a presença de diferenças significativas entre as pontuações globais obtidas na comparação dos protocolos “Citobloco e MGG”. Por oposição, tanto o protocolo “Citobloco e PEG” como “PEG e MGG” não apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre eles. Concluimos que também no soro citoqueratina AE1/AE3 não existem diferenças consideráveis entre a utilização do protocolo “PEG” como padrão.

**Tabela 4.13.** – Teste de *Wilcoxon* e aplicação de fator de correção nos valores de *p-value*.

<b>Protocolos em comparação</b>	<i>W</i>	<i>p-value</i>	<i>p-value</i> após fator de correção
<b><i>Citobloco/PEG</i></b>	47	0.2467	0.2467
<b><i>Citobloco/MGG</i></b>	59.5	0.01815	0.05445
<b><i>PEG/MGG</i></b>	25	0.05697	0.08546

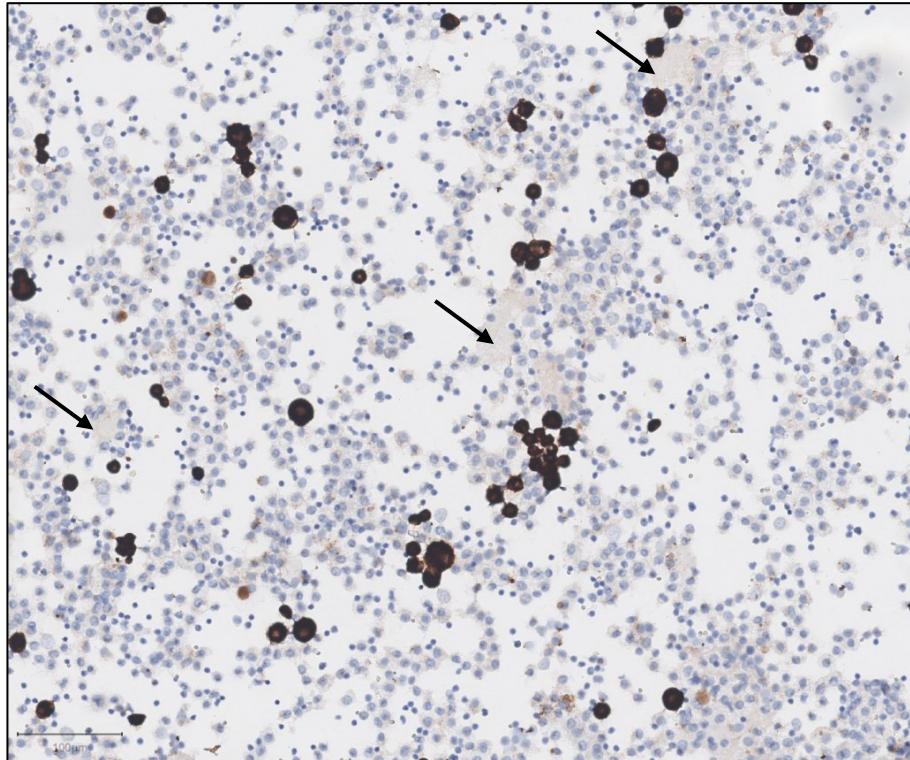
#### **4.3.2. Validação dos protocolos imunocitoquímicos – Pan-citoqueratina AE1/AE3**

A **figura 4.27** ilustra a lâmina obtida pelo citobloco para o soro pan-citoqueratina AE1/AE3. Verificaram-se mais de 91% das células com imunomarcção, apresentando intensidade forte e preservação morfológica mantida. O facto desta marcação ser citoplasmática e de intensidade forte faz com que o núcleo não seja visível e individualizado. Além das células-alvo, encontra-se ainda uma toalha de linfócitos sem imunomarcção nas zonas circundantes.



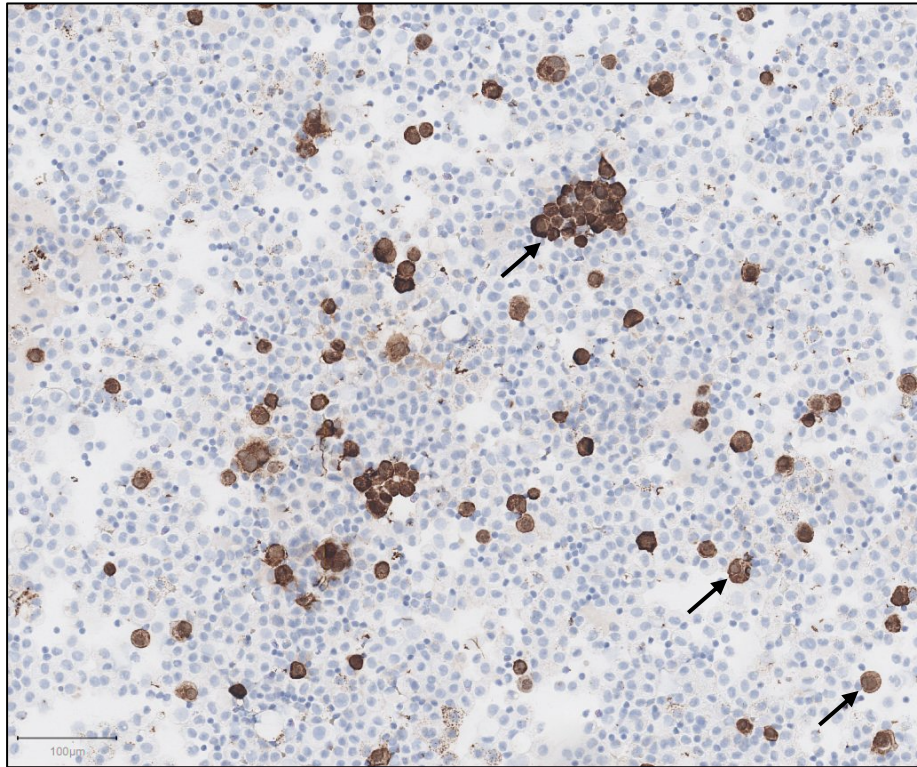
**Figura 4.27.** - Amostra 1: Lâmina Citobloco (Pontuação = 27) (Imagem da autora).

Na **figura 4.28** verificam-se algumas células individualizadas e pequenos agregados celulares que expressam o antígeno pan-citoqueratina AE1/AE3. Comparativamente à lâmina anteriormente apresentada, verifica-se a presença de alguma marcação inespecífica, designada como “fundo” (zonas assinaladas com setas pretas). Esta marcação inespecífica fez com que a pontuação no critério “especificidade” fosse mais reduzido.



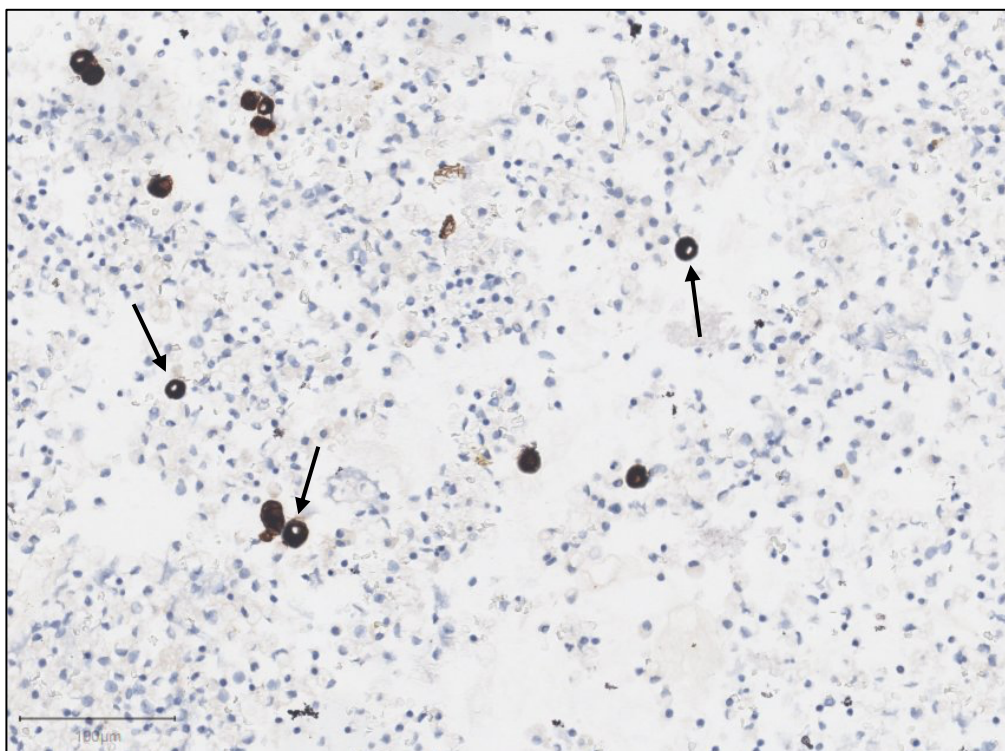
**Figura 4.28.** - Amostra 1: Lâmina PEG (Pontuação = 25). **Legenda:** Setas pretas (zonas de marcação inespecífica) (Imagem da autora).

Por fim, a **figura 4.29** representa a lâmina MGG da amostra 1 relativa ao soro pan-citoqueratina AE1/AE3. Nesta lâmina verificámos a presença de uma ligeira diminuição na intensidade de marcação, comparativamente às lâminas anteriormente apresentadas. Observou-se uma elevada percentagem de células-alvo com imunomarcação, assim como a preservação morfológica também se revelou mantida. É relevante mencionar que pelo facto de a intensidade de marcação ser mais fraca comparativamente às lâminas anteriores, permite uma melhor individualização do núcleo (exemplificado pelas setas pretas).



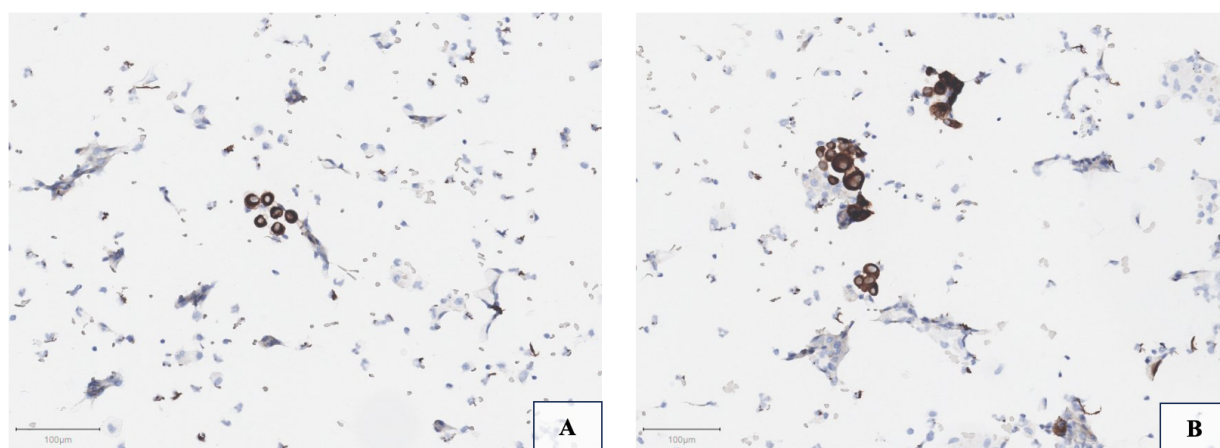
**Figura 4.29.** - Amostra 1: Lâmina MGG (Pontuação = 24). **Legenda:** Setas pretas (células em que é possível individualizar os núcleos, pela presença de uma coloração mais ténue) (Imagem da autora).

A **figura 4.30** ilustra a lâmina obtida pelo citobloco da amostra 2 para o soro pan-citoqueratina AE1/AE3. Neste campo verificam-se algumas células com individualização nuclear, sendo visíveis os contornos nucleares (assinalados com setas pretas) e, conseqüentemente, a marcação citoplasmática.



