

III Congresso Nacional Ciências Biomédicas Laboratoriais



Imunocitoquímica em citologia aspirativa do pulmão: comparação de três métodos de preservação

Santos B^{1,2}; Barroca C¹; Roque R^{1,3}; Pereira T^{1,3}; Mendonça P¹; André S³

¹ Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa

² CUF Descobertas Hospital

³ Instituto Português de Oncologia de Lisboa Francisco Gentil, EPE

E-mail de contacto: bruna_1996_santos@sapo.pt

25 de Outubro de 2019



Introdução

• Citopatologia

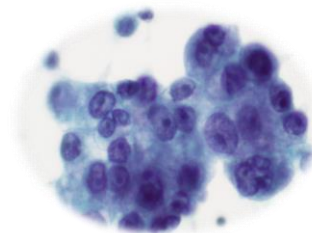
- A citologia desempenha um papel cada vez mais importante no diagnóstico de várias doenças, particularmente as de origem neoplásica.
- Não é incomum que amostras citológicas sejam a única amostra de diagnóstico disponível em doentes oncológicos.
- Atualmente, o diagnóstico de neoplasias com base apenas em critérios morfológicos já não é suficiente.

III Congresso Nacional de Ciências Biomédicas Laboratoriais

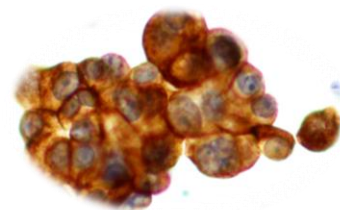
Introdução

- **Imunocitoquímica**

- Técnica utilizada para a identificação e localização de epítomos em células, baseada na ligação específica antígeno-anticorpo através de cor propiciando a observação microscópica desses locais *in situ*.



Coloração de Papanicolaou



ICQ com CK CAM 5.2

III Congresso Nacional de Ciências Biomédicas Laboratoriais

Introdução

- **Com Imunocitoquímica é possível:**

- Caracterizar o tipo celular
- Determinar o tecido de origem usando marcadores específicos do local
- Determinar a subclasse ou subtipo de tumores
- Fornecer informações prognósticas e preditivas
- Caracterizar microrganismos

III Congresso Nacional de Ciências Biomédicas Laboratoriais

Introdução

- Vários métodos têm sido relatados para a preservação e armazenamento de amostras (Pinheiro, 2014)

- Polietilenoglicol (PEG)
- Papanicolaou (PAP)
- May-Grunwald Giemsa (MGG)
- Congelação

**Temperatura
Ambiente**



Estas divergências dificultam a padronização intra-laboratorial e inter-laboratorial, que é hoje em dia uma das principais limitações da ICQ (Kirbis, 2011; Skoog, 2011).

III Congresso Nacional de Ciências Biomédicas Laboratoriais

Objetivo geral

**Avaliar a qualidade da imunomarcção de amostras de Citologia Aspirativa do
Pulmão preservadas em PEG, PAP e MGG para a determinação da
imunexpressão dos antígenos TTF-1, P40 e Cromogranina A.**

