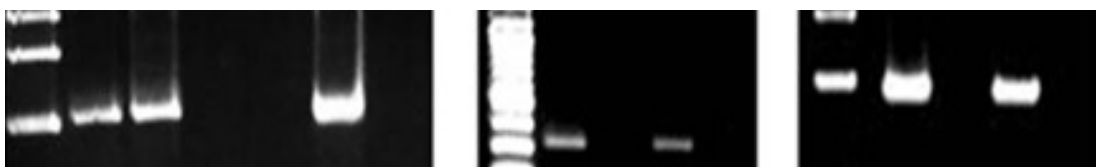
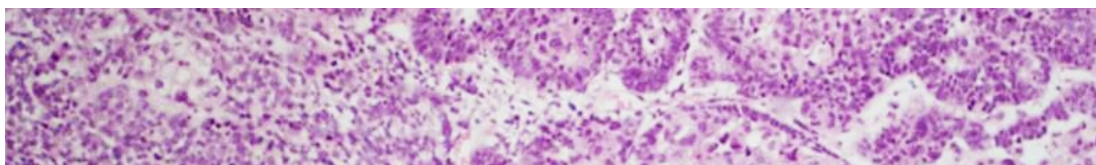
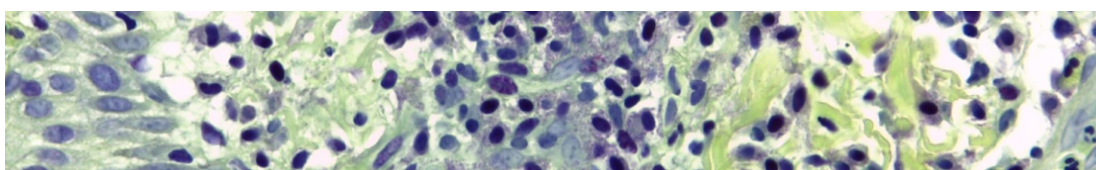


# mícron

Revista Técnica de Anatomia Patológica



Nº18 - Ano 17 - Outubro de 2014

A Área Técnico-Científica de Anatomia Patológica, Citológica e Tanatológica da Escola Superior de Tecnologia da Saúde do Porto do Instituto Politécnico do Porto (ESTSP.IPP) criou um novo projeto no âmbito do diagnóstico em Citologia - revista *Citotech Online - Case Review*, e vem, desta forma, apelar à participação de todos, assim como à divulgação do projeto, junto de potenciais interessados.

A *Citotech Online - Case Review* é uma publicação anual na área do diagnóstico citológico. A revista pretende divulgar a revisão de casos que estabeleçam uma relação entre a citopatologia e a clínica. A apresentação de casos desta índole, como são exemplo **os casos apresentados nas Reuniões de Citologia** da ESTSP.IPP fomenta, assim, o conhecimento e a eficiência na prática de *screening* e do diagnóstico citológico. Adicionalmente, esta revista pretende constituir um meio educativo e formativo.

Os critérios de aceitação de trabalhos para publicação são a pertinência, qualidade e originalidade de casos de citologia ginecológica e não ginecológica. A aceitação implica ideias e conceitos inovadores e/ou apresentação de informações relevantes com aplicação direta no diagnóstico citopatológico, com especial impacto nos casos cujo diagnóstico é, ainda, discutível.

A *Citotech Online - Case Review* é uma revista com revisão pelos pares (*peer-review*) de citotécnicos e médicos patologistas com vasta experiência no diagnóstico citológico.

A *Citotech Online - Case Review* encontra-se **oficialmente anotada pela ERC** (Entidade Reguladora para a Comunicação Social), e segue o princípio do livre acesso. A publicação nesta revista **não implica qualquer despesa** nem para os autores, nem para a instituição que submete o trabalho, sendo os mesmos publicados e disponibilizados na íntegra, de forma gratuita e permanente através do site <http://paginas.estsp.ipp.pt/citotechonline/>

A **data limite** para submissão de trabalhos no 1º número da Revista é **15 de Dezembro de 2014**, estando prevista a sua publicação em Março de 2015.

Informações acerca do processo e normas de submissão de trabalhos à *Citotech Online - Case Review* encontram-se disponíveis em: <http://paginas.estsp.ipp.pt/citotechonline/>.

## EDITORIAL

Caros leitores,

Regressamos com a edição nº18 da mícron - Revista Técnica de Anatomia Patológica.

Para a Equipa Editorial da mícron é um prazer publicar mais um número da nossa revista, que ao longo destes anos tem procurado difundir a atividade científica desenvolvida pelos estudantes e profissionais de Anatomia Patológica.

Pela primeira vez, a edição da revista será produzida apenas em formato digital, estando disponível gratuitamente para consulta no site da APTAP. Desta forma, a mícron passa a estar completamente acessível a todos aqueles que se interessam pela área de Anatomia Patológica, sendo mais fácil a partilha de conhecimentos entre todos.

Neste número da revista são publicados três artigos.

Dois deles são Artigos Originais de Investigação, um centrado na comparação de diferentes técnicas histoquímicas para evidenciação de mastócitos; e outro focado na pesquisa e análise filogenética do gene da integrase de fagos de *Helicobacter pylori*.

O terceiro artigo pretende apresentar um Caso Clínico, com o estudo de um caso de Carcinossarcoma através de citologia ginecológica.

Mais uma vez, esperamos que a mícron suscite o interesse de todos os leitores e contribua para o constante enriquecimento técnico-científico dos estudantes e profissionais desta área.

Ana Rita Silvestre

**FICHA TÉCNICA****Editora e Propriedade**

Associação Portuguesa de Técnicos de Anatomia Patológica - APTAP

Rua Rodrigues Sampaio, N°30 C, 5° Esq.  
1150-280 Lisboa  
<http://www.aptap.pt>

**Diretora**

Ana Rita Silvestre

**Equipa Editorial**

Ana Rita Silvestre  
Ana Margarida Santos  
Nélia Nunes

**Conselho Científico**

Dina Leitão  
Ana Luís Carrasqueira  
Cátia Teixeira  
Cláudia Pen Freitas  
Fernanda Malhão  
João Palma  
José Nogueira  
Magda Mendes

ISSN: 0874-1433

**Periodicidade**

Revista Anual

**Design e produção**

Carla Solange Pinto

**Reprodução**

Esta publicação não pode ser reproduzida, no todo ou em parte, sem autorização escrita dos editores da **mícron**.

Os artigos publicados foram avaliados e revistos pelos membros do Conselho Científico da revista. Os autores assumem as responsabilidades científica, ética, disciplinar e legal dos trabalhos publicados.

**Destinatários**

Estudantes e Profissionais de Anatomia Patológica e outros profissionais com interesse na área das Ciências da Saúde.

**Subscrição**

Distribuição gratuita, disponibilizada no site da APTAP.

**Declaração de Propósito**

A **mícron** - Revista Técnica de Anatomia Patológica, tem como propósito a publicação de artigos originais de investigação, de revisão e casos clínicos no âmbito das Ciências da Saúde, com particular relevância para a Anatomia Patológica. Pretende constituir-se como o reflexo da qualidade do exercício, contribuir para a formação dos profissionais e desempenhar um papel preponderante no desenvolvimento científico e tecnológico. A **mícron** está direcionada para os profissionais de Anatomia Patológica que exercem áreas científicas de Histologia, Citologia, Imunocitoquímica, Microscopia Electrónica, Biologia Molecular, Genética, Tanatologia, Citometria de Fluxo e Imagem, entre outras. Dirige-se igualmente a estudantes e profissionais com interesse na área das Ciências da Saúde.

# ÍNDICE



Azul de toluidina, giemsa e violeta de cresil na evidência de mastócitos \_\_\_\_\_ 05



Carcinossarcoma: estudo de caso em citologia ginecológica \_\_\_\_\_ 11



Pesquisa e Análise Filogenética do Gene da Integrase de Fagos de *Helicobacter pylori* \_\_\_\_\_ 15

Normas de Publicação \_\_\_\_\_ 20

O **Grupo de Interesse em Ciências Forenses (GICF)** pretende representar e dinamizar a área das Ciências Forenses, no âmbito da *Associação Portuguesa de Técnicos de Anatomia Patológica (APTAP)*.

Os principais objetivos do **GICF** são:

- Representar as Ciências Forenses no âmbito das competências da APTAP
- Mostrar a relevância dos técnicos de Anatomia Patológica na área Forense
- Dinamizar a investigação e comunicação nas Ciências Forenses
- Aproximar os técnicos que exerçam funções, ou tenham especial interesse pelas Ciências Forenses

Este projeto encontra-se na sua fase inicial, de divulgação, pelo que todos os Técnicos de Anatomia Patológica estão convidados a colaborar com o mesmo, através de sugestões e intervindo na nossa página do *Facebook*. Só desta forma será possível manter o grupo no ativo, conferindo-lhe visibilidade e confiança.

#### **Principais objetivos do GICF**

- Abertura de página do GICF para divulgação de informações no âmbito das Ciências Forenses.
- Abertura de perfil do GICF no facebook.
- Criação de um fórum on-line de discussão de diversos temas das Ciências Forenses.
- Realização de ações de formação e divulgação das Ciências Forenses com as escolas, assim como qualquer outra colaboração que seja solicitada pelas mesmas.
- Realização de, pelo menos, duas ações de formação anuais nas diversas áreas das Ciências Forenses.
- Criação de um prémio para o melhor artigo de investigação no âmbito das Ciências Forenses publicado na *mícron – Revista Técnica de Anatomia Patológica*.
- Criação de um painel ou debate no âmbito das Ciências Forenses a decorrer em cada Congresso Técnico de Anatomia Patológica.

#### **Contactos:**

[gicf.geral.apct@gmail.com](mailto:gicf.geral.apct@gmail.com)

[gicf.questoes.apct@gmail.com](mailto:gicf.questoes.apct@gmail.com)

[Página do Facebook](#)

#### **O GICF:**

**Andreia Gameiro**

**António Lima**

**Bruno Antunes**

**Cristiana Carneiro**

**Gisela Franco**

**Patrícia Ribeiro**

**Tânia Antunes**

**Vanda Abreu**



## Azul de toluidina, giemsa e violeta de cresil na evidência de mastócitos

Ana S Ribeiro<sup>1</sup>, Luís D Pimentel<sup>1</sup>, Amadeu B Ferro<sup>1</sup>, Cláudia Araújo<sup>1,2</sup>  
1 - Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa (ESTeSL - IPL)  
2 - Serviço de Anatomia Patológica do Hospital Curry Cabral (EPE)

Correspondência para Ana Sara Nogueira Ribeiro - e-mail: sararibeiro\_2@hotmail.com

### RESUMO

Os mastócitos são células do sistema imunitário responsáveis pela defesa do organismo contra diferentes agentes agressores externos. Para além da participação em inúmeros processos fisiológicos e patológicos, os mastócitos podem ser eles próprios sede de patologias designadas de mastocitoses. Percebendo a sua importância em diversos processos e dada a necessidade da sua identificação específica para a confirmação de um diagnóstico, foram sendo apresentadas diferentes propostas para a evidência destas células através da coloração metacromática dos seus grânulos citoplasmáticos. Com este trabalho pretendeu-se comparar a qualidade final das lâminas histológicas coradas com azul de toluidina, giemsa e violeta de cresil na evidência de mastócitos, em tecidos humanos fixados em formol 10% e incluídos em parafina, determinando qual das colorações histoquímicas permite obter melhores resultados.