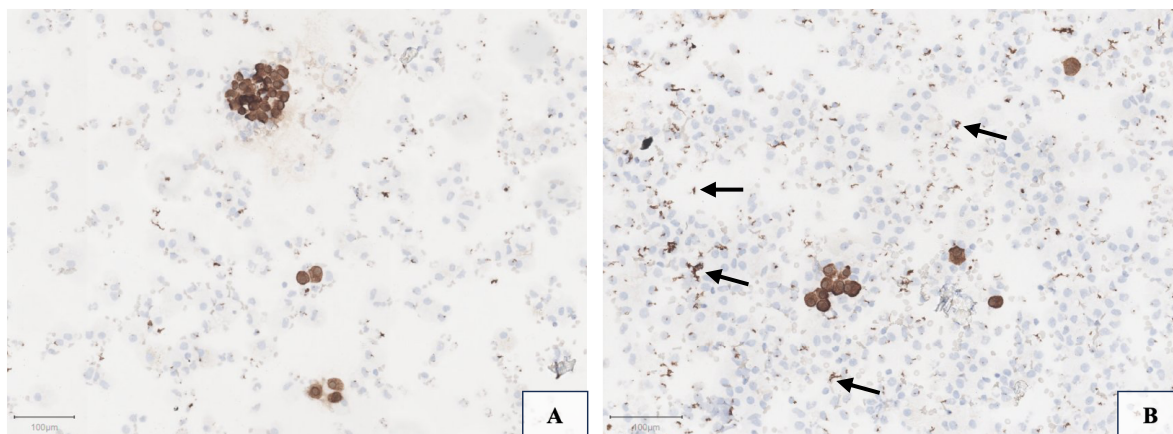
**Figura 4.30.** - Amostra 2: Lâmina Citobloco (Pontuação = 26) (Imagem da autora).

Através das figuras **4.31A** e **4.31B** foi possível observar grupos celulares com imunomarcagem específica. As células presentes tanto na figura 4.31A como na figura 4.31B, apresentaram uma clara distinção dos contornos nucleares relativamente à marcação citoplasmática específica. Em redor das células-alvo, verificaram-se diversos agregados celulares com ausência de imunomarcagem, como seria expectável.



**Figura 4.31.** - Amostra 2: Lâmina PEG (Pontuação = 25) (Imagem da autora).

Por fim, analisando os campos microscópicos representados pelas **figuras 4.32A** e **4.32B**, verificou-se mais uma vez a presença de imunomarcagem das células-alvo. Em algumas das amostras observámos a presença de zonas de marcação inespecífica, semelhantes a pequenos depósitos (representados pelas setas pretas), tendo estas sido somente verificadas em lâminas MGG. Não conseguimos apurar o motivo pelo qual isto sucedeu, mas torna-se relevante mencionar que este facto fez com que a pontuação do critério “especificidade” fosse mais baixa nestes casos.



**Figura 4.32.** - Amostra 2: Lâmina MGG (Pontuação = 21). **Legenda:** Setas pretas (zonas de marcação inespecífica) (Imagem da autora).

### 4.3.3. Avaliação da sensibilidade e especificidade de diagnóstico – Pan-citoqueratina AE1/AE3

Através da **tabela 4.14** infere-se que 100% das lâminas foram consideradas como positivas para o soro citoqueratina AE1/3.

**Tabela 4.14.** - Avaliação da sensibilidade, especificidade e diagnóstico das lâminas.

<i>Protocolo</i>	<i>Controlo Positivo</i>		<i>Controlo Negativo</i>		<i>Diagnóstico</i>	
	<i>Positivo</i>	<i>Negativo</i>	<i>Positivo</i>	<i>Negativo</i>	<i>Positivo</i>	<i>Negativo</i>
<b>CB</b>	7	0	0	7	7	0
<b>PEG</b>	10	0	0	10	10	0
<b>MGG</b>	10	0	0	10	10	0

De modo a avaliar o impacto da coloração MGG nas lâminas sujeitas a ICQ, foram comparados os resultados do protocolo MGG com os dos protocolos-padrão. Foram utilizados como padrão o citobloco e PEG, por não ter havido diferenças significativas entre as pontuações globais de ambos. Assim, foi possível o cálculo da sensibilidade e especificidade no soro pan-citoqueratina AE1/AE3.

Através da **tabela 4.15** verifica-se que tanto a sensibilidade como a especificidade do soro foi de 100%, pelo que a presença da coloração MGG não afeta a sensibilidade nem a especificidade do soro pan-citoqueratina AE1/AE3.

**Tabela 4.15.** - Tabela de cálculo de sensibilidade e especificidade de diagnóstico do soro pan-citoqueratina AE1/AE3.

		<b>Padrão (Citobloco e PEG)</b>	
		<i>Positivos</i>	<i>Negativos</i>
<b>Resultado ICQ das lâminas coradas com MGG</b>	<i>Positivo</i>	10	0
	<i>Negativo</i>	0	10

## 5. Discussão

Neste projeto foi possível obter diversas informações e resultados cruciais para a melhor compreensão dos potenciais fatores interferentes na imunomarcagem de lâminas previamente coradas com a coloração MGG. De modo a tornar a interpretação dos resultados mais perceptíveis, dividimos a discussão em fase pré-analítica e fase analítica (por soro primário).

Uma das metodologias utilizadas para o armazenamento de lâminas foi a congelação, que segundo a literatura, permite preservar os antígenos em amostras citológicas (Pinheiro et al., 2015). Os resultados obtidos na investigação estão em acordo com os resultados de alguns estudos mencionados na secção “Contextualização teórica”. Num estudo realizado em 2022, foi mencionado que os antígenos cromogranina A, p40 e TTF-1 eram preservados ao submeter as lâminas a congelação (Santos et al., 2022).

Os dados referidos num estudo comparativo de 2015, mostraram que a antigenicidade se mantinha preservada quando as lâminas eram congeladas em temperaturas entre os -20°C e os -70°C (Pinheiro et al., 2015). As lâminas sujeitas ao processo de congelação foram somente as destinadas ao protocolo MGG. Considerando os resultados obtidos no soro TTF-1, podemos concluir que a antigenicidade poderá não ter sido preservada, visto que existiram seis amostras discrepantes (entre os protocolos PEG e/ou citobloco e o protocolo MGG). Por oposição, as amostras reservadas para os soros CD45 e pan-citoqueratina AE1/AE3 mantiveram a antigenicidade preservada, dado que todas as amostras foram concordantes.

Deste modo, torna-se relevante avaliar se eventualmente o método de congelação poderá interferir na preservação antigénica de TTF-1. Apesar de terem existido amostras concordantes entre protocolos, a sensibilidade da técnica (comparando os protocolos padrão com o MGG) foi de 40%. Assim, avaliar este ponto e verificar se existe uma relação de causa-efeito entre os fatores “qualidade da ICQ” e “método de congelação” poderá ser benéfico para uma melhor compreensão desta perda de antigenicidade.

É reconhecido por diversos autores que a coloração MGG interfere na imunomarcagem, no entanto as suas causas não são totalmente conhecidas. Dos poucos estudos existentes acerca desta temática, existem opiniões distintas. Alguns autores mencionam que a coloração MGG não possui efeito negativo nos resultados imunocitoquímicos (Raskin et al., 2019) (Dörfelt et al., 2019), outros afirmam o contrário (Santos et al., 2022). Através do presente estudo foi possível confirmar este efeito negativo, visto que as pontuações globais dos protocolos citobloco e PEG foram superiores ao MGG em todos os soros primários.

Assim, os resultados desta investigação coincidem com os obtidos pelos autores, apesar de não ter sido possível realizar uma associação direta entre as variáveis responsáveis por este efeito negativo (Santos et al., 2022). No entanto, existem alguns pontos que merecem ser discutidos e tidos em consideração para eventuais estudos futuros.

Alguns autores mencionam que as alterações de pH e a percentagem de saturação dos corantes podem ser potenciais causas para a inconsistência de resultados na coloração MGG, no entanto não existe uma associação direta com a inconsistência de resultados imunocitoquímicos (Boon & Drijver, 1986; R. W. Horobin & Walter, 1987). O efeito Romanowsky ocorre em valores de pH compreendidos entre os 6.0 e 8.5 (Boon & Drijver, 1986). Durante a rotina laboratorial, a utilização dos corantes poderá eventualmente fazer variar os valores de pH dos corantes, pelo que a instabilidade dos mesmos aumenta. O facto de existir esta variação de pH poderá constituir um fator interferente na posterior aplicação da técnica ICQ. Isto é, o facto da própria coloração MGG não ser estável poderá interferir na reação química entre os reagentes da ICQ e os antigénios da amostra.

Ao longo do desenvolvimento da investigação foi realizada a troca dos corantes semanalmente, pelo que a possibilidade de variação da saturação dos mesmos foi elevada. Deste modo, foram tidos em conta quais os dias em que as trocas foram realizadas e, simultaneamente, os dias em que os casos discrepantes foram corados. No entanto, não foi possível encontrar uma associação entre estes dois fatores, visto que num conjunto de amostras coradas no mesmo dia, umas apresentaram imunomarcacão e outras não. Deste modo, também este tópico é importante ser reconhecido para eventuais estudos futuros visto que, ao controlar com mais detalhe este fator poderão eventualmente estabelecer-se relações de associação e/ou correlação.

A quantidade de corantes (pertencentes à coloração MGG) aplicados numa amostra citológica pode interferir na qualidade dos resultados imunocitoquímicos. Na fase da otimização foram testados protocolos que diferiram na quantidade de corantes aplicados nas amostras MGG. O protocolo 3, de entre os quatro protocolos-teste (3,4,5 e 6), foi aquele que apresentou melhores resultados, ainda que não ótimos.

Ao analisar os resultados obtidos nos protocolos 4, 5 e 6 foi possível verificar uma perda ligeira da preservação morfológica das células coradas acompanhada de uma coloração enfraquecida. Estas duas características, em conjunto, poderiam eventualmente condicionar a interpretação morfológica das células. A ausência de uma análise morfológica adequada poderá comprometer a atribuição de um diagnóstico fiável e, inclusive condicionar a eventual necessidade de aplicação de técnicas complementares como a ICQ.

Em suma, apesar de terem sido verificados resultados imunocitoquímicos com uma qualidade não ótima aplicando o protocolo 3, este foi o selecionado visto que é o único que permite uma melhor análise morfológica das células. Foi possível compreender que quantos mais reagentes estão em contacto com a amostra, menor é a sua qualidade imunocitoquímica. Pensamos que seria relevante realizar a repetição do presente estudo mas aplicando a coloração rápida (de 30 segundos) ao invés da coloração definitiva MGG (coloração de rotina), visto que o tempo de contacto da amostra com os corantes é inferior comparativamente à coloração definitiva. Seria, assim, expectável que fossem obtidos resultados imunocitoquímicos consideravelmente melhores, visto que os antigénios presentes na amostra seriam sujeitos e um menor número de interações moleculares.

A avaliação da qualidade técnica das lâminas tornou-se um ponto crucial neste estudo, visto que através desta foi possível estabelecer algumas relações entre a presença e/ou ausência da coloração MGG e a imunomarcacão. Um dos pontos limitantes da discussão dos resultados obtidos incide no facto de ser escassa a informação acerca desta temática. Isto é, existem estudos que abordam os fatores de forma individual, mas em conjunto (coloração MGG e qualidade dos resultados ICQ) são escassos.

De um modo geral, os resultados obtidos para o soro CD45 foram satisfatórios visto que foi possível verificar imunomarcacão em todas as amostras e não existiu discrepâncias entre os protocolos-padrão e o protocolo MGG. Num estudo referente a 2022, somente 80% ( $N = 25$ ) das amostras sujeitas

a fixação física obtiveram imunomarcação (Kushwaha et al., 2022). No presente estudo foi verificada positividade em 100% das amostras. No estudo citado não é disponibilizado o protocolo detalhado, pelo que não é possível afirmar que as amostras tenham sido sujeitas às mesmas condições. Os autores referem ainda que relativamente à intensidade de marcação, foram obtidos resultados heterogêneos tendo a intensidade variado entre fraca e ótima, em acordo com os resultados obtidos na presente investigação. O mesmo sucedeu no parâmetro “contraste”, em que 100% das amostras obtiveram a melhor classificação para este parâmetro.

Os antigénios membranares, como o CD45, são referidos como sendo menos suscetíveis à variação de fixadores utilizados na fase pré-analítica (Skoog & Tani, 2011). Deste modo, o facto de terem sido verificados resultados consistentes tanto nos três protocolos (citobloco, PEG e MGG), demonstra que este antigénio não sofreu variações consoante o fixador utilizado na fase pré-analítica. Os três protocolos foram sujeitos a diferentes tipos de fixação e/ou fixadores e os resultados imunocitoquímicos foram concordantes entre si. Pode concluir-se que o tipo de fixador utilizado na fase pré-analítica não afeta a qualidade dos resultados imunocitoquímicos para a deteção do antigénio CD45.

Através dos dados apresentados na secção dos resultados verificou-se que tanto a sensibilidade como a especificidade de diagnóstico do soro CD45 foi de 100%, pelo que todas as amostras positivas apresentaram marcação nos três protocolos existentes. Concluímos, assim, que o CD45 pode ser validado com a coloração MGG segundo as normas da CAP (College of American Pathologists, 2014).

