

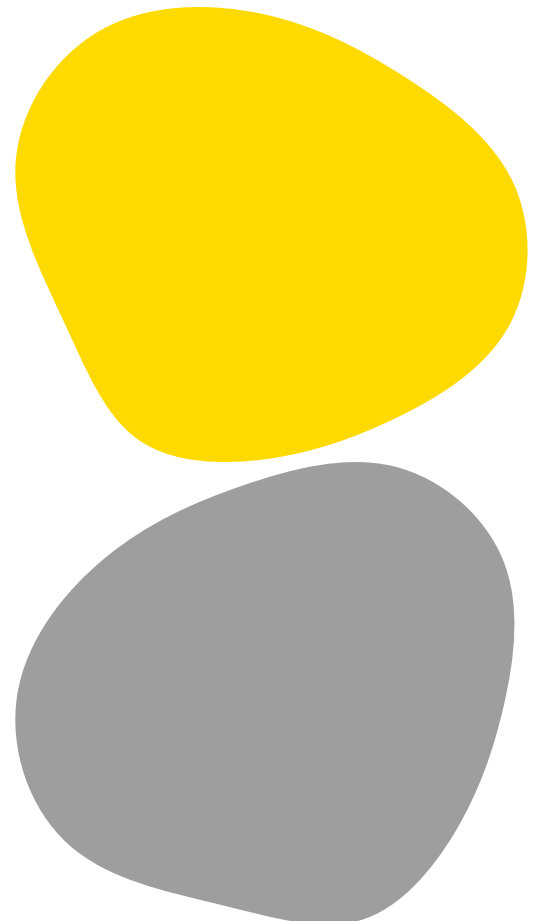


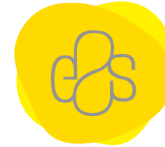
**M** MESTRADO  
TÉCNICAS LABORATORIAIS EM BIOPATOLOGIA

# Imunocitoquímica em amostras de líquido cefalorraquidiano: avaliação da qualidade e contributo diagnóstico

Joana Oliveira Pires Tente

09/2025





**Imunocitoquímica em amostras de líquido cefalorraquidiano:  
avaliação da qualidade e contributo diagnóstico**

**Autor**

Joana Oliveira Pires Tente

**Orientadores**

Dr. Rúben Roque | Instituto Português de Oncologia de Lisboa Francisco Gentil, EPE  
Prof. Doutora Sílvia Fernandes | Escola Superior de Saúde do Instituto Politécnico do Porto

*Dissertação apresentada para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em **Técnicas Laboratoriais em Biopatologia – Ramo de Patologia Molecular**, pela Escola Superior de Saúde do Instituto Politécnico do Porto.*



## Agradecimentos

Este trabalho é fruto do contributo de todos aqueles que, de alguma forma, passaram pela minha vida e deixaram um pouco de si comigo.

Aos meus filhos, Mimi e Necas, primeiro peço desculpa pelas muitas horas em que a mãe esteve ausente e pela paciência que, tantas vezes, a mãe não teve.... Amo-vos mais do que tudo e agora vamos recuperar o tempo que ficou para trás.

Ao meu Zé, nada teria sido possível sem a tua presença ao meu lado. Obrigada por tudo, por tanto! Que continuemos juntos a percorrer este mundo.

Aos meus pais, os grandes pilares da minha vida, que sempre me apoiaram à sua maneira, mas de forma incondicional. Obrigada Mamã, Obrigada Papá... não há distância que nos separe.

Aos meus irmãos, Gonçalo e Mariana, mostrar-lhes que apesar de difícil, é possível... eu consegui!

À Professora Sílvia, pela paciência, leveza e capacidade para ver sempre mais além. Foi um privilégio conhecê-la. Muito obrigada!

Ao Rúben, por me ter mostrado que a Citologia é apenas parte de um universo muito maior! Obrigada!

*Dedico este trabalho ao meu Sogro... a única pessoa que, com muita pena, já não vou conseguir compensar pelo tempo perdido.*



## Resumo

O diagnóstico de patologias do sistema nervoso central, sobretudo em casos de suspeita de disseminação leptomeníngea, pode requerer a análise do líquido cefalorraquidiano. Embora a citologia apresente limitações em amostras hipocelulares, a imunocitoquímica surge como ferramenta complementar, permitindo a deteção de biomarcadores específicos e a identificação de metástases.

Este estudo avaliou o desempenho, o contributo diagnóstico e a qualidade técnica da imunocitoquímica em 257 amostras de líquido cefalorraquidiano, entre 2020 e 2023. A qualidade foi aferida por critérios estruturados, o desempenho analisado por sensibilidade, especificidade e concordância global e o contributo classificado em quatro categorias distintas.

A imunocitoquímica apresentou elevada especificidade (99,5%) e boa sensibilidade (86,8%). Contribuiu diretamente para o diagnóstico em 86,0% dos casos, ajudou em 6,6%, não contribuiu em 4,7% e foi discordante em 2,7%. O processamento por citocentrifugação revelou sensibilidade de 84,8% e especificidade de 99,5%, enquanto a preservação em polietilenoglicol atingiu 100,0% de sensibilidade, embora com menor especificidade (97,0%). A qualidade técnica global foi elevada (22,8 em 27 pontos), destacando-se a marcação específica e a intensidade de imunomarcação como parâmetros mais consistentes.

Estes resultados, aliados à dimensão da amostra, reforçam a importância da imunocitoquímica como técnica complementar, essencial no diagnóstico citopatológico em amostras de líquido cefalorraquidiano.

**Palavras-chave:** líquido cefalorraquidiano, imunocitoquímica, citopatologia, sistema nervoso central, metástases.



## Abstract

The diagnosis of central nervous system pathologies, particularly in cases of suspected leptomeningeal dissemination, may require analysis of cerebrospinal fluid. Although cytology has limitations in hypocellular samples, immunocytochemistry emerges as a complementary tool, allowing the detection of specific biomarkers and the identification of metastases.

This study evaluated the performance, diagnostic contribution, and technical quality of immunocytochemistry in 257 cerebrospinal fluid samples collected between 2020 and 2023. Quality was assessed using structured criteria, performance was analyzed by sensitivity, specificity, and overall concordance, and contribution was classified into four distinct categories.

Immunocytochemistry demonstrated high specificity (99.5%) and good sensitivity (86.8%). It directly contributed to the diagnosis in 86.0% of cases, was helpful in 6.6%, did not contribute in 4.7%, and was discordant in 2.7%. Cytocentrifugation processing revealed a sensitivity of 84.8% and a specificity of 99.5%, while polyethylene glycol preservation achieved 100.0% sensitivity, albeit with lower specificity (97.0%). Overall technical quality was high (22.8 out of 27 points), with specific staining and immunostaining intensity standing out as the most consistent parameters.

These results, combined with the sample size, reinforce the importance of immunocytochemistry as a complementary technique, essential for cytopathological diagnosis in cerebrospinal fluid samples.

**Keywords:** cerebrospinal fluid, immunocytochemistry, cytopathology, central nervous system, metastases.



## Abreviaturas e Siglas

C – Contraste

CAP – Colégio Americano de Patologistas

CB – Citobloco

CEQ – Controlo externo da qualidade

CF – Citometria de fluxo

Ck – Citoqueratina

CQ – Controlo da qualidade

DAB – 3,3'-Diaminobenzidina

DNA – Ácido desoxirribonucleico

DP – Desvio-padrão

EANO – *European Association of Neuro-Oncology*

EGFR – Recetor do fator de crescimento epidérmico

ESMO – *European Society for Medical Oncology*

FN – Falso negativo

FP – Falso positivo

GQ – Garantia da qualidade

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – Peróxido de hidrogénio

HQ – *Hapten-Quinoline*

HRP – *Horseradish Peroxidase*

ICQ – Imunocitoquímica

II – Intensidade da imunomarcção

IPOLFG – Instituto Português de Oncologia de Lisboa Francisco Gentil, EPE

LCR – Líquido cefalorraquidiano

LLA – Leucemia linfoblástica aguda

LMA – Leucemia miéloide aguda

ME – Marcação específica

MGG – May-Grünwald Giemsa

MI – Marcação inespecífica

OMS – Organização Mundial de Saúde

PAP – Papanicolaou



**PBS** – Solução-tampão Fosfato Salino

**PCR** – *Polymerase Chain Reaction*

**PEG** – Polietilenoglicol

**PM** – Preservação da morfologia

**RMN** – Ressonância magnética nuclear

**SAP** – Serviço de Anatomia Patológica

**SNC** – Sistema Nervoso Central

**TP53** – Proteína supressora tumoral p53

**UK NEQAS** – *United Kingdom National External Quality Assessment Service*

**VN** – Verdadeiro negativo

**VP** – Verdadeiro positivo

**VPN** – Valor preditivo negativo

**VPP** – Valor preditivo positivo



## Índice

|  |           |
|--|-----------|
| Índice de Tabelas.....   | IX        |
| Índice de Figuras.....   | X         |
| <b>1. Introdução.....</b>  | <b>1</b>  |
| <b>1.1. Líquido cefalorraquidiano.....</b>                                     | <b>3</b>  |
| <b>1.2. Exame citopatológico do líquido cefalorraquidiano.....</b>             | <b>5</b>  |
| 1.2.1. Colheita e processamento.....   | 5         |
| 1.2.2. Análise microscópica.....   | 6         |
| 1.2.3. Desempenho diagnóstico.....   | 8         |
| <b>1.3. Imunocitoquímica em citologia de líquido cefalorraquidiano.....</b>    | <b>9</b>  |
| 1.3.1. Contributo para o diagnóstico.....                                      | 9         |
| 1.3.2. Protocolos e fatores que interferem com o desempenho do método.....     | 11        |
| 1.3.3. Validação da técnica e controlo de qualidade interno de ICQ.....        | 11        |
| <b>1.4. Controlo da Qualidade e Programas Internacionais de Qualidade.....</b> | <b>13</b> |
| <b>2. Objetivos.....</b>   | <b>14</b> |
| <b>3. Materiais e Métodos.....</b>   | <b>15</b> |
| <b>3.1. Amostragem e seleção de casos.....</b>                                 | <b>15</b> |
| <b>3.2. Tratamento de dados e questões éticas.....</b>                         | <b>15</b> |
| <b>3.3. Avaliação microscópica das amostras.....</b>                           | <b>16</b> |
| 3.3.1. Avaliação do contributo diagnóstico.....                                | 16        |
| 3.3.2. Avaliação da qualidade da imunomarcção.....                             | 17        |
| <b>3.4. Análise estatística dos dados.....</b>                                 | <b>19</b> |
| <b>4. Resultados.....</b>  | <b>20</b> |
| <b>4.1. Caracterização da amostra.....</b>                                     | <b>20</b> |
| <b>4.2. Processamento das amostras.....</b>                                    | <b>21</b> |
| <b>4.3. Diagnóstico citomorfológico e ICQ em LCR.....</b>                      | <b>21</b> |



|  |            |
|--|------------|
| 4.3.1. Testes de ICQ realizados .....  | 22         |
| 4.3.2. Concordância diagnóstica vs ICQ .....   | 22         |
| 4.3.3. Marcação com Ck AE1/AE3: concordância diagnóstica .....   | 26         |
| 4.3.4. Marcação com Ck AE1/AE3: processamento e coloração .....  | 27         |
| <b>4.4. Contributo diagnóstico da técnica de ICQ em amostras de LCR .....</b>                                    | <b>28</b>  |
| 4.4.1. Associação entre variáveis técnicas e o contributo da ICQ para o diagnóstico .....                        | 29         |
| 4.4.2. Associação entre classificações diagnósticas e resultados ICQ com o seu contributo para diagnóstico ..... | 31         |
| <b>4.5. Avaliação da qualidade da ICQ em amostras de LCR .....</b>   | <b>32</b>  |
| 4.5.1. Caracterização geral da qualidade da ICQ .....  | 32         |
| 4.5.2. Análise comparativa da qualidade da ICQ em função do tipo de coloração/preservação .....                  | 35         |
| <b>5. Discussão .....</b>  | <b>38</b>  |
| <b>6. Conclusão .....</b>  | <b>46</b>  |
| <b>7. Referências Bibliográficas .....</b>   | <b>47</b>  |
| <b>Anexos .....</b>  | <b>i</b>   |
| <b>Anexo I – Marcadores testados, no total de amostragem (n, %) .....</b>  | <b>i</b>   |
| <b>Anexo II – Características dos marcadores avaliados .....</b>   | <b>ii</b>  |
| <b>Anexo III – Exemplos de amostras observadas por microscopia ótica .....</b>                                   | <b>iii</b> |
| <b>Anexo IV – Protocolo da técnica citopatológica prévia ao estudo .....</b>                                     | <b>v</b>   |



## Índice de Tabelas

|  |    |
|--|----|
| <b>Tabela 1</b> – Neoplasias primárias e secundárias do SNC identificadas pela análise citopatológica de LCR .....   | 2  |
| <b>Tabela 2</b> – Sensibilidade do exame citopatológico na deteção de neoplasias malignas em LCR.....  | 9  |
| <b>Tabela 3</b> – Principais marcadores imunocitoquímicos utilizados em LCR.....   | 10 |
| <b>Tabela 4</b> – Classificação da utilidade diagnóstica da ICQ .....  | 17 |
| <b>Tabela 5</b> – Grelha de avaliação utilizada na análise dos resultados de ICQ .....   | 18 |
| <b>Tabela 6</b> – Diagnóstico citomorfológico das amostras de LCR submetidas a ICQ (n = 257) .....   | 21 |
| <b>Tabela 7</b> – Concordância entre o diagnóstico citomorfológico e o resultado da ICQ (n = 257) .....  | 23 |
| <b>Tabela 8</b> – Indicadores de desempenho da ICQ, em relação ao diagnóstico citomorfológico .....  | 24 |
| <b>Tabela 9</b> – Análise dos indicadores de desempenho ICQ, por tipo de processamento e coloração/preservação (n = 257) .....                             | 24 |
| <b>Tabela 10</b> – Concordância entre diagnóstico citomorfológico e o resultado da ICQ, para o marcador Ck AE1/AE3 (n = 123).....                          | 26 |
| <b>Tabela 11</b> – Indicadores de desempenho da ICQ, com o marcador Ck AE1/AE3.....  | 26 |
| <b>Tabela 12</b> – Desempenho diagnóstico da ICQ com o marcador Ck AE1/AE3, segundo tipo de processamento e coloração/preservação (n = 123) .....          | 27 |
| <b>Tabela 13</b> – Contributo da ICQ para o diagnóstico, por tipo de processamento de amostra e por tipo de coloração e preservação da lâmina (n (%))..... | 30 |
| <b>Tabela 14</b> – Distribuição do contributo de ICQ para o diagnóstico final, por classificação diagnóstica e resultado ICQ (n, %).....                   | 31 |
| <b>Tabela 15</b> – Distribuição dos marcadores imunocitoquímicos avaliados, quanto à qualidade da imunomarcação (n = 46) .....                             | 33 |
| <b>Tabela 16</b> – Pontuação final média da qualidade da ICQ em função do tipo de coloração/preservação utilizada (n = 46) .....                           | 35 |



## Índice de Figuras

|   |     |
|---|-----|
| <b>Figura 1</b> – Representação da circulação do LCR, no espaço subaracnoideu .....   | 4   |
| <b>Figura 2</b> – Representação microscópica de células numa amostra de LCR normal.....   | 7   |
| <b>Figura 3</b> – Imagem microscópica que evidência a presença de células malignas no LCR.....  | 7   |
| <b>Figura 4</b> – Representação esquemática das diferenças entre os sistemas de deteção ultraView e OptiView (Ventana–Roche).....   | 9   |
| <b>Figura 5</b> – Distribuição das amostras, segundo o serviço de origem (frequência absoluta; n = 257) .....   | 20  |
| <b>Figura 6</b> – Distribuição das amostras, segundo o tipo de coloração/preservação da amostra, utilizado antes da ICQ (frequência absoluta; n = 257).....   | 21  |
| <b>Figura 7</b> – Distribuição dos resultados da imunomarcação (positiva/negativa), por grupo de marcadores utilizados, segundo o resultado (positivo ou negativo) (frequência absoluta e relativa; n = 257) .....                            | 22  |
| <b>Figura 8</b> – Distribuição do contributo diagnóstico da técnica de ICQ nas amostras de LCR (n = 257) .....  | 29  |
| <b>Figura 9</b> – Representação gráfica da distribuição do número de casos com imunomarcação positiva (n = 46), de acordo com os cinco critérios de qualidade técnica avaliados, segundo método de coloração/preservação (PAP, MGG, PEG)..... | 36  |
| <b>Figura 10</b> – Comparação das médias ( $\pm$ desvio padrão) dos critérios da qualidade técnica avaliados (PM, II, ME, MI e C), segundo o método de coloração/preservação da amostra (PAP, PEG e MGG).....                                 | 37  |
| <b>Figura 11</b> – Citologias de amostras de LCR, sujeitas a técnica ICQ, positivas para malignidade (imunomarcação com diferentes tipos de marcadores).....  | iii |
| <b>Figura 12</b> – Representação microscópica de amostra de LCR, classificada citomorfologicamente como suspeita de malignidade.....  | iii |
| <b>Figura 13</b> – Representação microscópica de amostra de LCR, negativa para malignidade..  | iv  |
| <b>Figura 14</b> – Representação microscópica de amostra de LCR submetida a ICQ com o marcador Ck AE1/AE3, negativo para malignidade.....   | iv  |



## 1. Introdução

As doenças neurológicas representam uma das principais causas de morbidade e mortalidade a nível mundial. Segundo dados da Organização Mundial da Saúde (OMS), uma em cada três pessoas é afetada por alguma patologia neurológica ao longo da vida (1). Um estudo recente de Steinmetz J. et al. estima que mais de três milhões de pessoas no mundo sofrem de uma doença neurológica, destacando-se os acidentes vasculares cerebrais, epilepsias, enxaquecas, meningites e neoplasias do sistema nervoso (2).

O diagnóstico de patologias cerebrais é um processo complexo e que requer frequentemente uma abordagem multidisciplinar, com combinação de múltiplas avaliações clínicas, exames laboratoriais e técnicas imagiológicas. Embora métodos como a ressonância magnética nuclear (RMN) e a pesquisa de marcadores tumorais sejam essenciais, a deteção de células neoplásicas no espaço subaracnoideu depende da análise do líquido cefalorraquidiano (LCR) (3).

As metástases cerebrais são mais frequentes do que qualquer tipo de tumor primário do sistema nervoso central (SNC) e ocorrem em cerca de 25% dos óbitos por neoplasias malignas (3–7). O prognóstico é reservado, com tempos de sobrevivência de apenas um mês quando os pacientes não são sujeitos a qualquer tipo de tratamento (8). Ainda assim, em pacientes sem historial oncológico a identificação de uma massa cerebral isolada, visível em RMN, mesmo que accidental, levanta maior suspeita de tumor primário do que lesão metastática (5,6). As metástases leptomeníngeas, associadas a rápida progressão e mau prognóstico, são complicação de tumores sólidos, em estadios avançados, sendo vistas como prioridades do ponto de vista terapêutico. Os tumores com maior propensão para disseminação leptomeníngea incluem os melanomas e carcinomas do pulmão e mama (3,5,6,9–15), enquanto que neoplasias da cabeça e pescoço, ovário e tireoide raramente metastizam para o SNC (10).

Entre os tumores primários do SNC, os astrocitomas são os mais frequentes em adultos, enquanto os meduloblastomas são os tumores cerebrais mais frequentemente diagnosticados em idade pediátrica nesta localização (7,13) (Tabela 1).