Foram selecionados 20 blocos contendo fragmentos de tecido de diferentes órgãos humanos. De cada bloco efetuaram-se 3 cortes, um para cada coloração, num total de 60 lâminas. A avaliação da qualidade das lâminas foi realizada por 2 avaliadores independentes, através da aplicação de uma grelha de avaliação. Os dados recolhidos foram submetidos a procedimentos estatísticos para comparação da qualidade final de cada coloração.

A coloração de giemsa registou o *score* médio mais elevado ( $67,3 \pm 16,2$ ), seguida da coloração de violeta de cresil ( $63,9 \pm 13,2$ ) e da coloração de azul de toluidina ( $63,4 \pm 17,7$ ). No entanto, estas diferenças não foram estatisticamente significativas.

Embora as diferenças registadas não tenham sido estatisticamente significativas, a proximidade existente entre os valores médios obtidos para cada uma das colorações permite concluir que as técnicas têm eficácia semelhante na evidência de mastócitos.

**PALAVRAS-CHAVE:** Azul de toluidina, Giemsa, Mastócitos, Metacromasia, Violeta de cresil

### INTRODUÇÃO

Os mastócitos são células do sistema imunitário, encontrando-se amplamente distribuídos pelo tecido conjuntivo. Localizam-se preferencialmente adjacentes a vasos sanguíneos e nervos, em tecidos linfóides e na proximidade de tecidos epiteliais, nomeadamente na pele e trato respiratório e gastrointestinal. Dada a sua presença em tecidos que contactam com o meio exterior, podem ser considerados a primeira linha de defesa do organismo, uma vez que se constituem como as únicas células efetoras do sistema imunitário presentes nos tecidos [1-4].

A nível morfológico, a sua característica mais relevante corresponde à presença de numerosos grânulos secretores, distribuídos por todo o citoplasma, sendo estas as estruturas celulares que permitem a identificação histoquímica destas células [4-6].

Atualmente são reconhecidos como células altamente complexas e que desempenham múltiplas funções biológicas de extrema importância, havendo crescente evidência que aponta para a sua participação em processos neoplásicos [2,5,7].

Além da participação em inúmeros processos, quer fisiológicos, quer patológicos, os mastócitos, tal como todas as células do organismo, podem ser eles próprios sede de patologias, genericamente designadas de mastocitoses.

Percebendo a importância e o envolvimento dos mastócitos em diversos processos patológicos e dada a necessidade da sua identificação específica tanto para a caracterização histológica de um possível processo patológico, como para a confirmação de um diagnóstico, foram, ao longo do tempo, desenvolvidas várias técnicas histoquímicas que permitissem a sua evidência em tecidos fixados em formol e

incluídos em parafina. Entre elas destacam-se o azul de toluidina, giemsa e violeta de cresil, técnicas que possibilitam a identificação destas células através da coloração dos seus grânulos citoplasmáticos [8-13].

Embora a técnica de azul de toluidina seja considerada o *gold standard*, não é exclusivamente específica para a evidência dos mastócitos. Neste contexto estão descritas e validadas outras técnicas histoquímicas como a coloração de giemsa, que possui inúmeras aplicações no diagnóstico anátomo-patológico e que é uma coloração frequentemente referida como alternativa ao azul de toluidina, ou o violeta de cresil. Contudo a sua aplicabilidade na evidência deste tipo celular continua pouco estudada.

Assim, este estudo teve por objetivo determinar, de entre as colorações azul de toluidina, giemsa e violeta de cresil, a que permite obter lâminas histológicas com melhor qualidade final na evidência de mastócitos, em tecidos humanos fixados em formol 10% e incluídos em parafina.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Casos em Estudo

Para a realização deste estudo experimental, foi selecionado um total de 20 amostras histológicas com presença confirmada de mastócitos, sendo 4 de cada um dos seguintes tecidos: pele, fígado, rim, estômago e tireóide. Para a seleção dos blocos foi apenas tida em conta a presença de mastócitos, ignorando-se outros fatores como a presença/ausência de qualquer patologia, idade e/ou género dos indivíduos. Os blocos selecionados correspondiam a exames realizados durante o mesmo ano. Com exceção dos blocos que continham fragmentos de pele, todos os outros diziam respeito a material de necropsia.

Selecionou-se ainda, como controlo positivo, uma amostra histológica de pele de um caso com diagnóstico confirmado de mastocitose.

### Fixação, Processamento e Microtomia

Por se ter recorrido a material de arquivo, as etapas de fixação e processamento não foram especificamente controladas para a realização deste estudo. Assim, todas as amostras histológicas utilizadas, foram previamente fixadas e processadas de acordo com a metodologia padrão do laboratório (formol neutro tamponado a 10%, temperatura ambiente, 24 a 48 horas para peças cirúrgicas e biópsias, 1 a 2 semanas para material de necropsia).

Após confirmação da presença de mastócitos em todas as amostras histológicas utilizadas, realizaram-se 3 cortes histológicos de cada bloco selecionado, um por coloração. Estes cortes foram realizados a uma espessura de 3µm, tendo sido colocado 1 corte por lâmina, num total de 60 lâminas (20 lâminas por cada coloração). Procedeu-se de igual forma para a amostra controlo.

### Colorações

Cada coloração foi realizada simultaneamente nas respetivas lâminas, incluindo a lâmina de caso controlo, para que todas fossem coradas nas mesmas condições. As soluções corantes utilizadas foram: Toluidine blue O (C.I. 52040; Certistain®, Merck) [14], Giemsa's azur eosin methylene blue solution (C.I. 109204; Merck) [15] e Cresyl violet acetate (C.I. 105235, Certistain®, Merck) [16].

### Azul de toluidina

As lâminas foram, inicialmente, desparafinadas e hidratadas. De seguida foram coradas, durante 10 minutos à temperatura ambiente, com solução aquosa de azul de toluidina 0,1% e lavadas em água destilada. Por fim, as lâminas foram desidratadas, clarificadas e montadas em Entellan® [17].

### Giemsa

Após desparafinação e hidratação, as secções tecidulares foram coradas com a solução de giemsa a 20%, durante 1 hora à temperatura ambiente. Concluído este passo, os cortes foram diferenciados em álcool 95°, com controlo ao microscópio. Após esta diferenciação os tecidos foram desidratados em álcool 100°, clarificados em xilol e montados em Entellan® [18].

### Violeta de cresil

As lâminas, desparafinadas e hidratadas, foram coradas com uma solução de violeta de cresil a 1%, durante 5 minutos à temperatura ambiente. Seguidamente, as secções foram lavadas em água corrente e contrastadas com Van Gieson, durante 6 segundos à temperatura ambiente. Por último, as lâminas foram desidratadas em álcool a 100°, clarificadas e montadas em Entellan® [19].

### Avaliação das Lâminas

Tendo em consideração o objetivo traçado - determinar a coloração histoquímica que permite obter lâminas histológicas com melhor qualidade - foi construída uma grelha de avaliação, tendo-se considerado os seguintes critérios: preservação da morfologia do tecido,

intensidade da coloração específica, coloração inespecífica, contraste e observação do detalhe nuclear (Quadro I). A grelha foi igualmente construída com o intuito de permitir a conversão da qualidade das lâminas em dados quantitativos, através da atribuição de um *score* final a cada lâmina. A grelha utilizada foi previamente validada.

De forma a relevar a importância relativa de cada critério para a qualidade da coloração histoquímica, foram atribuídos diferentes fatores de ponderação (Quadro II).

Por último, os *scores* finais calculados foram multiplicados pelo fator de unificação 2,5, de forma a que a qualidade final das lâminas fosse convertida para uma escala de 0 a 100, em que 0 corresponde à pontuação mínima e 100 à pontuação máxima. Neste contexto, considera-se que valores superiores ou iguais a 50 representam *scores* de qualidade positivos.

### Métodos Estatísticos

Os dados obtidos foram analisados com recurso ao software estatístico Statistical Package for Social Sciences® (SPSS®) 17.0 para Windows. O tratamento gráfico dos resultados foi realizado recorrendo ao SPSS® e ao Microsoft Office Excel® 2010.

Para a comparação de resultados entre os grupos (técnicas de coloração) foi utilizado o teste paramétrico One-way ANOVA, tendo-se considerado um  $\alpha=0,05$ .

	Preservação da Morfologia do tecido	Intensidade da coloração específica	Coloração inespecífica	Contraste	Observação do detalhe nuclear
0	Ausente e invalida a avaliação	Nula	Presente e invalida a avaliação	Dificulta a visualização da coloração específica	Não observável
1	-	Fraca	-	-	-
2	Ausente mas não invalida a avaliação	Moderada	Presente mas não invalida a avaliação	Não influencia a visualização da coloração específica	Observável com pormenor limitado
3	-	Forte	-	-	-
4	Presente	Muito forte	Ausente	Incrementa a visualização da coloração específica	Observável com elevado pormenor

**Quadro I - Critérios de avaliação da qualidade das colorações azul de toluidina, giemsa e violeta de cresil na evidência de mastócitos em fragmentos histológicos**

Fonte: Adaptado de Ferro, Amadeu. *Técnicas imunocitoquímicas. Texto Inédito. Lisboa: Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa; Área Científica de Anatomia Patológica, 2008.*

	Preservação da Morfologia do tecido	Intensidade da coloração específica	Coloração inespecífica	Contraste	Observação de detalhe nuclear
Fator de ponderação	1	3	3	2	1

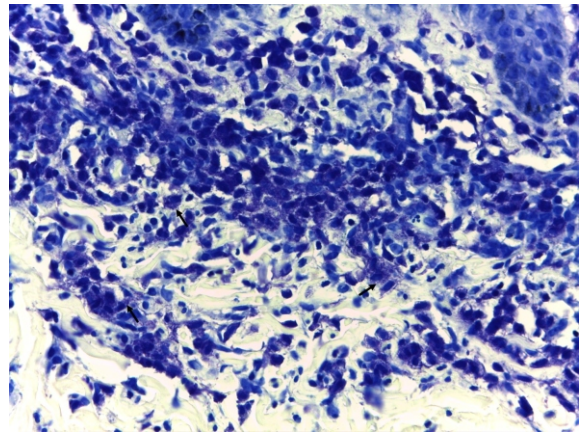
**Quadro II - Fatores de ponderação atribuídos a cada um dos critérios utilizados na avaliação da qualidade das colorações azul de toluidina, giemsa e violeta de cresil na evidência de mastócitos em fragmentos histológicos**

## RESULTADOS

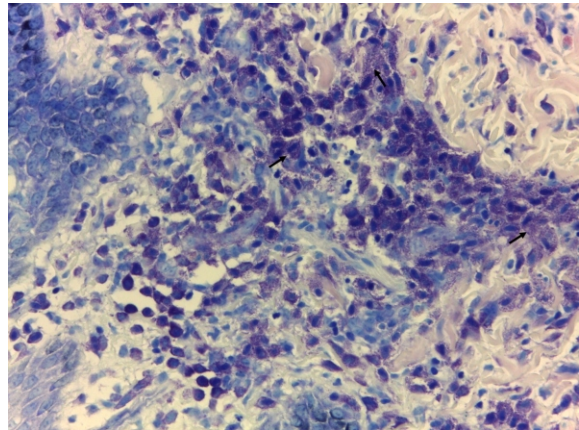
Em termos qualitativos, observou-se que todas as técnicas de coloração permitiram distinguir os mastócitos das restantes estruturas tecidulares. As Figuras 1, 2 e 3 exemplificam o aspeto final de cada coloração, demonstrando os resultados obtidos.