Outro dos pontos fulcrais deste estudo relativamente à sensibilidade dos protocolos utilizados foi o facto de não terem sido verificadas diferenças estatisticamente significativas entre os protocolos PEG e citobloco ( $p\text{-value} = 0.3329$ ). As lâminas PEG apresentaram inclusive uma pontuação média geral mais elevada (média = 25.1) que as lâminas obtidas pelo citobloco (média = 24.0). Assim, foi possível confirmar a fiabilidade da utilização deste método como padrão, na ausência do citobloco (Srebotnik Kirbis et al., 2021).

Apesar destes resultados, torna-se relevante mencionar que o número de lâminas não foi equitativo para os três protocolos. Desta forma, a diferença das pontuações globais médias entre o citobloco e o PEG poderão dever-se a este facto. O modo de ser realizada uma comparação fidedigna seria a realização do estudo com igual número de lâminas para todos os protocolos em estudo.

O soro TTF-1, contrariamente aos outros soros em estudo, apresentou resultados discrepantes entre protocolos. A expressão de TTF-1 ocorre essencialmente em adenocarcinomas de origem pulmonar e permite a diferenciação dos adenocarcinomas de outros tumores pulmonares (Yan et al., 2014). Segundo alguns autores, a imunoexpressão de TTF-1 pode ser considerada útil para a identificação adenocarcinomas primários do pulmão entre 60% e 100% dos casos (Klebe et al., 2016). Está descrito que os antigénios nucleares possuem maior suscetibilidade a pequenas variações, como o tipo de fixadores utilizados e a interação molecular com reagentes (Skoog & Tani, 2011).

A literatura acerca da qualidade dos resultados imunocitoquímicos pós-coloração MGG é escassa, pelo que a discussão será baseada na informação existente acerca de amostras histológicas.

A intensidade de marcação foi um dos parâmetros que melhor retratou a interferência da coloração MGG nos resultados imunocitoquímicos. Verificaram-se 6 (60%) discrepâncias em 10 amostras, sendo que o resultado dos protocolos-padrão diferiu do protocolo MGG. Para compreender a possível causa destas discrepâncias foi analisado o dia em que as lâminas foram coradas e realizada a ICQ. Sabendo os dias em que foram realizadas as trocas dos corantes foi realizado um cruzamento de dados de modo a verificar a existência de alguma associação. No entanto, no dia em que foram realizadas as lâminas discrepantes foram juntamente realizadas outras lâminas que foram concordantes, pelo que não é possível estabelecer uma associação.

A imunomarcção deste antígeno apresentou diferentes graus de intensidade quer na mesma célula, quer entre grupos celulares diferentes. Deste modo é possível realizar um paralelismo com um estudo realizado em 2005, em foi analisada a sensibilidade e especificidade do soro TTF-1 (dois clones diferentes) de duas casas comerciais diferentes (Compérat et al., 2005). Neste estudo foram utilizadas amostras histológicas ao invés de amostras citológicas e, também nestas foi verificada imunomarcção focal.

Na mesma lâmina foram analisados diversos grupos com ausência de marcação e alguns micrômetros ao lado outro grupo com imunomarcção. Esta heterogeneidade não foi possível de explicar através do presente estudo e torna-se um fator importante a investigar em estudos futuros. Concluímos que a coloração MGG afeta negativamente a imunomarcção do soro TTF-1, mais especificamente diminuindo a sua intensidade de marcação ou provocando a ausência total da mesma.

Os resultados obtidos permitem concluir que a sensibilidade do soro TTF-1 foi afetada. Foram obtidas 6 lâminas discrepantes, pelo que a sensibilidade do soro foi de 40%. Como havia sido referido anteriormente, segundo as normas da CAP, para a validação de um soro primário é necessário que a sensibilidade de diagnóstico atingida seja superior a 90%, o que não ocorreu neste soro (College of American Pathologists, 2014). Deste modo, não é possível validar o protocolo otimizado para o soro TTF-1.

Relativamente à especificidade, não foram obtidos falsos positivos, pelo que a especificidade foi de 100%. Assim, verifica-se que a especificidade de diagnóstico do soro não é afetada pela presença da coloração MGG, contrariamente à sensibilidade de diagnóstico.

Durante a etapa de otimização do protocolo TTF-1 foram ajustados parâmetros no protocolo imunocitoquímico tais como o tempo de recuperação antigénica e o tempo de incubação da hematoxilina (coloração de contraste). Na amostra utilizada para a otimização, os resultados obtidos foram satisfatórios, não tendo sido reproduzíveis nas restantes amostras. As condições tanto pré-analíticas como analíticas foram as mesmas, pelo que não foi possível realizar associações ou justificar este facto. No entanto, uma das possibilidades poderá incidir no facto de se tratar de amostras com componente celular diferente que possa afetar a sua capacidade de imunomarcção. Por outro lado, o facto de a marcação ser nuclear torna-a consideravelmente mais sensível.

No soro TTF-1 foi verificada a ausência de diferenças estatisticamente significativas entre os protocolos do citobloco e PEG ( $p\text{-value} = 1.000$ ), pelo que na impossibilidade da realização do citobloco, as lâminas PEG podem ser utilizadas como padrão para o soro TTF-1. Apesar destes resultados, torna-se relevante mencionar que foram somente obtidas 5 lâminas pelo citobloco e 10 lâminas PEG e MGG, pelo que a diferença de médias entre os dois primeiros protocolos poderá dever-se a esse mesmo facto. Para ser realizada uma comparação fidedigna seria importante a realização do estudo com igual número de lâminas em todos os protocolos em estudo.

O soro pan-citoqueratina AE1/AE3 apresentou resultados satisfatórios visto não terem existido amostras com resultados discrepantes. Todas as amostras apresentaram imunomarcção contrariamente aos dados obtidos num estudo de 2022 em que foram analisados os soros CD45 e pan-citoqueratina (Kushwaha et al., 2022). Como referido anteriormente, relativo à discussão dos resultados do soro CD45, não foi detalhado o protocolo utilizado, pelo que não é possível estabelecer afirmar que as amostras dos estudos foram sujeitas às mesmas condições.

As amostras apresentaram intensidade de marcação entre moderada a forte, com exceção de uma das lâminas MGG, que apresentou intensidade fraca. Contrariamente, no estudo acima mencionado, as amostras com pan-citoqueratina AE1/AE3, apresentaram uma maior heterogeneidade de resultados relativamente à intensidade de marcação (Kushwaha et al., 2022). Tanto as lâminas PEG como as

lâminas obtidas através do citobloco apresentaram intensidade de marcação mais forte que as lâminas MGG.

Os resultados deste soro no parâmetro relativo à especificidade foram consideravelmente mais heterogêneos do que os restantes soros em estudo. Uma grande percentagem das amostras apresentou uma ligeira marcação de fundo que se assemelhava a pequenos depósitos de coloração castanha. O mesmo foi reportado no estudo citado (Kushwaha et al., 2022). Não foi possível estabelecer uma causalidade para este facto, no entanto, verificou-se que este soro assume uma maior tendência de apresentar fundo. O facto deste soro também ser expresso em células como os macrófagos, poderá ser um dos motivos pelos quais existe esta marcação de fundo, por as partículas antes de serem fagocitadas se encontrarem fora das células.

Apesar dos resultados obtidos não foi possível estabelecer uma associação de causa entre a presença da coloração MGG e uma menor pontuação da qualidade técnica. A avaliação da origem destes pequenos depósitos é um ponto relevante a ter em conta para estudos futuros. O soro citoqueratina AE1/AE3 apresentou uma sensibilidade e especificidade de 100%, dado que todas as amostras apresentaram concordância entre os protocolos-padrão e o MGG.

Foi verificada a ausência de diferenças estatisticamente significativas entre as lâminas obtidas pelo citobloco e as lâminas PEG ( $p\text{-value} = 0.2467$ ), pelo que na impossibilidade da realização do citobloco, as lâminas PEG podem ser utilizadas como padrão para o soro pan-citoqueratina AE1/AE3. No entanto, foram somente obtidas 7 lâminas pelo citobloco e 10 lâminas PEG e MGG, pelo que a diferença de médias entre os dois primeiros protocolos poderá dever-se a esse facto. De facto a ser realizada uma comparação fidedigna seria importante a realização do estudo com igual número de lâminas para todos os protocolos em estudo.

É importante referir que, num estudo retrospectivo realizado em 2023, foram analisadas as discrepâncias entre as amostras MGG e os exames de *follow-up* (histológicos e/ou citológicos) em todas as amostras processadas durante o ano de 2022, no IPOLFG (Maciel et al., 2023). Foram analisados 16 antigénios, tendo sido o soro citoqueratina AE1/AE3 o mais utilizado ( $N = 45$ ). Os resultados mostraram que o soro que apresentou maior número de discrepâncias entre as lâminas MGG e os exames de *follow-up* foi precisamente a citoqueratina AE1/AE3. A utilização de maior número de amostras em trabalhos de investigação futuros é indispensável para avaliar a aparente discordância entre estes dois estudos.

## 6. Conclusões

A presente investigação assumiu uma relevância considerável na área da Citopatologia, com ênfase no diagnóstico do carcinoma do pulmão, ao permitir compreender melhor as possíveis interações entre a coloração MGG e a imunomarcação e, adicionalmente, ao confirmar a fixação com PEG com alternativa ao citobloco para uma imunocitoquímica de qualidade.

Os resultados obtidos permitiram inferir que a coloração MGG assume um efeito negativo relativamente a antigénios com imunomarcação nuclear (TTF-1), contrariamente aos antigénios com imunomarcação citoplasmática (pan-citoqueratina AE1/AE3) e membranas (CD45). Conclui-se que presença de coloração interfere na qualidade da ICQ consoante a localização celular da imunomarcação.

A otimização dos protocolos imunocitoquímicos foi realizada para os três anticorpos propostos no estudo, sendo que em todos eles foram obtidos resultados imunocitoquímicos satisfatórios para a atribuição de diagnóstico. Foram realizadas testagens para os três anticorpos, recorrendo a protocolos-teste que permitiram selecionar as melhores condições para o protocolo otimizado. Apesar de ter sido realizada a otimização de protocolos dos três anticorpos, não foi possível validar o anticorpo TTF-1 perante as normas estabelecidas pela CAP.

A qualidade da técnica imunocitoquímica foi avaliada em todas as amostras, o que permitiu retirar conclusões acerca da sensibilidade e especificidade dos anticorpos em estudo, mas não foi possível avaliar uma causa-raiz para as discrepâncias observadas no anticorpo TTF-1.

A ausência de diferenças significativas entre o citobloco e o PEG para os três soros primários em estudo, permitem concluir que nos casos em que não seja possível a realização de citobloco, o protocolo PEG poderá ser utilizado sem qualquer comprometimento dos resultados.

No presente estudo foi possível destacar algumas limitações, nomeadamente a utilização de um número de lâminas não equitativo para cada um dos protocolos e para cada um dos soros. Num estudo futuro seria expectável a igual distribuição de lâminas quer por soro, quer por protocolo. O facto de não terem sido realizadas algumas associações entre variáveis, poder-se-á dever não só à não distribuição equitativa de lâminas, como também à própria dimensão da amostra. Deste modo, ao aumentar a amostra ( $N > 30$ ) poderia permitir a realização de associações não possíveis no presente estudo.

É de ressaltar a importância que esta temática assume na rotina laboratorial de um laboratório de Citopatologia, pelo que o investimento em investigação desta área é crucial. Seria interessante realizar o estudo novamente com as alterações acima mencionadas (dimensão e distribuição de amostras), como também alterando algumas particularidades. De forma a compreender se os resultados ICQ assumiam uma melhor qualidade com a aplicação da coloração MGG, poderiam ser repetidos os passos realizados nesta investigação, com a realização de uma lâmina extra (corada com a coloração MGG rápida, ao invés da coloração definitiva). Por esta coloração ser de menor duração seria interessante analisar o eventual impacto da coloração MGG rápida na qualidade dos resultados ICQ.