**Tabela 1** – Neoplasias primárias e secundárias do SNC identificadas pela análise citopatológica de LCR

| Neoplasias primárias do SNC |  | Neoplasias secundárias                     |
|-----------------------------|--|--|
| Tumores neuroepiteliais     |  | Tumores metastáticos                       |
| Tumores gliais (gliomas)    | Astrocitomas<br>Oligodendrogliomas<br>Ependiomas | Mama<br>Pulmão<br>Sistema Gastrointestinal |
| Tumores embrionários        | Meduloblastomas                                  | Melanomas                                  |
| Tumores meningeais          |  | Neoplasias hematológicas                   |
| Meningiomas                 |  | Leucemias (LLA e LMA)<br>Linfomas          |

Abreviaturas: LLA: Leucemia linfoblástica aguda; LMA: Leucemia mielóide aguda

Estudos reportam que entre 80 a 85% das metástases cerebrais estão localizadas no cérebro, 10 a 15% no cerebelo e menos de 5% no tronco cerebral (5).

A disseminação tumoral para o SNC pode ocorrer por extensão direta, migração perineural ou perivascular, sendo uma condição grave que conduz a diversos sintomas neurológicos e a rápida mortalidade (6,16,17).

O exame citopatológico de uma amostra de LCR para pesquisa de células neoplásicas pode configurar duas hipóteses diagnósticas: a primeira, quando o tumor primário já está identificado, mas há necessidade de confirmação de disseminação leptomeníngea; a segunda, rege-se por evidências clínicas ou neurorradiológicas sugestivas de disseminação tumoral para o espaço subaracnoide, mas sem tumor primário identificado (18). No primeiro caso, a análise de LCR visa estadiamento do tumor ou monitorização terapêutica, enquanto na segunda situação o exame vai servir para caracterizar o tipo de células malignas e posterior informação sobre o tumor primário (18).

Neste contexto, o recurso a técnicas complementares contribui para diagnóstico e identificação de marcadores de prognóstico e terapias direcionadas (19,20). A imunocitoquímica (ICQ) é uma técnica de elevada exatidão, frequentemente utilizada para classificação de neoplasias, determinação do local de origem de metástases e ainda na deteção de pequenos focos de células tumorais impercetíveis com as colorações laboratoriais de rotina (20). Na versão mais recente do sistema de classificação dos tumores do SNC da OMS, existe uma divisão em duas secções, uma sobre tumores



metastáticos que preferencialmente afetam o cérebro e o parênquima medular e os que favorecem as meninges. Para tal, dá especial ênfase a marcadores imuno-histoquímicos e moleculares que auxiliam no diagnóstico e orientam o processo terapêutico (21).

Tal como em outras neoplasias, os tumores cerebrais surgem como resultado de alterações genéticas, como é o caso da perda de genes supressores tumorais (ex. TP53), ou pela sobre expressão de proto-oncogenes (ex. EGFR). A acumulação destas alterações resulta num crescimento descontrolado e na formação de tumores (6). Posto isto, a OMS atualizou a classificação de tumores do SNC, incorporando parâmetros moleculares além dos aspetos histopatológicos no diagnóstico de tumores cerebrais (6).

Apesar do reconhecimento da importância da ICQ em citologia de LCR, a literatura carece de estudos quanto à efetiva utilidade desta técnica no diagnóstico de rotina. São escassos os dados sistematizados sobre a qualidade técnica da ICQ em amostras de LCR, bem como sobre a sua sensibilidade e especificidade em comparação com a coloração convencional e o seu verdadeiro contributo para o diagnóstico final em contexto clínico real.

Neste enquadramento, torna-se pertinente a realização de estudos que permitam caracterizar o desempenho técnico da ICQ em amostras de LCR, com especial foco na utilidade para deteção de metástases leptomeníngeas e na relevância para a definição do diagnóstico final.

### **1.1. Líquido cefalorraquidiano**

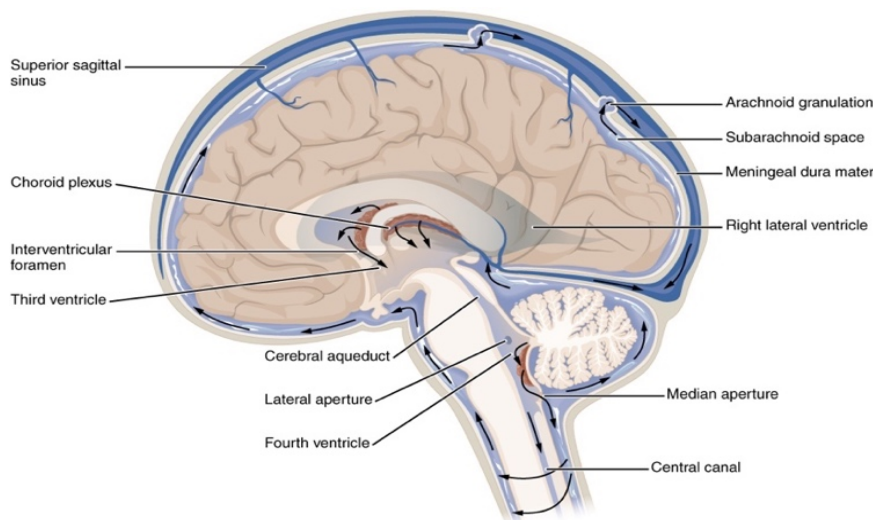
O sistema nervoso é composto pelo SNC e o sistema nervoso periférico. O SNC inclui o encéfalo e a medula espinal, estruturas protegidas pela caixa craniana e pela coluna vertebral, respetivamente, e envolvidas por três finas membranas – as meninges (22). O espaço subaracnoideu, localizado entre duas dessas membranas (a aracnóide e a pia-máter), é uma cavidade preenchida por líquido – o LCR – e que se estende desde o encéfalo até à medula espinal, com comunicação direta aos ventrículos cerebrais (18,23).

O LCR é produzido por células do plexo coroideu, localizadas nas cavidades ventriculares do cérebro e atua como barreira protetora, impedindo a entrada livre de sangue e de outras substâncias potencialmente nocivas ao SNC (15,17,18,22,23). Para além disso, desempenha funções essenciais na proteção e manutenção da homeostase do SNC (23–25).

É um líquido translúcido, rico em nutrientes, hormonas e moléculas de sinalização; fundamentais para o adequado funcionamento cerebral (17,22,25–27). Em condições fisiológicas, no LCR apenas estão presentes linfócitos e monócitos, no qual usualmente não existem populações de células aberrantes, monoclonais ou imaturas (28).

Num adulto, o volume total de LCR é de aproximadamente 150 mL, dos quais 125 mL se distribuem pelos espaços subaracnoideus cranianos e espinais, e 25 mL pelos ventrículos cerebrais. A sua produção diária varia entre os 400 e os 600 mL; contudo, há variações inter-individuais significativas (3,17,22,24,26,27). O equilíbrio entre a produção e a absorção de LCR é o que permite manter a pressão intracraniana estável, em torno de 10 mmHg (22,23).

A circulação do LCR é, um processo ativo e cuidadosamente regulado, responsável pela homeostase cerebral. Resumidamente, o LCR circula dos locais de secreção para os locais de absorção de acordo com um fluxo rostro-caudal unidirecional nos ventrículos e com um fluxo multidirecional nos espaços subaracnoideus (Figura 1) (24).



**Figura 1** – Representação da circulação do LCR, no espaço subaracnoideu

O LCR produzido nos plexos coróides dos ventrículos laterais flui para o terceiro ventrículo, passando pelo aqueduto cerebral até o quarto ventrículo. É aí que o LCR é libertado no espaço subaracnoideu, circulando ao redor do cérebro e da medula espinal. Depois é reabsorvido pelas granulações aracnóideas, retornando à corrente sanguínea.

Fonte: Adaptado de Betts JG et al. (22)

O exame microscópico do LCR é de máxima importância, em pacientes sintomáticos e assintomáticos, em que haja envolvimento do SNC, quer por processos malignos, quer infecciosos (3,29). Sabe-se que a produção e a composição do LCR pode sofrer alterações significativas na presença de infeções, traumas ou neoplasias (27,30).



Além dessas alterações morfológicas, no LCR podem também ser identificadas células TCD4+ e TCD8+ específicas de um tumor, assim como ácido desoxirribonucleico (DNA) livre em circulação, que na presença de malignidade faz derivar uma fração do DNA do tumor (25,31).

## 1.2. Exame citopatológico do líquido cefalorraquidiano

### 1.2.1. Colheita e processamento

A colheita de amostras de LCR é um procedimento relativamente comum na prática clínica, sobretudo para diagnóstico de patologias neurológicas (29,32). Embora seja um procedimento mais invasivo do que uma colheita de sangue usada para a biópsia líquida, a proximidade do LCR ao SNC e eventual contacto direto com lesões tumorais aumentam significativamente a probabilidade de deteção de células neoplásicas (33).

Normalmente são colhidos quatro tubos de amostra de LCR destinados a análise laboratorial: química clínica e hematologia, imunologia, microbiologia e citologia (34,35). Esta divisão permite uma abordagem diagnóstica abrangente e evita a contaminação cruzada entre análises.

O exame citopatológico do LCR baseia-se na avaliação morfológica das células presentes na amostra. No entanto, esta avaliação nem sempre é conclusiva, sendo frequentemente necessário recorrer a técnicas complementares que permitam a caracterização celular (18).

O sucesso do diagnóstico citopatológico depende, em grande medida, da fase pré-analítica – desde a colheita, preservação, manuseamento e transporte da amostra, os quais influenciam diretamente a fase analítica (processamento técnico e observação microscópica). Um controlo rigoroso destas fases é essencial para garantir resultados laboratoriais fiáveis (36).

Diversos fatores influenciam a qualidade da amostra e a fiabilidade dos resultados, nomeadamente o volume de amostra colhido, local da colheita, temperatura de armazenamento, e tempo decorrido até ao processamento. Idealmente, o LCR deve ser colhido e transportado “a fresco”, ou seja, sem adição de nenhum tipo de agente fixador, de modo a preservar as características celulares (3). Contudo, alguns estudos sugerem que a



adição de soluções fixadoras pode contribuir para a preservação da integridade morfológica, permitindo também realização de testes subsequentes (9).

As células presentes no LCR degradam-se rapidamente, após colheita. Estima-se que até 90% das células tumorais se deterioreem nos primeiros 90 minutos após a colheita (37). Por este motivo, é recomendado que o processamento da amostra ocorra o mais rapidamente possível. Quando o envio imediato não é viável, a adição de um fixador pode ajudar a prevenir autólise e a preservar a morfologia celular (18,28,29).

Outro fator crítico é a temperatura de armazenamento da amostra, devendo manter-se entre os 5 °C e os 12 °C. Temperaturas demasiado baixas podem induzir lise celular por frio, enquanto que temperaturas elevadas aceleram a degradação celular (18,23,26).

O pH da amostra é outro fator determinante para a viabilidade celular. Valores fora do intervalo fisiológico do LCR (pH entre 7,32 e 7,36) podem comprometer a integridade morfológica, podendo originar resultados falsos-negativos ou falsos-positivos (18,27). Devido à baixa composição proteica e celular do LCR, o pH tende a baixar rapidamente após colheita, favorecendo a lise celular precoce (26).

### 1.2.2. Análise microscópica

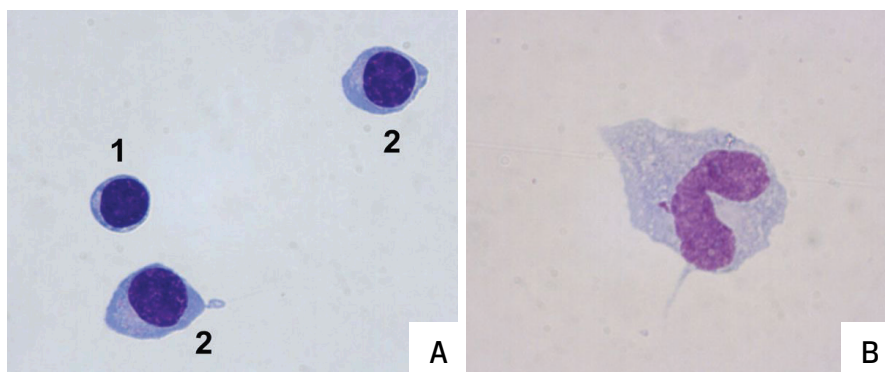
A análise citológica constitui frequentemente a base de decisões terapêuticas, permitindo diagnósticos precisos em diversas condições clínicas (38).

Em condições normais, o LCR é uma amostra paucicelular ou mesmo acelular. Quando presentes, as células correspondem a linfócitos maduros e ocasionalmente a monócitos, ou mais raramente células mesoteliais (Figura 2) (7,23,29,39). A presença de um número aumentado de células inflamatórias está habitualmente associada a processos inflamatórios. É importante salientar que a ausência de células tumorais numa amostra de LCR não exclui a presença de neoplasias primárias ou metastáticas do SNC (30,40). Este dado é particularmente relevante na interpretação de resultados negativos, que podem ocorrer em casos confirmados de malignidade.

Contudo, em casos de amostras de recém-nascidos e crianças pequenas, é frequente observar grupos de células com elevada taxa de proliferação, sem que tal seja

indicador de neoplasia (18). Células imaturas, semelhantes a blastos, com origem na matriz germinativa, são comuns encontrar-se em bebés com história de prematuridade (18).

As amostras positivas para malignidade são caracterizadas, microscopicamente, por células de grandes dimensões, com núcleos aumentados, hipercromático e polimórficos, cromatina heterogénea, presença de diferentes números de nucléolos, relação núcleo-citoplasma aumentada, vacuolização citoplasmática e elevada atividade mitótica (Figura 3) (18,26). Estas características citomorfológicas justificam a realização de técnicas complementares para confirmação diagnóstica.

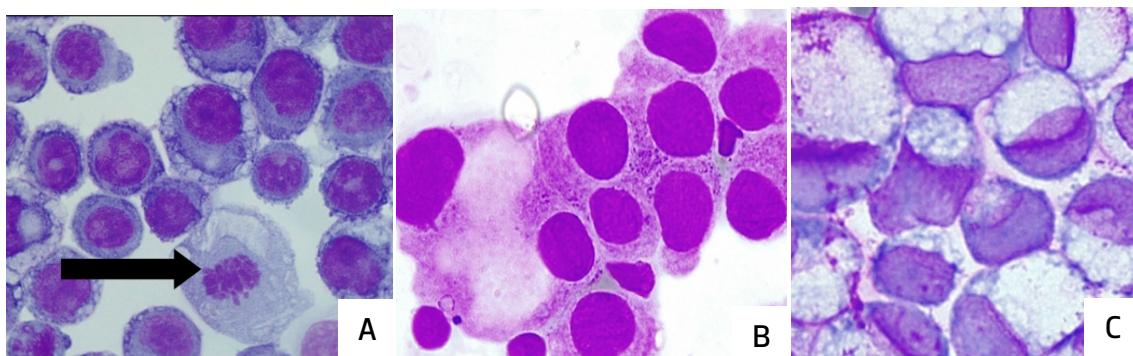


**Figura 2** – Representação microscópica de células numa amostra de LCR normal

(A) – Linfócitos normais (1) e ativados (2); (B) – monócito normal; Coloração de May-Grunwald Giemsa (MGG), 400x

Em amostras de LCR normais, a citologia revela predominantemente linfócitos e monócitos, com núcleos regulares e citoplasma escasso. Estas células apresentam-se dispersas, sem agrupamentos anormais ou características atípicas.

Fonte: Adaptado de Torzewski M. e LaCkner K. (39)



**Figura 3** – Imagem microscópica que evidência a presença de células malignas no LCR

(A) – Células mononucleadas discretamente dispersas, algumas das quais ligadas por pontes citoplasmáticas, num doente com carcinoma metastático da mama. Observa-se ainda uma mitose atípica (seta); (B) – células tumorais com núcleos à periferia e abundante citoplasma hipercromático, num doente com adenocarcinoma do pulmão; (C) – aglomerado de células tumorais pleomórficas e a presença de vacúolos com mucina intracitoplasmática, num doente com adenocarcinoma colorretal metastizado; Coloração MGG, 400x.

Fonte: Adaptado de Mahindra et al. (41)



### 1.2.3. Desempenho diagnóstico

A análise citopatológica, centrada na avaliação da composição celular, constitui uma parte fundamental do exame do LCR (28,30). É uma ferramenta essencial para as mais diversas condições patológicas do SNC, incluindo infeções como a meningite e encefalite mas com especial relevância para a deteção de tumores primários e metástases cerebrais (41,42).

Em 1998, Glantz *et al.* definiram que uma citologia positiva de LCR é indicativa da presença de células malignas e, conseqüentemente, existência de neoplasia maligna do SNC. Além disso, os autores referem que a probabilidade de deteção de células malignas é superior quando a punção lombar é realizada perto do local da doença anteriormente conhecida (43).

Embora o número de células presentes no LCR possa fornecer indicações importantes em processos patológicos do SNC; a citologia tem um carácter essencialmente qualitativa no que respeita à deteção de células tumorais, não permitindo uma quantificação exata das mesmas (37). A morfologia das células malignas detetadas pode variar consoante o tipo de tumor primário ou local de metastização. Frequentemente, estas células encontram-se acompanhadas por linfócitos reativos e macrófagos, o que também pode dificultar a interpretação morfológica (17).

A análise citológica do LCR, quando complementada por técnicas como a imunofenotipagem por citometria de fluxo (CF) oferece uma caracterização mais completa das alterações patológicas na amostra (28,43). Apesar da especificidade diagnóstica da citologia do LCR rondar os 90%, podem ocorrer resultados falsos-positivos que requerem validação por métodos adicionais (43). Contudo, resultados falso-negativos são relativamente comuns, sobretudo quando a amostra recebida tem pouco volume, o seu processamento não é imediato, ou quando a punção é efetuada à distância do local onde a doença foi previamente identificada. Nestes casos, recomenda-se repetição do procedimento e a colheita de volumes mais elevados, sempre que possível (43).

Os processos linforeticulares que envolvem o SNC como é o caso de linfomas e leucemias são as neoplasias mais frequentemente diagnosticadas por análise do LCR (29).

A Tabela 2 resume a sensibilidade do exame citopatológico em diferentes tipos de neoplasias detetadas em LCR.

**Tabela 2 – Sensibilidade do exame citopatológico na deteção de neoplasias malignas em LCR**

|                             |     |
|-----------------------------|-----|
| Processo linforeticular     | 66% |
| Neoplasias metastáticas     | 50% |
| Neoplasias primárias do SNC | 33% |

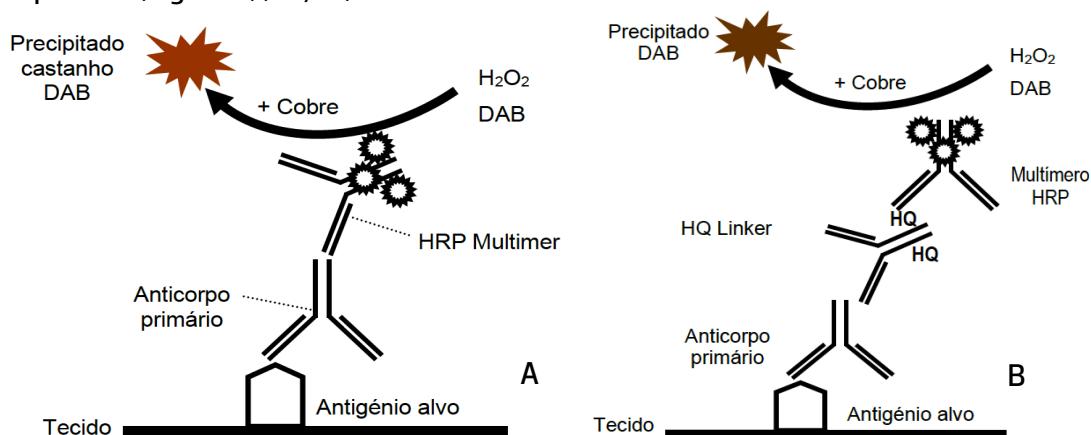
Fonte: Adaptado de Ganjei-Azar et al (29)

### 1.3. Imunocitoquímica em citologia de líquido cefalorraquidiano

#### 1.3.1. Contributo para o diagnóstico

A ICQ é a técnica complementar mais utilizada em anatomia patológica, e desempenha um papel fundamental na identificação de células tumorais em amostras de LCR. Permite a deteção de tumores primários do SNC e de metástases com envolvimento leptomeníngeo. Baseia-se numa reação *in situ*, de reconhecimento antigénio-anticorpo e que permite detetar antigénios celulares específicos; através da marcação com anticorpos dirigidos. Esta especificidade acrescenta precisão diagnóstica à avaliação morfológica tradicional, sendo uma ferramenta essencial para a caracterização das células e para definição de estratégias para terapias direcionadas (26,36,44–47).