As lâminas coradas pela técnica de giemsa obtiveram o *score* médio mais elevado, seguidas das lâminas coradas pela técnica de violeta de cresil e, por último, das lâminas coradas pela técnica de azul de toluidina (Gráfico I). Relativamente ao desvio-padrão, a coloração de azul de toluidina apresenta o maior valor, 17,7, seguida da coloração de giemsa com 16,2. O menor valor de desvio-padrão corresponde à coloração de violeta de cresil com 13,2.

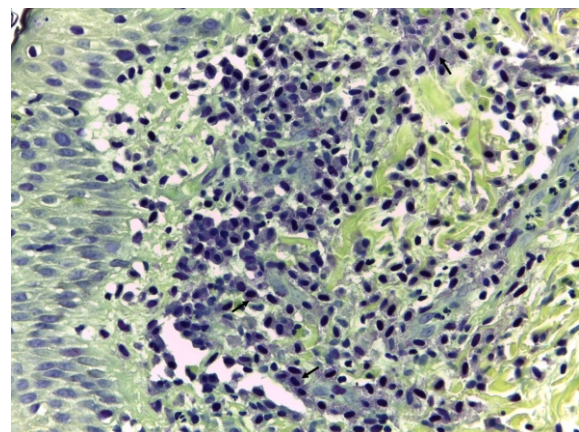
Para os tecidos fígado, rim e pele, a coloração de giemsa obteve resultados superiores, comparativamente com as colorações de azul de toluidina e de violeta de cresil. Relativamente aos restantes tecidos utilizados, tiróide e estômago, os melhores resultados foram obtidos com a técnica de violeta de cresil. Contudo, as diferenças obtidas entre os valores médios dos *scores* finais é muito ténue entre as três colorações, em particular para as lâminas de tiróide e de estômago (Gráfico II).



*Figura 1 - Secção de pele corada com a coloração de azul de toluidina. Grânulos dos mastócitos (setas) corados metacromaticamente de violeta/púrpura. (400X)*



*Figura 2 - Secção de pele corada com a coloração de giemsa. Grânulos dos mastócitos (setas) corados metacromaticamente de violeta/púrpura. (400X)*



*Figura 3 - Secção de pele corada com a coloração de violeta de cresil. Grânulos dos mastócitos (setas) corados metacromaticamente de violeta/púrpura. (400X)*

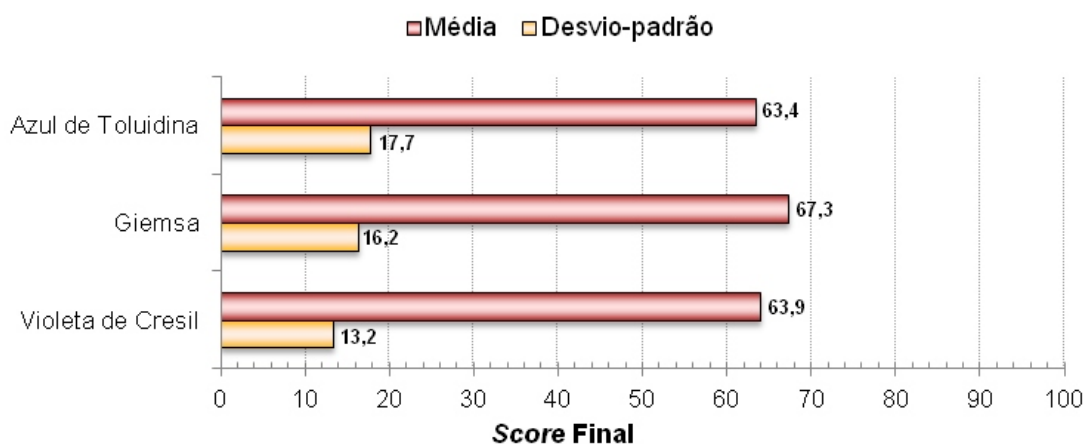


Gráfico I - Valores de média e desvio-padrão do score final obtidos cada coloração histoquímica em estudo (ANOVA;  $p > 0.05$ ).

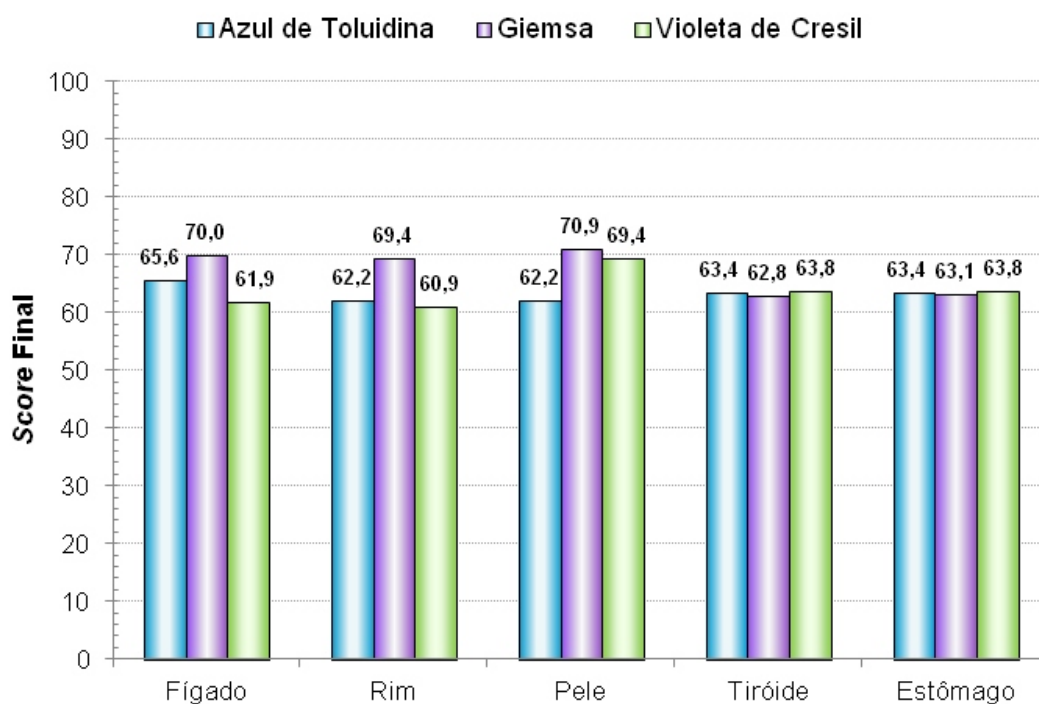


Gráfico II - Valores médios do score final obtidos para cada coloração histoquímica em estudo, por tipo de tecido.

## DISCUSSÃO

Os mastócitos são células do sistema imunitário muito pouco estudadas em Anatomia Patológica, área em que a pesquisa e o estudo deste tipo celular estão praticamente restringidos à confirmação do diagnóstico de mastocitoses, realizada, na maioria das vezes, com recurso à técnica de coloração de azul de toluidina. Contudo, a importante função destas células em inúmeros processos fisiológicos e patológicos, bem como a crescente evidência da participação destas células em processos neoplásicos parece estar a despertar o interesse da comunidade biomédica [2,5,7].

No que se refere aos resultados obtidos, de modo geral, todas as colorações apresentaram scores de qualidade de coloração positivos ( $>50$ ), o que permite afirmar que as três técnicas de coloração estudadas podem ser utilizadas na evidência histoquímica dos mastócitos para fins diagnósticos. A proximidade verificada entre as três colorações, e o facto de as diferenças não apresentarem significado estatístico, deixa transparecer uma qualidade semelhante na distinção destas células, em tecidos fixados em formol 10% e incluídos em parafina.

Já no que se refere à distribuição dos resultados, a coloração de violeta de cresil foi a que obteve menor desvio-padrão, seguida da coloração de

giemsa e da coloração de azul de toluidina. Neste sentido, apesar de a coloração de giemsa ter obtido a melhor média, o menor desvio-padrão verificado para a técnica de violeta de cresil deixa transparecer, no nosso ponto de vista, uma maior consistência e homogeneidade, características que estão na base de resultados mais fiáveis.

Havendo, assim, diferentes alternativas de qualidade semelhante no que à evidenciação histoquímica de mastócitos diz respeito, a escolha da técnica de coloração a utilizar poderá prender-se com outros fatores, nomeadamente: disponibilidade de reagentes, custo relativo ou o tempo disponível para a realização da técnica.