## 7. Referências Bibliográficas

- Al Barashdi, M. A., Ali, A., McMullin, M. F., & Mills, K. (2021). Protein tyrosine phosphatase receptor type C (PTPRC or CD45). *Journal of Clinical Pathology*, 74(9), 548–552. <https://doi.org/10.1136/jclinpath-2020-206927>
- Al-Abbadi, M. A. (2011). Basics of cytology. *Avicenna Journal of Medicine*, 01(01), 18–28. <https://doi.org/10.4103/2231-0770.83719>
- Antonangelo, L., Vargas, F. S., Acencio, M. M. P., Corá, A. P., Teixeira, L. R., Genofre, E. H., & Sales, R. K. B. (2012). Effect of temperature and storage time on cellular analysis of fresh pleural fluid samples. *Cytopathology*, 23(2), 103–107. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2303.2011.00863.x>
- Badzio, A. (2019). Prognostic value of broad-spectrum keratin clones AE1/AE3 and CAM5.2 in small cell lung cancer patients undergoing pulmonary resection. *Acta Biochimica Polonica*, 66(1), 111–114. [https://doi.org/10.18388/abp.2018\\_2773](https://doi.org/10.18388/abp.2018_2773)
- Belgaumi, U., & Shetty, P. (2013). Leishman Giemsa cocktail as a new, potentially useful cytological technique comparable to Papanicolaou staining for oral cancer diagnosis. *Journal of Cytology*, 30(1), 18. <https://doi.org/10.4103/0970-9371.107507>
- Beraki, E., Olsen, T. K., & Sauer, T. (2012). Establishing a protocol for immunocytochemical staining and chromogenic in situ hybridization of Giemsa and Diff-Quick prestained cytological smears. *CytoJournal*, 9(1). <https://doi.org/10.4103/1742-6413.94518>
- Bertram, C. A., Dietert, K., Pieper, L., Erickson, N. A., Barton, A. K., & Klopffleisch, R. (2018). Effects of on-slide fixation on the cell quality of cytocentrifuged equine bronchioalveolar lavage fluid. *Veterinary Clinical Pathology*, 47(3), 513–519. <https://doi.org/10.1111/vcp.12623>
- Bezrukov, A. (2017). Romanowsky staining, the Romanowsky effect and thoughts on the question of scientific priority. *Biotechnic & Histochemistry*, 92(1), 29–35. <https://doi.org/10.1080/10520295.2016.1250285>
- Boon, M. E., & Drijver, J. S. (1986). *Routine Cytological Staining Techniques*. Mac Millan Education Ltd.
- Borges Ferro, A. (2014). *Imunohistoquímica*. <https://repositorio.ipl.pt/bitstream/10400.21/4569/1/Imunohistoqu%C3%ADmica.pdf>
- Cell Marque. (n.d.). Cell Marque Immunohistochemistry Reference Guide (Vol. 11). [https://www.cellmarque.com/cmsial-literature/162-CM\\_Vol\\_11\\_Catalog.pdf](https://www.cellmarque.com/cmsial-literature/162-CM_Vol_11_Catalog.pdf)
- Centers for Disease Control and Prevention, National Center for Chronic Disease Prevention and Health Promotion, & Office on Smoking and Health. (2010). *How Tobacco Smoke Causes Disease: The Biology and Behavioral Basis for Smoking-Attributable Disease: A Report of the Surgeon General*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK53010/>
- College of American Pathologists. (2014). Principles of Analytic Validation of Immunohistochemical Assays. In *Frequently Asked Questions (FAQs)*. Retrieved March, 10, 2023, from <https://www.cap.org/protocols-and-guidelines/cap-guidelines/current-cap-guidelines/principles-of-analytic-validation-of-immunohistochemical-assays>
- Compérat, E., Zhang, F., Perrotin, C., Molina, T., Magdeleinat, P., Marmey, B., Régnard, J.-F., Audouin, J., & Camilleri-Broët, S. (2005). Variable sensitivity and specificity of TTF-1 antibodies in lung metastatic adenocarcinoma of colorectal origin. *Modern Pathology*, 18(10), 1371–1376. <https://doi.org/10.1038/modpathol.3800422>

- Cunha, G., Eiras, M., & Teixeira, N. (2011). *Bioestatística e Qualidade na Saúde*. LIDEL.
- Dako. (2009). *Education Guide Immunohistochemical Staining Methods* (pp. 21–23). [https://kanidis.gr/wp-content/uploads/ihc\\_staining\\_methods\\_5ed.pdf](https://kanidis.gr/wp-content/uploads/ihc_staining_methods_5ed.pdf)
- Deepthi, B., Prayaga, A., & Rukmangadha, N. (2022). Comparison of modified ultrafast giemsa stain with the standard may grunwald giemsa stain in FNAC of various organs. *Journal of Cytology*, 39(4), 174. [https://doi.org/10.4103/joc.joc\\_43\\_22](https://doi.org/10.4103/joc.joc_43_22)
- Dey, P. (2018). Routine Staining in Cytology Laboratory. In *Basic and Advanced Laboratory Techniques in Histopathology and Cytology* (pp. 133–138). Springer Singapore. [https://doi.org/10.1007/978-981-10-8252-8\\_14](https://doi.org/10.1007/978-981-10-8252-8_14)
- Dörfelt, S., Matiasek, L. A., Felten, S., Sangl, L., Hartmann, K., & Matiasek, K. (2019). Antigens under cover—The preservation and demasking of selected antigens for successful poststaining immunocytochemistry of effusion, brain smears, and lymph node aspirates. *Veterinary Clinical Pathology*, 48(S1), 98–107. <https://doi.org/10.1111/vcp.12702>
- Fenu, E., & Maracaja, D. (n.d.). *CD45 (LCA)*. PathologyOutlines.Com Website. Retrieved August 12, 2023, from <https://www.pathologyoutlines.com/topic/cdmarkerscd45.html>
- Ferro, A. B. (2019). Immunohistochemistry results assessment: a scale based semiquantitative approach - The Global Immunohistochemistry Score (GIS). In *An essential guide to immunohistochemistry: cell biology research progress*. Nova Science Publishers (pp. 47–71). <http://hdl.handle.net/10400.21/11710>
- Fitzgibbons, P. L., Bradley, L. A., Fatheree, L. A., Alsabeh, R., Fulton, R. S., Goldsmith, J. D., Haas, T. S., Karabakhtsian, R. G., Loykasek, P. A., Marolt, M. J., Shen, S. S., Smith, A. T., & Swanson, P. E. (2014). Principles of Analytic Validation of Immunohistochemical Assays: Guideline From the College of American Pathologists Pathology and Laboratory Quality Center. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, 138(11), 1432–1443. <https://doi.org/10.5858/arpa.2013-0610-CP>
- Fulciniti, F., Frangella, C., Staiano, M., La Vecchia, F., Botti, G., Demuru, A., Magliulo, G., & Boon, M. E. (2008). Air-Dried Smears for Optimal Diagnostic Immunocytochemistry. *Acta Cytologica*, 52(2), 178–186. <https://doi.org/10.1159/000325476>
- Gong, Y., Symmans, W. F., Krishnamurthy, S., Patel, S., & Sneige, N. (2004). Optimal Fixation Conditions for Immunocytochemical Analysis of Estrogen Receptor in Cytologic Specimens of Breast Carcinoma. *Cancer*, 102(1), 34–40. <https://doi.org/10.1002/cncr.11906>
- Horobin, R. W., & Walter, K. J. (1987). Understanding Romanowsky staining. *Histochemistry*, 86(3), 331–336. <https://doi.org/10.1007/BF00490267>
- Ikeda, K., Sato, S., Chigira, H., Shibuki, Y., & Hiraoka, N. (2020). Effects of the Storage Solution Type and Prolonged Storage on the Immunoreactivity of Cells. *Acta Cytologica*, 64(4), 352–359. <https://doi.org/10.1159/000503268>
- Jain, D., Nambirajan, A., Borczuk, A., Chen, G., Minami, Y., Moreira, A. L., Motoi, N., Papotti, M., Rekhtman, N., Russell, P. A., Savic Prince, S., Yatabe, Y., & Bubendorf, L. (2019). Immunocytochemistry for predictive biomarker testing in lung cancer cytology. *Cancer Cytopathology*, 127(5), 325–339. <https://doi.org/10.1002/cncy.22137>
- Jörundsson, E., Lumsden, J. H., & Jacobs, R. M. (1999). Rapid Staining Techniques in Cytopathology: A Review and Comparison of Modified Protocols for Hematoxylin and Eosin, Papanicolaou and Romanowsky Stains. *Veterinary Clinical Pathology*, 28(3), 100–108. <https://doi.org/10.1111/j.1939-165X.1999.tb01057.x>

- Kaliyadan, F., & Kulkarni, V. (2019). Types of variables, descriptive statistics, and sample size. *Indian Dermatology Online Journal*, 10(1), 82. [https://doi.org/10.4103/idoj.IDOJ\\_468\\_18](https://doi.org/10.4103/idoj.IDOJ_468_18)
- Kamal, M. M. (2022). George N. Papanicolaou- A tribute. *Cytojournal Monograph Related Review Series*, 19, 20. [https://doi.org/10.25259/CMAS\\_03\\_01\\_2021](https://doi.org/10.25259/CMAS_03_01_2021)
- Kanber, Y., Pusztaszeri, M., & Auger, M. (2021). Immunocytochemistry for diagnostic cytopathology—A practical guide. *Cytopathology*, 32( 5), 562–587). <https://doi.org/10.1111/cyt.12993>
- Kirbis, I. S., Maxwell, P., Fležar, M. S., Miller, K., & Ibrahim, M. (2011). External quality control for immunocytochemistry on cytology samples: a review of UK NEQAS ICC (cytology module) results. *Cytopathology*, 22(4), 230–237. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2303.2011.00867.x>
- Klebe, S., Swalling, A., Jonavicius, L., & Henderson, D. W. (2016). An immunohistochemical comparison of two TTF-1 monoclonal antibodies in atypical squamous lesions and sarcomatoid carcinoma of the lung, and pleural malignant mesothelioma. *Journal of Clinical Pathology*, 69(2), 136–141. <https://doi.org/10.1136/jclinpath-2015-203184>
- Koss, L. (2006). *Koss' Diagnostic Cytology and its Histopathologic Bases. Vol. I* (5th ed.). Lippincott Williams & Wilkins.
- Krafts, K., & Pambuccian, S. (2011). Romanowsky staining in cytopathology: history, advantages and limitations. *Biotechnic & Histochemistry*, 86(2), 82–93. <https://doi.org/10.3109/10520295.2010.515492>
- Krogerus, L., & Kholová, I. (2018). Cell Block in Cytological Diagnostics: Review of Preparatory Techniques. *Acta Cytologica*, 62(4), 237–243. <https://doi.org/10.1159/000489769>
- Kushwaha, P., Pandey, T., Agarwal, R., Singh, M., Jain, S., & Mishra, A. (2022). Evaluation of immunocytochemistry on destained giemsa stained smears as an alternative to conventional technique. *Indian Journal Pathology Microbiology*, 65(4), 891–894. <https://www.ijpmonline.org/text.asp?2022/65/4/891/359358>
- Leonardo, E., & Bardales, R. H. (2020). Exfoliative Cytology. *Practical Immunocytochemistry in Diagnostic Cytology* (pp. 41–67). Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-46656-5\\_3](https://doi.org/10.1007/978-3-030-46656-5_3)
- Lew, K. (2012). Blood Sample Collection and Handling. In *Comprehensive Sampling and Sample Preparation* (pp. 95–121). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-381373-2.00068-5>
- Maciel, C., Roque, R., Pinheiro, C., Pina-Martins, F., Matos, J., Mesquita, M., Fagulha, R., Oliveira, S., Tavares, V., Pereira, T., & André, S. (2023). Imunocitoquímica em lâminas coradas com May-Grünwald Giemsa: análise retrospectiva de resultados. In *Trends in Biomedical Laboratory Sciences Abstract Book* (Vol. 1, pp. 31). <https://abiomedlab.org/wp-content/uploads/2023/03/I-Congresso-da-BioMedLab-Abstract-Book.pdf>
- Messaritakis, I., Stoltidis, D., Kotsakis, A., Dermitzaki, E.-K., Koinis, F., Lagoudaki, E., Koutsopoulos, A., Politaki, E., Apostolaki, S., Souglakos, J., & Georgoulas, V. (2017). TTF-1- and/or CD56-positive Circulating Tumor Cells in patients with small cell lung cancer (SCLC). *Scientific Reports*, 7(1), 45351. <https://doi.org/10.1038/srep45351>
- Moldvay, J., Jackel, M., Bogos, K., Soltész, I., Agócs, L., Kovács, G., & Schaff, Z. (2004). The role of TTF-1 in differentiating primary and metastatic lung adenocarcinomas. *Pathology & Oncology Research*, 10(2), 85–88. <https://doi.org/10.1007/BF02893461>