O sistema de deteção é um componente fundamental da ICQ, crucial para maximizar a sensibilidade da técnica e otimizar a visibilidade da reação imunológica. Deve ser reprodutível, preciso e apresentar uma elevada relação sinal-ruído. Os sistemas de deteção classificam-se em métodos diretos ou indiretos (48). Tanto o kit de deteção *OptiView* como o *ultraView* são métodos indiretos, sem recurso a biotina, o que reduz o risco de reatividade inespecífica (Figura 4)(49,50).



**Figura 4 – Representação esquemática das diferenças entre os sistemas de deteção ultraView e OptiView (Ventana-Roche)**

Ambos os sistemas utilizam anticorpos primários específicos, mas diferem na aplicação do sinal e na formação do precipitado visível. (A) – Sistema ultraView Universal DAB Detection: utiliza anticorpos ligados a HRP, formando um complexo com o substrato DAB para gerar o precipitado visível. (B) – Sistema OptiView DAB IHC Detection: inclui um passo adicional de amplificação com polímeros secundários, permitindo maior intensidade e sensibilidade do sinal.

Abreviaturas: DAB: 3,3'-Diaminobenzidina; HQ – Hapten-Quinoline; HRP – Horseradish Peroxidase

Fonte: *OptiView DAB Detection Kit* e do *ultraView Universal DAB Detection Kit*, Ventana-Roche (47,48)



O uso da ICQ é especialmente indicado em situações com suspeita de neoplasia, desde que as células malignas preservem as suas características imunofenotípicas, permitindo a distinção entre diferentes tipos tumorais, ajudando não só na confirmação do diagnóstico, mas também da sua tipificação; contudo existem outras técnicas complementares, igualmente importantes na distinção entre neoplásico ou não neoplásico; entre elas a imunofenotipagem por CF, a hibridização *in situ* e a reação em cadeia da polimerase (PCR), que podem ser aplicadas de forma integrada para uma avaliação mais completa das amostras de LCR (18,26,46,47).

Estudos demonstram que independentemente do tipo de processamento da amostra citológica, todos eles podem ser utilizados para realização da técnica de ICQ (51); contudo, à exceção do citobloco (CB) fixado em formol, representam um desafio no que diz respeito a validação de resultados (36). Na Tabela 3 encontram-se listados os principais marcadores imunocitoquímicos utilizados na avaliação citopatológica do LCR, permitindo estabelecer diagnósticos e avaliar marcadores preditivos e de prognóstico (29,44,52,53).

**Tabela 3** - Principais marcadores imunocitoquímicos utilizados em LCR

| Neoplasias          | Principais marcadores imunocitoquímicos |
|---------------------|---|
| Carcinomas (geral)  | Pan-Ck AE1/AE3, Ck7, Ck20               |
| Carcinoma do cólon  | CDX-2                                   |
| Carcinoma da mama   | GATA-3, RE, RP                          |
| Carcinoma do pulmão | TTF-1                                   |
| Melanoma            | S100, HMB45                             |
| Linfoma             | CD3, CD20                               |
| Tumores gliais      | GFAP                                    |
| Neuroendócrinos     | CD56, Sinaptofisina, Cromogranina       |

Abreviaturas: Ck, citoqueratinas; TTF, fator de transcrição da tiroide; GATA, fator de transcrição associado a tecidos mamários e urotelial; RE, recetor de estrogénios; RP, recetor de progesterona; CDX, fator de transcrição caudal associado ao epitélio intestinal; S100, proteína de ligação ao cálcio, expressa em células gliais e melanócitos; HMB, *Human Melanoma BlaCk*; CD, *cluster* de diferenciação; GFAP, proteína ácida fibrilar glial.

Fonte: Adaptado de Tran, Suzanne e Villa, Chiara (26) e de Dušková, Jaroslava e Sobek, Ondřej (32)

Para amostras com escassa celularidade, para as quais há necessidade da pesquisa de mais do que um antígeno para realizar diagnóstico, existe a possibilidade de marcação dupla, colmatando desta maneira o problema da escassez da amostra (44).



### 1.3.2. Protocolos e fatores que interferem com o desempenho do método

Apesar dos avanços, a garantia e controlo da qualidade (CQ) da ICQ em amostras citopatológicas continuam limitados, ao contrário do que se verifica na imuno-histoquímica em cortes de tecido fixados em formol e incluídos em parafina (54). Ainda assim, há que ter cuidados acrescidos quando a amostra é seca ao ar, durante qualquer etapa do processamento, visto que tal resulta em ligações inespecíficas dos anticorpos e faz com que haja resultados falsos-positivos (36,44). Há autores que consideram ainda que o processamento por citocentrifugação seguido de fixação com acetona permite manter íntegros os epítomos-alvo, revelando-se um método que promove a qualidade da marcação ICQ (45).

As barreiras para um resultado ótimo da qualidade do ICQ, vão desde o tipo de agente fixador utilizado, à quantidade de amostra disponível e sobretudo à falta de validações e amostras de controlo; tornando assim a ICQ em citologia como um procedimento de segunda instância e não como técnica de rotina padronizada (36,53). Assim, é indispensável uniformizar a preparação da amostra citológica, desde o tipo de agente fixador (metanol, etanol, acetona, formol ou secagem ao ar), as etapas pós-fixação, nomeadamente o tipo de processamento (citocentrifugação, citologia em meio líquido *ThinPrep*, esfregaço convencional ou CB), o tipo de coloração: Papanicolaou (PAP) ou May-Grünwald Giemsa (MGG) e os diferentes tipos de protocolos e validações técnicas (54).

### 1.3.3. Validação da técnica e controlo de qualidade interno de ICQ

A otimização e validação de protocolos imunocitoquímicos constituem etapas fundamentais para garantir exatidão de resultados laboratoriais (54).

A validação analítica assegura que os ensaios produzem resultados consistente, fiáveis e clinicamente relevantes. O Colégio Americano de Patologistas (CAP) na sua atualização mais recente publicada em 2024, introduziu diretrizes específicas para a validação de ICQ em amostras citopatológicas, alertando para a necessidade de validação individualizada para cada método de fixação e processamento. O CAP sublinha ainda a urgência na padronização de variáveis pré-analíticas, como os tempos de isquemia da amostra, que podem influenciar significativamente os resultados (55).



No contexto da validação técnica, a utilização de controlos externos é essencial. Estes incluem os *on-slide controls* e *batch controls*, que devem ser aplicados a cada ensaio, garantindo a especificidade dos marcadores utilizados e a integridade do procedimento técnico (45,56). Apesar da sua importância, o estudo de Colasacco *et al.* (57) demonstrou que o uso adequado de controlos para correta validação da amostra fica muito aquém do que é esperado. Apenas uma fração das publicações analisadas referia explicitamente a utilização de controlos realizados de forma idêntica à amostra do doente. Em alguns casos, recorre-se a controlos histológicos e a CB, e mais raramente, omite-se o uso de controlos devido à escassez de material (57).

Paralelamente à validação, a avaliação da qualidade da imunomarcação representa uma ferramenta imprescindível para garantir a fiabilidade da técnica. Idealmente, esta, deve ser efetuada de forma sistematizada, através de grelhas de avaliação que quantifiquem parâmetros como a preservação da morfologia celular, intensidade da coloração, sensibilidade (marcação específica), especificidade (marcação inespecífica) e contraste. Atualmente já existem *softwares* de análise de imagem, com potencial para automatizar esta mesma avaliação, contudo o custo elevado e a sua irregular sensibilidade e reprodutibilidade limita a sua implementação na rotina laboratorial (58). Ainda assim, a interpretação de resultados em ICQ continua altamente dependente da análise e sentido crítico do observador. Apesar da sua ampla utilização, especialmente no contexto da medicina de precisão, persistem desafios significativos relacionados com a falta de padronização das condições pré-analíticas (59).

Mais recentemente, e com o avanço da patologia digital, existem novas abordagens baseadas em análise quantitativa computadorizada, que permitem normalizar a interpretação de resultados e reduzir a variabilidade inter-observador, que na opinião dos peritos irá revolucionar toda a clínica (32).

Por fim, para além da utilização sistemática de controlos, a importância da prática regular de controlo interno da qualidade e da participação em programas de controlo externo da qualidade (CEQ) são cada vez mais indispensáveis para assegurar a excelência diagnóstica em ICQ.



#### 1.4. Controlo da Qualidade e Programas Internacionais de Qualidade

O CAP define a garantia de qualidade (GQ) como um sistema abrangente que inclui todas as etapas de processo laboratorial – desde a fase pré-analítica, analítica até à pós-analítica. Envolve otimização de protocolos, validação de métodos, monitorização contínua do desempenho, entre outros. Dentro deste sistema, insere-se o CQ (controlo de qualidade), que atua de forma mais restrita, sobretudo na fase analítica. O objetivo do CQ é prevenir, detetar e corrigir erros técnicos, assegurando que cada ensaio produz resultados válidos e fiáveis (47,62). Assim, o CQ é considerado pelo CAP como uma componente essencial da GQ, sendo ambos complementares na promoção da fiabilidade diagnóstica (62).

No contexto da ICQ, a implementação de programas de qualidade é crucial, uma vez que se trata de uma técnica sensível a múltiplas variáveis, nomeadamente no que diz respeito à concentração do anticorpo primário, recuperação antigénica e método de deteção (63). A consistência dos resultados depende não só do controlo da qualidade interno (utilizado em cada ensaio), mas também de programas de Controlo Externo da Qualidade (CEQ), que permitem monitorizar a variabilidade inter-laboratorial e assegurar padrões internacionais.

Entre os programas qualificados para CEQ em ICQ, destaca-se o *United Kingdom National External Quality Assessment Service for Immunocytochemistry & In Situ Hybridisation* (UK NEQAS ICC & ISH), atualmente o único que oferece um módulo específico para citologia. Contudo, até à data, dispõe de poucos marcadores testados (54). Estudos realizados segundo este programa de qualidade, classificam os CB e a citocentrifugação com melhor pontuação, seguidos de base líquida e esfregaços. Relativamente à fixação, as lâminas fixadas em acetona obtiveram pontuações mais baixas do que os restantes fixadores (64).

Em conjunto, estes programas constituem uma ferramenta essencial para garantir fiabilidade de resultados, especialmente em contextos clínicos de maior complexidade diagnóstica, como é o caso das amostras de LCR.



## 2. Objetivos

Persistem lacunas relativamente ao desempenho diagnóstico dos testes de ICQ e à avaliação da qualidade técnica da imunomarcação, aspetos com impacto potencial na prática clínica e na tomada de decisão em contexto diagnóstico.

O objetivo principal deste estudo é analisar a sensibilidade e especificidade dos testes de ICQ, avaliar a qualidade técnica da imunomarcação e aferir o contributo da mesma para o diagnóstico anatomopatológico, em amostras de LCR.

Mais especificamente, pretende-se identificar qual o método de preservação e coloração de amostras que proporciona melhor qualidade técnica da imunomarcação; avaliar se o contributo diagnóstico da ICQ varia consoante o método de preservação utilizado e analisar o desempenho da ICQ em função dos diferentes biomarcadores utilizados.



### 3. Materiais e Métodos

O presente projeto corresponde a um estudo observacional, transversal e retrospectivo, que visa avaliar a aplicação de testes de ICQ em amostras de LCR.

#### 3.1. Amostragem e seleção de casos

A amostra em estudo é constituída por todas as amostras de LCR submetidas à técnica de ICQ, no Laboratório de Citopatologia do Instituto Português de Oncologia de Lisboa Francisco Gentil, EPE (IPOLFG), no período compreendido entre os anos de 2020 e 2023.

Foram excluídas as amostras cujas lâminas de ICQ se encontravam inacessíveis ou ilegíveis, nomeadamente lâminas danificadas, que impossibilitavam a observação microscópica e inviabilizavam a respetiva análise.

De um total de 335 amostras identificadas, 78 foram rejeitadas com base nesses critérios, resultando num total de 257 amostras elegíveis para análise.

As amostras são provenientes de diferentes serviços do IPOLFG. No Serviço de Anatomia Patológica (SAP) foi realizado o seu processamento e a ICQ foi aplicada em amostras previamente coradas com coloração de PAP e/ou MGG, bem como em amostras preservadas em polietilenoglicol (PEG). A preparação com PEG, após fixação imediata com metanol, permite a conservação das lâminas à temperatura ambiente (32).

A técnica de ICQ foi realizada mediante solicitação do médico anatomopatologista após avaliação citomorfológica inicial, com recurso a marcadores específicos, selecionados de acordo com a hipótese diagnóstica formulada para cada caso.

#### 3.2. Tratamento de dados e questões éticas

Foi criada uma base de dados no *Microsoft Excel (Office 365)*, contendo informações referentes ao serviço de origem da amostra, sexo e idade do utente à data da colheita, tipo de processamento e coloração citológica, tipo de marcador utilizado para a técnica de ICQ e o diagnóstico citopatológico.

Os dados foram cedidos pelo Laboratório de Citopatologia do SAP do IPOLFG, já devidamente codificados com uma referência numérica individual para cada amostra,



garantindo a confidencialidade dos pacientes. O investigador não teve acesso a qualquer dado identificativo do doente.

Tratando-se de um estudo retrospectivo, com base exclusivamente na observação de lâminas de arquivo, não houve manipulação de qualquer tipo de material biológico, nem qualquer intervenção direta sobre os pacientes.

### 3.3. Avaliação microscópica das amostras

Para este estudo, e com base nos critérios previamente definidos, as lâminas foram retiradas do arquivo do laboratório e submetidas a avaliação microscópica, com o objetivo de determinar a qualidade da imunomarcação e aferir o contributo diagnóstico da técnica. O contributo diagnóstico foi realizado por um médico anatomopatologista experiente e a qualidade da imunomarcação por dois citotecnologistas.

Para assegurar a qualidade dos testes imunocitoquímicos, foram utilizados controlos de qualidade externos, nomeadamente *on-slide controls* (preparações celulares de controlo positivo e negativo aplicados na mesma lâmina da amostra do paciente) ou *batch controls* (lâminas de controlo positivo e negativo, processadas em simultâneo com as lâminas de amostra do paciente). Ambos os tipos de controlo incluíam células negativas e positivas, permitindo validar adequadamente a imunomarcação observada. A implementação dos *on-slide controls* seguiu o modelo descrito por Kirbiš e Roque (65).

#### 3.3.1. Avaliação do contributo diagnóstico

O resultado da ICQ foi avaliado quanto à sua capacidade de influenciar, ou não, o diagnóstico final. Com base no estudo de Chavali *et al.*, cada amostra foi diferenciada em: ajudou no diagnóstico, contribuiu para o diagnóstico, discordante do diagnóstico ou não contribuiu para o diagnóstico (46). Para cada amostra, apenas uma das categorias foi selecionada.

Na Tabela 4 encontram-se descritas as categorias possíveis acompanhadas da respetiva descrição.



**Tabela 4 – Classificação da utilidade diagnóstica da ICQ**

| Classificação                     | Descrição  |
|-----------------------------------|--|
| Contribuiu para o diagnóstico     | A ICQ foi determinante para a obtenção de um diagnóstico que não seria possível apenas com citologia isolada |
| Ajudou no diagnóstico             | A ICQ contribuiu apenas para esclarecer, mas não alterar o diagnóstico citológico inicial                    |
| Não contribuiu para o diagnóstico | A ICQ não teve qualquer utilidade diagnóstica  |
| Discordante do diagnóstico        | A ICQ revelou resultados contrários à interpretação citomorfológica  |

Fonte: Adaptado de Chavali et al. 2016 (46)

Para garantir a aplicabilidade e reprodutibilidade dos critérios definidos, foi inicialmente realizado um pré-teste, com recurso a dez casos selecionados aleatoriamente, avaliados pelo médico anatomopatologista.

### 3.3.2. Avaliação da qualidade da imunomarcação

No que respeita à avaliação da qualidade técnica da imunomarcação, esta foi aferida com base numa grelha de critérios (58). A observação microscópica foi realizada por dois avaliadores independentes, que atribuíram pontuações de acordo com a qualidade da imunomarcação, em que 0 indica o pior resultado e 3 o melhor resultado, sendo posteriormente ponderado um fator específico, atribuído de acordo com a sua relevância na qualidade final da técnica, para cada lâmina, de acordo com a Tabela 5. A soma ponderada dos critérios resultou na pontuação final da avaliação da qualidade técnica da ICQ, para cada lâmina. Foram excluídos desta avaliação os casos com imunomarcação negativa, uma vez que, os critérios como a intensidade, contraste ou especificidade apenas podem ser aferidos na presença de imunoreatividade visível. Nos casos em que se verificaram discrepâncias entre os avaliadores, foi realizada uma revisão conjunta das lâminas, até à obtenção de consenso, assegurando assim maior consistência e fiabilidade no processo de avaliação.

Esta abordagem permitiu não só caracterizar o desempenho global da técnica como também avaliar o impacto da escolha do método de coloração e/ou preservação da amostra, sobre a qualidade da imunomarcação, fornecendo uma base objetiva para otimização de protocolos laboratoriais futuros.



A escala incluiu os parâmetros: preservação da morfologia (PM), intensidade da imunomarcção (II), marcação específica (ME) e inespecífica (MI) e contraste (C).

*Tabela 5 - Grelha de avaliação utilizada na análise dos resultados de ICQ*

| <i>Pontos</i>              | <b>Preservação da morfologia (PM)</b>                             | <b>Intensidade da imunomarcção (II)</b> | <b>Marcação específica (ME)</b>   | <b>Marcação inespecífica (MI)</b>           | <b>Contraste (C) (C)</b>   |
|----------------------------|---|---|-----------------------------------|---|--|
| <b>0</b>                   | Ausência de preservação morfológica que invalida a avaliação      | Marcação nula                           | Marcação de 0% a 10% das células  | Marcação inespecífica grave                 | Coloração com deficiências que invalidam a avaliação               |
| <b>1</b>                   | Preservação deficiente, mas avaliada                              | Marcação de fraca intensidade           | Marcação de 11 a 50% das células  | Marcação inespecífica moderada              | Coloração com deficiências moderadas que não invalidam a avaliação |
| <b>2</b>                   | Preservação com ligeiras alterações, que não invalida a avaliação | Marcação de moderada intensidade        | Marcação em 51 a 90% das células  | Marcação inespecífica ligeira               | Coloração com deficiências ligeiras que não invalidam a avaliação  |
| <b>3</b>                   | Preservação completa da morfologia                                | Marcação de forte intensidade           | Marcação em 91 a 100% das células | Ausência de marcação de estruturas não-alvo | Coloração nítida e com bom contraste                               |
| <b>Fator de ponderação</b> | <b>1</b>  | <b>3</b>                                | <b>2</b>                          | <b>2</b>                                    | <b>1</b>   |

*Fonte: Adaptado de Ferro, AB. Imunohistoquímica. 2014 (58)*

A PM refere-se à integridade estrutural das células analisadas após processo de preparação da amostra, a II avalia a intensidade da coloração nas células-alvo (indicativo da concentração de antígeno presentes nas células), a ME diz respeito à especificidade do marcador utilizado, ou seja, que o mesmo só deva marcar as células de interesse, enquanto a MI verifica a presença de marcação não desejada, por falha na técnica ou no marcador, e o C diferencia as células marcadas das não-marcadas.