Quanto à disponibilidade de reagente, a técnica de giemsa pode apresentar vantagem relativamente aos outros dois corantes, dadas as inúmeras utilidades deste corante em Anatomia

Patológica estando, por isso, presente em quase todos os laboratórios. Contudo, o reagente azul de toluidina pode ser de mais fácil acesso em serviços que disponham de microscopia eletrónica, enquanto que o violeta de cresil, em virtude da sua utilidade para a evidenciação da substância de Nissl, é um reagente comum em laboratórios de anatomia patológica dedicados à neuropatologia. Em situações em que o tempo disponível seja um fator limitante para a execução da técnica, devem ser considerados os tempos necessários à realização de cada protocolo. Neste aspeto específico, a coloração de violeta de cresil será a melhor opção, por ser a que permite obter lâminas para avaliação diagnóstica mais rapidamente.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Metcalfe DD. Mast cells and mastocytosis. *Blood*. 2008; 112(4); 940-955.
2. Metcalfe DD, Baram D, Mekori YA. Mast Cells. *Physiol Rev*. 1997; 77;4; 1033-1066.
3. Pettigrew HD, Teuber SS, Kong JS, Gershwin ME. Contemporary Challenges in Mastocytosis. *Clinic Rev Allerg Immunol*. 2010; 38; 125-134.
4. Ackerman AB, Boer A, Bennin B, Gottlieb GJ. *Histologic Diagnosis of Inflammatory Skin Diseases: An Algorithmic Method Based on Pattern Analysis*. 3rd ed. Ardor Scribendi; 2005.
5. Beaven MA. Our perception of the mast cells from Paul Ehrlich to now. *Eur J Immunol*. 2009; 39;1;11-25.
6. Adkinson NF, Busse WW, Bochner BS, Holgate ST, Simons FE, Lemanske RF, et al. *Middleton's Allergy: Principles and Practice*. 7th ed. Mosby Elsevier; 2009.
7. Henz B. Exploring the mast cell enigma: a personal reflection of what remains to be done. *Experimental Dermatology*. 2006; 17; 91-99.
8. Preto P. Staining of macromolecules: possible mechanisms and examples. *Biotech Histochem*. 2009; 84;4; 139-158.
9. Quintas A, Halpern MJ, Freire AP. *Bioquímica: Organização Molecular da Vida*. Lisboa: Lidel; 2008.
10. Wulff S, Hafer L, Cheles M, Couture R, Holliday JM, Smith S, et al. *Education Guide - Special Stains*. California: Dako; 2004.
11. Carson F. *Histotechnology a self instructional text*. 2nd ed. ASCP Press; 1997.
12. Moral R. *Laboratório de Anatomia Patológica*. Interamericana. McGraw-Hill; 1993.
13. Ladeira C. Aula nº1 da disciplina de Tecnologias Laboratoriais em Anatomia Patológica
14. Merck Millipore [Internet]. Material Safety Data Sheet: Toluidine blue O. [recuperado em 1012, Junho 14] Disponível em: [http://www.merckmillipore.com/is-bin/INTERSHOP.enfinity/WFS/Merck-PT-Site/en\\_US/-/EUR/ViewPDF-Print.pdf?RenderPageType=ProductDetail&CatalogCategoryID=&ProductUUID=wMqb.s1O4c0AAAEb7Z010mvl&Port alCatalogUUID=diGb.s1OpM0AAAE5wwdBYP2](http://www.merckmillipore.com/is-bin/INTERSHOP.enfinity/WFS/Merck-PT-Site/en_US/-/EUR/ViewPDF-Print.pdf?RenderPageType=ProductDetail&CatalogCategoryID=&ProductUUID=wMqb.s1O4c0AAAEb7Z010mvl&Port alCatalogUUID=diGb.s1OpM0AAAE5wwdBYP2).
15. Merck Millipore [Internet]. Material Safety Data Sheet: Giemsa's azur eosin methylene blue solution. [recuperado em 2012, Junho 13] Disponível em: [http://www.merckmillipore.com/is-bin/INTERSHOP.enfinity/WFS/Merck-International-Site/en\\_US/-/USD/ViewPDF-Print.pdf?RenderPageType=ProductDetail&CatalogCategoryID=&ProductUUID=Dfyb.s1OjloAAAEWNkkW4z8B&Port alCatalogUUID=Uc6b.s1LfzAAAAEW6tYfVhTL](http://www.merckmillipore.com/is-bin/INTERSHOP.enfinity/WFS/Merck-International-Site/en_US/-/USD/ViewPDF-Print.pdf?RenderPageType=ProductDetail&CatalogCategoryID=&ProductUUID=Dfyb.s1OjloAAAEWNkkW4z8B&Port alCatalogUUID=Uc6b.s1LfzAAAAEW6tYfVhTL).
16. Merck Millipore [Internet]. Material Safety Data Sheet: Cresyl violet acetate. [recuperado em 2012, Junho 15] Disponível em: [http://www.merckmillipore.com/is-bin/INTERSHOP.enfinity/WFS/Merck-PT-Site/en\\_US/-/EUR/ViewPDF-](http://www.merckmillipore.com/is-bin/INTERSHOP.enfinity/WFS/Merck-PT-Site/en_US/-/EUR/ViewPDF-Print.pdf?RenderPageType=ProductDetail&CatalogCategoryID=&ProductUUID=Dfyb.s1OjloAAAEWNkkW4z8B&Port alCatalogUUID=Uc6b.s1LfzAAAAEW6tYfVhTL)
17. Adaptado de Carson F. *Histotechnology a self instructional text*. 2nd ed. ASCP Press: 1997.
18. Adaptado do protocolo utilizado no Laboratório de Anatomia Patológica do Hospital Curry Cabral, EPE, Lisboa.
19. Adaptado de Nezelof C. *Exames de Laboratorio: Tecnicas Microscopicas*. Barcelona: Editorial Jims; 1975.



# Carcinossarcoma: estudo de caso em citologia ginecológica

Cátia Sousa<sup>1</sup>, Inês Silva<sup>1</sup>, Carla Pinheiro<sup>2</sup>, Paula Mendonça<sup>1</sup>, Rúben Roque<sup>1,2</sup>, Saudade André<sup>2</sup>

1 - Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa (ESTeSL)

2 - Instituto Português de Oncologia de Lisboa Francisco Gentil (EPE)

Correspondência para Cátia Sousa - e-mail: catiaamsousa@gmail.com

**PALAVRAS-CHAVE:** Citologia ginecológica, Carcinossarcoma, Citologia em meio líquido, Etiologia, Epidemiologia

## INTRODUÇÃO

O carcinossarcoma uterino, ou tumor *mülleriano* misto maligno, é um tumor raro, que compreende 2-5% dos tumores malignos do útero, com origem nos canais embrionários denominados canais *müllerianos*, que dão origem aos componentes epitelial e mesenquimatoso do órgão. O carcinossarcoma tem mau prognóstico e a taxa de sobrevivência aos 5 anos é de 33-39% [1-3].

Desenvolve-se geralmente em mulheres pós-menopausa, com idade superior a 60 anos, sem antecedentes ginecológicos, com maior incidência em mulheres obesas, hipertensas, nulíparas e/ou diabéticas. A sintomatologia inclui piometra, hemorragia vaginal, dor abdominal e massa abdominal [3,4].

Existe uma frequência aumentada após a terapêutica com tamoxifeno, com uma incidência de 17 em cada 100 000 mulheres. O Tamoxifeno atua como anti-estrogénio na mama, no entanto, dados clínicos demonstram que tem um efeito estrogénico no endométrio. O aparecimento da neoplasia endometrial pode ter um longo período de latência, e por esse motivo recomenda-se a monitorização das mulheres [5].

## INFORMAÇÃO CLÍNICA

O caso em estudo diz respeito a uma mulher de 68 anos, com antecedentes pessoais de menarca aos 12 anos, ciclos regulares, uma gravidez e um parto, sem antecedentes de patologia ginecológica e hipertensão arterial moderada há 10 anos. Foi-lhe diagnosticada uma neoplasia do reto em 2002 no hospital da área de residência, onde realizou quimioterapia e radioterapia neoadjuvante, tendo a partir dessa data vigilância ginecológica regular. Em 2012 apresentou um quadro clínico de dores pélvicas e metrorragias, sendo realizada uma tomografia computadorizada na qual se observou aumento das dimensões da cavidade endometrial, com espessamentos nodulares no corpo e no istmo e com envolvimento do colo e do fórnix esquerdo da vagina. Em 2013, após uma biópsia do endométrio com diagnóstico de carcinossarcoma endometrial, foi referenciada ao Instituto Português de Oncologia de Lisboa Francisco Gentil. Na consulta de ginecologia foi efetuada colheita para análise citológica do colo uterino e foi detetado por palpação um gânglio inguinal, o qual posteriormente foi estudado por citologia aspirativa por agulha fina, tendo como diagnóstico metástase ganglionar de neoplasia

maligna pouco diferenciada, compatível com carcinossarcoma endometrial. Como parte da rotina de admissão de novos doentes, as lâminas da biópsia do hospital da área de residência foram revistas, tendo sido diagnosticada uma neoplasia maligna bifásica com componente epitelial de tipo adenocarcinoma pouco diferenciado (carcinossarcoma). A doente foi novamente encaminhada para o hospital da área de residência para realizar quimioterapia, pelo que se desconhece o seguimento.

## ACHADOS CITOLÓGICOS

A amostra citológica foi colhida em meio líquido (ThinPrep®), processada e corada com coloração de *Papanicolaou*. No exame microscópico observa-se um fundo com detritos celulares e sangue (Figura 1), células bem preservadas do tipo intermediário e parabasal, correspondendo a epitélio exocervical atrófico, e agregados tridimensionais de células epiteliais com limites mal definidos, núcleos pleomórficos, hiper cromáticos, nucléolos proeminentes e cromatina grosseira (Figura 2). Existiam também agregados de células atípicas fusiformes, por vezes multinucleadas e com núcleos pleomórficos (Figuras 3 e 4).

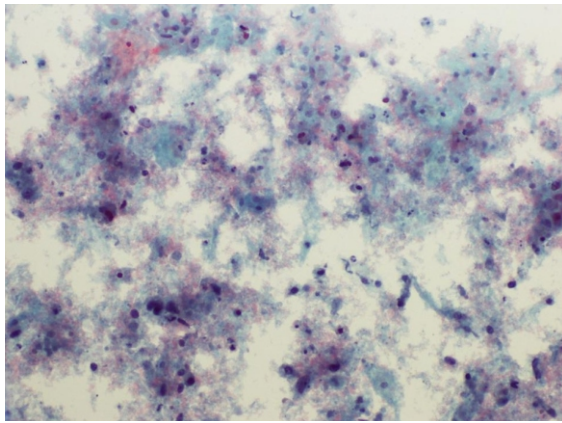


Figura 1 - ThinPrep (Papanicolaou, 10x).

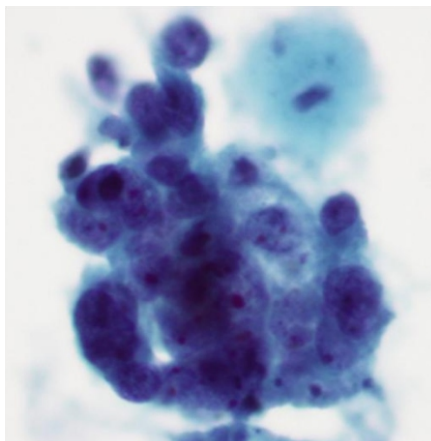


Figura 2 - ThinPrep (Papanicolaou, 40x).