III Congresso Nacional de Ciências Biomédicas Laboratoriais

Material e Métodos

- Amostra em estudo: citologia aspirativa do pulmão

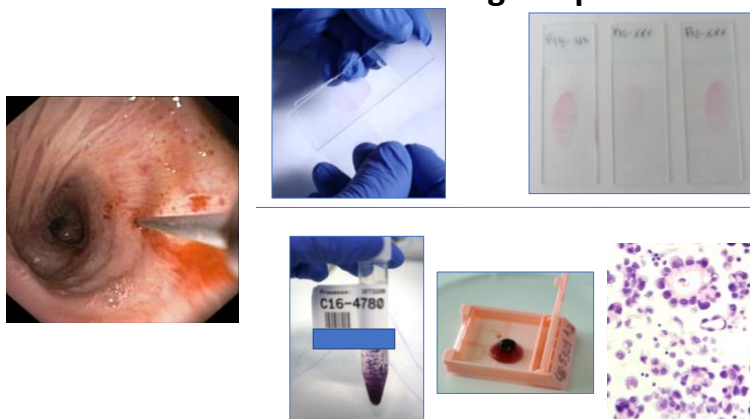


Imagens gentilmente cedidas pelo Serviço de Pneumologia do IPOLFG

III Congresso Nacional de Ciências Biomédicas Laboratoriais

Material e Métodos

- Amostra em estudo: citologia aspirativa do pulmão



Esfregaços:
Papanicolaou
MGG
PEG

Citobloco
Gold Standard

III Congresso Nacional de Ciências Biomédicas Laboratoriais

30 Casos provenientes do IPO
(120 lâminas)

11 casos de carcinoma
de pequenas células

Imunomarcação com o
Ac anti-Cromogranina A

10 casos de
Adenocarcinoma

Imunomarcação com o
Ac anti-TTF1

9 casos de Carcinoma
Pavimento Celular

Imunomarcação com o
Ac anti-P40

**Observados ao M.O.C
por 2 observadores
independentes**

III Congresso Nacional de Ciências Biomédicas Laboratoriais

Material e métodos

• Qualidade da ICQ

Pontuação final: pode tomar valores entre 0 e 27

- 1 x Preservação da Morfologia +
- 3 x Intensidade da Marcação +
- 2 x Marcação Específica +
- 2 x Marcação Inespecífica +
- 1 x Contraste

• Resultado da ICQ

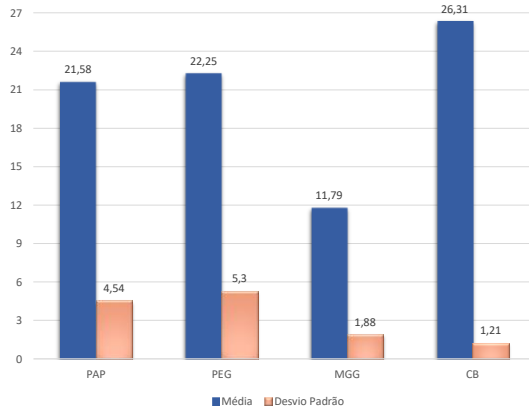
Inconclusivo/ Negativo/ Positivo

Pontos	Preservação da Morfologia	Intensidade da Marcação (Sensibilidade)	Marcação Específica (Sensibilidade)	Marcação Inespecífica (Especificidade)	Contraste
0	Ausência da Preservação Morfológica que invalida a avaliação	Marcação Nula	Marcação de 0% a 10% do alvo	Marcação de estruturas não alvo que invalida a avaliação	Coloração com deficiências que invalidam a avaliação
1	Ausência moderada de Preservação Morfológica que não invalida a avaliação	Marcação de Fraca Intensidade	Marcação de 11% a 50% do alvo	Marcação moderada de estruturas não alvo que não invalida a avaliação	Coloração com deficiências moderadas que não invalidam a avaliação
2	Ausência ligeira da Preservação Morfológica que não invalida a avaliação	Marcação de Moderada Intensidade	Marcação de 51% a 90% do alvo	Marcação ligeira de estruturas não alvo que não invalida a avaliação	Coloração com deficiências ligeiras que não invalidam a avaliação
3	Preservação da Morfologia	Marcação de Forte Intensidade	Marcação de 91% a 100% do alvo	Ausência de Marcação de estruturas não alvo	Coloração que incrementa a visualização da marcação
Fatores de Ponderação	1	3	2	2	1

III Congresso Nacional de Ciências Biomédicas Laboratoriais

Resultados

- Qualidade da ICQ



Resultados da estatística descritiva das pontuações finais

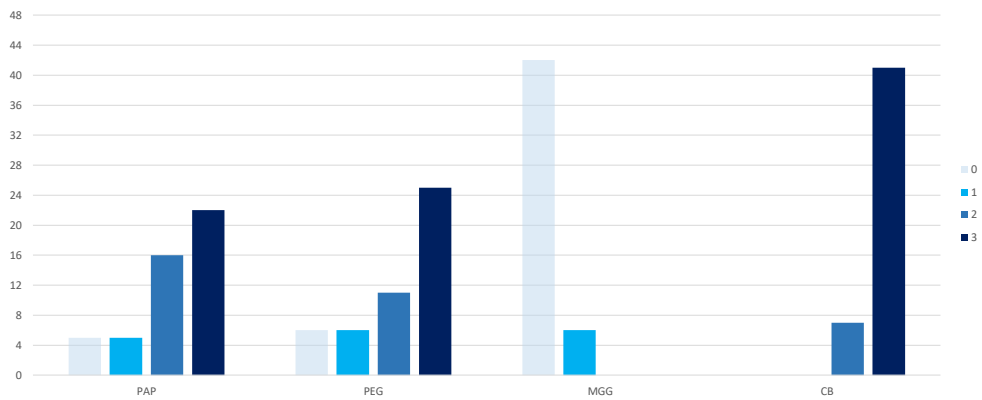
Resultados do teste One-Way ANOVA – $\alpha=0,05$