A pontuação final da qualidade para cada lâmina foi obtida através da fórmula:  $[(1 \times PM) + (3 \times II) + (2 \times ME) + (2 \times MI) + (1 \times C)]$ . A pontuação atribuída a cada caso pode variar entre 0 e 27, em que 0 corresponde ao pior resultado possível, e o 27 diz respeito ao melhor resultado possível. Esta abordagem permitiu uma avaliação objetiva e padronizada da performance técnica da ICQ entre as diferentes amostras.



### 3.4. Análise estatística dos dados

A análise estatística foi realizada no software *IBM SPSS Statistics (versão 29.0.1.0 [171])*, após exportação da base de dados inicialmente organizada em *Excel (Office 365, Microsoft)*.

Os dados categóricos foram descritos através de frequências absolutas e relativas, e as associações entre as variáveis categóricas foram avaliadas pelo Teste de Qui-Quadrado de Pearson ou, sempre que os pressupostos para aplicação do mesmo não foram verificados ( $n < 5$ ), recorreu-se ao Teste Exato de Fisher e ao Teste Exato de Fisher-Freeman-Halton. Recorreu-se ainda ao teste de *post hoc* do Teste Exato de Fisher, para comparar pares de métodos de coloração/preservação (PAP vs PEG, PAP vs MGG e MGG vs PEG) quanto ao desempenho diagnóstico da ICQ, recomendado em estudos com amostras pequenas (reduzido número de falsos positivos (FP) e falsos negativos (FN)).

Os dados da avaliação da qualidade da técnica de ICQ não seguem uma distribuição normal, após confirmação pelo Teste de Shapiro-Wilk, tendo sido aplicados os seguintes testes não-paramétricos: correlação de Spearman, para analisar a correlação entre a pontuação final e variáveis numéricas (ano de execução da técnica e a idade à data da colheita); Teste de Mann-Whitney (Teste U), para comparar a pontuação final entre dois grupos (sexo masculino e feminino) e o Teste de Kruskal-Wallis (Teste H), para variáveis com mais do que dois grupos (tipo de processamento, o tipo de coloração/preservação da amostra).

Foi considerado estatisticamente significativo um valor de  $p < 0,05$ .



## 4. Resultados

Foram obtidas 257 amostras de LCR submetidas a ICQ, que constituem a população em estudo. Os resultados apresentados nesta secção referem-se à análise global dessas amostras, no período compreendido entre 2020 e 2023.

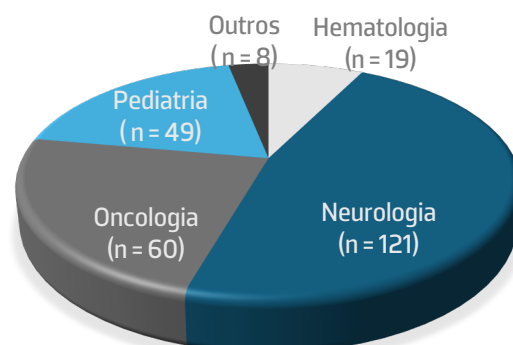
### 4.1. Caracterização da amostra

No total, foram observadas 257 lâminas, distribuídas ao longo dos quatro anos em estudo: 60 amostras (23,3%) em 2020, 74 amostras (28,8%) em 2021, 83 amostras (32,3%) em 2022 e 40 amostras (15,6%) em 2023. O número médio de lâminas por ano foi de 64,2 lâminas ( $\pm 18,7$ ) com uma mediana de 67 lâminas e um intervalo entre 40 e 83 amostras anuais, refletindo uma ligeira variação na distribuição anual das amostras processadas.

A idade dos pacientes à data da colheita do LCR variou entre os 4 meses e os 85 anos de idade, com uma média de 45,1 anos, mediana de 51 anos e um desvio padrão de 24,1 anos, valor relativamente elevado, refletindo uma elevada heterogeneidade etária na população em estudo.

Relativamente ao sexo dos utentes, 161 das amostras (62,6%) corresponderam a utentes do sexo feminino enquanto 96 amostras (37,4%) corresponderam a utentes do sexo masculino.

No que respeita à proveniência das amostras, a Figura 5 apresenta a distribuição por serviço de origem. Demonstra que, a maioria das amostras foi enviada pelo Serviço de Neurologia ( $n = 121$ ; 47,1%), seguido pelos Serviços de Oncologia ( $n = 60$ ; 23,3%), Pediatria ( $n = 49$ ; 19,1%) e Hematologia ( $n = 19$ ; 7,4%). Os restantes casos ( $n = 8$ , 3,2%) foram provenientes de outros serviços, nomeadamente Unidade de Transplantes de Medula, Pneumologia, Radiologia e Cuidados Intensivos.



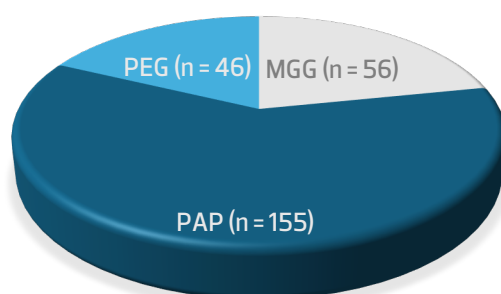
**Figura 5** - Distribuição das amostras, segundo o serviço de origem (frequência absoluta;  $n = 257$ )



#### 4.2. Processamento das amostras

Relativamente ao tipo de processamento citológico utilizado, a maioria das amostras ( $n = 243$ ; 94,6%) foi processada por citocentrifugação, enquanto apenas 14 amostras (5,4%) foram submetidas ao método de *ThinPrep*.

No que respeita à coloração ou preservação utilizado previamente à realização da técnica de ICQ, 155 lâminas (60,3%) foram coradas pelo método de PAP e 56 lâminas (21,8%) pela coloração de MGG. As restantes 46 lâminas (17,9%) foram preservadas em PEG, sem coloração prévia, conforme representado na Figura 6.



*Figura 6 – Distribuição das amostras, segundo o tipo de coloração/preservação da amostra, utilizado antes da ICQ (frequência absoluta;  $n = 257$ )*

#### 4.3. Diagnóstico citomorfológico e ICQ em LCR

Das amostras de LCR analisadas, 197 (76,7%) foram classificadas como negativas para malignidade, 51 (19,8%) como positivas para malignidade, e 9 (3,5%) categorizadas como suspeitas para malignidade, conforme apresentado na Tabela 6.

*Tabela 6 – Diagnóstico citomorfológico das amostras de LCR submetidas a ICQ ( $n = 257$ )*

| Diagnóstico               | n   | %    |
|---------------------------|-----|------|
| Negativo para malignidade | 197 | 76,7 |
| Positivo para malignidade | 51  | 19,8 |
| Suspeito para malignidade | 9   | 3,5  |

Entre os casos classificados como positivos para malignidade, 14 amostras foram identificadas como sendo metástases de tumores primários reconhecidos, com origem explicitamente referida no diagnóstico final.

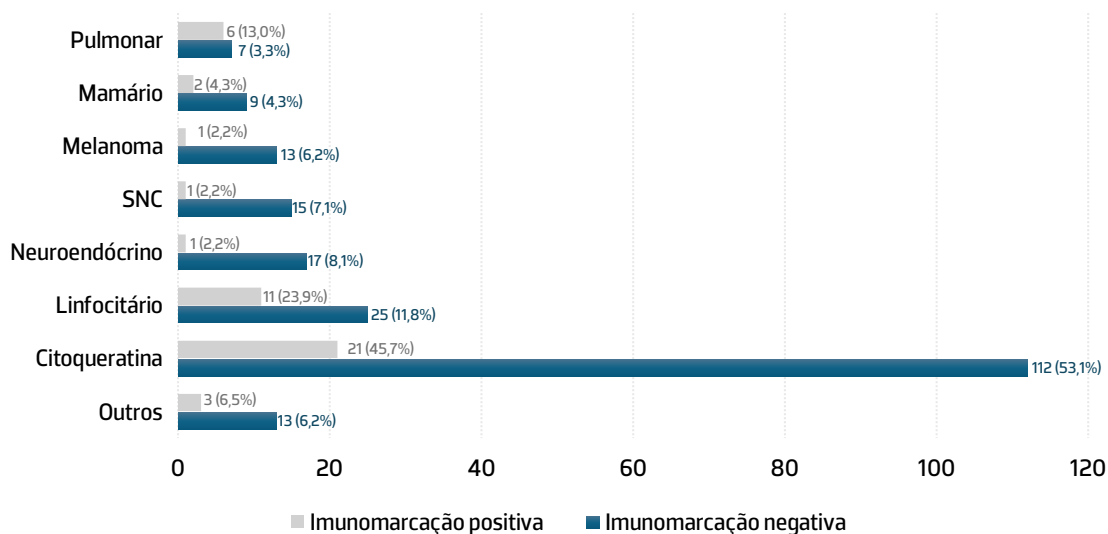


#### 4.3.1. Testes de ICQ realizados

Dos 257 casos de ICQ realizados, em 194 casos (75,5%) foram usados *on-slide controls*, enquanto que em 63 casos (24,5%) utilizaram-se *batch controls*, consoante as características técnicas e logísticas de cada amostra.

Foram aplicados 33 tipos de anticorpos primários distintos (Anexo I), com particular destaque para os marcadores de citoqueratinas (Ck), o grupo mais frequentemente utilizado. Destes, o mais aplicado foi o clone AE1/AE3, estando presente em 123 amostras (47,9%).

Os marcadores foram agrupados por tipo (citoqueratinas, linfocitários, marcadores do SNC, neuroendócrinos, origem mamária e pulmonar, melanoma, entre outros) e analisados quanto à sua frequência e resultado (positivo/negativo). A Figura 7 representa a distribuição dos resultados da imunomarcação (positiva ou negativa), por grupo de marcadores utilizados.



**Figura 7** – Distribuição dos resultados da imunomarcação (positiva/negativa), por grupo de marcadores utilizados, segundo o resultado (positivo ou negativo) (frequência absoluta e relativa; n = 257)

#### 4.3.2. Concordância diagnóstica vs ICQ

Para avaliar a concordância global entre o diagnóstico citomorfológico e o resultado da ICQ, os casos foram reagrupados em apenas duas categorias principais: positivos (englobando os casos com diagnóstico citomorfológico positivo ou suspeito para malignidade) e negativos (correspondendo aos casos sem evidência citomorfológica de



malignidade). Este reagrupamento permitiu simplificar a análise estatística e centrar a atenção na identificação de possíveis discordâncias diagnósticas, nomeadamente: falsos positivos (ICQ positiva em casos com diagnóstico citomorfológico negativo) e falsos negativos (ICQ negativa em casos com diagnóstico citomorfológico positivo ou suspeito).

A Tabela 7 apresenta a distribuição das amostras segundo o diagnóstico citomorfológico e o resultado da imunomarcação ICQ.

**Tabela 7** – Concordância entre o diagnóstico citomorfológico e o resultado da ICQ  
(*n* = 257)

| Imunomarcação | Diagnóstico citomorfológico |          |
|---------------|-----------------------------|----------|
|               | Positivo                    | Negativo |
| Positiva      | 40                          | 6        |
| Negativa      | 20                          | 191      |
| <b>Total</b>  | 60                          | 197      |

O Teste de Qui-Quadrado revelou uma associação estatisticamente significativa entre as variáveis ( $\chi^2=126,681, p < 0,001$ ), confirmando que o resultado da imunomarcação está fortemente associado à classificação morfológica atribuída, uma vez que são interdependentes.

No entanto, importa salientar que uma imunomarcação negativa não corresponde necessariamente a um diagnóstico negativo, ou seja, não exclui necessariamente a presença de neoplasia; tal como uma imunomarcação positiva não implica, por si só, malignidade. Por exemplo, o marcador CD68 pode apresentar imunoreatividade em contexto inflamatório, refletindo apenas a presença de histiócitos/macrófagos, sem qualquer significado neoplásico. Inversamente, a ausência de expressão do marcador RE não invalida a presença de carcinoma mamário, como acontece nos carcinomas triplo-negativos, que são inequivocamente malignos, apesar da imunomarcação negativa para este marcador.

Posto isto, os resultados da ICQ foram comparados com o diagnóstico e *follow-up* do doente, aferindo assim o desempenho da técnica. Após esta análise da base de dados, foram identificados 7 FN, 1 FP, 46 verdadeiros positivos (VP) e 203 verdadeiros negativos (VN). A partir destes valores, calcularam-se os seguintes indicadores de desempenho diagnóstico da ICQ, discriminados na Tabela 8.



**Tabela 8** – Indicadores de desempenho da ICQ, em relação ao diagnóstico citomorfológico

| Indicadores de desempenho                      | Total |
|--|-------|
| Sensibilidade (VP / (VP+FN))                   | 86,8% |
| Especificidade (VN / (VN+FP))                  | 99,5% |
| Valor Preditivo Positivo (VPP) (VP / (VP+FP))  | 97,9% |
| Valor Preditivo Negativo (VPN) (VN / (VN+FN))  | 96,6% |
| Taxa de discordância ((FP+FN) / Total)         | 3,1%  |
| Concordância global do teste ((VP+VN) / Total) | 96,9% |

Abreviaturas: VP: verdadeiro positivo; FN: falso negativo; FP: falso positivo; VN: verdadeiro negativo; VPP: valor preditivo positivo; VPN: valor preditivo negativo.

A técnica demonstrou uma sensibilidade de 86,8% e uma especificidade ainda superior, atingindo os 99,5%; valores que se traduzem em valor preditivo positivo (VPP) e valores preditivos negativos (VPN) elevados, baixa taxa de discordância e elevada taxa de concordância global entre o diagnóstico citomorfológico e a ICQ, refletindo a robustez da técnica, embora esta dependa, em grande parte, da sua elevada especificidade em excluir FP. Ainda, com o objetivo de avaliar o impacto do tipo de processamento e do método de coloração/preservação, no desempenho global da ICQ, os casos analisados foram distribuídos nas categorias de desempenho diagnóstico, permitindo calcular a sensibilidade, especificidade e concordância global da técnica para cada variável, conforme sintetizado na Tabela 9.

**Tabela 9** – Análise dos indicadores de desempenho ICQ, por tipo de processamento e coloração/preservação (n = 257)

|                                   | Indicadores de desempenho |    |    |     |                                 |                                  |  |
|-----------------------------------|---------------------------|----|----|-----|---------------------------------|----------------------------------|--|
|                                   | FN                        | FP | VP | VN  | Sensibilidade<br>(VP / (VP+FN)) | Especificidade<br>(VN / (VN+FP)) | Concordância<br>global do teste<br>((VP+VN) / Total) |
| <b>Processamento</b>              |                           |    |    |     |                                 |                                  |  |
| Citocentrifugação<br>(n = 243)    | 7                         | 1  | 39 | 196 | 84,8%                           | 99,5%                            | 96,7%  |
| <i>ThinPrep</i> (n = 14)          | 0                         | 0  | 7  | 7   | 100,0%                          | 100,0%                           | 100,0%   |
| <b>Coloração/<br/>preservação</b> |                           |    |    |     |                                 |                                  |  |
| PAP (n = 155)                     | 5                         | 0  | 29 | 121 | 85,3%                           | 100,0%                           | 96,8%  |
| PEG (n = 46)                      | 0                         | 1  | 13 | 32  | 100,0%                          | 97,0%                            | 97,8%  |
| MGG (n = 56)                      | 2                         | 0  | 4  | 50  | 66,7%                           | 100,0%                           | 96,4%  |

Abreviaturas: VP: verdadeiro positivo; FN: falso negativo; FP: falso positivo; VN: verdadeiro negativo.



O Teste Exato de Fisher confirmou a associação estatisticamente significativa entre as variáveis ( $p = 0,021$ ), que sugere que o tipo de processamento pode influenciar o desempenho diagnóstico da ICQ. Embora o grupo *ThinPrep* tenha apresentado sensibilidade e especificidade de valor máximo, com ausência de FP e FN, deve-se interpretar este resultado com cautela, dado o reduzido número de casos ( $n = 14$ ) comparativamente à citocentrifugação ( $n = 243$ ), que apresentou valores elevados de desempenho, com uma sensibilidade de 84,8% e especificidade de 99,5%, reforçando uma vez mais a importância da técnica com este tipo de processamento.

Relativamente à coloração/preservação, a coloração com o método de PAP obteve uma sensibilidade de 85,3% e uma especificidade de 100,0% e uma concordância global de 96,8%. A preservação em PEG evidenciou sensibilidade máxima (100,0%), mas uma ligeira redução na especificidade (97,0%), devido à presença de um único FP, resultando assim numa concordância global de 97,8%. Por sua vez a coloração com MGG apresentou sensibilidade bastante inferior (66,7%), apesar de especificidade máxima (100,0%), totalizando uma concordância global de 96,4%. A análise global revelou uma associação estatisticamente significativa entre o método de coloração/preservação e o desempenho diagnóstico da técnica de ICQ, através do Teste Exato de Fisher-Freeman-Halton ( $p = 0,023$ ), sugerindo que poderiam existir variações relevantes entre os métodos de coloração/preservação testados.

Com o intuito de fazer a avaliação entre pares de métodos (PAP vs MGG, PAP vs PEG, MGG vs PEG), e dado o reduzido número de FP e FN, a análise estatística foi realizada em tabelas 2x2, em que os resultados do desempenho diagnóstico da ICQ foram reagrupados em duas categorias: resultados corretos (todos os casos classificados como VP ou VN) e resultados incorretos (todos os casos FP ou FN). A aplicação do Teste Exato de Fisher e respetivo teste *post hoc* não confirmou a existência de associação entre os pares de variáveis ( $p = 1,000$ , em todas as comparações), sugerindo que embora se observem variações nos indicadores individuais de desempenho, essas diferenças não são estatisticamente significativas quando os resultados são agrupados apenas como corretos ou incorretos.



#### 4.3.3. Marcação com Ck AE1/AE3: concordância diagnóstica

Considerando a elevada frequência de amostras testadas com o marcador Ck AE1/AE3 ( $n = 123$ ; 47,9%), justifica-se uma análise detalhada do seu desempenho, não só pela representatividade na amostra total, como também pela sua relevância clínica para identificação de neoplasias epiteliais metastáticas no SNC. A Tabela 10 apresenta a distribuição dos casos segundo o resultado da imunomarcação com o marcador Ck AE1/AE3 e o diagnóstico citomorfológico.