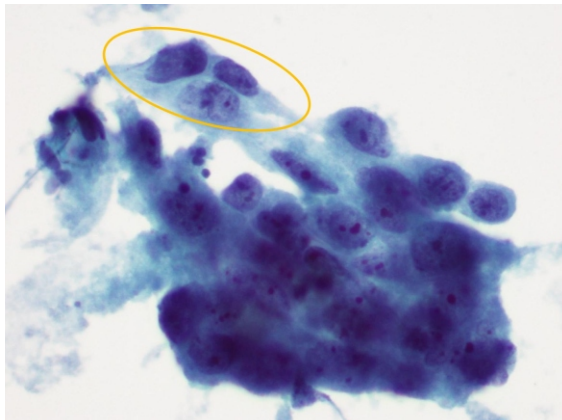


Figura 3 - ThinPrep (Papanicolaou, 40x).

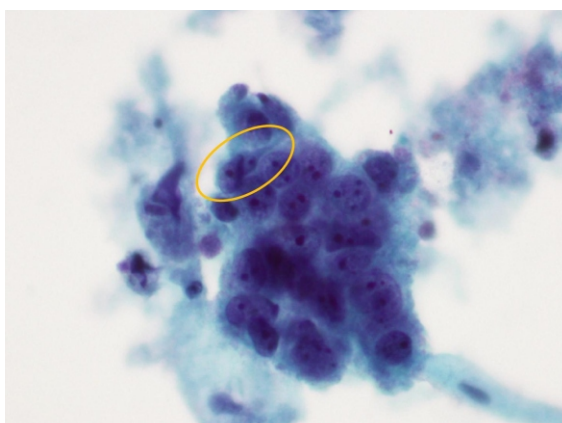


Figura 4 - ThinPrep (Papanicolaou, 40x).

## DISCUSSÃO

A etiologia do carcinosarcoma não é consensual, existindo dois principais modelos teóricos para explicar a sua origem: i. Teoria monoclonal (Teoria da Colisão), que sugere a colisão entre dois tumores de diferentes componentes dando origem ao carcinosarcoma; ii. Teoria policlonal, que compreende a Teoria da Combinação e Teoria da Conversão, sendo a última a mais apoiada. Na Teoria da Combinação uma célula estaminal tumoral é diferenciada em componente epitelial, sofre estimulação pela proteína *transforming growth factor beta* (TGF- $\beta$ ) no componente mesenquimatoso, que se funde com o componente epitelial, originando o carcinoma. Na Teoria da Conversão, o componente epitelial sofre uma diferenciação metaplásica, da qual surge o componente mesenquimatoso [3,4].

A presença de metástases é um importante fator de prognóstico ocorrendo em cerca de 70% dos pacientes. O carcinosarcoma do útero metastiza mais frequentemente para o pulmão (49%), peritoneu (44%), gânglios linfáticos pélvicos ou para-aórticos (35%), glândula suprarrenal ou osso (19%), com uma taxa de sobrevivência de 2 anos. É discutido qual o componente mais agressivo e mais propenso a metastizar, sendo este um problema ainda sem solução [2].

Devido à rápida progressão desta neoplasia, a primeira ação terapêutica indicada é a histerectomia total com salpingo-ooforectomia bilateral, linfadenectomia pélvica, dissecação dos gânglios aórticos e biópsia omental. A radioterapia adjuvante permite um controle local das recidivas, contudo sem alterar a sobrevivência. A elevada taxa de recorrências e metastização à distância tornam estes tumores candidatos a terapêutica sistêmica. Geralmente a cirurgia complementa-se com quimioterapia adjuvante. No entanto, não existem estudos que comprovem a sua eficácia terapêutica, sendo realizado consoante as características específicas de cada caso [2,3,5].

O carcinosarcoma pode sobre-expressar recetores de tirosina quinase como o Her-2, EGFR ou c-Kit. A compreensão dos processos que envolvem estas proteínas reguladoras do ciclo celular podem no futuro melhorar o prognóstico deste tumor, sugerindo potenciais alvos terapêuticos [6-8].

Apesar das características morfológicas observadas favorecerem o diagnóstico de adenocarcinoma, a presença de células fusiformes atípicas, com nucléolos evidentes, permitiu a identificação de um componente mesenquimatoso (Figura 5).

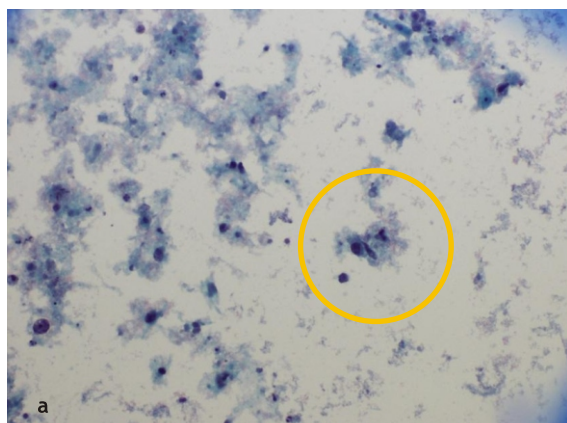


Figura 5a - Meio líquido ThinPrep (Papanicolaou, 10x).

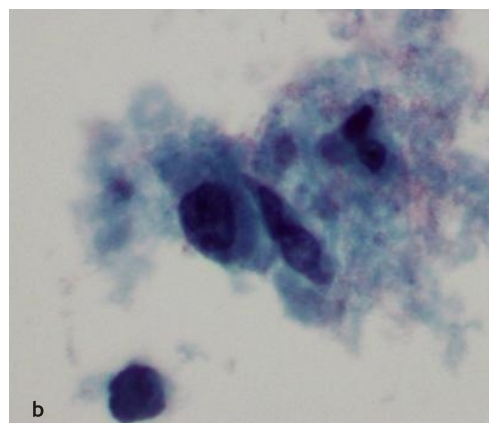


Figura 5b - Ampliação do componente mesenquimatoso.  
- Meio líquido ThinPrep (Papanicolaou, 40x).

A existência de dois componentes, com origens distintas (epitelial e mesenquimatoso), são características morfológicas do carcinosarcoma, tal como confirmado pela biópsia onde se efetuou imunomarcagem com o anticorpo anti-citoqueratina 7. Foi observada marcação específica na componente do tumor que corresponde à diferenciação glandular, não existindo marcação nas células fusiformes, o que revela as duas componentes do tumor (Figuras 6 e 7).

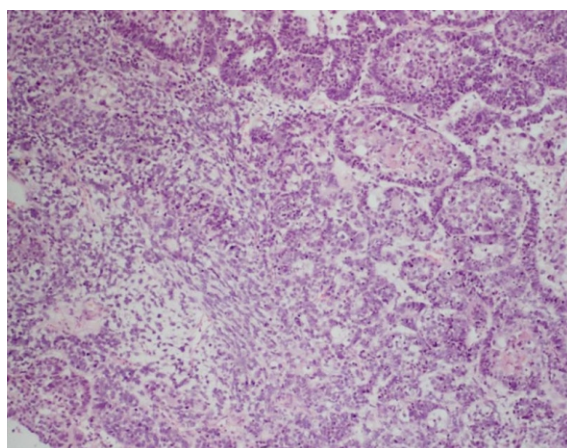


Figura 6 - Histologia (HE, 10x).

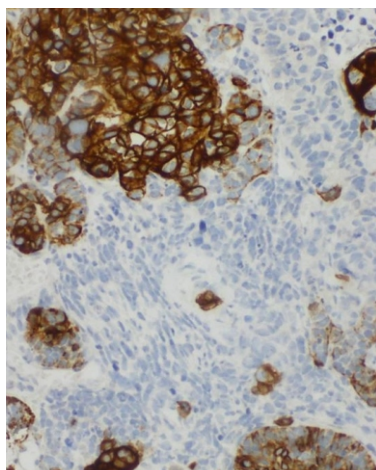


Figura 7 - Imunohistoquímica (Citoqueratina 7, 10x).

A imunohistoquímica é uma técnica essencial no diagnóstico do carcinosarcoma permitindo a diferenciação dos dois componentes que constituem este tumor. Como as células mais comuns do componente mesenquimatoso são os rhabdomioblastos, a reação positiva do anticorpo anti-desmina permite identificar a diferenciação muscular do tumor. No entanto, a diferenciação condrocitária ou adipocitária do componente mesenquimatoso pode ser evidenciada com o anticorpo anti-S100. A evidenciação do componente epitelial pode ser demonstrado pelos anticorpos anti-citoqueratina 7, acima referido, e anti-Epithelial Membrane Antigen (EMA) [7,8,10]. Este tumor faz diagnóstico diferencial com tumores distintos: o adenocarcinoma endometrial e o sarcoma puro, sendo as características de ambos observadas em diferentes áreas no carcinosarcoma. Por se tratar de um tumor raro é fundamental que as suas características sejam do conhecimento dos profissionais que intervêm no diagnóstico citológico, de forma a assegurar uma correta identificação da neoplasia, cuja dificuldade de diagnóstico não reside em caracterizá-la como maligna, mas sim em determinar a sua bidiferenciação.

**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

1. Callister M., et al. Malignant Mixed Müllerian Tumors of The Uterus: Analysis of Patterns of Failure, Prognostic Factors, and Treatment Outcome. *International Journal of Radiation Oncology\*Biophysics*, 2004. 58: 786-796.
2. Cancro Ginecológico. Reunião de Consenso Nacional, 2010.
3. Kanthan, R.; Senger, J.-L. Uterine Carcinosarcomas (Malignant Mixed Mullerian Tumours): A Review with Special Emphasis on the Controversies in Management. *Obstetrics and Gynecology International*, 2011.
4. Saphir, O.; Vass, A. Carcinosarcoma. *Am J Cancer*, 1938. 33: 331-361.
5. Sasco, A. et al. Endometrial mullerian carcinosarcoma after cessation of tamoxifen therapy for breast cancer. *International Journal of Gynecology & Obstetrics*, 1995. 48: 307-310.
6. Rani Kanthan, J.-L. S. (2011). Uterine Carcinosarcomas (Malignant Mixed Mullerian Tumours): A Review with Special Emphasis on the Controversies in Management. p. 13.
7. Zhanyong, Z. et al. Malignant Mixed Mullerian Tumor: An Immunohistochemical Study. *Pathology Research International*, 2012.
8. Parvin Ganjei-Azar, M. N. *Color Atlas of Immunocytochemistry in Diagnostic Cytology*. Springer: Florida. 2007
9. Snyder, J. M. et al. An Abnormal Cervicovaginal Cytology Smear in Uterine Carcinosarcoma Is an Adverse Prognostic Sign. *Am J Clin Pathol*, 2004. 122:434-439
10. Rani Kanthan, J.-L. B. (s.d.). Malignant mixed Mullerian tumors of the uterus: histopathological evaluation of cell cycle and apoptotic regulatory protein. p. 9.