- Moreau, A., Le Neel, T., Joubert, M., Truchaud, A., & Laboisse, C. (1998). Approach to automation in immunohistochemistry. *Clinica Chimica Acta*, 278(2), 177–184. [https://doi.org/10.1016/S0009-8981\(98\)00145-4](https://doi.org/10.1016/S0009-8981(98)00145-4)
- Nedel, W. L., & Silveira, F. da. (2016). Different research designs and their characteristics in intensive care. *Revista Brasileira de Terapia Intensiva*, 28(3). <https://doi.org/10.5935/0103-507X.20160050>
- Noonan, C. W. (2017). Environmental asbestos exposure and risk of mesothelioma. *Annals of Translational Medicine*, 5(11), 234–234. <https://doi.org/10.21037/atm.2017.03.74>
- Piaton, E., Fabre, M., Goubin-Versini, I., Bretz-Grenier, M. F., Courtade-Saïdi, M., Vincent, S., Belleannée, G., Thivolet, F., Boutonnat, J., Debaque, H., Fleury-Feith, J., Vielh, P., Egelé, C., Bellocq, J. P., Michiels, J. F., & Cochand-Priollet, B. (2016). Guidelines for May-Grünwald–Giemsa staining in haematology and non-gynaecological cytopathology: recommendations of the French Society of Clinical Cytology (SFCC) and of the French Association for Quality Assurance in Anatomic and Cytologic Pathology (AFAQAP). *Cytopathology*, 27(5), 359–368. <https://doi.org/10.1111/cyt.12323>
- Pinheiro, C., Roque, R., Adriano, A., Mendes, P., Praça, M., Reis, I., Pereira, T., Srebotnik Kirbis, I., & André, S. (2015). Optimization of immunocytochemistry in cytology: comparison of two protocols for fixation and preservation on cytospin and smear preparations. *Cytopathology*, 26(1), 38–43. <https://doi.org/10.1111/cyt.12156>
- Raskin, R. E., Vickers, J., Ward, J. G., Toland, A., & Torrance, A. G. (2019). Optimized immunocytochemistry using leukocyte and tissue markers on Romanowsky-stained slides from dogs and cats. *Veterinary Clinical Pathology*, 48(S1), 88–97. <https://doi.org/10.1111/vcp.12759>
- Rheinländer, A., Schraven, B., & Bommhardt, U. (2018). CD45 in human physiology and clinical medicine. *Immunology Letters*, 196, 22–32. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2018.01.009>
- Roche. (2020). *OptiView DAB IHC Detection Kit*. Retrieved June, 8, 2023, from <https://www.fishersci.com/shop/products/optiview-dab-detection-kit-3/NC1689706>
- Roy-Chowdhuri, S. (2020). Immunocytochemistry of cytology specimens for predictive biomarkers in lung cancer. *Translational Lung Cancer Research*, 9(3), 898–905. <https://doi.org/10.21037/tlcr.2019.12.31>
- Santos, B., Roque, R., Pereira, T., & Mendonça, P. (2022). Imunocitoquímica em citologia aspirativa do pulmão: comparação de quatro protocolos. *Saúde & Tecnologia*, 26, 27-35. <https://doi.org/https://doi.org/10.25758/set.488>
- Satturwar, S., Malenie, R., Sutton, A., Dai, D., & Aly, F. Z. (2019). Validation of immunohistochemical tests performed on cytology cell block material: Practical application of the College of American Pathologists' guidelines. *CytoJournal*, 16, 6. [https://doi.org/10.4103/cytojournal.cytojournal\\_29\\_18](https://doi.org/10.4103/cytojournal.cytojournal_29_18)
- Shidham, V. B., Lindholm, P. F., Kajdacsy-Balla, A., Chang, C.-C., & Komorowski, R. (2000). Methods of Cytologic Smear Preparation and Fixation. *Acta Cytologica*, 44(6), 1015–1022. <https://doi.org/10.1159/000328590>
- Shield, P. W., Perkins, G., & Wright, R. G. (1996). Immunocytochemical Staining of Cytologic Specimens: How Helpful Is It? *American Journal of Clinical Pathology*, 105(2), 157–162. <https://doi.org/10.1093/ajcp/105.2.157>
- Skoog, L., & Tani, E. (2011). Immunocytochemistry: an indispensable technique in routine cytology. *Cytopathology*, 22(4), 215–229. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2303.2011.00887.x>

- Srebotnik Kirbis, I., Prača, M. J., Roque, R. R., Košuta, T., Saudade, A., & Strojjan Flezar, M. (2021). Preservation of biomarkers immunoreactivity on cytopins protected with polyethylene glycol. *Cytopathology*, 32(1), 84–91. <https://doi.org/10.1111/cyt.12913>
- Suvarna, S. K., Layton, C., & Bancroft, J. D. (2013). *Bancroft's Theory and Practice of Histological Techniques*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/C2015-0-00143-5>
- Taniuchi, M., Terada, T., & Kawata, R. (2022). Fine-Needle Aspiration Cytology for Parotid Tumors. *Life*, 12(11), 1897. <https://doi.org/10.3390/life12111897>
- Thompson, L. D. R. (2013). Malignant neoplasms of the thyroid gland. In *Head and Neck Pathology* (pp. 565–632). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-1-4377-2607-7.00033-6>
- Travis, W. D. (2002). Pathology of lung cancer. *Clinics in Chest Medicine*, 23(1), 65–81. [https://doi.org/10.1016/S0272-5231\(03\)00061-3](https://doi.org/10.1016/S0272-5231(03)00061-3)
- Tuffaha, M. S. A., Guski, H., & Kristiansen, G. (2018). Recommendations for the Utility of Immunohistochemistry in Tumor Diagnosis. In *Immunohistochemistry in Tumor Diagnostics* (pp. 257–258). Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-53577-7\\_32](https://doi.org/10.1007/978-3-319-53577-7_32)
- Ulici, V., & Wang, L. (n.d.). *TTF1*. PathologyOutlines.Com Website. Retrieved August 16, 2023, from <https://www.pathologyoutlines.com/topic/stainsttfl.html>
- Van Bockstal, M. (n.d.). *Cytokeratin AE1 / AE3*. PathologyOutlines.Com Website. Retrieved August 16, 2023, from <https://www.pathologyoutlines.com/topic/stainsae1ae3.html>
- Wang, H., Wei, N., Tang, Y., Wang, Y., Luo, G., Ren, T., Xiong, C., Li, H., Wang, M., & Qian, X. (2019). The Utility of Rapid On-Site Evaluation during Bronchoscopic Biopsy: A 2-Year Respiratory Endoscopy Central Experience. *BioMed Research International*, 2019, 1–7. <https://doi.org/10.1155/2019/5049248>
- Wittekind, D. H. (1983). On the nature of Romanowsky-Giemasa staining and its significance for cytochemistry and histochemistry: an overall view. *The Histochemical Journal*, 15(10), 1029–1047. <https://doi.org/10.1007/BF01002498>
- World Health Organization. (2023, June 26). *Lung cancer*. Retrieved September, 25, 2023, from <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/lung-cancer>
- Yan, J., Wei, Q., Jian, W., Liu, J., Tang, H., Ge, J., Zhou, J., & Zhao, T. (2014). Original Article A fine decision tree consisted of CK5/6, IMP3 and TTF1 for cytological diagnosis among reactive mesothelial cells, metastatic adenocarcinoma of lung and non-lung origin in pleural effusion. In *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 7(9) 5810-5818. Retrieved October, 15, 2023, from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4203193/>
- Yatabe, Y., Dacic, S., Borczuk, A. C., Warth, A., Russell, P. A., Lantuejoul, S., Beasley, M. B., Thunnissen, E., Pelosi, G., Rekhtman, N., Bubendorf, L., Mino-Kenudson, M., Yoshida, A., Geisinger, K. R., Noguchi, M., Chirieac, L. R., Bolting, J., Chung, J.-H., Chou, T.-Y., ... Moreira, A. L. (2019). Best Practices Recommendations for Diagnostic Immunohistochemistry in Lung Cancer. *Journal of Thoracic Oncology*, 14(3), 377–407. <https://doi.org/10.1016/j.jtho.2018.12.005>
- Yip, C., Han, N.-L., & Sng, B. (2016). Legal and ethical issues in research. *Indian Journal of Anaesthesia*, 60(9), 684. <https://doi.org/10.4103/0019-5049.190627>
- Yuan, M., Wang, Y., Yin, W., Xiao, Y., Hu, M., & Hu, Y. (2021). Efficacy of rapid on-site cytological evaluation (ROSE) by a pulmonologist in determining specimen adequacy and diagnostic accuracy in

interventional diagnosis of lung lesions. *Journal of International Medical Research*, 49(2), 030006052098268. <https://doi.org/10.1177/0300060520982687>

Zheng, L.-H., Jia, H.-Y., Liu, X.-J., Sun, H.-S., Du, F.-J., Pan, L.-P., Huang, H.-R., & Zhang, Z.-D. (2016). Modified cytospin slide microscopy method for rapid diagnosis of smear-negative pulmonary tuberculosis. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, 20(4), 456–461. <https://doi.org/10.5588/ijtld.15.0733>

Zheng, S., & Epstein, P. (2021). CD45 Immunohistochemistry in Mouse Kidney. *Bio-protocol*, 11(22). <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.4230>

## 8. Apêndices

### 8.1. Apêndice 1

#### 8.1.1. Cronograma das tarefas

Tabela 8.1. - Cronograma das tarefas realizadas para o projeto de investigação.

	Set	Out	Nov	Dez	Jan	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul	Ago	Set
Revisão bibliográfica	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
Organização do plano de trabalho	■												
Entrega do formulário de projeto de investigação				■									
Realização da fase I	■	■	■	■	■								
Realização da fase II						■	■	■	■				
Realização da fase III									■	■	■	■	
Estatística e organização de dados				■	■	■	■	■	■	■	■	■	■

## 8.1.2. Orçamento do projeto

Tabela 8.2. - Orçamento do projeto.

Recursos Humanos		Custo Mensal (€)	Meses	Custo Total (€)
Bolsa de Investigação de Licenciado		745,00 €	14	10 430,00 €
Seguro Social Voluntário		115,00 €	14	1 610,00 €
Seguro de acidentes pessoal		150,00 €	12	1 800,00 €
Deslocações		40,00 €	14	560,00 €
<b>Total Recursos Humanos</b>				<b>14 400,00 €</b>
Materiais e Reagentes de Laboratório		Custo Unitário (€)	Quantidade	Custo Total (€)
Geral	Caneta de acetato	2,10 €	2	4,20 €
	Borracha	1,17 €	1	1,17 €
	Lápis de carvão	0,40 €	1	0,40 €
	Papel absorvente (caixa = 180 unidades)	1,33 €	1	1,33 €
Material de Laboratório	Tubo de Falcon 50 mL	0,13 €	1	0,13 €
	Pipeta de Pasteur	0,01 €	4	0,04 €
	Lâmina de vidro	0,27 €	6	1,62 €
	Lamelas	0,01 €	12	0,12 €
Técnicas Laboratoriais	Processamento histológico	28,90 €	20	578,00 €
	Técnica de coloração MGG	31,30 €	40	1 252,00 €
	Técnica de ICQ	27,80 €	40	3 336,00 €
<b>Total de Material e Técnicas de Laboratório</b>				<b>5 167,91 €</b>
<b>Total do Orçamento do Projeto</b>				<b>19 567,91 €</b>

**Nota:** Nesta análise consta somente o custo com reagentes e materiais. Serão utilizados equipamentos do IPO de Lisboa (citocentrífuga, aparelho de coloração e aparelho de ICQ), mas a sua utilização para este projeto não altera os intervalos de manutenção nem acarretam custos extra para o IPO de Lisboa.

## 8.2. Apêndice 2: Preparação do citobloco



Figura 8.1. - HistoGel (Imagem da autora).