**Tabela 10** – Concordância entre diagnóstico citomorfológico e o resultado da ICQ, para o marcador Ck AE1/AE3 ( $n = 123$ )

| Imunomarcação | Diagnóstico citomorfológico |          |
|---------------|-----------------------------|----------|
|               | Positivo                    | Negativo |
| Positiva      | 19                          | 0        |
| Negativa      | 4                           | 100      |

O Teste de Qui-Quadrado revelou uma associação estatisticamente significativa entre o diagnóstico citomorfológico atribuído e o resultado da ICQ para o marcador Ck AE1/AE3 ( $\chi^2 = 97,701$ ;  $p < 0,001$ ), reforçando a robustez diagnóstica deste marcador na deteção de carcinomas epiteliais metastáticos em amostras de LCR.

Na Tabela acima encontra-se a concordância bruta entre o diagnóstico citomorfológico e a imunomarcação com o marcador Ck AE1/AE3; contudo na análise individual dos casos, houve integração de dados complementares (repetição da ICQ, correlação histológica e *follow-up* clínico). Nessa mesma revisão, um dos quatro casos com diagnóstico citomorfológico positivo e imunomarcação negativa foi considerado como VN, por ausência de confirmação de malignidade na análise subsequente. Daí, foram identificados 19 VP, 3 FN, 101 VN e nenhum FP. Estes dados permitiram calcular os indicadores de desempenho do marcador de Ck AE1/AE3, descritos na Tabela 11.

**Tabela 11** – Indicadores de desempenho da ICQ, com o marcador Ck AE1/AE3

| Indicadores   | Total  |
|---|--------|
| <b>Sensibilidade</b> (VP / (VP+FN))                   | 86,4%  |
| <b>Especificidade</b> (VN / (VN+FP))                  | 100,0% |
| <b>Valor Preditivo Positivo</b> ((VPP) VP / (VP+FP))  | 100,0% |
| <b>Valor Preditivo Negativo</b> ((VPN) VN / (VN+FN))  | 97,1%  |
| <b>Taxa de discordância</b> ((FP+FN) / Total)         | 2,4%   |
| <b>Concordância global do teste</b> ((VP+VN) / Total) | 97,5%  |

Abreviaturas: VP: verdadeiro positivo; FN: falso negativo; FP: falso positivo; VN: verdadeiro negativo; VPP: valor preditivo positivo; VPN: valor preditivo negativo.



#### 4.3.4. Marcação com Ck AE1/AE3: processamento e coloração

Para avaliar o impacto do tipo de processamento e do método de coloração/preservação no desempenho da imunomarcação com o marcador Ck AE1/AE3, analisou-se a distribuição dos casos segundo as categorias: VP, VN, FP e FN.

No processamento por citocentrifugação, obtiveram-se 18 VP, 3 FN, 98 VN e 0 FP; enquanto que para o processamento por *ThinPrep* observaram-se apenas 1 VP e 3 VN, com 0 FP e 0 FN.

Quanto ao tipo de coloração, a técnica por PAP revelou 12 VP, 3 FN, 56 VN e 0 FP; enquanto por MGG verificou-se 1 VP, 29 VN, com 0 FN e 0 FP. A preservação em PEG mostrou-nos 6 VP e 16 VN, com 0 FP e 0 FN.

Com base nesses valores absolutos, foram calculados os indicadores de desempenho (sensibilidade, especificidade e concordância global), organizados por método de preparação/coloração da amostra.

Os respetivos valores encontram-se sintetizados na Tabela 12.

**Tabela 12** – Desempenho diagnóstico da ICQ com o marcador Ck AE1/AE3, segundo tipo de processamento e coloração/preservação (n = 123)

|                                   | Indicadores de desempenho |    |    |    |                                 |                                  |  |
|-----------------------------------|---------------------------|----|----|----|---------------------------------|----------------------------------|--|
|                                   | FN                        | FP | VP | VN | Sensibilidade<br>(VP / (VP+FN)) | Especificidade<br>(VN / (VN+FP)) | Concordância<br>global do teste<br>((VP+VN) / Total) |
| <b>Processamento</b>              |                           |    |    |    |                                 |                                  |  |
| Citocentrifugação                 | 3                         | 0  | 18 | 98 | 85,7                            | 100,0                            | 97,5%  |
| <i>ThinPrep</i>                   | 0                         | 0  | 1  | 3  | 100,0                           | 100,0                            | 100,0%   |
| <b>Coloração/<br/>preservação</b> |                           |    |    |    |                                 |                                  |  |
| PAP                               | 3                         | 0  | 12 | 56 | 80,0                            | 100,0                            | 95,8%  |
| PEG                               | 0                         | 0  | 6  | 16 | 100,0                           | 100,0                            | 100,0%   |
| MGG                               | 0                         | 0  | 1  | 29 | 100,0                           | 100,0                            | 100,0%   |

Abreviaturas: VP: verdadeiro positivo; FN: falso negativo; FP: falso positivo; VN: verdadeiro negativo.

A análise mostra que todos os métodos apresentaram especificidade máxima (100,0%), o que reforça a capacidade do marcador Ck AE1/AE3 em evitar FP, independentemente do método de processamento e coloração/preservação.

A sensibilidade variou entre os grupos, no processamento por *ThinPrep* obteve 100,0%, enquanto que por citocentrifugação o valor foi relativamente mais baixo (85,7%). Nos grupos de coloração: PAP obteve 80,0% e PEG e MGG com 100,0%.



Apesar da variabilidade observada, a concordância global manteve-se elevada em todas as condições, mostrando desempenho robusto, especialmente nas amostras processadas por citocentrifugação e coradas com PAP, sustentando a fiabilidade da imunomarcação com o marcador Ck AE1/AE3 em diferentes condições técnicas.

No que respeita ao tipo de processamento, não se observou associação estatisticamente significativa com os resultados da ICQ (Teste Exato de Fisher com  $p = 1,000$ ), o que poderá dever-se ao número reduzido de amostras processadas por *ThinPrep* ( $n = 4$ ), comprometendo a utilidade da comparação; embora se tenha observado uma taxa ligeiramente superior de imunomarcações positivas com este tipo de processamento.

Por outro lado, também não se identificou associação estatisticamente significativa entre o tipo de coloração/preservação e o desempenho diagnóstico da ICQ com Ck AE1/AE3, confirmada pelo Teste Exato de Fisher-Freeman-Halton ( $p = 0,324$ ).

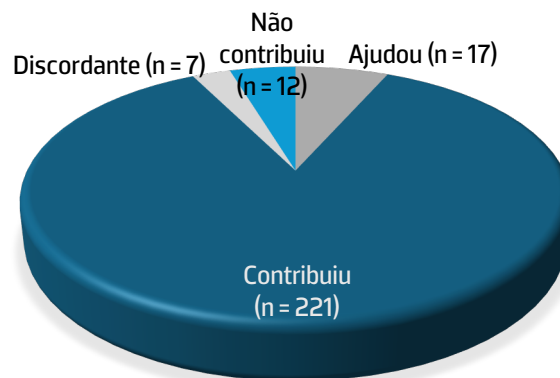
#### 4.4. Contributo diagnóstico da técnica de ICQ em amostras de LCR

Com o objetivo de aferir o contributo da ICQ no contexto da avaliação citopatológica das amostras de LCR, todas as lâminas incluídas no estudo foram revistas de forma independente por três observadores, com formação e experiência na área. Verificou-se concordância total entre os avaliadores relativamente à classificação atribuída ao tipo de contributo da ICQ para o diagnóstico final.

Esta abordagem visou avaliar de forma prática o valor da técnica de ICQ na interpretação diagnóstica de amostras citológicas de LCR.

A análise descritiva revelou que, na maioria dos casos ( $n = 221$ ; 86,0%) a técnica de ICQ contribuiu diretamente para o diagnóstico final. Em 17 casos (6,6%) a técnica foi considerada útil de forma complementar ao fornecer informações adicionais ao diagnóstico citomorfológico ("ajudou no diagnóstico"), enquanto que em 12 casos (4,7%) não se verificou qualquer contributo diagnóstico da ICQ. Apenas 7 casos (2,7%) apresentaram discordância entre os resultados da imunomarcação e o diagnóstico final estabelecido.

A Figura 8 resume graficamente esta distribuição, ilustrando o papel global da ICQ na avaliação citológica de LCR.



**Figura 8** - Distribuição do contributo diagnóstico da técnica de ICQ nas amostras de LCR (n = 257)

A categorização proposta demonstrou-se eficaz na valorização prática da ICQ como ferramenta diagnóstica em amostras citológicas de LCR, permitindo distinguir casos com impacto decisivo, complementar, nulo e ainda contraditório. Os dados evidenciam a elevada utilidade clínica da técnica, com mais de 90% das amostras analisadas a beneficiarem da sua aplicação em contexto diagnóstico.

#### 4.4.1. Associação entre variáveis técnicas e o contributo da ICQ para o diagnóstico

A análise do contributo da ICQ para o diagnóstico final representa uma etapa essencial na avaliação da utilidade clínica da técnica em amostras de LCR. Esta abordagem permite aferir se determinadas condições técnicas ou contextos morfológicos favorecem ou limitam a utilidade da ICQ no processo diagnóstico.

Neste contexto, torna-se relevante explorar se o tipo de processamento da amostra, nomeadamente se o processamento por citocentrifugação ou por método de *ThinPrep*, poderá influenciar esse mesmo contributo. Apesar do processamento por citocentrifugação ser o método amplamente predominante no protocolo laboratorial em estudo, importa perceber se a técnica influencia significativamente os resultados da ICQ, nomeadamente se facilita ou limita a sua utilidade diagnóstica.

O método de coloração/preservação da amostra representa também um fator técnico potencialmente determinante para o desempenho e interpretação da ICQ. Diferentes colorações, como o MGG e o PAP, e a solução preservante de PEG, podem influenciar a preservação morfológica e antigénica, impactando tanto a intensidade, como a especificidade e sensibilidade da imunomarcagem. A Tabela 13 apresenta a distribuição



dos casos segundo o tipo de processamento e segundo o tipo de coloração/preservação da amostra, analisando o contributo destas variáveis para diagnóstico.

**Tabela 13** - Contributo da ICQ para o diagnóstico, por tipo de processamento de amostra e por tipo de coloração e preservação da lâmina (n (%))

|   | Contributo para o diagnóstico |                |          |            |
|---|-------------------------------|----------------|----------|------------|
|   | Discordante                   | Não contribuiu | Ajudou   | Contribuiu |
| <b>Tipo de processamento da amostra</b>             |                               |                |          |            |
| Citocentrifugação                                   | 7 (2,9)                       | 12 (4,9)       | 14 (5,8) | 210 (86,4) |
| <i>ThinPrep</i>                                     | 0 (0,0)                       | 0(0,0)         | 3 (21,4) | 11 (78,6)  |
| <b>Tipo de Coloração e/ou preservação da lâmina</b> |                               |                |          |            |
| PAP   | 5 (3,2)                       | 8 (5,2)        | 8 (5,2)  | 134 (86,5) |
| MGG   | 2 (3,6)                       | 1 (1,8)        | 3 (5,4)  | 50 (89,3)  |
| PEG   | 0 (0,0)                       | 3 (6,5)        | 6 (13,0) | 37 (80,4)  |

A análise estatística pelo Teste Exato de Fisher-Freeman-Halton não revelou associação significativa entre o tipo de processamento e o contributo diagnóstico ( $p = 0,179$ ), sugerindo que o método de processamento não influenciou de forma significativa o contributo da ICQ para o diagnóstico. Apesar de não atingir significância estatística, destaca-se a maior proporção de casos na categoria “ajudou no diagnóstico”, entre as amostras processadas por *ThinPrep* (21,4% v. 5,8%), sem qualquer ocorrência de resultados discordantes ou sem contributo, o que pode também indicar potencial benéfico em relação a este tipo de processamento.

No que diz respeito à coloração/preservação da lâmina, o Teste também não evidenciou associação estatisticamente significativa com o contributo diagnóstico da ICQ ( $p=0,375$ ), indicando que as variações entre os grupos não foram suficientemente robustas para atingir significância estatística. Contudo, a preservação em PEG, apesar de menos utilizada, apresentou uma proporção relativamente elevada de casos classificados como “ajudou no diagnóstico” (13,0%), e não originou qualquer resultado discordante. Apesar disso, deve ter-se em conta que este mesmo tipo de preservação inclui também um caso classificado como FP, o que limita a interpretação do seu benefício clínico.



#### 4.4.2. Associação entre classificações diagnósticas e resultados ICQ com o seu contributo para diagnóstico

Com o intuito de compreender em que contextos os marcadores de ICQ se revelaram mais ou menos úteis para o diagnóstico, foi analisada também a associação entre o contributo atribuído à ICQ e a classificação diagnóstica bem como com o resultado da imunomarcação.

Na Tabela 14, encontra-se descrita a distribuição cruzada entre estas variáveis.

**Tabela 14** – Distribuição do contributo de ICQ para o diagnóstico final, por classificação diagnóstica e resultado ICQ (n, %)

|                                  | Contributo para o diagnóstico |                |          |            |
|----------------------------------|-------------------------------|----------------|----------|------------|
|                                  | Discordante                   | Não contribuiu | Ajudou   | Contribuiu |
| <b>Classificação diagnóstica</b> |                               |                |          |            |
| Negativa                         | 0 (0,0)                       | 4 (2,0)        | 8 (4,1)  | 185 (93,9) |
| Positiva                         | 6 (11,8)                      | 7 (13,7)       | 8 (15,7) | 30 (58,8)  |
| Suspeita                         | 1 (11,1)                      | 1 (11,1)       | 1 (11,1) | 6 (66,7)   |
| <b>Resultado ICQ</b>             |                               |                |          |            |
| Negativo                         | 7 (3,3)                       | 9 (4,3)        | 12 (5,7) | 183 (86,7) |
| Positivo                         | 0 (0,0)                       | 3 (6,5)        | 5 (10,9) | 38 (82,6)  |

A maioria das amostras com diagnóstico citomorfológico negativo foi considerada como tendo beneficiado da ICQ (93,9%), não se verificando qualquer caso de discordância (0,0%). Por outro lado, nos casos com diagnóstico citomorfológico positivo, a taxa de contributo da ICQ foi inferior (58,8%), com maior proporção de casos classificados como “ajudou no diagnóstico” (15,7%), “não contribuiu” (13,7%) e “discordante” (11,8%). Esta tendência repete-se nos casos classificados citomorfologicamente como suspeitos, nos quais a técnica de ICQ também mostrou menor contributo direto (66,7%) e maior dispersão nas diferentes categorias.

Quanto ao resultado da imunomarcação, observou-se que a maioria dos casos com ICQ negativa foi considerada contributiva para o diagnóstico (86,7%), embora a proporção de casos discordantes ou sem contributo bastante reduzida (3,3% e 4,3%, respetivamente). Nos casos com ICQ positiva, observou-se uma ligeira redução na taxa de contributo direto (82,6%), e um ligeiro aumento de proporção nos casos classificados como “ajudou no



diagnóstico” (10,9%) ou “não contribuiu para o diagnóstico” (6,5%), mantendo-se inexistência de casos discordantes.

Por sua vez, o Teste Exato de Fisher-Freeman-Halton não revelou associação estatisticamente significativa entre o resultado da ICQ e o contributo diagnóstico ( $p = 0,303$ ), sugerindo que, neste estudo, o simples fato da imunomarcção ser positiva ou negativa não determinou por si só a percepção do seu contributo para o diagnóstico final.

#### 4.5. Avaliação da qualidade da ICQ em amostras de LCR

##### 4.5.1. Caracterização geral da qualidade da ICQ

A avaliação da qualidade técnica da ICQ é essencial para garantir a fiabilidade da interpretação diagnóstica, especialmente em amostras desafiantes como o LCR, frequentemente caracterizadas por apresentarem baixa celularidade.

Nesta etapa do estudo, as lâminas com imunomarcção positiva foram revistas por dois observadores independentes, não se tendo registado discrepâncias nas pontuações atribuídas aos critérios avaliados, o que demonstra um elevado grau de concordância interobservador.

Dos 257 testes de ICQ realizados, apenas 46 casos (17,9%) apresentaram imunomarcção positiva, sendo estes os casos incluídos na avaliação sistematizada segundo os cinco critérios previamente definidos (PM, II, ME, MI e C).

A Tabela 15 apresenta a distribuição dos marcadores utilizados nas lâminas com imunomarcção positiva ( $n = 46$ ).



**Tabela 15** – Distribuição dos marcadores imunocitoquímicos avaliados, quanto à qualidade da imunomarcação (n = 46)

| Marcador        | n  | %    |
|-----------------|----|------|
| Ck AE1/AE3      | 19 | 41,3 |
| TTF-1           | 6  | 13,0 |
| CD20            | 3  | 6,5  |
| Mieloperoxidase | 2  | 4,3  |
| CD45            | 2  | 4,3  |
| Actina          | 1  | 2,2  |
| Desmina         | 1  | 2,2  |
| Sinaptofisina   | 1  | 2,2  |
| Ck CAM.2        | 1  | 2,2  |
| CD56            | 1  | 2,2  |
| CD30            | 1  | 2,2  |
| CD99            | 1  | 2,2  |
| Ck7             | 1  | 2,2  |
| GATA3           | 1  | 2,2  |
| GFAP            | 1  | 2,2  |
| PAX-5           | 1  | 2,2  |
| PGM             | 1  | 2,2  |
| RE              | 1  | 2,2  |
| S100            | 1  | 2,2  |

Abreviaturas: Ck, citoqueratinas; TTF, fator de transcrição da tiroide; CD, *cluster of differentiation*; Mieloperoxidase, marcador de linhagem mielóide; Actina, marcador de músculo liso; Desmina, marcador de diferenciação muscular; Sinaptofisina, marcador e diferenciação neuroendócrina; GATA, fator de transcrição associado a tecidos mamários e uroteliais; GFAP, proteína ácida fibrilar glial; PAX-5, fator de transcrição de células B; PGM, marcador histiocitário; RE, recetor de estrogénios; S100, proteína de ligação ao cálcio, expressa em células gliais e melanócitos.

Devido ao facto de a distribuição dos marcadores ser extensa e apenas um deles apresentar um número significativo de aplicações, optou-se por analisar os marcadores em conjunto, em vez de se efetuar uma avaliação individualizada.

A predominância do marcador Ck AE1/AE3 (41,3%) entre as imunomarcações positivas reflete o seu papel central na investigação de carcinomas epiteliais em LCR, sendo também aquele que apresentou melhor desempenho geral, nas análises anteriores. A diversidade dos restantes marcadores utilizados reflete a amplitude das suspeitas diagnósticas abordadas através da ICQ. Por exemplo, o marcador TTF-1 reflete a sua utilidade na identificação de neoplasias pulmonares e a presença de marcadores como o CD20, CD30, CD45, PAX-5 ou CD99 evidencia a tentativa de caracterização de neoplasias hematolinfóides, frequentemente desafiantes em contexto de amostragens de LCR.



Contudo, a reduzida frequência destes e outros marcadores limita a possibilidade de uma análise estatística robusta, sendo a análise quantitativa e a avaliação de qualidade mais informativas quando consideradas de forma agregada.

A distribuição da pontuação final da avaliação da qualidade técnica de ICQ, nos 46 casos com imunomarcção positiva, revelou uma média de  $22,83 \pm 3,49$  e mediana de 24 pontos (num mínimo de 0 e máximo de 27 pontos). Estes resultados confirmam, de uma forma geral, uma qualidade técnica elevada na execução da ICQ. A maioria das lâminas obteve pontuações finais entre os 23 e os 27 pontos, destacando-se frequências mais elevadas nas pontuações de 24 pontos (21,7%) e 25 pontos (23,9%). Apenas um caso (2,2%) obteve a pontuação mínima de 9 pontos, o que pode indicar falhas técnicas pontuais ou problemas de preservação morfológica e/ou antigénica.