# Pesquisa e Análise Filogenética do Gene da Integrase de Fagos de *Helicobacter pylori*

Andreia D. Timóteo<sup>1</sup>, Filipa F. Vale<sup>2</sup>

1 - Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa

2 - Centro de Patogénese Molecular, Unidade dos Retrovírus e Infecções Associadas, Instituto de Medicina Molecular e Instituto de Investigação do Medicamento (iMed.Ulisboa), Faculdade de Farmácia, Universidade de Lisboa, Lisboa, Portugal

Correspondência para Andreia Timóteo - e-mail: andreiadtimoteo@gmail.com

## RESUMO

A bactéria *Helicobacter pylori* infeta o estômago de aproximadamente metade da população humana estando associada ao desenvolvimento de adenocarcinoma gástrico e outras patologias gástricas. A terapêutica com antibióticos é ineficaz em aproximadamente 20 a 30% dos pacientes, devido principalmente à resistência aos antibióticos, tornando necessário o desenvolvimento de novas terapêuticas. A terapêutica fágica consiste na utilização de bacteriófagos para provocar a lise celular, sendo um processo alternativo a fim de evitar a resistência aos antibióticos.

Pretende-se pesquisar por PCR o gene da integrase de fagos de *H. pylori* de forma a compreender a prevalência de profagos nesta espécie e determinar a distribuição geográfica e/ou a patologia associada a estirpes integrase positivas. Em estirpes positivas para o gene que codifica a integrase foram pesquisados outros genes profágicos, como a primase.

Em 866 estirpes isoladas de doentes com origem e patologias diversas foi feita a amplificação por PCR e sequenciação do gene da integrase de fagos de *H. pylori*. Às estirpes positivas para o gene da integrase foi feita amplificação por PCR e sequenciação de outros genes do profago. Efetou-se a análise filogenética e estatística de todas as sequências obtidas.

A pesquisa por PCR do gene da integrase do fago mostrou uma prevalência de 19,3%. A análise filogenética da integrase demonstrou haver *clusters* de estirpes de acordo com a região geográfica. Os resultados mostram haver associação da presença de profagos em estirpes isoladas de doentes com úlcera péptica.

Os resultados reforçam a abundância de sequências de profagos em *H. pylori*.

**PALAVRAS-CHAVE:** *Helicobacter pylori*, Profagos

## INTRODUÇÃO

### *Helicobacter pylori*

A bactéria *Helicobacter pylori* infeta o estômago de aproximadamente metade da população humana e está associada ao desenvolvimento de gastrite, úlcera péptica, adenocarcinoma gástrico e linfoma MALT (Tecido Linfóide Associado a Mucosa) gástricos [1].

Apesar da infeção por *H. pylori* na maioria dos indivíduos (aproximadamente 70%) permanecer assintomática, 10 a 20% poderão vir a desenvolver úlcera péptica e 1 a 2% cancro gástrico ao longo da vida [2]. Desde o aparecimento desta associação variados aspetos da imunopatogénese têm sido estudados [3].

A terapêutica utilizada, atualmente, é composta por dois antibióticos e um inibidor da bomba de prótons, tendo o tratamento uma duração habitual de 7 dias [2]. No entanto, devido principalmente à existência de bactérias multiresistentes a antibióticos, a terapêutica com antibióticos é ineficaz em cerca de 20 a 30%

dos pacientes, tornando necessário o desenvolvimento de novas terapêuticas. A terapêutica fágica consiste na utilização de bacteriófagos para provocar a lise celular, sendo um processo alternativo a fim de evitar a resistência aos antibióticos [4, 5].

### Bacteriófagos (Fagos)

Os bacteriófagos são vírus cujos hospedeiros são bactérias. Os bacteriófagos, que infetam *Helicobacter pylori*, possuem cadeia dupla de DNA e pertencem à ordem *Caudovirales*. Pertencem à família *Siphoviridae*, quando apresentam cauda longa e não contrátil [6] ou à família *Podoviridae*, se a cauda for curta e, também, não contrátil [7].

A infeção por fagos inicia-se com a adsorção a recetores da superfície bacteriana. Os fagos tendem a ligar-se a estirpes específicas injetando os seus ácidos nucleicos no citoplasma do hospedeiro. Após este ponto pode seguir duas vias, o ciclo lítico ou o ciclo lisogénico, provocando a lise da bactéria hospedeira ou

integrando-se no genoma bacteriano, respectivamente [8].

Após a integração do genoma fágico no genoma da bactéria, o fago passa a ser designado profago e a bactéria de bactéria lisogénica [9].

**MATERIAL E MÉTODOS**

**Estirpes de *H. Pylori***

Foram utilizadas 866 estirpes de *H. pylori* para pesquisa do gene da integrase de fagos de *H. pylori*. As estirpes pertencem às coleções do Laboratório Nacional das Infecções Gastrointestinais do Departamento de Doenças Infeciosas do Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, da Université Bordeaux Segalen (França) e do Rabin Medical Center do Beilinson Hospital (Israel).

A cultura inicial de *H. pylori* foi efetuada descongelando as estirpes. Foram utilizados meios seletivos e não seletivo MHA (Mueller-Hinton Agar) com 5% de sangue (Biogerm, Portugal) e incubadas em condições de microaerofilia durante 24h ou 48h.

Na pesquisa por PCR do gene da integrase de fagos de *H. pylori* das 866 estirpes isoladas de doentes de origem geográfica diferente, 686 eram de origem europeia, 60 de origem africana, 119 de origem asiática e 1 de origem americana. Em relação à patologia associada 218 provieram de doentes com úlcera péptica, 415 com gastrite, 76 com adenocarcinoma gástrico, 63 linfoma MALT e em 94 não foi possível aceder à informação de qual a patologia associada.

**Pesquisa por PCR do Gene da Integrase de Fagos de *H. Pylori***

Os primers utilizados para a integrase, primase e para a região do fim do fago foram desenhados com base no alinhamento dos genomas de uma estirpe de *Helicobacter acinonychis*, de *H. pylori* B45 e *H. pylori* B38.

Na reação de PCR para a pesquisa do gene da integrase foi utilizado tampão 1X (Promega), dNTPs a 0,2 µM (New England BioLabs), cloreto de magnésio a 0,09 mM (Promega), primers a 0,48 µM (Invitrogene), Taq polimerase a 1,25 U (Promega), 1 µL de DNA de *H. pylori* e a mesma mix, mas sem adição de DNA como controlo negativo.

A desnaturação aconteceu durante 4 min a 94°C, cada reação foi amplificada em 35 ciclos: 30 segundos a 94°C, 30 segundos de hibridização a 58°C e 60 segundos a 72°C. A extensão continuou por 7 minutos, também, a 72°C.

Após a reação de PCR foi feita eletroforese em gel de agarose (Sigma Life Science) a 2% (Figura 1), usando como controlo positivo a estirpe B45, que é positiva para o gene da

integrase, primase e fim do fago, e como controlo negativo a mix de PCR mas sem a adição de DNA.

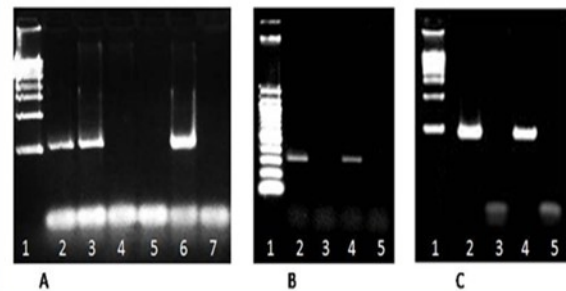


Figura 1 - A) 1: Marcador<sup>1</sup>, 2: CP, 3 e 6: (+) integrase, 4 e 5: (-) integrase, 7: CN.  
 B) 1: Marcador<sup>2</sup>, 2: CP, 3: (-) primase, 4: (+) primase e 5: CN.  
 C) 1: Marcador<sup>1</sup>, 2: CP, 3: (-) fim do fago, 4: (+) fim do fago e 5: CN.

<sup>1</sup>Marcador 1kb DNA Ladder  
<sup>2</sup>Marcador 100pb DNA ladder  
 CP: Controlo positivo;  
 (+): estirpe positiva para o gene da integrase (ou primase ou região do fim do fago);  
 (-): estirpe negativa para o gene da integrase (ou primase ou região do fim do fago);  
 CN: Controlo negativo

As estirpes positivas para o gene da integrase foram purificadas e sequenciadas (Stabvida, Portugal) em ambas as cadeias (Figura 2). Para a purificação do produto de PCR foi utilizada a resina (*Spharyl S400 High Resolution, GE Healthcare*) e as colunas (*Illustra™ Microspin™ columns, GE Healthcare*).

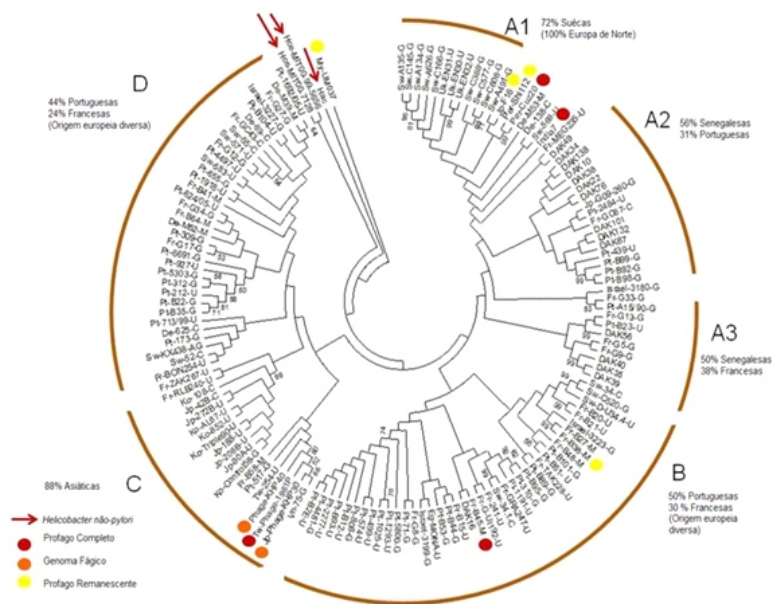


Figura 2 -Árvore filogenética do gene da integrase neighbor-joining method, kimura two-parameter model (1000 réplicas). Estirpes isoladas de pacientes com diferentes patologias: C - Adenocarcinoma, G - Gastrite, M - Linfoma MALT e U - Úlcera Péptica.

Após a purificação procedeu-se ao controlo positivo da purificação fazendo uma eletroforese para confirmar a presença de DNA e enviar para sequenciação. Foi feita a quantificação da concentração do DNA com o Qubit dsDNA HS Assay Kit (Invitrogene).

### Pesquisa por PCR do Gene da Primase e Fim do Fago de Fagos de *H. Pylori*

Todas as estirpes com a sequência de integrase positiva foram, também, testadas quanto à presença de outros genes fágicos, primase e fim do fago.

Na reação de PCR para a pesquisa do gene da primase e da região do fim do fago foi utilizado tampão 1X (Promega), dNTPs a 0,2  $\mu$ M (New England BioLabs), cloreto de magnésio a 0,09 mM (Promega), *primers* a 0,48  $\mu$ M (Invitrogene), Taq polimerase a 1,25 U (Promega), 1  $\mu$ L de DNA de *H. pylori* e a mesma mix, mas sem adição de DNA como controlo negativo.