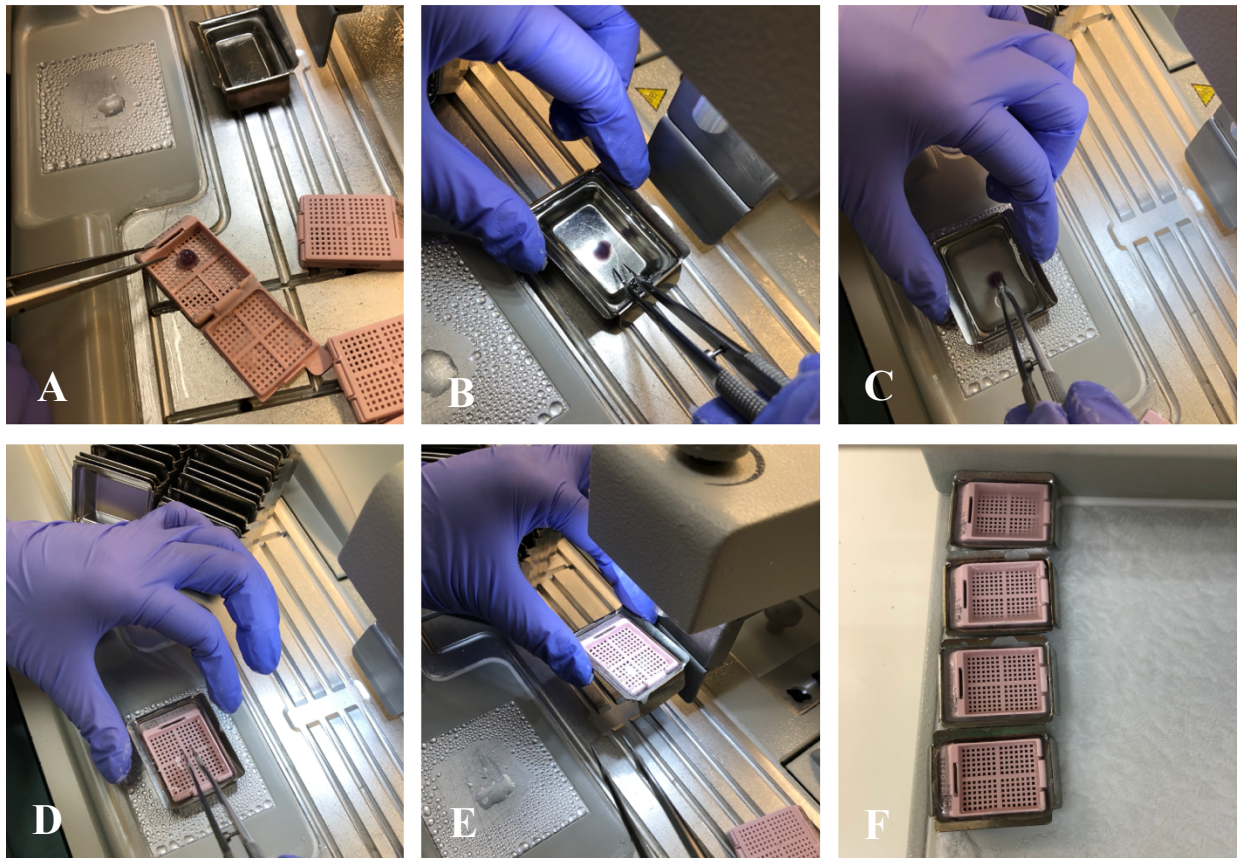
**Figura 8.2.** – Cesto de cassetes para processamento histológico. **Nota:** foram colocadas barras pretas na identificação das amostras de modo a proteger a identidade do paciente (Imagem da autora).



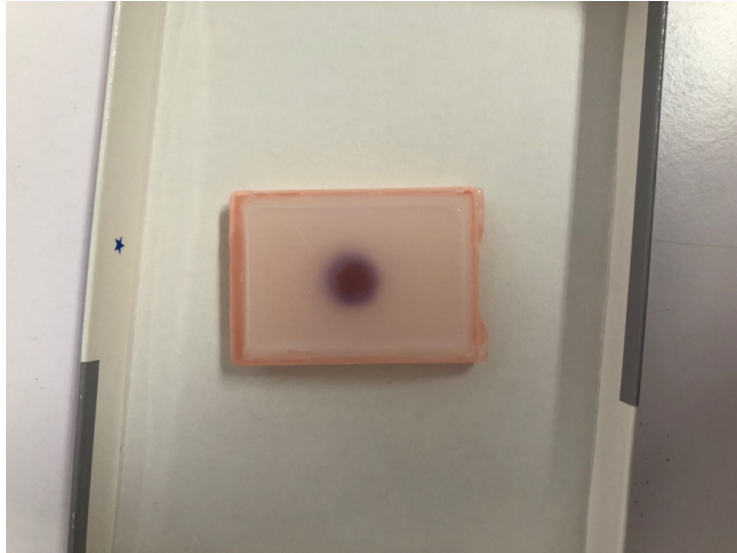
**Figura 8.3.** - Processador Leica™ PELORIS 3 (Imagem da autora).



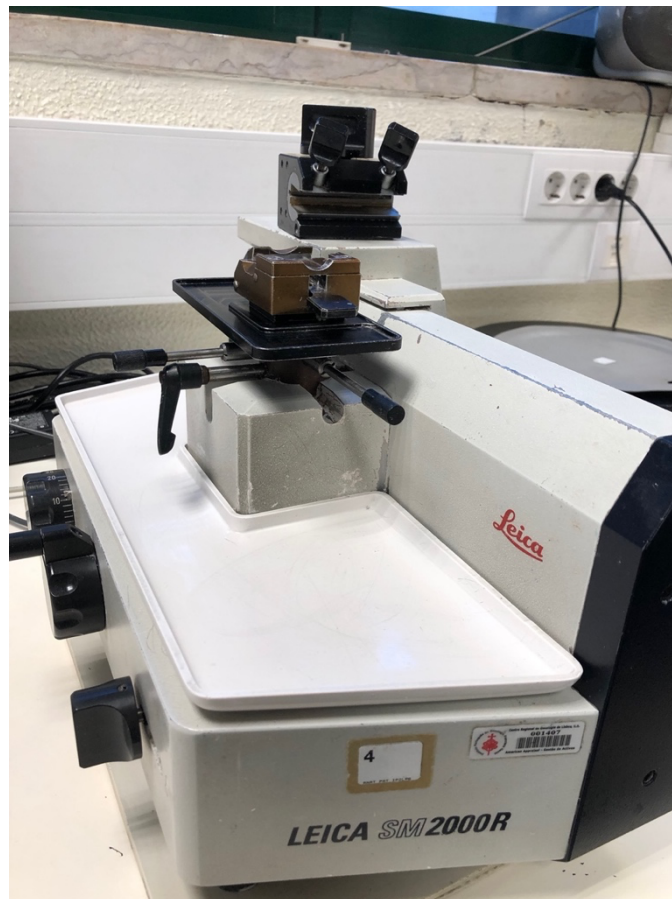
**Figura 8.4.** - Reagentes do processamento histológico - Processador Leica™ PELORIS 3 (Imagem da autora).



**Figura 8.5.** - Etapas da inclusão de um citobloco. **Legenda:** (A) Cassete com citobloco. (B) Colocação de parafina no molde e orientação de citobloco. (C) Colocação do molde na pequena superfície fria e realização do calque. (D) Colocação da cassete identificadora. (E) Enchimento do molde com parafina. (F) Bloco na placa fria para gelar (Imagem da autora).



**Figura 8.6.** - Bloco de parafina (Imagem da autora).



**Figura 8.7.** - Micrótopo de correção LEICA SM 2000R (Imagem da autora).



Figura 8.8. - Micrótomo de *Minot* LEICA RM 2255 (Imagem da autora).

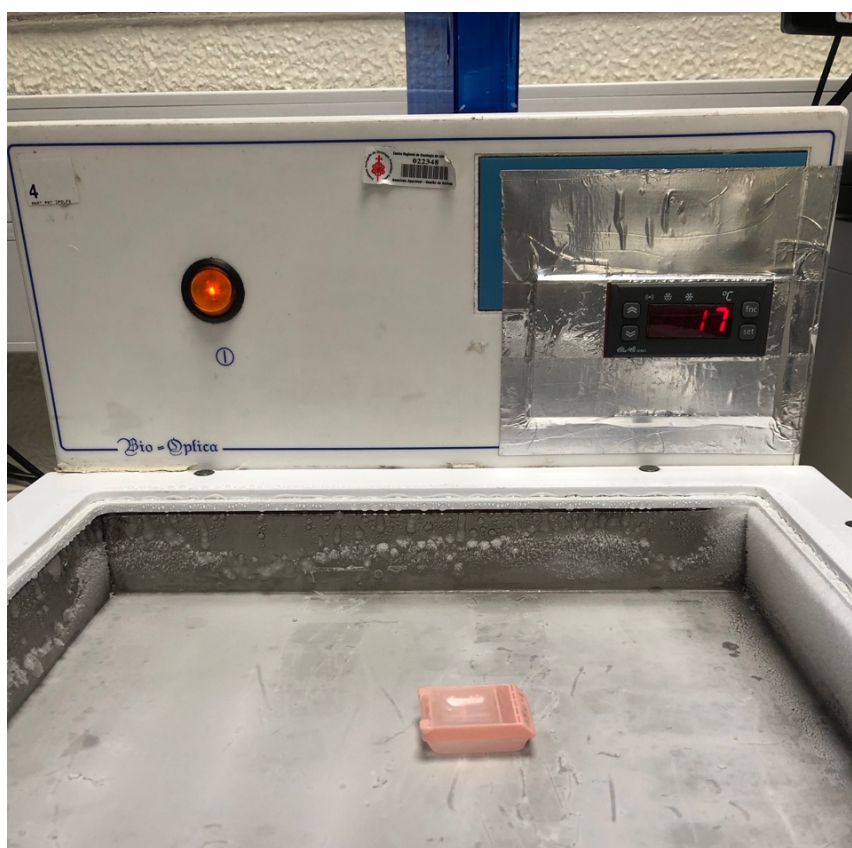
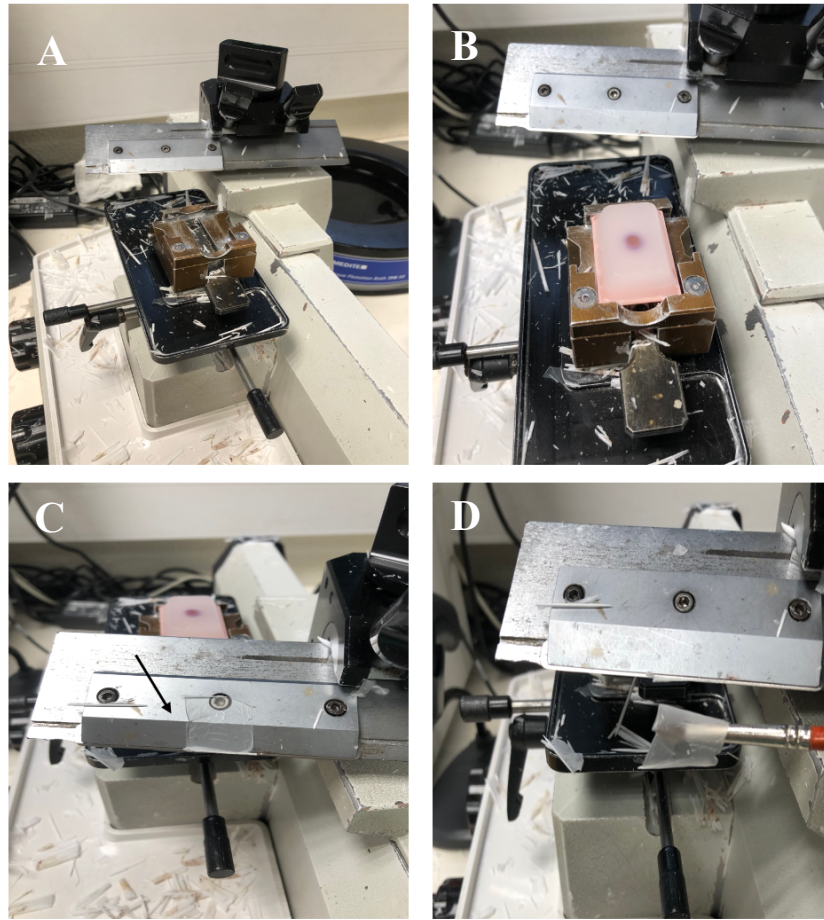


Figura 8.9. - Placa fria (Imagem da autora).



**Figura 8.10.** - Realização de um corte histológico. **Legenda:** (A) Micrótomo com suporte de facas; (B) Suporte de micrótomo para blocos; (C) Corte histológico com 3  $\mu\text{m}$  - seta preta; (D) Corte histológico em pincel (Imagem da autora).

### 8.3. Apêndice 2: Coloração MGG



**Figura 8.11.** - Colorador Sakura Tissue-Tek Prisma 6130 (Imagem da autora).

## 8.4. Apêndice 3: Técnica ICQ



Figura 8.12. - Ventana Benchmark (Imagem da autora).

## 9. Anexos

### 9.1. Anexo 1: Protocolo Processamento Histológico dos Citoblocos

Tabela 9.1. - Protocolo do processamento histológico dos citoblocos.