Em termos globais, a PM apresentou uma média de  $2,59 \pm 0,58$ , tendo o valor máximo atingido 63,0% das amostras, o que evidencia uma preservação celular satisfatória na maioria dos casos. A II registou uma média de  $2,50 \pm 0,59$ , com 54,3% das amostras a atingirem o valor máximo de pontuação, refletindo boa expressão antigénica. A ME, indicador de sensibilidade técnica, obteve a média mais elevada entre todos os critérios,  $2,76 \pm 0,64$ , com 84,8% das amostras a receberem a pontuação máxima, o que demonstra excelente capacidade de deteção de células-alvo. Por sua vez, a MI, que avalia a especificidade da técnica, apresentou uma média inferior,  $2,43 \pm 0,58$ , ainda que a maioria das amostras (47,8%) tenha igualmente atingido pontuações elevadas, ou seja, marcação inespecífica ligeira ou ausência de marcação de estruturas não-alvo. Por fim, o C, que traduz a nitidez da coloração entre áreas positivas e negativas, revelou-se ligeiramente mais heterogéneo, com uma média de  $2,35 \pm 0,71$ . Ainda assim, 47,8% das amostras atingiram o valor máximo, sendo que 13,0% ficaram na pontuação mínima (1 ponto), o que sugere variações na clareza visual das imunomarcções.

Estes dados reforçam a consistência geral da técnica, demonstrando que, na maioria dos critérios avaliados, a ICQ aplicada em amostras de LCR apresenta desempenhos médios superiores a 2 pontos (numa escala de 0 a 3), o que sustenta a sua adequação técnica no contexto estudado.



#### 4.5.2. Análise comparativa da qualidade da ICQ em função do tipo de coloração/preservação

A avaliação da qualidade da ICQ, em função do tipo de coloração ou preservação utilizada na preparação das lâminas (PAP, PEG ou MGG) teve como objetivo explorar se determinadas metodologias de preparação da amostra influenciam o desempenho técnico da imunomarcação, quantificado através da grelha de critérios anteriormente descrita (Tabela 5).

Entre as 46 amostras com imunomarcação positiva, observou-se que a maioria destas amostras foi previamente submetida à técnica de coloração de PAP, ( $n = 28$ ; 60,9%), seguidas das lâminas preservadas em PEG ( $n = 14$ ; 30,4%) e lâminas coradas com MGG ( $n = 4$ ; 8,7%). Posto isto, compararam-se as pontuações finais atribuídas à qualidade técnica da ICQ apenas nestas amostras, e entre os métodos de coloração/preservação. A Tabela 16 resume os valores médios e os desvio-padrão (DP) associados, da pontuação final da qualidade da ICQ, por método.

*Tabela 16 - Pontuação final média da qualidade da ICQ em função do tipo de coloração/preservação utilizada ( $n = 46$ )*

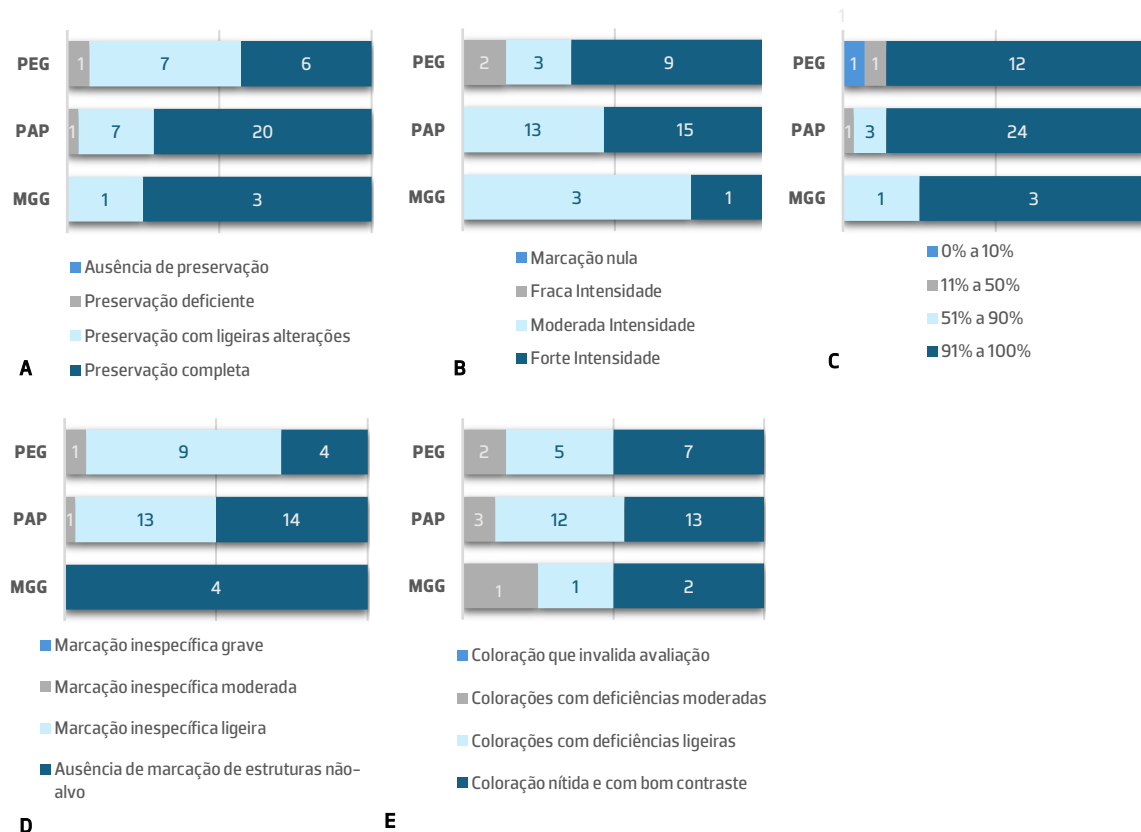
| Coloração/Preservação das lâminas | n (%)      | Pontuação Final (Média $\pm$ DP) |
|-----------------------------------|------------|----------------------------------|
| PAP                               | 28 (60,9%) | 23,21 $\pm$ 2,96                 |
| PEG                               | 14 (30,4%) | 21,93 $\pm$ 4,55                 |
| MGG                               | 4 (8,7%)   | 23,25 $\pm$ 2,99                 |

Apesar de pequenas variações entre os métodos, todas as colorações demonstraram uma pontuação média elevada, indicando desempenho técnico globalmente satisfatório. A coloração de PAP apresentou resultados mais consistentes (23,21  $\pm$  2,96), muito semelhantes aos obtidos pela coloração com MGG (23,25  $\pm$  2,99), embora o reduzido número de amostras coradas com MGG ( $n = 4$ ) limite a generalização dos resultados obtidos para este método. Por sua vez, preservação em PEG registou uma média ligeiramente inferior (21,93  $\pm$  4,55), sugerindo maior variabilidade entre os casos. Estes dados sugerem que, embora haja bons resultados e todas as abordagens sejam tecnicamente adequadas para realização de ICQ em amostras de LCR, a preservação em PEG poderá beneficiar de maior padronização para garantir maior consistência nos resultados.

Com o objetivo de avaliar se existem diferenças estatisticamente significativas entre os diferentes métodos quanto ao desempenho técnico da ICQ, foi aplicado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, considerando a pontuação final entre os diferentes métodos de coloração/preservação, bem como cada um dos cinco critérios de avaliação, individualmente.

A análise revelou que não houve diferenças significativas na pontuação final global entre os três métodos ( $H = 0,680$ ;  $p = 0,712$ ), nem nos critérios PM ( $H = 3,452$ ;  $p = 0,178$ ), II ( $H = 1,187$ ;  $p = 0,552$ ), ME ( $H = 0,244$ ;  $p = 0,885$ ) ou C ( $H = 0,034$ ;  $p = 0,983$ ). Contudo, para o critério MI, foi identificada uma diferença estatisticamente significativa ( $H = 6,234$ ;  $p = 0,044$ ). Verificou-se que a coloração com MGG obteve pontuação máxima neste critério, refletindo ausência de marcação inespecífica e maior especificidade.

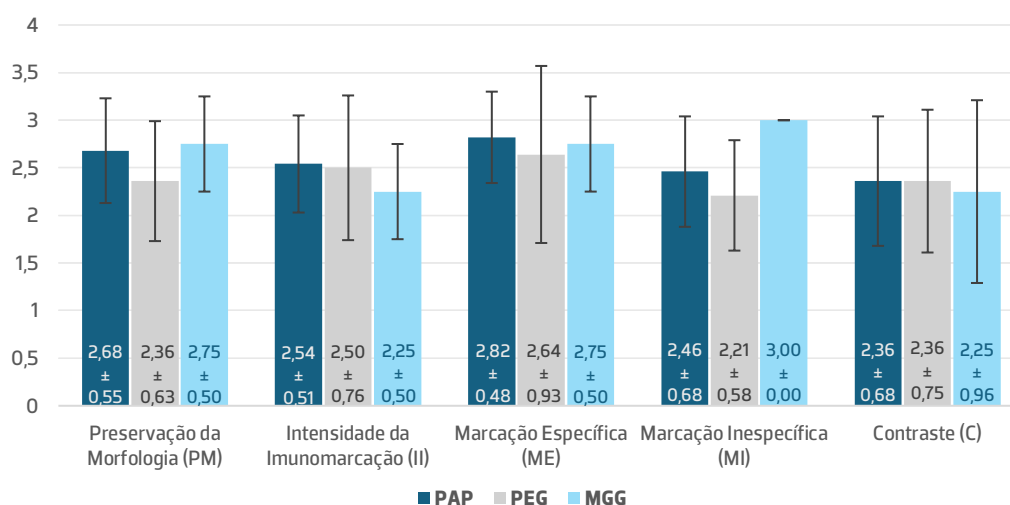
A Figura 9 apresenta a distribuição qualitativa das categorias atribuídas a cada um dos cinco critérios avaliados, permitindo comparar visualmente a frequência das diferentes classificações entre os métodos de coloração/preservação.



**Figura 9 – Representação gráfica da distribuição do número de casos com imunomarcação positiva ( $n = 46$ ), de acordo com os cinco critérios de qualidade técnica avaliados, segundo método de coloração/preservação (PAP, MGG, PEG) (A) – Preservação da morfologia; (B) – Intensidade da imunomarcação; (C) – Marcação específica; (D) – Marcação inespecífica; (E) – Contraste.**



Já a Figura 10 apresenta as médias e desvios-padrão de cada critério de qualidade para os três métodos, permitindo uma leitura visual imediata das variações entre eles.



**Figura 10** – Comparação das médias ( $\pm$  desvio padrão) dos critérios da qualidade técnica avaliados (PM, II, ME, MI e C), segundo o método de coloração/preservação da amostra (PAP, PEG e MGG)

Estes gráficos permitem uma leitura imediata e objetiva das variações no desempenho técnico, permitindo identificar padrões ou discrepâncias específicas entre os métodos. Destaca-se, por exemplo, média mais elevada da MI em amostras coradas com MGG, que, segundo a grelha de avaliação utilizada, se traduz em ausência de marcação de estruturas não-alvo, ou seja, maior especificidade. Em contrapartida, os métodos PAP e PEG demonstraram maior consistência global, com médias superiores das pontuações nos critérios de PM e ME, independentemente do método.

Esta análise gráfica permite também reforçar observações anteriormente descritas, mostrando que, embora não tenham sido identificadas diferenças estatisticamente significativas na maioria dos critérios, existem variações nos desempenhos individuais, que podem ter implicações práticas, em contexto laboratorial.

Em conjunto, estes resultados indicam que a II e PM são os principais fatores determinantes e os quais têm maior peso na perceção da qualidade da técnica de ICQ em amostras de LCR.



## 5. Discussão

A principal força deste estudo reside no tamanho da amostra, composta por 257 testes de ICQ realizados em amostras de LCR, número substancialmente superior ao observado na maioria dos estudos publicados até hoje, frequentemente limitados a séries de pequena escala ou estudos de caso. Esta dimensão confere maior poder analítico e reforça a validade dos resultados obtidos. A população estudada revelou uma ampla dispersão etária, com idades compreendidas entre os 4 meses e os 85 anos, refletindo a diversidade de indicações clínicas para estudo do LCR. A distribuição anual revelou uma tendência relativamente estável ao longo do tempo, com uma ligeira redução em 2023, sem explicação clínica ou técnica evidente.

Do ponto de vista do desempenho diagnóstico, a técnica de ICQ demonstrou uma sensibilidade de 86,8% e especificidade de 99,5%. Estes valores traduzem-se em elevados índices de fiabilidade, com VPP de 97,9% e VPN de 96,7%, uma taxa de discordância global reduzida (3,1%) e excelente capacidade para excluir FP. Estes resultados estão alinhados com os valores de referência sugeridos pelo CAP, que recomenda, para validação clínica de ensaios ICQ, valores de concordância global do teste  $\geq 90,0\%$  (55). Embora a sensibilidade no presente estudo se encontre ligeiramente abaixo deste valor, a especificidade superior a 99,0% e a elevada concordância global do teste (96,9%) sustentam a fiabilidade da técnica em contexto diagnóstico. Comparando com a literatura, estes resultados demonstram desempenho robusto e claramente superior ao da citologia isolada do LCR, cuja sensibilidade raramente ultrapassa os 70,0%, apesar de manter especificidades elevadas (9,29,43,66,67). Estes dados confirmam a utilidade da ICQ como indispensável no estudo do LCR, especialmente em situações de baixa celularidade, onde a citologia convencional por si só pode ser insuficiente para confirmação de malignidade.

A relevância da ICQ em contexto diagnóstico é também destacada nas *guidelines* conjuntas da EANO e da ESMO, que recomendam ser usada como técnica complementar em todos os casos de suspeita clínica de metástase leptomeníngea, particularmente quando os achados citológicos são inconclusivos (67). Nestes contextos, a aplicação de painéis de marcadores específicos pode aumentar substancialmente a deteção de células tumorais em amostras de LCR, especialmente quando as alterações morfológicas são mais discretas (67). Os resultados do presente estudo comprovam esta recomendação, ao



demonstrar que a ICQ foi determinante para confirmar ou esclarecer casos suspeitos e reduzir possíveis casos diagnosticados incorretamente como negativos.

A análise do desempenho da ICQ de acordo com as variáveis técnicas, nomeadamente em função do tipo de processamento da amostra (por citocentrifugação vs *ThinPrep*) e o método de coloração ou preservação prévia da amostra (PAP, PEG e MGG), revelou diferenças relevantes no que diz respeito à sensibilidade, especificidade e concordância global da técnica. Apesar do total de amostras processadas por *ThinPrep* representar apenas 5,4% dos casos (n = 14), este método atingiu sensibilidade e especificidade de 100,0%, sem qualquer caso de FP ou FN; contudo, a quantidade reduzida de casos obriga a que estes valores sejam interpretados com cautela. Estudos recentes, como o de Otto et al. destacam que, embora possam ocorrer perdas antigénicas na ausência de preservações adequadas, o método por *ThinPrep* pode favorecer uniformização morfológica, aparentando ser uma alternativa válida à técnica convencional por esfregaço, sobretudo quando combinada com técnicas moleculares ou ICQ (25). Já o processamento por citocentrifugação, amplamente utilizado no estudo (n = 243), confirmou-se como método de eleição, com sensibilidade de 84,8%, especificidade de 99,5% e concordância global de 96,7%. A sua capacidade de concentrar o material celular em área bem delimitada facilita a avaliação morfológica, mas sobretudo a aplicação de técnicas adicionais subsequentes, como é o caso da ICQ (68). Assim, os dados sustentam a hipótese de que o método de preparação pode ter impacto no desempenho técnico da imunomarcagem em LCR.

No que diz respeito ao método de coloração/preservação da amostra anteriores à realização da técnica de ICQ, a análise comparativa evidenciou que a preservação em PEG, sem qualquer tipo de coloração prévia, atingiu sensibilidade de 100,0%, com uma ligeira redução da especificidade (97,0%), devido a um único caso de FP. Este dado sugere que, embora a ausência de coloração possa preservar melhor os epítomos antigénicos, pode também comprometer a interpretação morfológica. Neste contexto, as colorações convencionais (PAP e MGG) oferecem uma vantagem adicional ao permitir a avaliação citomorfológica anterior à técnica de ICQ, aumentando também a segurança diagnóstica, sobretudo em amostras de baixa celularidade. Assim, a coloração por PAP, utilizada na maioria dos casos, revelou melhor equilíbrio entre a qualidade morfológica e o desempenho



técnico, com sensibilidade de 85,3%, especificidade de 100,0% e concordância global de 96,8%, confirmando a sua fiabilidade como método pré-analítico. Por sua vez, a coloração com MGG apresentou sensibilidade mais baixa (66,7%), apesar de manter especificidade máxima, sugerindo que pode interferir na deteção de epítomos sensíveis à fixação e/ou ao pH (25). Estes dados estão em consonância com a revisão publicada por Tran & Villa, que destaca a importância dos fatores pré-analíticos (fixação, coloração e tempo de processamento) como determinantes na qualidade e reprodutibilidade da imunomarcação em amostras de citologia (26). A variabilidade observada entre os diferentes métodos reforça a pertinência do estudo em quantificar diretamente o impacto dos fatores pré-analíticos na ICQ do LCR, destacando a necessidade constante de validações internas e adoção de protocolos padronizados, tal como recomendado pelas diretrizes internacionais (67,68). Neste ponto do estudo, não se encontrou evidência de que o tipo de coloração/preservação influencia significativamente o desempenho diagnóstico da ICQ em amostras de LCR. Note-se que, apesar de um Teste Exato de Fisher com significância estatística prévio, as comparações par-a-par (PAP vs PEG; PAP vs MGG; PEG vs MGG) não foram significativas após reagrupamento em “resultados corretos vs incorretos”, refletindo evidência de que não há diferenças significativas entre os pares.

Neste estudo, foram revistos 33 marcadores distintos, os quais foram agrupados em categorias tumorais e a análise de distribuição dos resultados revelou que a taxa de imunomarcações positivas variou significativamente consoante o grupo utilizado, o que indica também que o desempenho da ICQ não depende apenas da presença de células tumorais, mas sim da escolha do painel de marcadores, com base na morfologia e no contexto clínico. O estudo centrou-se sobretudo no marcador de Ck AE1/AE3, utilizado em 123 das 257 amostras (47,9%). É um marcador que combina dois clones dirigidos contra múltiplos epítomos de Ck epiteliais, amplamente utilizado na identificação de carcinomas, incluindo os de potencial metastático para o SNC. Os dados obtidos revelaram um ótimo desempenho da imunomarcação com este marcador em específico, com 86,36% de sensibilidade, 100,0% de especificidade, valor que confirma a elevada fiabilidade da técnica na exclusão de FP e uma concordância global de 97,56%. Estes resultados estão de acordo com o estudo de Chavali et al., que reportam valores de VPP de 100,0% para AE1/AE3 em citologia de LCR (46). A presença de 3 casos FN pode ser atribuída a variáveis pré-



analíticas, como a degradação antigénica ou fraca expressão tumoral, o que vai também reforçar a importância da escolha do método de preservação e fixação, anteriormente discutido (25,68).

A associação estatística entre o resultado da ICQ com AE1/AE3 e o diagnóstico citomorfológico foi altamente significativa, reforçando o papel deste tipo de marcador para o diagnóstico de malignidade em LCR. Este mesmo desempenho corrobora a literatura, na qual este marcador é considerado o principal de rastreio epitelial, particularmente útil em líquidos biológicos, salientando a sua expressividade em tumores metastáticos e a sua aplicabilidade mesmo em amostras com pouca celularidade (25,26).