Métodos (I)	Métodos (J)	Significância
PAP	PEG	0,814
	MGG	0,000
	CB	0,000
PEG	PAP	0,814
	MGG	0,000
	CB	0,000
MGG	PAP	0,000
	PEG	0,000
	CB	0,000
CB	PAP	0,000
	PEG	0,000
	MGG	0,000

III Congresso Nacional de Ciências Biomédicas Laboratoriais

Resultados

- Qualidade da ICQ

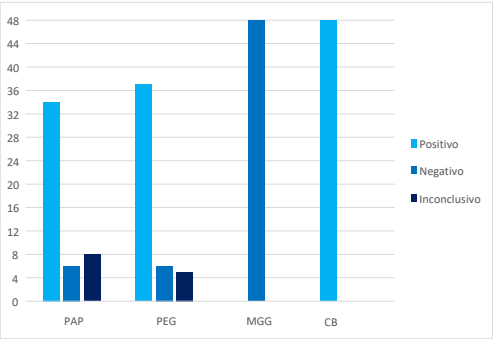


Frequência absoluta no parâmetro intensidade da marcação (Sensibilidade)

III Congresso Nacional de Ciências Biomédicas Laboratoriais

Resultados

- Resultados da ICQ



Frequência absoluta no parâmetro resultados da ICQ

Resultados do teste do qui-quadrado

$P=0,000 < \alpha=0,05$

	CB	PAP	PEG	MGG
+	48	34	37	0
-	0	14	11	48
Sensibilidade	100%	70,83%	77,08%	0%
I.C 95%	92.60 % a 100%	55.94% a	62.69% a	0% a 8,81 %