	<b>Reagente</b>	<b>Tempo (minutos)</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Tipo de pressão/Vácuo</b>	<b>Agitador</b>
<b>1</b>	Formalina 10%	20	45°C	Ambiente	Médio
<b>2</b>	Etanol 70%	20	45°C	Ambiente	Médio
<b>3</b>	Etanol 95%	20	45°C	Ambiente	Médio
<b>4</b>	Etanol Absoluto	20	45°C	Ambiente	Médio
<b>5</b>	Etanol Absoluto	20	45°C	Ambiente	Médio
<b>6</b>	Etanol Absoluto	40	45°C	Ambiente	Médio
<b>7</b>	Etanol Absoluto	60	45°C	Ambiente	Médio
<b>8</b>	Xileno	30	45°C	Ambiente	Médio
<b>9</b>	Xileno	30	45°C	Ambiente	Médio
<b>10</b>	Xileno	60	45°C	Ambiente	Médio
<b>11</b>	Parafina	40	65°C	Vácuo	Médio
<b>12</b>	Parafina	40	65°C	Vácuo	Médio
<b>13</b>	Parafina	60	65°C	Vácuo	Médio

## 9.2. Anexo 2: Protocolo da coloração Hematoxilina-Eosina

Tabela 9.2. – Protocolo da coloração Hematoxilina-Eosina.

	Reagente	Duração	Tempo máximo
1	Xilol	3'30''	3'30''
2	Xilol	3'30''	3'30''
3	Álcool 96%	0'15''	---
4	Álcool 96%	2'00''	---
5	Álcool 70%	2'00''	---
6	Água corrente	2'00''	---
7	Hematoxilina DAKO	0'45''	0'45''
8	Água destilada	2'00''	2'00''
9	Bluing Buffer DAKO	1'00''	1'00''
10	Água corrente	2'00''	2'00''
11	Álcool 70%	1'00''	1'00''
12	Eosina DAKO	3'00''	3'00''
13	Álcool 96%	1'00''	1'00''
14	Álcool 100%	1'00''	1'00''
15	Álcool 100%	1'00''	1'00''
16	Álcool 100%	1'00''	1'00''
17	Xilol	1'00''	---

## 9.3. Anexo 3: Protocolo da coloração MGG

Tabela 9.3 – Protocolo da coloração MGG.

Etapa	Nome da solução	Duração	Agitação
1	May-Grünwald	10 minutos	Sim
2	Solução de lavagem	1 minuto	Sim
3	Giemsa	15 minutos	Sim
4	Solução de lavagem	1 minuto	Sim
5	Estação de secagem	20 minutos	Sim (Intensiva)
6	Montagem	---	---

## 9.4. Anexo 4: Protocolos ICQ - CD45

**Protocol Summary**  
**Procedure: U ultraView DAB ( v1.02.0018 )**  
**BenchMark ULTRA IHC/ISH**  
**Ventana Medical Systems, Inc., 1910 Innovation Park Drive Tucson, Arizona USA**

Validated: No		Active: Yes	
Protocol No	Protocol Name	Version	Creation Date
1255	CIT CD45 VENT	2	09/23/2022 11:50:09 AM

- 1 Ab Incubation Temperatures [Selected]
- 2 Warmup Slide to [37 Deg C], and Incubate for 4 Minutes ( Antibody )
- 3 Antibody [Selected]
- 4 Apply One Drop of [ANTI-LCA] ( Antibody ), Apply Coverslip, and Incubate for [0 Hr 20 Min]
- 5 ultraBlock [Selected]
- 6 Apply One Drop of [OPTION 3] ( 2nd Option ), Apply Coverslip, and Incubate for [8 Minutes]
- 7 Counterstain [Selected]
- 8 Apply One Drop of [HEMATOXYLIN II] ( Counterstain ), Apply Coverslip, and Incubate for [12 Minutes]
- 9 Post Counterstain [Selected]
- 10 Apply One Drop of [BLUING REAGENT] ( Post Counterstain ), Apply Coverslip, and Incubate for [8 Minutes]

**Figura 9.1.** - Protocolo ICQ do soro primário CD45 para lâminas PEG.

**Protocol Summary**  
**Procedure: U ultraView DAB ( v1.02.0018 )**  
**BenchMark ULTRA IHC/ISH**  
**Ventana Medical Systems, Inc., 1910 Innovation Park Drive Tucson, Arizona USA**

Validated: No		Active: Yes	
Protocol No	Protocol Name	Version	Creation Date
1257	CIT CD45 VENT GIEMSA	2	09/23/2022 11:51:31 AM

- 1 Cell Conditioning [Selected]
- 2 ULTRA Conditioner #1 [Selected]
- 3 Warmup Slide to [95 Deg C], and Incubate for 8 Minutes ( Cell Conditioner #1 )
- 4 Ab Incubation Temperatures [Selected]
- 5 Warmup Slide to [37 Deg C], and Incubate for 4 Minutes ( Antibody )
- 6 Antibody [Selected]
- 7 Apply One Drop of [ANTI-LCA] ( Antibody ), Apply Coverslip, and Incubate for [0 Hr 20 Min]
- 8 ultraBlock [Selected]
- 9 Apply One Drop of [OPTION 3] ( 2nd Option ), Apply Coverslip, and Incubate for [8 Minutes]
- 10 Counterstain [Selected]
- 11 Apply One Drop of [HEMATOXYLIN II] ( Counterstain ), Apply Coverslip, and Incubate for [12 Minutes]
- 12 Post Counterstain [Selected]
- 13 Apply One Drop of [BLUING REAGENT] ( Post Counterstain ), Apply Coverslip, and Incubate for [8 Minutes]

**Figura 9.2.** - Protocolo ICQ do soro primário CD45 para lâminas MGG.

## Protocol Summary

Procedure: U OptiView DAB IHC v6 ( v1.00.0136 )

BenchMark ULTRA IHC/ISH

Ventana Medical Systems, Inc., 1910 Innovation Park Drive Tucson, Arizona USA

Protocol No	Protocol Name	Version	Creation Date
435	CD45	4	10/19/2022 11:40:37 AM

- 1 Paraffin [Selected]
- 2 Baking [Selected]
- 3 Warmup Slide to [72 Deg C], and Incubate for [4 Minutes] ( Baking )
- 4 Deparaffinization [Selected]
- 5 Warmup Slide to [72 Deg C] from Medium Temperatures ( Deparaffinization )
- 6 Extended Depar [Selected]
- 7 Cell Conditioning [Selected]
- 8 Ultra CC1 [Selected]
- 9 Warmup Slide to [98 Deg C], and Incubate for 4 Minutes ( Cell Conditioner #1 )
- 10 CC1 8 Min [Selected]
- 11 CC1 16 Min [Selected]
- 12 CC1 24 Min [Selected]
- 13 CC1 32 Min [Selected]
- 14 CC1 40 Min [Selected]
- 15 Pre Primary Peroxidase Inhibit. [Selected]
- 16 Primary Antibody [Selected]
- 17 Primary Antibody Temperature [Selected]
- 18 Warmup Slide to [37 Deg C] ( Primary Antibody )
- 19 Apply Coverslip, One Drop of [ANTI-LCA] ( Antibody ), and Incubate for [0 Hr 32 Min]
- 20 OptiView HQ Linker [Selected]
- 21 OptiView HQ Universal Linker [Selected]
- 22 Apply Coverslip, One Drop of OV HQ UNIV LINKR, and Incubate for [8 Minutes]
- 23 OptiView HRP Multimer [Selected]
- 24 HRP Multimer Incubation Time [Selected]
- 25 Apply Coverslip, One Drop of OV HRP MULTIMER, and Incubate for [8 Minutes]
- 26 Counterstain [Selected]
- 27 Apply One Drop of [HEMATOXYLIN II] ( Counterstain ), Apply Coverslip, and Incubate for [8 Minutes]
- 28 Post Counterstain [Selected]
- 29 Apply One Drop of [BLUING REAGENT] ( Post Counterstain ), Apply Coverslip, and Incubate for [4 Minutes]

Figura 9.3. - Protocolo ICQ do soro primário CD45 para lâminas realizadas a partir de citobloco.

## 9.5. Anexo 5: Protocolos ICQ – TTF-1

### Protocol Summary

**Procedure: U ultraView DAB ( v1.02.0018 )**  
**BenchMark ULTRA IHC/ISH**  
**Ventana Medical Systems, Inc., 1910 Innovation Park Drive Tucson, Arizona USA**

Validated: No		Active: Yes	
Protocol No	Protocol Name	Version	Creation Date
714	CIT TTF1 VENT	5	06/05/2023 3:00:00 PM

- 1 Cell Conditioning [Selected]
- 2 ULTRA Conditioner #1 [Selected]
- 3 Warmup Slide to [94 Deg C], and Incubate for 8 Minutes ( Cell Conditioner #1 )
- 4 Ab Incubation Temperatures [Selected]
- 5 Warmup Slide to [37 Deg C], and Incubate for 4 Minutes ( Antibody )
- 6 Antibody [Selected]
- 7 Apply One Drop of [TTF-1 (SP141)] ( Antibody ), Apply Coverslip, and Incubate for 0 Hr 16 Min ← Tempo de incubação inicial:  
0 Hr 20 Min
- 8 Amplify [Selected]
- 9 Mouse Antibody Amp [Selected]
- 10 ultraBlock [Selected]
- 11 Apply One Drop of [OPTION 3] ( 2nd Option ), Apply Coverslip, and Incubate for [8 Minutes]
- 12 Counterstain [Selected]
- 13 Apply One Drop of [HEMATOXYLIN II] ( Counterstain ), Apply Coverslip, and Incubate for [12 Minutes]
- 14 Post Counterstain [Selected]
- 15 Apply One Drop of [BLUING REAGENT] ( Post Counterstain ), Apply Coverslip, and Incubate for [8 Minutes]

**Figura 9.4.** - Protocolo ICQ do soro TTF-1 para lâminas PEG. **Nota:** a caixa de texto representa o tempo de incubação antes das alterações; o sublinhado vermelho representa alterações efetuadas no protocolo.

### Protocol Summary

**Procedure: U ultraView DAB ( v1.02.0018 )**  
**BenchMark ULTRA IHC/ISH**  
**Ventana Medical Systems, Inc., 1910 Innovation Park Drive Tucson, Arizona USA**

Validated: No		Active: Yes	
Protocol No	Protocol Name	Version	Creation Date
1165	CIT TTF1 CM	4	04/14/2023 11:31:16 AM

- 1 Cell Conditioning [Selected]
- 2 ULTRA Conditioner #1 [Selected]
- 3 Warmup Slide to [96 Deg C], and Incubate for 8 Minutes ( Cell Conditioner #1 ) ← Tempo de incubação inicial:  
0Hr 20 Min
- 4 20 minutes of ULTRA CC1 [Selected]
- 5 Ab Incubation Temperatures [Selected]
- 6 Warmup Slide to [37 Deg C], and Incubate for 4 Minutes ( Antibody )
- 7 Antibody [Selected]
- 8 Apply One Drop of [TTF-1 (SP141)] ( Antibody ), Apply Coverslip, and Incubate for [0 Hr 28 Min]
- 9 Amplify [Selected]
- 10 Mouse Antibody Amp [Selected]
- 11 ultraBlock [Selected]
- 12 Apply One Drop of [OPTION 3] ( 2nd Option ), Apply Coverslip, and Incubate for [8 Minutes]
- 13 Counterstain [Selected]
- 14 Apply One Drop of [HEMATOXYLIN II] ( Counterstain ), Apply Coverslip, and Incubate for [8 Minutes] ← Tempo de incubação inicial:  
0Hr 4 Min
- 15 Post Counterstain [Selected]
- 16 Apply One Drop of [BLUING REAGENT] ( Post Counterstain ), Apply Coverslip, and Incubate for [4 Minutes]

**Figura 9.5.** - Protocolo ICQ do soro primário TTF-1 para lâminas MGG. **Nota:** as caixas de texto representam o tempo de incubação antes das alterações; o sublinhado vermelho representa alterações efetuadas no protocolo.