Para além do seu excelente desempenho global, a análise estratificada do marcador Ck AE1/AE3 por variáveis técnicas associadas à preparação da amostra (tipo de processamento e método de coloração ou preservação), permitiu avaliar a importância deste marcador em diferentes condições técnicas. No processamento por citocentrifugação, observou-se uma sensibilidade de 85,7%, especificidade de 100,0% e concordância global de 97,5%. O processamento por *ThinPrep* apresentou valores de sensibilidade, especificidade e concordância global de 100,0%, sem qualquer caso de FP ou FN. Estes resultados indicam que este marcador mantém um desempenho estável e fiável, independentemente do tipo de processamento utilizado. Ainda assim, a ausência de significância estatística no Teste Exato de Fisher sugere que a diferença observada entre métodos poderá ser atribuída à reduzida amostragem de casos processados por *ThinPrep* (n = 4), e não a uma verdadeira variação de desempenho. No que diz respeito ao tipo de coloração/preservação, o marcador de Ck AE1/AE3 mostrou especificidade de 100,0% em todos os métodos, sem qualquer caso de FP, reforçando a sua elevada fiabilidade analítica; contudo os valores de sensibilidade alteraram entre eles (MGG e PEG: 100,0% e PAP: 80,0%). No caso da coloração por MGG, a sensibilidade máxima baseou-se provavelmente no reduzido número de casos (n = 14). Embora não tenham sido encontradas diferenças estatisticamente significantes entre o tipo de coloração/preservação e o desempenho do marcador Ck AE1/AE3, especialmente neste tipo de amostras com baixa celularidade, verificaram-se variações relevantes nos valores de sensibilidade entre os diferentes métodos. Estes achados reforçam a influência dos fatores pré-analíticos na imunomarcação e o seu impacto no desempenho diagnóstico (69,70). Nas comparações



*post hoc* par-a-par também não se verificaram diferenças. Em conjunto, os dados indicam que o marcador Ck AE1/AE3 apresenta desempenho robusto em diferentes condições técnicas, embora a padronização pré-analítica permaneça crítica (25,26,69,70).

De forma integrada, os resultados obtidos demonstram que a técnica de ICQ em amostras de LCR apresenta um desempenho global robusto, independentemente do método de preparação da amostra, ou do tipo de marcador avaliado, convergindo para a conclusão de que a ICQ é uma ferramenta diagnóstica altamente fiável em LCR, com desempenho estável em diferentes condições laboratoriais, embora a padronização dos procedimentos e a validação contínua permaneçam essenciais para assegurar reprodutibilidade e qualidade analítica.

Mais importante ainda, esta robustez técnica traduziu-se em elevado valor clínico, uma vez que a ICQ contribuiu diretamente para o diagnóstico em 86,0% das amostras (n = 221), sendo útil (“ajudou no diagnóstico”) em 6,6% e não contribuindo em 4,7%. Em 2,7% dos casos, verificou-se discordância com o diagnóstico final. Valores como estes confirmam a elevada utilidade clínica da técnica, principalmente em situações onde a citologia isolada pode ser inconclusiva.

Embora o processamento por *ThinPrep* e a preservação em PEG tenham mostrado proporções relativamente mais elevadas de casos na categoria “ajudou no diagnóstico”, não se verificaram associações estatisticamente significativas entre estas e o contributo diagnóstico, refletindo, em ambas as variáveis, a limitação do número de casos.

Importa sublinhar também que, o contributo diagnóstico da ICQ não depende exclusivamente da imunomarcação ser positiva ou negativa. Tanto imunomarcações positivas como negativas podem ter utilidade diagnóstica, de acordo com o contexto clínico. A imunomarcação pode confirmar malignidade ou apenas ajudar a direcionar o diagnóstico. Assim, o valor da ICQ não depende apenas da positividade ou negatividade isolada, mas está intrinsecamente ligado ao tipo/painel de marcadores aplicados, ao contexto clínico do pedido e à suspeita citomorfológica prévia. No presente estudo, esta interpretação contextualizada foi assegurada pela avaliação integrada de cada caso, considerando não apenas o resultado da imunomarcação, mas também, sempre que possível, a evolução diagnóstica subsequente (*follow-up*). As *guidelines* da EANO e ESMO recomendam a sua



utilização na suspeita de metástase leptomeníngea, por permitir clarificar e sustentar o diagnóstico (67).

Tal dado, reforça a importância de integrar os achados imunocitoquímicos no contexto morfológico e clínico global, reforçando a necessidade de uma abordagem multidisciplinar no diagnóstico citológico de amostras de LCR.

No que diz respeito à avaliação da qualidade técnica da ICQ em amostras de LCR, a mesma assume um papel central, dado que este tipo de amostras apresenta frequentemente baixa celularidade e fragilidade antigénica, tornando-as particularmente desafiantes. No presente estudo, esta avaliação foi realizada em apenas 46 amostras com imunomarcagem positiva, por ser a condição necessária para aferir os critérios técnicos da PM, II, ME, MI e C. Importa salientar que os fatores de ponderação atribuídos a cada critério na grelha de avaliação adotada do modelo de Ferro, foram definidos com base em fundamentos teóricos e experiência técnica e não com base em análises estatísticas empíricas, como a deste trabalho. Neste modelo, a II recebe o maior fator de ponderação ( $\times 3$ ), a ME e MI fatores intermédios ( $\times 2$ ) e a PM e o C assumem ponderações inferiores ( $\times 1$ ), refletindo a importância atribuída e privilegiando a qualidade na pontuação final (58).

A pontuação final obtida revelou uma média elevada com baixa variabilidade ( $22,83 \pm 3,49$  pontos, em 27 possíveis), e com a maioria das lâminas com pontuações entre os 23 e os 27 pontos, evidenciando a consistência global da técnica. A avaliação individual dos critérios também confirmou o bom desempenho técnico. A ME apresentou uma média mais elevada ( $2,76 \pm 0,64$ ), confirmando a capacidade da ICQ em evidenciar a presença de antígenos-alvo de forma fiável. A PM ( $2,59 \pm 0,58$ ) e a II ( $2,50 \pm 0,59$ ) mantiveram valores elevados, confirmando boa conservação estrutural e coloração eficaz. No entanto, critérios como a MI ( $2,43 \pm 0,58$ ) e o C ( $2,35 \pm 0,71$ ), embora com médias satisfatórias, revelaram maior dispersão nos dados, sugerindo que estas variáveis ainda possuem grande margem para melhoria, nomeadamente no controlo da coloração de fundo e no contraste da imunoreatividade.

Comparando os métodos de coloração/preservação, não se observaram diferenças estatisticamente significativas na pontuação final global. Do mesmo modo, por critério individual, também não houve diferenças na pontuação final da avaliação da qualidade da ICQ, exceto no critério correspondente à MI, no qual se verificou uma diferença



estatisticamente significativa, com a coloração com MGG a apresentar menor MI, seguida da coloração com PAP e por fim da preservação em PEG. Estes resultados indicam que, apesar de todos os métodos se mostrarem adequados para a técnica de ICQ em amostras de LCR, a coloração com MGG tem vantagem específica, no controlo do fundo, reforçando o impacto dos fatores pré-analíticos e da otimização dos sistemas de deteção imunocitoquímicos, na qualidade da imunomarcação (36,52,69,71).

Em síntese, a qualidade técnica da ICQ foi elevada e consistente, com variações subtis entre os diferentes métodos, sobretudo ao nível da MI. Os dados validam a viabilidade dos três métodos de coloração/preservação da lâmina, apenas com pequenos ajustes práticos para consolidar a reprodutibilidade nas amostras de LCR.

Por fim, importa referir que no presente trabalho não foram identificadas discrepâncias entre os observadores, o que confirma a elevada concordância interobservador e a aplicabilidade prática da grelha utilizada. A concordância entre avaliadores é um dos indicadores mais relevantes na validação de sistemas com pontuações quantitativas, sendo essencial para garantir a reprodutibilidade diagnóstica em contextos com elevada variabilidade morfológica, como o do LCR.

Em síntese, este estudo cumpriu integralmente os objetivos propostos. Relativamente ao desempenho diagnóstico da ICQ em amostras de LCR, foi demonstrada uma elevada especificidade e boa sensibilidade, confirmando a importância da técnica na confirmação ou exclusão de malignidade. Quanto à qualidade técnica da imunomarcação, verificou-se que todos os métodos de coloração/preservação se mostraram adequados, embora o PAP tenha oferecido melhor equilíbrio entre a preservação antigénica e a avaliação morfológica, e o MGG se tenha destacado pelo menor nível de MI. No que diz respeito ao contributo diagnóstico, a ICQ revelou elevada utilidade, não se encontrando variações estatisticamente significativas entre os diferentes métodos de coloração/preservação, ainda que se tenham observado tendências mais favoráveis na coloração por ThinPrep e na preservação em PEG. Finalmente, no desempenho e função dos marcadores, a Ck AE1/AE3 destacou-se pela sua fiabilidade, confirmando o seu papel central na identificação de neoplasias epiteliais, em linha com a literatura. Estes resultados validam a ICQ como técnica complementar essencial à citologia convencional, reforçando a



sua aplicabilidade na prática clínica diária e a pertinência da sua utilização sistemática em amostras de LCR.

Apesar da robustez metodológica e do número de amostras incluídas no estudo (n=257), o mesmo apresenta algumas limitações inerentes à natureza retrospectiva da análise. A escassa celularidade em várias amostras de LCR constitui um desafio frequente, por vezes dificultando a interpretação morfológica e exigindo repetições da técnica. A ausência de confirmação histológica em todos os casos positivos ou suspeitos pode ter impacto na classificação final de alguns resultados, embora se tenha recorrido ao *follow-up* clínico sempre que possível. Além disso, o reduzido número de casos em determinados subgrupos técnicos, como é o caso do processamento por *ThinPrep* ou da preservação em PEG, acabou por limitar a estatística, a nível das comparações entre as variáveis.

Apesar destas limitações, os resultados obtidos são consistentes, fazendo com que o presente estudo abra caminhos para novas linhas de investigação: será importante aprofundar a avaliação dos fatores pré-analíticos, uma vez que estes se revelaram determinantes para a qualidade da imunomarcção; bem como desenvolver painéis de marcadores dirigidos e adaptados a contextos clínicos específicos, permitindo aumentar a sensibilidade diagnóstica. A integração da ICQ com outras metodologias, como a CF ou a análise molecular de DNA tumoral circulante no LCR poderá potenciar ainda mais a sua utilidade clínica, reduzir os números de FN e acelerar a tomada de decisão.



## 6. Conclusão

Os resultados do presente estudo assumem particular relevância por integrarem uma análise global da ICQ, com avaliação integrada do desempenho diagnóstico, contributo clínico e qualidade técnica. A principal inovação reside na quantificação do contributo da ICQ em categorias operacionais de apoio ao diagnóstico em LCR e da avaliação da qualidade da imunomarcação, pioneira neste contexto.

O estudo demonstrou que a ICQ não só complementa, como ultrapassa as limitações da avaliação morfológica. É uma técnica determinante em cenários clínicos ambíguos ou de escassa celularidade, reduzindo o número de FN e aumentando a sensibilidade diagnóstica, sobretudo em amostras paucicelulares. Para além disso, permitiu identificar variáveis técnicas críticas: a citocentrifugação destacou-se como o método de processamento mais eficaz; a preservação em PEG maximizou a sensibilidade; e a coloração com PAP ofereceu o melhor equilíbrio entre preservação morfológica e intensidade da imunomarcação.

Em conjunto, estes dados do estudo sublinham a importância de incluir sistematicamente a técnica de ICQ no estudo do LCR, sempre que haja suspeita de malignidade. Reforça ainda a adoção de protocolos padronizados de processamento e coloração, dando especial atenção aos fatores pré-analíticos, bem como a utilização de painéis de marcadores integrados no contexto clínico e morfológico, de modo a garantir maior sensibilidade, sem comprometer a especificidade.

Os resultados deste trabalho apoiam a incorporação da técnica de ICQ como prática de referência em patologia molecular aplicada a amostras de LCR, com impacto direto na fiabilidade diagnóstica e no suporte à decisão clínica multidisciplinar.



## 7. Referências Bibliográficas

1. [www.who.int/news/item/14-03-2024-over-1-in-3-people-affected-by-neurological-conditions--the-leading-cause-of-illness-and-disability-worldwide](http://www.who.int/news/item/14-03-2024-over-1-in-3-people-affected-by-neurological-conditions--the-leading-cause-of-illness-and-disability-worldwide). 2024. Consultado a 2024-10-29.
2. Steinmetz J, Seeher K, Schiess N, Nichols E, Cao B, Servili C, et al. Global, regional, and national burden of disorders affecting the nervous system, 1990–2021: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2021. *Lancet Neurol*. 2024;(23):344–81.
3. Samuel R, Singer G, Anghebem M, de Souza A, de Almeida S. Líquido Cefalorraquidiano – LCR. Em: *Tratado de Análises Clínicas*. 1ª Edição. 2018. p. 167–93.
4. Bienkowski M, Furtner J, Hainfellner J. Chapter 32 – Clinical neuropathology of brain tumors. Em: *Handbook of Clinical Neurology*. Elsevier; 2018. p. 477–534.
5. Brenner A, Patel A. Review of Current Principles of the Diagnosis and Management of Brain Metastases. *Front Oncol*. 2022;12.
6. Loscalzo, Fauci, Kasper, Hauser, Longo, Jameson. *Harrison's Principles of Internal Medicine*. 21.ª ed. McGrawHill;
7. Nguyen GK. *ESSENTIALS OF FLUID CYTOLOGY*. Em Alberta, Canada; 2009.
8. Stelzer K. Epidemiology and prognosis of brain metastases. *Surg Neurol Int*. 2013;4.
9. Singh L, Rastogi K, Jajoo M. Reliable Cerebrospinal Fluid Cytology and Immunocytochemistry Reporting over an Extended Period by the Addition of Aldehyde and Osmolyte-Based Preservative Solution. *Acta Cytol*. 2023;550–6.
10. Rosen S. *Leptomeningeal Metastases*. Springer; 2005. (Cancer Treatment and Research).
11. Nguyen A, Nguyen A, Dada O, Desai P, Ricci J, Godbole N, et al. Leptomeningeal Metastasis: A Review of the Pathophysiology, Diagnostic Methodology, and Therapeutic Landscape. *Curr Oncol*. 2023;30:5906–31.
12. Santos B, Roque R, Pereira T, Mendonça P, André S. Imunocitoquímica em citologia aspirativa do pulmão: comparação de quatro protocolos. *Saúde Tecnol*. 2022;(26):27–35.
13. Zhang L, Fang K, Ren H, Fan S, Wang J, Guan H. Comparison of the diagnostic significance of cerebrospinal fluid metagenomic nextgeneration sequencing copy number variation analysis and cytology in leptomeningeal malignancy. *BMC Neurol*. 2024;24:223.
14. Rehman A, Khan P, Maurya S, Siddiqui J, Santamaria-Barria J, Batra S, et al. Liquid



- biopsies to occult brain metastasis. *Mol Cancer*. 2022;21:113.
15. Khosla A, Saxena S, Ozair A, Venur V, Peereboom D, Ahluwalia M. Novel Therapeutic Approaches in Neoplastic Meningitis. *Cancers*. 2023;15(119).
  16. Weston CL, Glantz MJ, Connor JR. Detection of cancer cells in the cerebrospinal fluid: current methods and future directions. *Fluids Barriers CNS*. 2011;8:14.
  17. Koss L, Melamed M. *Koss' Diagnostic Cytology and Its Histopathologic Bases*. 5th edition. Vol. II. Lippincott Williams & Wilkins; 1023–1052 p.
  18. Torzewski M, LaCkner KJ, Bohl J, Sommer C. *Integrated Cytology of Cerebrospinal Fluid*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg; 2008.
  19. Skoog L, Tani E. Immunocytochemistry: an indispensable technique in routine cytology. *Cytopathology*. 2011;215–29.
  20. Magaki S, Hojat S, Wei B, So A, Yong W. An Introduction to the Performance of Immunohistochemistry. *Methods Mol Biol*. 2019;1897: 289–298.
  21. Louis D, Perry A, Wesseling, Brat D, Cree I, Figarella-Branger D, et al. The 2021 WHO Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Neuro-Oncol*. 2021;23:1231–51.
  22. Pellegrini L, Bonfio C, Chadwick J, Begum F, Skehel M, Lancaster M. Human CNS barrier-forming organoids with cerebrospinal fluid production. *Science*. 2021;
  23. Barcelos L, Filho H, Corrêa J, Lima L, Fleury M, Anghebem M, et al. *Tratado de Análises Clínicas*. 1ª Edição. Atheneu; 2018.
  24. Sakka L, Coll G, Chazal J. Anatomy and physiology of cerebrospinal fluid. *Eur Ann Otorhinolaryngol Head Neck Dis*. 2011;309–316.
  25. Otto F, Harrer C, Pilz G, Wipfler P, Harrer A. Role and Relevance of Cerebrospinal Fluid Cells in Diagnostics and Research: State-of-the-Art and Underutilized Opportunities. *Diagnostics*. 2022;12:79.
  26. Tran S, Villa C. Cytopathologie du liquide céphalorachidien (LCR) ou liquide cérébrospinal (LCS). *Rev Francoph Lab*. 2023;(554).
  27. Sofronescu A. Cerebrospinal Fluid Analysis. *Medscape*. 2023;
  28. Wick M, Gross CC, Isenmann S, Strik H. *Liquorzytologie Standards, Stellenwert und moderne Methoden*. Springer-Verl Berl Heidelb 2016. 2016;87:1276–1281.
  29. Ganjei-Azar P, Jordà M, Krishan A. *Effusion Cytology: A Practical Guide to Cancer*



Diagnosis. 1st Edition. Demos Medical Publishing; 2011.

30. Rahimi J, Woehrer A. Overview of cerebrospinal fluid cytology. Handbook of Clinical Neurology. Elsevier. 2018;563–71.
31. Fitzpatrick A, Iravani M, Mills A, Childs L, Alaguthurai T, Clifford A, et al. Assessing CSF ctDNA to Improve Diagnostic Accuracy and Therapeutic Monitoring in Breast Cancer Leptomeningeal Metastasis. Clin Cancer Res – Precis Med Imaging. 2022;1180–91.
32. Dušková J, Sobek O. Assisting the neurologist in diagnosis of CNS malignancies – Current Possibilities and Limits of Cerebrospinal Fluid Cytology and Immunocytochemistry. Wiley Brain Behav. 2017;7(10).
33. Diaz M, Chudsky S, Pentsova E, Miller A. Clinical applications of cerebrospinal fluid liquid biopsies in central nervous system tumors. Transl Oncol. 2024;41.
34. Lakshmi S. Cerebrospinal Fluid Analysis. Easy Guide Pract Biochem. 2018;
35. Yap C, Choon Aw T. Revisiting Cerebrospinal Fluid (CSF) Examination. Proc Singap Healthc. 2010;19(4):355–9.
36. Lozano M, Argueta A, Robledano R, García J, Ocon V, Gómez N, et al. Practical issues related to immunocytochemistry on cytological smears: Tips and recommendations. Cytopathology. 2024;35(6):761–9.
37. Darlix A, Cayrefourcq L, Poudroux S, Menjot de Champfleury N, Bievez A, Jacot W, et al. Detection of Circulating Tumor Cells in Cerebrospinal Fluid of Patients with Suspected Breast Cancer Leptomeningeal Metastases: A Prospective Study. Clin Chem. 2022;1311–22.
38. Kirbis IS, Flezar MS. Cell count-based triaging of cytology samples for cell block preparation. Cytopathology. 2016;28(3):216–20.
39. Torzewski M, Lackner K. Cerebrospinal fluid cytology: a highly diagnostic method for the detection of diseases of the central nervous system. J Lab Med. 2016;
40. Harms DZ. The diagnostic value of cytology of the CSF. Klin Padiatr. 1975;
41. Schumann G, Crisman L. Cerebrospinal fluid cytopathology. Clin Lab Med. 1985;
42. Shahan, B, Y. Choi E, Nieves G. Cerebrospinal Fluid Analysis. Am Fam Physician. 2021;103(7).
43. Glantz MJ, Cole BF, Glantz LK, Cobb J, Mills P, Lejos A, et al. Cerebrospinal Fluid Cytology in Patients with Cancer Minimizing False-Negative Results. Am Cancer Soc.