Os restantes procedimentos foram semelhantes aos descritos para o gene da integrase, exceto que neste caso a hibridização decorreu a 63°C.

### Análise Filogenética das Sequências de *H. pylori*

A análise filogenética das sequências de integrase foi obtida utilizando o *software* MEGA 5.05 e o método *neighbor-joining* e o modelo *Kimura two-parameter* [10].

### Análise Estatística das Sequências de *H. Pylori*

A análise estatística das estirpes estudadas foi feita utilizando o teste do Qui-quadrado e o teste de Fisher.

## RESULTADOS

### Prevalência de Profagos em *Helicobacter pylori*

A pesquisa por PCR do gene da integrase do fago mostrou uma prevalência de 19,3%. Nos resultados globais da amplificação por PCR, das 866 estirpes analisadas, 3,5% foram positivas para a presença do gene da integrase e da primase, 2,9% foram positivas para presença do gene da integrase e do fim do fago. Apenas 0,8% das estirpes foram, simultaneamente, positivas para a presença dos 3 genes estudados, integrase, primase e fim do fago.

### Análise Estatística

No presente estudo esta análise foi utilizada para tentar compreender se existe associação entre a patologia e/ou origem e a positividade para o gene da integrase, primase e fim do fago.

No teste do qui-quadrado em que se testou a independência [11] entre patologia associada às estirpes de *H. pylori* e presença do gene da integrase obteve-se um valor  $p=0,0479$ . Este resultado sugere que existe associação estatística entre a patologia e a presença do gene da integrase. O valor que mais parece contribuir para esta associação é a úlcera péptica.

No teste do qui-quadrado em que se testou a independência entre patologia associada às estirpes de *H. pylori* testadas e presença da região do fim do fago obteve-se um valor  $p=0,0555$  (maior que 0,05). Este resultado significa que, apesar de estar próximo do limite, com os dados que temos não existe associação estatística entre a patologia e a presença da região do fim do fago. O valor que mais parece contribuir para esta aproximação ao valor limite de associação é úlcera péptica.

No teste do qui-quadrado em que se testou a independência entre a origem geográfica das estirpes de *H. pylori* testadas e presença da região do fim do fago obteve-se um valor  $p=0,0789$ , não existindo associação estatística entre a origem e a presença da região do fim do fago. Os restantes parâmetros analisados não apresentaram associação estatística.

### Análise Filogenética do Gene da Integrase

A análise filogenética das sequências dos produtos de PCR do gene da integrase originou uma árvore filogenética com 4 clusters (grupos de sequências com semelhança entre si) (Figura 2).

Foi feita comparação com sequências do gene da integrase presentes noutras espécies de *Helicobacter*, como *H. cetorum* (isolado de mamíferos marinhos), que se encontram situadas em posições mais extremas da árvore filogenética. O nome das estirpes termina com uma letra que designa a patologia associada a essa estirpe.

A análise filogenética do gene da integrase demonstrou haver *clusters* de estirpes de acordo com a região geográfica, não ocorrendo, a mesma situação em relação às patologias.

### Análise Filogenética do Gene da Primase

Foi estudado em que *clusters* as estirpes positivas para o gene da primase (Figura 3) se localizavam, e se se localizavam nos mesmos *clusters* da árvore filogenética da integrase, ou seja, se analisando um gene diferente os *clusters* se mantinham. Por exemplo, relativamente às sequências de origem asiática KHP30, 1961 e KHP40 que estavam no *cluster* C da árvore filogenética para análise do gene da integrase, também, na árvore filogenética para a análise do gene da primase aparecem juntas, daí que nesta figura tenha sido adotada a mesma identificação de *cluster* C.

De um modo semelhante as estirpes que nesta figura aparecem agrupadas e identificadas com um B, significa que, também, estavam juntas na árvore filogenética para análise do gene da integrase e pertenciam ao *cluster* B.

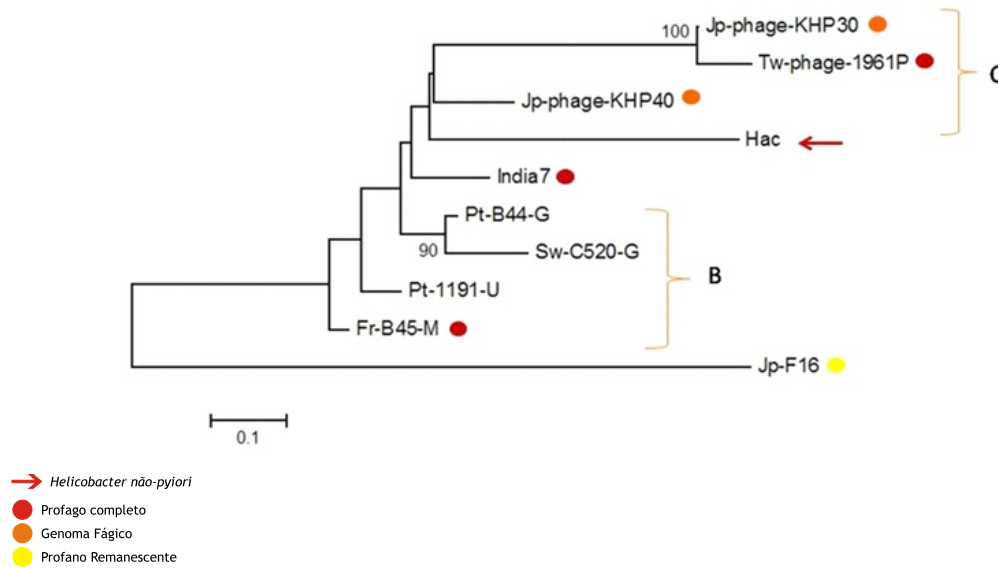


Figura 3 - Árvore filogenética do gene da primase, neighbor-joining method, kimura two-parameter model (1000 réplicas). Estirpes isoladas de pacientes com diferentes patologias: C-Adenocarcinoma, G-Gastrite, M-Linfoma MALT e U-Úlcera Péptica.

O cluster B apresenta 3 estirpes estudadas, duas delas de origem portuguesa e uma de origem sueca.

**Análise Filogenética da Região do Fim do Fago**

Foi, também, estudado em que clusters estas estirpes, positivas para a região do fim do fago, se localizam e se se localizavam nos mesmos

clusters da árvore filogenética da integrase, ou seja, se analisando um gene diferente os clusters se mantinham (Figura 4). Esta verificou-se ser uma hipótese verdadeira. Sendo utilizado o mesmo esquema de anotação.

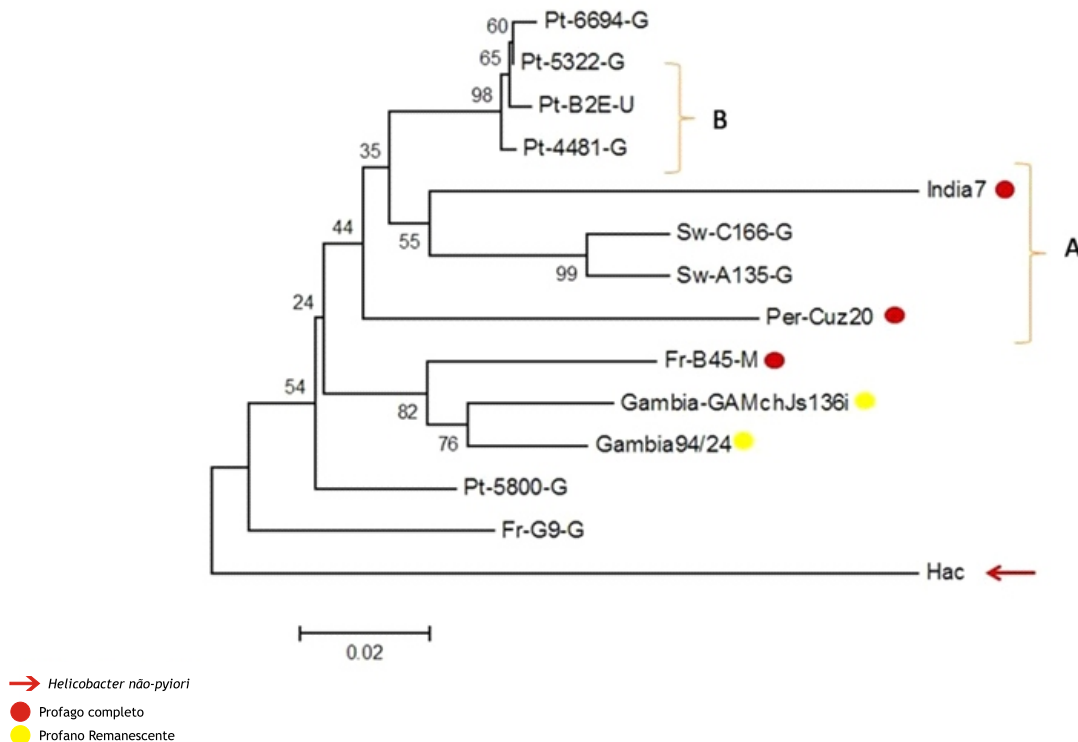


Figura 4 - Árvore filogenética da região do Fim do Fago, neighbor-joining method, kimura two-parameter mode (1000 réplicas). Estirpes isoladas de pacientes com diferentes patologias: C-Adenocarcinoma, G-Gastrite, M-Linfoma MALT e U-Úlcera Péptica.

## DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

Os resultados reforçam a informação da abundância de sequências profágicas em *H. pylori* [7]. A generalidade das sequências parece pertencer a profagos remanescentes integrados no genoma bacteriano, uma vez que na maioria dos casos as estirpes são positivas para um gene mas não o são para os restantes genes fágicos. Apenas 0,8% das estirpes são, simultaneamente, positivas para a presença dos genes da integrase, primase e fim do fago.

Na pesquisa por PCR pesquisou-se um gene do início, um gene do meio e a região do fim do fago para que fosse possível efetuar uma primeira avaliação sobre a existência de profagos completos, cuja confirmação está dependente da sequenciação completa do genoma do profago.

A análise filogenética mostrou existirem *clusters* de acordo com a origem geográfica das estirpes, uma vez que nos *clusters* pode-se observar que as estirpes de origem asiática estão agrupadas e o mesmo se passa com as restantes diversas origens geográficas.