Avaliação da Sensibilidade dos Resultados da ICQ

III Congresso Nacional de Ciências Biomédicas Laboratoriais

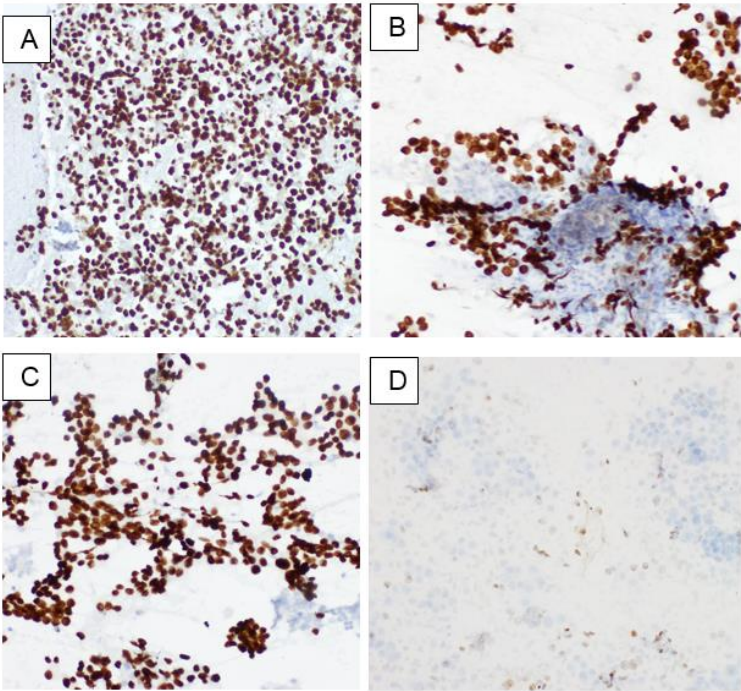
Resultados

A – TTF-1, CB, 10x

B- TTF-1, PAP, 10x

C- TTF-1, PEG, 10x

D- TTF-1, MGG, 10x





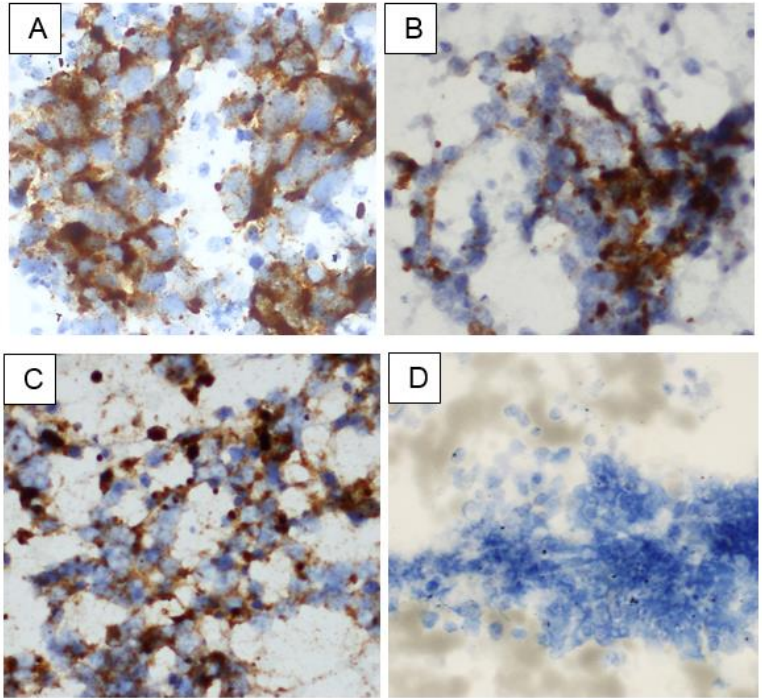
Resultados

A – Cromogranina A, CB, 40x

B- Cromogranina A, PAP, 40x

C- Cromogranina A, PEG, 40x

D- Cromogranina A, MGG, 40x



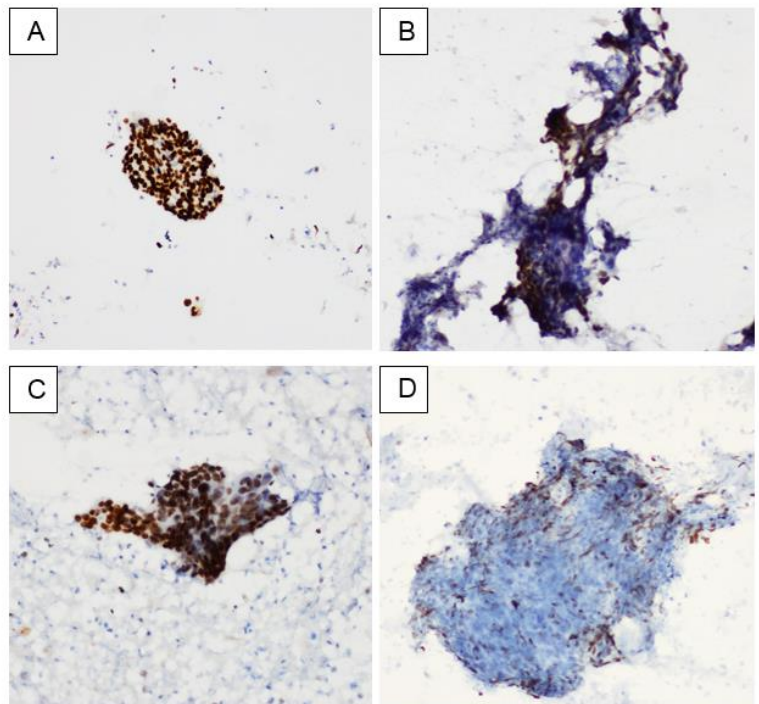
Resultados

A – P40, CB, 10x

B- P40, PAP, 10x

C- P40, PEG, 10x

D- P40, MGG, 10x



Discussão

- O MGG classifica todos os casos como negativos
 - Falsos negativos
 - Este protocolo não é adequado para a utilização na rotina laboratorial, utilizando os anticorpos em estudo – não concordante com os resultados descritos por Adriano et al. (2014).
 - Possíveis causas:
 - Redução da imunomarcação devido à difusão dos antígenos da sua localização intracelular - Adriano et al. (2014)
 - Processo de autólise - Adriano et al. (2014)
 - Diminuição da densidade antigénica devido ao aumento celular- Pinheiro et al. (2014)

III Congresso Nacional de Ciências Biomédicas Laboratoriais

Discussão

- O protocolo de PEG é o protocolo que mais se aproxima da técnica padrão quer a nível da Qualidade, quer a nível dos Resultados da ICQ.