1998;82(4).

44. Dabbs DJ. Diagnostic Immunohistochemistry: theranostic and genomic applications. 5th Edition. Saunders. Elsevier; 2019.
45. Suvarna SK, Layton C, Bancroft JD. Bancroft's Theory and Practice of Histological Techniques. 7th Edition. Churchill Livingstone - Elsevier; 2013.
46. Chavali P, Prayaga A, Tandon A, Uppin S. Utility of immunochemistry in cytology. *J Cytol.* 2016;71–5.
47. Cates J, Troutman A. Quality Management of the Immunohistochemistry Laboratory: A Practical Guide. 2014;
48. Ramos-Vara JA, Miller MA. When Tissue Antigens and Antibodies Get Along: Revisiting the Technical Aspects of Immunohistochemistry—The Red, Brown, and Blue Technique. *Sage Journals.* 51.<sup>a</sup> ed. 2014;42–87.
49. OptiView DAB IHC Detection Kit. Ventana Medical Systems - Roche; 2024.
50. ultraView Universal DAB Detection Kit. Ventana Medical Systems - Roche; 2024.
51. Schmitt F, Bubendorf L, Canberk S, Chandra A, Creeh I, Engels M, et al. The World Health Organization Reporting System for Lung Cytopathology. *World Health Organ Report Syst Lung Cytopathol.* 2022;67(1):80–91.
52. Shi Y, Yee-Chang M, Shi SR. Application of Immunohistochemistry in Cytology. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2023;459–66.
53. Dupré MP, Courtade-Saidi M. Immunocytochemistry as an adjunct to diagnostic cytology. *Ann Pathol.* 2012;e47–51.
54. Kirbiš I, Roque R, Bongiovanni M, Fležar M, Cochand-Priollet B. Immunocytochemistry Practices in European Cytopathology Laboratories—Review of European Federation of Cytology Societies (EFCS) Online Survey Results With Best Practice Recommendations. *Cancer Cytopathol.* 2020;757–66.
55. Goldsmith J, Troxell M, Roy-Chowdhuri S, Colasacco C, Edgerton M, Fitzgibbons P, et al. Principles of Analytic Validation of Immunohistochemical Assays Guideline Update. *CAP Lab Improv Programs.* junho de 2024;148(6):111–53.
56. Torlakovic EE, Riddell R, Banerjee D, El-Zimaity H, Pilavdzic D, Dawe P, et al. Best Practice Recommendations for Standardization of Immunohistochemistry Tests. *Am Soc Clin Pathol.* 2010;133(3):354–65.



57. Colasacco C, Mount S, Leiman G. Documentation of immunocytochemistry controls in the cytopathologic literature: a meta-analysis of 100 journal articles. *Diagn Cytopathol.* 2011;39(4):245–50.
58. Ferro AB. *Imunohistoquímica.* 2014.
59. Torlakovic E, Cheung C, D'Arrigo C, Dietel M, Francis G, Gilks CB, et al. Evolution of Quality Assurance for Clinical Immunohistochemistry in the Era of Precision Medicine. Part 3: Technical Validation of Immunohistochemistry (IHC) Assays in Clinical IHC Laboratories. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2017;25:151–9.
60. Goldsmith J, Colasacco C, Kalicanin T, Lacchetti C, Thomas N. Principles of Analytic Validation of Immunohistochemical Assays: Guideline Update. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine;* 2023.
61. Gutmann EJ. The Pathologist Pipeline – A Brief Look at the “Other End”. *Arch Pathol Lab Med.* 2024;148:631–2.
62. CAP Laboratory Accreditation Program Standards for Accreditation. College of American Pathologists;
63. Satturwar S, Malenie R, Sutton A, Dai D, Aly FZ. Validation of immunohistochemical tests performed on cytology cell block material: Practical application of the College of American Pathologists' guidelines. *CytoJournal.* 2019;16(6).
64. I. S. Kirbis, P. Maxwell, M. S. Flezar, K. Miller and M. Ibrahim. External quality control for immunocytochemistry on cytology samples: a review of UK NEQAS ICC (cytology module) results. *Cytopathology.* 2011;(22):230–7.
65. Kirbiš I, Roque R, Fležar M. Integrated On-Slide Positive Controls for Immunocytochemistry on Cytology Slides. *Acta Cytol.* 2024;69(1):44–50.
66. Nakasu Y, Deguchi S, Nakasu S, Yamazaki M, Notsu A, Mitsuya K, et al. Diagnostic accuracy of cerebrospinal fluid liquid biopsy and MRI for leptomeningeal metastases in solid cancers: A systematic review and meta-analysis. 2023;5(1):1–9.
67. Rhun EL, Weller M, Bent M van den, Brandsma D, Furtner J, Rudà R, et al. Leptomeningeal metastasis from solid tumours: EANOeESMO Clinical Practice Guideline for diagnosis, treatment and follow-up. *ESMO.* 2023;8(5):1–16.
68. Fitzgibbons, JDG Patrick L, and Paul E. Swanson. Principles of Analytic Validation of Clinical Immunohistochemistry Assays. *Adv Anat Pathol.* 2015;22(6):22:384–387.



69. Agrawal L, Engel K, Greytak S, Moore H. Understanding Preanalytical Variables and their Effects on Clinical Biomarkers of Oncology and Immunotherapy. *Semin Cancer Biol.* 2018;52(2):26–38.
70. Roy-Chowdhuri S. Immunocytochemistry of cytology specimens for predictive biomarkers in lung cancer. *Transl Lung Cancer Res.* 2020;9(3):898–905.
71. Dremelj A, Miceska S, Kuhar A, Nolde N, Kloboves-Prevodnik V. Validation and Implementation of OptiView and EnVision FLEX Detection Systems for Immunocytochemical Staining Protocols of the Ten Most Commonly Used Diagnostic Markers in Routine Cytopathological Practice. *Diagnostics.* 2024;14.



## Anexos

### Anexo I – Marcadores testados, no total de amostragem (n, %)

| Marcadores   | n   | %    |
|--------------|-----|------|
| ACTINA       | 4   | 1,6  |
| AE1/AE3      | 123 | 47,9 |
| CAM5.2       | 1   | 0,4  |
| CD10         | 3   | 1,2  |
| CD117        | 2   | 0,8  |
| CD20         | 12  | 4,7  |
| CD30         | 2   | 0,8  |
| CD34         | 9   | 3,5  |
| CD45         | 3   | 1,2  |
| CD56         | 2   | 0,8  |
| CD99         | 1   | 0,4  |
| Ck20         | 1   | 0,4  |
| Ck7          | 1   | 0,4  |
| Cromogranina | 1   | 0,4  |
| DESMINA      | 3   | 1,2  |
| EMA          | 2   | 0,8  |
| GATA3        | 6   | 2,3  |

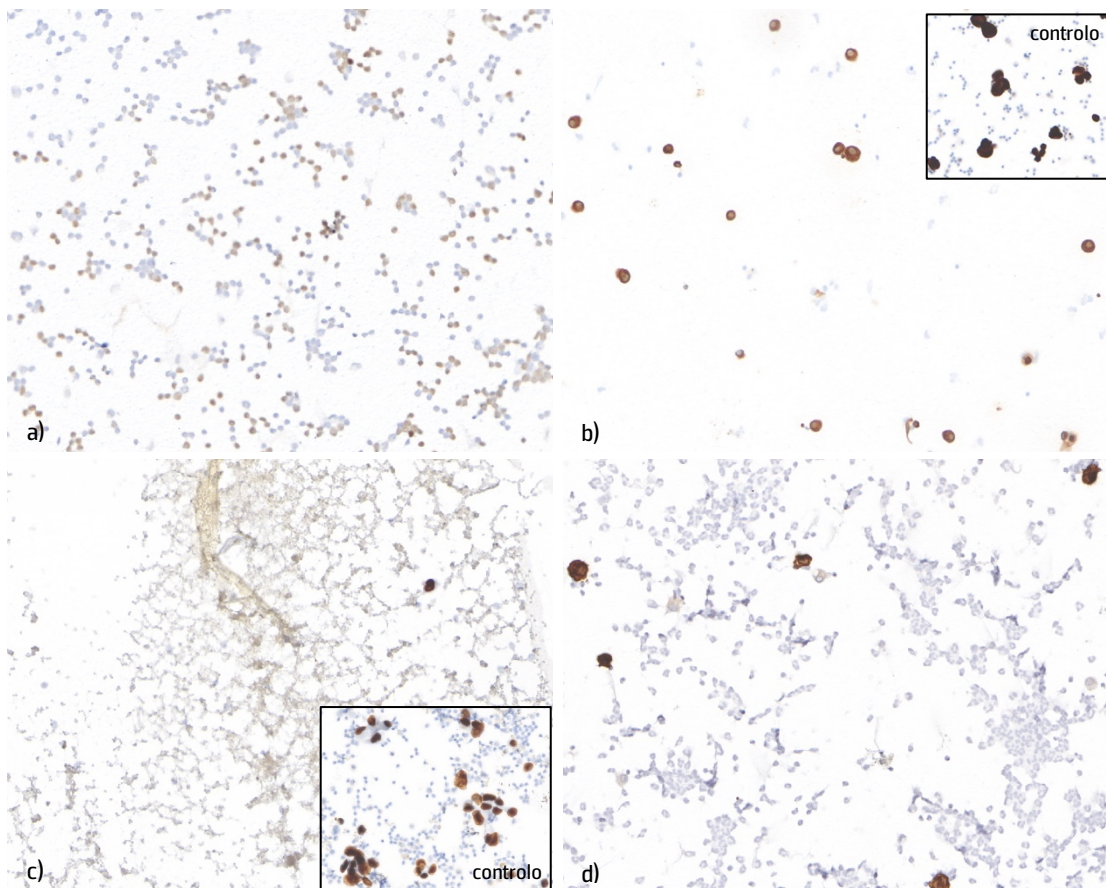
| Marcadores      | n          | %            |
|-----------------|------------|--------------|
| GFAP            | 16         | 6,2          |
| HMB45           | 1          | 0,4          |
| Mieloperoxidase | 2          | 0,8          |
| MNF116          | 3          | 1,2          |
| P40             | 1          | 0,4          |
| P53             | 1          | 0,4          |
| PAX5            | 3          | 1,2          |
| PGM1            | 4          | 1,6          |
| PSA             | 1          | 0,4          |
| RE              | 4          | 1,6          |
| RP              | 1          | 0,4          |
| S100            | 6          | 2,3          |
| Sinaptofisina   | 17         | 6,6          |
| SOX10           | 7          | 2,7          |
| TTF1            | 13         | 5,1          |
| WT1             | 1          | 0,4          |
| <b>Total</b>    | <b>257</b> | <b>100,0</b> |



## Anexo II – Características dos marcadores avaliados

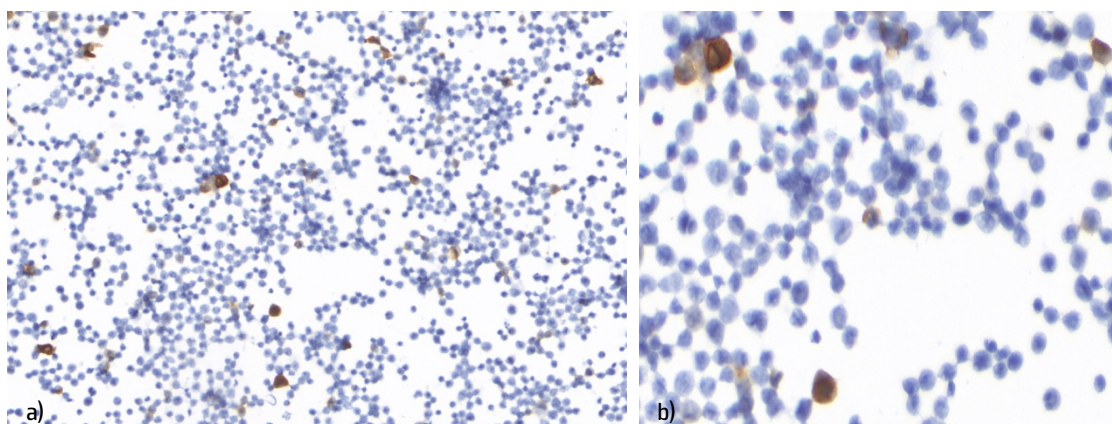
| Marcadores             | Grupo          | Tipo de marcação              |
|------------------------|----------------|-------------------------------|
| <b>Ck AE1/AE3</b>      | Citoqueratina  | citoplasmática                |
| <b>Ck CAM5.2</b>       | Citoqueratina  |                               |
| <b>Ck20</b>            | Citoqueratina  |                               |
| <b>Ck7</b>             | Citoqueratina  |                               |
| <b>EMA</b>             | Citoqueratina  | citoplasmática e membranas    |
| <b>MNF116</b>          | Citoqueratina  | citoplasmática                |
| <b>P40</b>             | Citoqueratina  | nuclear                       |
| <b>CD10</b>            | Linfocitário   | citoplasmática e membranas    |
| <b>CD20</b>            | Linfocitário   |                               |
| <b>CD30</b>            | Linfocitário   | membranas e/ou citoplasmática |
| <b>CD34</b>            | Linfocitário   | membranas                     |
| <b>CD45</b>            | Linfocitário   |                               |
| <b>CD56</b>            | Linfocitário   |                               |
| <b>CD99</b>            | Linfocitário   |                               |
| <b>Mieloperoxidase</b> | Linfocitário   | citoplasmática                |
| <b>PAX5</b>            | Linfocitário   | nuclear                       |
| <b>GATA3</b>           | Mamário        |                               |
| <b>RE</b>              | Mamário        |                               |
| <b>RP</b>              | Mamário        |                               |
| <b>HMB45</b>           | Melanoma       | citoplasmática                |
| <b>S100</b>            | Melanoma       | citoplasmática e nuclear      |
| <b>SOX10</b>           | Melanoma       | nuclear                       |
| <b>Cromogranina</b>    | Neuroendócrino | citoplasmática                |
| <b>Sinaptofisina</b>   | Neuroendócrino |                               |
| <b>Actina</b>          | Outros         |                               |
| <b>CD117</b>           | Outros         | citoplasmática e membranas    |
| <b>Desmina</b>         | Outros         | citoplasmática                |
| <b>P53</b>             | Outros         | nuclear                       |
| <b>PGM</b>             | Outros         | citoplasmática                |
| <b>PSA</b>             | Outros         |                               |
| <b>WT1</b>             | Outros         | nuclear                       |
| <b>TTF1</b>            | Pulmonar       |                               |
| <b>GFAP</b>            | SNC            | citoplasmática                |

### Anexo III – Exemplos de amostras observadas por microscopia ótica



**Figura 11** – Citologias de amostras de LCR, sujeitas a técnica ICQ, positivas para malignidade (imunomarcação com diferentes tipos de marcadores)

- a) imunomarcação positiva para marcador PAX-5; em lâmina previamente corada com PAP, comprova diagnóstico final de Linfoma. Ampliação 100x;
- b) imunomarcação positiva para marcador *Ck* AE1/AE3 com recurso a teste de controlo; em lâmina previamente corada com PAP, comprova diagnóstico de Carcinoma. Ampliação 100x.
- c) imunomarcação positiva para marcador TTF-1 com recurso a teste de controlo; em lâmina previamente preservada em PEG, comprova diagnóstico de Adenocarcinoma do Pulmão. Ampliação 100x;
- d) imunomarcação positiva para marcador CD30; em lâmina previamente corada com MGG, comprova diagnóstico de Linfoma Anaplásico de Células Grandes. Ampliação 100x.

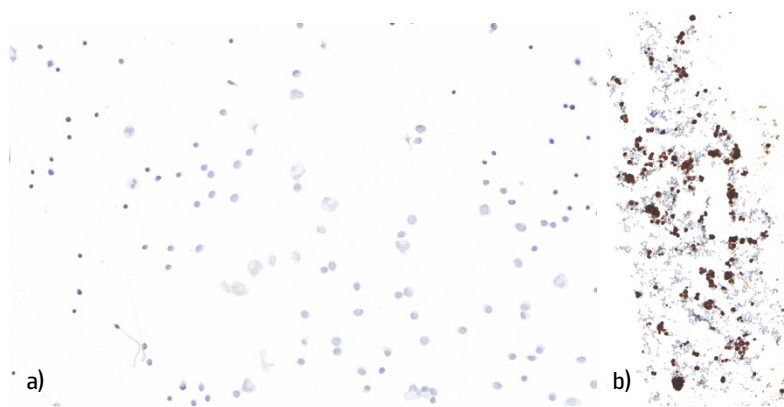


**Figura 12** – Representação microscópica de amostra de LCR, classificada citomorfologicamente como suspeita de malignidade

- a) imunomarcação suspeita para marcador Actina; em lâmina previamente corada com MGG. Ampliação 100x;
- b) imunomarcação suspeita para marcador Actina; em lâmina previamente corada com MGG. Ampliação 400x;



**Figura 13** - Representação microscópica de amostra de LCR, negativa para malignidade  
Coloração MGG. Ampliação 200x



**Figura 14** - Representação microscópica de amostra de LCR submetida a ICQ com o marcador Ck AE1/AE3, negativo para malignidade

- a) Coloração prévia com PAP. Ampliação 200x  
b) Teste de controlo. Ampliação 50x



#### Anexo IV – Protocolo da técnica citopatológica prévia ao estudo

Os protocolos utilizados seguiram os procedimentos internos em utilização no SAP do IPOLFG, otimizados e validados para diagnóstico citopatológico.

Para realização da técnica de ICQ, no que diz respeito a amostras previamente coradas por PAP (fixação em metanol absoluto, imediatamente após a colheita (10 minutos)):

- Remoção da lamela (filme) por imersão em acetona pura (5 minutos)
- Imersão em etanol a 100% (1 minuto)
- Imersão em xilol (10 minutos)
- Imersão em etanol a 100% (4 minutos)
- Hidratação
- As lâminas permanecem em PBS até início da fase analítica da técnica ICQ.

Por sua vez, para as amostras com coloração de MGG (secagem ao ar após colheita):

- Remoção da lamela por imersão em acetona pura (15 minutos)
- As lâminas permanecem em PBS até início da fase analítica da técnica ICQ.

Para preservação em PEG (fixação imediata em metanol absoluto a 4 °C (30 minutos)):

- Aplicação de duas ou três gotas de solução de PEG a 10% nas lâminas ainda húmidas, de forma a cobrir toda a área do esfregaço.
- Após a solidificação desta solução, as lâminas foram arquivadas à temperatura ambiente.

Antes da realização da técnica ICQ:

- Remoção do PEG, por imersão das lâminas em etanol a 96% (10 minutos)
- Hidratação
- As lâminas permanecem em PBS até início da fase analítica da técnica ICQ.

**P. PORTO**

ESCOLA  
SUPERIOR  
DE SAÚDE



**M** MESTRADO

TÉCNICAS LABORATORIAIS EM BIOPATOLOGIA – PATOLOGIA MOLECULAR