## Protocol Summary

Procedure: U OptiView DAB IHC v6 ( v1.00.0136 )

BenchMark ULTRA IHC/ISH

Ventana Medical Systems, Inc., 1910 Innovation Park Drive Tucson, Arizona USA

Validated: No		Active: Yes	
Protocol No	Protocol Name	Version	Creation Date
414	TTF1	4	10/19/2022 11:40:14 AM

- 1 Paraffin [Selected]
- 2 Baking [Selected]
- 3 Warmup Slide to [72 Deg C], and Incubate for [4 Minutes] ( Baking )
- 4 Deparaffinization [Selected]
- 5 Warmup Slide to [72 Deg C] from Medium Temperatures ( Deparaffinization )
- 6 Extended Depar [Selected]
- 7 Cell Conditioning [Selected]
- 8 Ultra CC1 [Selected]
- 9 Warmup Slide to [95 Deg C], and Incubate for 4 Minutes ( Cell Conditioner #1 )
- 10 CC1 8 Min [Selected]
- 11 CC1 16 Min [Selected]
- 12 CC1 24 Min [Selected]
- 13 CC1 32 Min [Selected]
- 14 CC1 40 Min [Selected]
- 15 CC1 48 Min [Selected]
- 16 CC1 56 Min [Selected]
- 17 CC1 64 Min [Selected]
- 18 Pre Primary Peroxidase Inhibit. [Selected]
- 19 Primary Antibody [Selected]
- 20 Apply Coverslip, One Drop of [TTF-1 (SP141)] ( Antibody ), and Incubate for [0 Hr 12 Min]
- 21 OptiView HQ Linker [Selected]
- 22 OptiView HQ Universal Linker [Selected]
- 23 Apply Coverslip, One Drop of OV HQ UNIV LINKR, and Incubate for [8 Minutes]
- 24 OptiView HRP Multimer [Selected]
- 25 HRP Multimer Incubation Time [Selected]
- 26 Apply Coverslip, One Drop of OV HRP MULTIMER, and Incubate for [8 Minutes]
- 27 Counterstain [Selected]
- 28 Apply One Drop of [HEMATOXYLIN II] ( Counterstain ), Apply Coverslip, and Incubate for [12 Minutes]
- 29 Post Counterstain [Selected]
- 30 Apply One Drop of [BLUING REAGENT] ( Post Counterstain ), Apply Coverslip, and Incubate for [8 Minutes]

Figura 9.6. - Protocolo ICQ do soro primário TTF-1 para lâminas realizadas a partir de citobloco.

## 9.6. Anexo 6: Protocolos ICQ – Citoqueratina AE1/AE3

### Protocol Summary

**Procedure: U ultraView DAB ( v1.02.0018 )**  
**BenchMark ULTRA IHC/ISH**  
**Ventana Medical Systems, Inc., 1910 Innovation Park Drive Tucson, Arizona USA**

Validated: No		Active: Yes	
Protocol No	Protocol Name	Version	Creation Date
36	CIT AE1AE3	5	06/12/2023 1:53:42 PM

- 1 Ab Incubation Temperatures [Selected]
- 2 Warmup Slide to [37 Deg C], and Incubate for 4 Minutes ( Antibody )
- 3 Antibody [Selected]
- 4 Apply One Drop of [ANTI-PAN KERATIN] ( Antibody ), Apply Coverslip, and Incubate for [0 Hr 28 Min]
- 5 ultraBlock [Selected]
- 6 Apply One Drop of [OPTION 3] ( 2nd Option ), Apply Coverslip, and Incubate for [4 Minutes]
- 7 Counterstain [Selected]
- 8 Apply One Drop of [HEMATOXYLIN II] ( Counterstain ), Apply Coverslip, and Incubate for [12 Minutes]
- 9 Post Counterstain [Selected]
- 10 Apply One Drop of [BLUING REAGENT] ( Post Counterstain ), Apply Coverslip, and Incubate for [8 Minutes]

Figura 9.7. - Protocolo ICQ do soro primário citoqueratina AE1/AE3 para lâminas PEG.

### Protocol Summary

**Procedure: U ultraView DAB ( v1.02.0018 )**  
**BenchMark ULTRA IHC/ISH**  
**Ventana Medical Systems, Inc., 1910 Innovation Park Drive Tucson, Arizona USA**

Validated: No		Active: Yes	
Protocol No	Protocol Name	Version	Creation Date
35	CIT AE1AE3 MGG TIT	4	07/10/2023 9:23:39 AM

- 1 Cell Conditioning [Selected]
- 2 ULTRA Conditioner #1 [Selected]
- 3 Warmup Slide to [95 Deg C], and Incubate for 8 Minutes ( Cell Conditioner #1 )
- 4 Ab Incubation Temperatures [Selected]
- 5 Warmup Slide to [37 Deg C], and Incubate for 4 Minutes ( Antibody )
- 6 Antibody [Selected]
- 7 Apply One Drop of [ANTI-PAN KERATIN] ( Antibody ), Apply Coverslip, and Incubate for [0 Hr 32 Min] ← Tempo de incubação inicial:  
0 Hr 28 Min
- 8 ultraBlock [Selected]
- 9 Apply One Drop of [OPTION 3] ( 2nd Option ), Apply Coverslip, and Incubate for [4 Minutes] ← Tempo de incubação inicial:  
0 Hr 8 Min
- 10 Counterstain [Selected]
- 11 Apply One Drop of [HEMATOXYLIN II] ( Counterstain ), Apply Coverslip, and Incubate for [12 Minutes]
- 12 Post Counterstain [Selected]
- 13 Apply One Drop of [BLUING REAGENT] ( Post Counterstain ), Apply Coverslip, and Incubate for [8 Minutes]

Figura 9.8. - Protocolo ICQ do soro primário citoqueratina AE1/AE3. **Nota:** as caixas de texto representam o tempo de incubação antes das alterações; o sublinhado vermelho representa alterações efetuadas no protocolo.

**Protocol Summary**  
**Procedure: U OptiView DAB IHC v6 ( v1.00.0136 )**  
**BenchMark ULTRA IHC/ISH**  
**Ventana Medical Systems, Inc., 1910 Innovation Park Drive Tucson, Arizona USA**

Validated: No		Active: Yes	
Protocol No	Protocol Name	Version	Creation Date
455	CKA1A3	13	07/17/2023 10:51:27 AM

- 1 Paraffin [Selected]
- 2 Baking [Selected]
- 3 Warmup Slide to [72 Deg C], and Incubate for [4 Minutes] ( Baking )
- 4 Deparaffinization [Selected]
- 5 Warmup Slide to [72 Deg C] from Medium Temperatures ( Deparaffinization )
- 6 Extended Depar [Selected]
- 7 Cell Conditioning [Selected]
- 8 Ultra CC1 [Selected]
- 9 Warmup Slide to [98 Deg C], and Incubate for 4 Minutes ( Cell Conditioner #1 )
- 10 CC1 8 Min [Selected]
- 11 CC1 16 Min [Selected]
- 12 CC1 24 Min [Selected]
- 13 Post Cell Conditioning Enzyme [Selected]
- 14 Apply One Drop of [PROTEASE 3] ( Enzyme ), Apply Coverslip, and Incubate for [4 Minutes]
- 15 Pre Primary Peroxidase Inhibit. [Selected]
- 16 Primary Antibody [Selected]
- 17 Apply Coverslip, One Drop of [ANTI-PAN KERATIN] ( Antibody ), and Incubate for [0 Hr 4 Min]
- 18 OptiView HQ Linker [Selected]
- 19 OptiView HQ Universal Linker [Selected]
- 20 Apply Coverslip, One Drop of OV HQ UNIV LINKR, and Incubate for [8 Minutes]
- 21 OptiView HRP Multimer [Selected]
- 22 HRP Multimer Incubation Time [Selected]
- 23 Apply Coverslip, One Drop of OV HRP MULTIMER, and Incubate for [8 Minutes]
- 24 Counterstain [Selected]
- 25 Apply One Drop of [HEMATOXYLIN II] ( Counterstain ), Apply Coverslip, and Incubate for [12 Minutes]
- 26 Post Counterstain [Selected]
- 27 Apply One Drop of [BLUING REAGENT] ( Post Counterstain ), Apply Coverslip, and Incubate for [8 Minutes]

**Figura 9.9.** - Protocolo ICQ do soro primário citoqueratina AE1/AE3 para lâminas realizadas a partir de citobloco.

## 9.7. Anexo 7: Scripts R Studio

### 9.7.1. Análise Estatística Soro CD45

*#Análise estatística: Soro primário CD45*

```
protocolos = read.table ("/Users/catarina.maciел/Desktop/tabela.csv",
header = TRUE, sep = ";", dec = ",")
```

```
summary(protocolos)
```

```
MGG = protocolos[,3]
PEG = protocolos [,2]
CB = protocolos[,1]
```

```
shapiro.test(MGG) #p-value > 0,05 = Os dados assumem uma distribuição normal
```

```
shapiro.test(PEG) #p-value < 0,05 = Os dados não assumem uma distribuição normal
```

```

shapiro.test(CB) #p-value > 0,05 = Os dados assumem uma distribuição
normal

wilcox.test(x = MGG, y = PEG)
#O valor de p-value < 0,05 pelo que a hipótese nula é rejeitada --> H1:
são estatisticamente diferentes

wilcox.test(x = CB, y = PEG)
#O valor de p-value > 0,05 pelo que a hipótese nula é aceite --> H0:
não são estatisticamente diferentes

wilcox.test(x = CB, y = MGG)
#O valor de p-value < 0,05 pelo que a hipótese nula é rejeitada --> H1:
são estatisticamente diferentes

pvalues = c(0.003872, 0.3329, 0.02817)

p.adjust(pvalues, method = "fdr")

#p-values após aplicação do fator de correção

#MGG vs. PEG: p-value = 0,011616
#CB vs. PEG: p-value = 0,332900
#CB vs. MGG: p-value = 0,042255

```

## 9.7.2. Análise Estatística Soro TTF-1

*#Análise estatística: Soro primário TTF-1*

```

protocolos = read.table ("/Users/catarina.maciell/Desktop/ttfl.csv",
header = TRUE, sep = ";", dec = ",")

MGG = protocolos[,3]
PEG = protocolos [,2]
CB = protocolos[,1]

shapiro.test(MGG) #p-value > 0,05 = Os dados assumem uma distribuição
normal
shapiro.test(PEG) #p-value < 0,05 = Os dados não assumem uma
distribuição normal
shapiro.test(CB) #p-value < 0,05 = Os dados não assumem uma
distribuição normal

wilcox.test(x = MGG, y = PEG)
#O valor de p-value < 0,05 pelo que a hipótese nula é rejeitada --> H1:
são estatisticamente diferentes

wilcox.test(x = CB, y = PEG)
#O valor de p-value > 0,05 pelo que a hipótese nula é aceite --> H0:
não são estatisticamente diferentes

wilcox.test(x = CB, y = MGG)
#O valor de p-value < 0,05 pelo que a hipótese nula é rejeitada --> H1:
são estatisticamente diferentes

pvalues = c(0.0009695, 1, 0.01483)

p.adjust(pvalues, method = "fdr")

```

```
#p-values após aplicação do fator de correção
```

```
#MGG vs. PEG: p-value = 0,085455
```

```
#CB vs. PEG: p-value = 0,246700
```

```
#CB vs. MGG: p-value = 0,054450
```

### 9.7.3. Análise Estatística Soro Citoqueratina AE1/AE3

```
#Análise estatística: Soro primário Citoqueratina AE1/3
```

```
protocolos = read.table  
("/Users/catarina.maciell/Desktop/tabela_ae13.csv", header = TRUE, sep =  
";", dec = ",")
```

```
CB = protocolos[,1]  
PEG = protocolos[,2]  
MGG = protocolos[,3]
```

```
shapiro.test(CB) #p-value > 0,05 = Os dados assumem uma distribuição  
normal
```

```
shapiro.test(PEG) #p-value > 0,05 = Os dados assumem uma distribuição  
normal
```

```
shapiro.test(MGG) #p-value > 0,05 = Os dados assumem uma distribuição  
normal
```

```
wilcox.test(x = MGG, y = PEG) #0,05697
```

```
#O valor de p-value > 0,05 pelo que a hipótese nula é rejeitada --> H1:  
não são estatisticamente diferentes
```

```
wilcox.test(x = CB, y = PEG)
```

```
#O valor de p-value > 0,05 pelo que a hipótese nula é aceite --> H0:  
não são estatisticamente diferentes
```

```
wilcox.test(x = CB, y = MGG)
```

```
#O valor de p-value < 0,05 pelo que a hipótese nula é rejeitada --> H1:  
são estatisticamente diferentes
```

```
pvalues = c(0.05697, 0.2467, 0.01815)
```

```
p.adjust(pvalues, method = "fdr")
```

```
#p-values após aplicação do fator de correção
```

```
#MGG vs. PEG: p-value = 0,085455
```

```
#CB vs. PEG: p-value = 0,246700
```

```
#CB vs. MGG: p-value = 0,054450
```