Permite a manutenção da imunoreatividade dos antígenos

Maxwell et al. (1999) e Pinheiro et al. (2014)

- No entanto estes autores não estudaram um intervalo de tempo tão grande como o nosso podendo residir aqui a existência de casos Falsos Negativos nos nossos Resultados.

III Congresso Nacional de Ciências Biomédicas Laboratoriais

Discussão

- O protocolo de PAP apresenta diminuição da imunomarcagem
 - Referido anteriormente por outros autores (Schmitt et al 1995)
 - Perda da antigenicidade devido á complexidade do protocolo

III Congresso Nacional de Ciências Biomédicas Laboratoriais

Considerações Finais

- Resposta ao objetivo
 - Existem 2 métodos cujos resultados se aproximam do Gold Standard necessitando de mais estudos de forma a aferir a sua utilidade diagnóstica em Neoplasias do Pulmão.
 - O MGG não é indicado para utilização a nível do diagnóstico!!
- Limitações do Estudo
 - Tratando-se de um estudo retrospectivo não foi possível padronizar parâmetros essenciais como tempos de fixação, tempos de secagem ao ar, entre outros.
- Sugestões de Estudos Futuros
 - Realização de um estudo prospetivo onde se controlem fatores críticos;
 - Analisar a estabilidade da preservação antigénica ao longo do tempo de arquivo.

III Congresso Nacional de Ciências Biomédicas Laboratoriais

“Science never solves a problem without creating ten more”

(George Bernard Shaw)

III Congresso Nacional de Ciências Biomédicas Laboratoriais

Referências Bibliográficas

1. Maxwell P, Patterson AH, Jamison J, Miller K, Anderson N. Use of alcohol fixed cytopspins protected by 10% polyethylene glycol in immunocytochemistry external quality assurance. *J Clin Pathol*. 1999;(52):141–4.
2. Krishnamurthy S, Dimashkieh H, Patel S, Sneige N. Immunocytochemical evaluation of estrogen receptor on archival Papanicolaou-stained fine-needle aspirate smears. *Diagn Cytopathol* [Internet]. 2003 Dec;29(6):309–14. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/dc.10348>
3. Hudock JA, Hanau CA, Christen R, Bibbo M. Expression of estrogen and progesterone receptors in cytologic specimens using various fixatives. *Diagn Cytopathol*. 1996;15(1):78–83.
4. Adriano A, Roque R, Pinheiro C., Praça M, Pereira T, Cardoso P, et al. 18/11/2017 OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DE UM PROTOCOLO DE IMUNOCITOQUÍMICA EM AMOSTRAS DE CITOLOGIA CORADAS COM MAY-GRÜN WALT GIEMSA. Lisboa; 2014.
5. Srebotnik Kirbiš I, Us Krašovec M, Pogačnik A, Strojman Fležar M. Optimization and validation of immunocytochemical detection of oestrogen receptors on cytopspins prepared from fine needle aspiration (FNA) samples of breast cancer. *Cytopathology* [Internet]. 2015 Apr;26(2):88–98. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/cyt.12143>
6. Schmitt FC, Bento MJ, Amendoeira I. Estimation of estrogen receptor content in fine-needle aspirates from breast cancer using the monoclonal antibody 1d5 and microwave oven processing: Correlation with paraffin embedded and frozen sections determinations. *Diagn Cytopathol*. 1995;13(4):347–51.
7. Jayaram G, Elsayed EM. Cytologic Evaluation of Prognostic Markers in Breast Carcinoma. *Acta Cytol*. 2005;49:605–10.
8. Beraki E, Olsen TK, Sauer T. Establishing a protocol for immunocytochemical staining and chromogenic in situ hybridization of Giemsa and Diff-Quick prestained cytological smears. *Cytojournal*. 2012;9(8).

III Congresso Nacional de Ciências Biomédicas Laboratoriais

III Congresso Nacional Ciências Biomédicas Laboratoriais



Imunocitoquímica em citologia aspirativa do pulmão: comparação de três métodos de preservação

Santos B^{1,2}; Barroca C¹; Roque R^{1,3}; Pereira T^{1,3}; Mendonça P¹; André S³

¹ Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa

² CUF Descobertas Hospital

³ Instituto Português de Oncologia de Lisboa Francisco Gentil, EPE

E-mail de contacto: bruna_1996_santos@sapo.pt

25 de Outubro de 2019