As estirpes foram isoladas de doentes com diferentes patologias, mas as diferentes patologias aparecem distribuídas em todos os *clusters*, ou seja, não existe agrupamento por patologia. Apesar de filogeneticamente não se encontrar nenhuma discriminação de acordo com a patologia, as estirpes que são provenientes de doentes que tinham úlcera péptica têm mais frequentemente profagos

integrados do que as estirpes provenientes de pacientes com outras patologias. O que pode sugerir uma associação entre a presença do profago e o desenvolvimento da úlcera péptica. Este aspeto é importante pois existem espécies de bactérias em que a existência de profagos está associada à virulência (como por exemplo a difteria e toxinas da cólera), em que os profagos codificam fatores de virulência que aumentam a amplitude do hospedeiro e promovem a evasão do sistema imunitário [12].

A análise estatística mostrou haver associação entre a presença do gene da integrase e úlcera péptica. A análise da associação entre região do fim do fago e úlcera péptica apresenta um valor *p* limite. Pode ser esclarecida esta possível associação aumentando o número de estirpes testadas.

Estudos futuros impõem a sequenciação completa de estirpes que foram positivas para a presença do gene da integrase, primase e fim do fago numa tentativa de encontrar mais profagos completos integrados no genoma de *H. pylori*. Outro estudo possível será a procura de genes que apresentem uma ação terapêutica importante como, por exemplo, os genes das lisinas fágicas, que podem ser utilizados na terapia fágica.

## AGRADECIMENTOS

Projeto financiado pela Fundação para a Ciência e Tecnologia (PTDC/EBB-EBI/119860/2010).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 - Ferreira, W. e Sousa, J., 2002. Microbiologia, volume 3, Lidel Edições Técnicas Lda: Lisboa.
- 2 - Fox, A., (2011) Aspectos gerais da patogénese bacteriana. [http://microbiologybook.org/Portuguese/chapter\\_10\\_bp.htm](http://microbiologybook.org/Portuguese/chapter_10_bp.htm) (28-8-2013).
- 3 - Hérelle, F., 1933. Le bactériophage et ses applications thérapeutiques. G. Doin&Cic., Paris.
- 4 - Kim, K., et al. 2007. Enterobacter sakazakii bacteriophages can prevent bacterial growth in reconstituted infant formula. Int. J. Food Microbiol. 115:195-203.
- 5 - Kimura, M., 1980. A Simple Method for Estimating Evolutionary Rates of Base Substitution Through Comparative Studies of Nucleotide Sequences. J. Mol. Evol. 16: 111-20.
- 6 - Krusters, G., et al. 2006. Pathogenesis of Helicobacter pylori infection. Clin. microbiol.
- 7 - Lehours, P., et al. 2011. Genome sequencing reveals a phage in Helicobacter pylori. Mbio 2:e00239-11.
- 8 - Luo, C., et al, 2012. Genome, integration and transduction of a Novel temperate phage of Helicobacter pylori. J. Viro: 86 n.16: 8781-8792.
- 9 - Madigan, M., 2000. Brock Biology of Microorganisms. Nona edição, J. Prentice-Hall: London.
- 10 - Marshall, B., e Warren, J., 1984. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. Lancet 1:1311-1315.
- 11 - Mégraud, F., e Lehours, P., 2007. Helicobacter pylori detection and antimicrobial susceptibility testing. Clin Microbiol Rev. 20(2):280-322
- 12 - Nitharwal R., et al 2011. Helicobacter pylori chromosomal DNA replication: Current status and future perspectives. Elsevier. 585:7-17.
- 13 - Pestana, D. D. e Velosa, S.F. (2006) Introdução à Probabilidade e à Estatística, Vol. 1, Lisboa, Fundação Calouste Gulbenkian..
- 14 - Vale, F., e Vitor J., 2010. Transmission pathway of Helicobacter pylori: Does food play a role in rural and urban areas? Inter J. Food Microbio 138: 112

## INFORMAÇÃO AOS AUTORES

A **micron** - Revista Técnica de Anatomia Patológica é a publicação científica da Associação Portuguesa de Técnicos de Anatomia Patológica.

A **micron** publica, em português e inglês, Artigos originais de investigação, Artigos de revisão e Casos clínicos no âmbito das Ciências da Saúde, considerados relevantes para a Anatomia Patológica.

A **micron** disponibiliza também um Espaço de Opinião onde os autores poderão publicar reflexões sobre temas que considerem merecedores de discussão para a nossa comunidade científica.

Todo o material para publicação deve ser enviado para o e-mail [micron@aptap.pt](mailto:micron@aptap.pt).

Os artigos publicados passam a ser propriedade da revista, não podendo ser reproduzidos, no todo ou em parte, sem autorização do diretor ou editor.

A aceitação dos originais enviados para publicação é condicionada à avaliação por três elementos do Conselho Científico da revista.

Nesta avaliação os artigos poderão ser:

- a) aceites sem alterações;
- b) aceites após as modificações propostas;
- c) recusados.

A revisão dos trabalhos pelo Conselho Científico da revista é efetuada com o devido respeito pela confidencialidade do(s) autor(es).

O Conselho Científico fará, no máximo, duas revisões de cada artigo.

A **micron** não aceita trabalhos já publicados ou que tenham sido enviados para publicação noutras revistas, a não ser que estes se façam acompanhar da devida autorização do editor. Um trabalho apresentado num encontro científico pode vir a ser considerado para publicação, desde que não tenha sido publicado na íntegra em qualquer ata ou publicação similar.

Os autores, a partir do momento em que enviam um trabalho para futura publicação na revista, assumem a inteira responsabilidade de todo o seu conteúdo.

## NORMAS DE PUBLICAÇÃO

As normas para a uniformização dos trabalhos enviados para publicação em Revistas Biomédicas, *The Vancouver style*, foram elaboradas pelo Comité Internacional de Redatores de Revistas Médicas (CIRPM) e adotadas pela **micron**.

Os artigos deverão ser escritos mediante o Novo Acordo Ortográfico.

Os artigos que não sigam as normas de publicação serão reenviados para os autores para correção antes da avaliação por parte do Conselho Científico.

Os **Artigos Originais de investigação** não devem ter mais de 2000 palavras (excluindo resumo e referências bibliográficas) e 30 referências bibliográficas.

Cada parte do trabalho deve ser iniciada numa nova página. Todas as páginas devem ser numeradas no canto inferior direito, começando na página de título.

Os artigos devem ser estruturados pela seguinte ordem:

### a) Página de título

Deve incluir:

- Título abreviado, conciso e explícito;
- Primeiro nome, inicial do meio e último nome de cada autor;
- Afiliação institucional de cada autor;
- Nome, morada, e-mail e telefone do autor responsável pela correspondência referente ao trabalho.

### b) Resumo (máximo de 250 palavras) e Palavras-chave (três a dez);

### c) Texto, dividido em INTRODUÇÃO, MATERIAL E MÉTODOS, RESULTADOS e DISCUSSÃO.

Estes títulos devem ser escritos em maiúsculas, a negrito e ajustados à esquerda da página. Os subtítulos devem ser escritos à esquerda da página e cada palavra começar com maiúscula.

Os sub-títulos também são dactilografados à esquerda da página mas só a primeira palavra começa com maiúscula.

A **INTRODUÇÃO** deverá ser uma exposição completa e sucinta do estado atual do conhecimento sobre o tema do artigo e expressas claramente as motivações e objetivos que levaram ao planeamento do trabalho.

Em **MATERIAL E MÉTODOS** deverão ser descritos os critérios de seleção do material em estudo e o desenho do mesmo com suficiente detalhe, de modo a que permita a reprodutibilidade do estudo. Os métodos estatísticos devem ser assinalados e as unidades do Sistema Internacional aplicadas. Nas experiências com seres humanos, deverá ser informado o comité ou comissão de ética institucional ou regional, e respeitados os princípios que constam da Declaração de Helsínquia (1983).

A identificação dos sujeitos em estudo e de instituições hospitalares devem ser ocultados.

Nos **RESULTADOS** devem ser escritos os dados relevantes. Os dados que constem de tabelas, quadros ou figuras não devem ser repetidos no texto - devem apenas salientar ou resumir as observações mais importantes.

A **DISCUSSÃO** deve dar especial atenção a aspetos novos ou significantes do estudo, refletir sobre limitações e justificar erros ou omissões.

Deve ainda relacionar os resultados com outros estudos relevantes. As conclusões deverão ser correlacionadas com os objetivos propostos, evitando afirmações não diretamente baseadas no trabalho efetuado. Podem incluir-se recomendações.

#### d) Agradecimentos

Devem ser dactilografados após o texto principal e os agradecimentos pessoais devem preceder os das instituições.

#### e) Referências bibliográficas

Devem ser referenciadas pela ordem que aparecem no texto, devendo ser identificadas em numeração Árabe, ao nível da linha, dentro de parêntesis retos (ex.: [1,2-4]). A lista de referências deve conter todos os autores até ao máximo de seis. Sempre que este número seja ultrapassado, devem-se listar os primeiros seis seguido de *et al.*

O tipo de referências utilizado deverá ser o recomendado pelo List of Journals Indexed in Index Medicus. Se alguma referência se encontrar pendente de publicação deverá escrever-se "in press". A referência a comunicações pessoais não deve ser citada na lista de referências mas pode aparecer no texto entre parêntesis. Qualquer dúvida em relação à sua elaboração pode ser esclarecida em [www.icmje.org](http://www.icmje.org).

#### Citar livro:

Apelido do autor inicial do primeiro nome. Título do livro. Edição (se não a primeira). Local de publicação: nome do editor; ano de publicação.

Exemplo: Frish B, Bartl R. Biopsy interpretation of bone and bone marrow: Histology and immunohistology in paraffin and plastic. 2ª ed. Nova Iorque: Arnold Publishers; 1999.

#### Citar capítulo de livro:

Apelido do autor inicial do primeiro nome. Título do capítulo. In: Apelido do editor inicial do primeiro nome, editor. Título do livro. Edição (se não a primeira). Local de publicação: nome do publicante; ano de publicação. número das páginas do capítulo.

Exemplo: Blaxter P. Social health and class inequalities. In: Carter C, Peel J, editors. Equalities and inequalities in health. 2ª ed. Londres: Academic Press; 1976. p.165-78.

#### Citar revista científica:

Apelido do autor inicial do primeiro nome. Título do artigo. Título da revista (abreviado); número do volume (Issue number); número das páginas do artigo.

Exemplo: Fasano M, Theise N, Nalesnik M. Immunohistochemical evaluation of hepatoblastomas with use of the hepatocyte-specific marker, hepatocyte paraffin 1, and polyclonal anticarcinoembryonic antigen. Mod Pathol 1998;11(10):934-938.

#### Citar página da internet:

Apelido do autor inicial do primeiro nome. Título da página. Título do site. Último update. URL (Data de acesso).

Exemplo: Hudson P. PM, Costello liars: former bank chief. In: The age. 16 Setembro 1998. <http://www.theage.com.au/daily/980916/news/news2.html> (16set1998)

#### f) Tabelas, Quadros e Gráficos

Devem complementar a informação do texto e ser enviados em página separada.

Devem ser numerados com caracteres romanos pela ordem que são citados no texto.

A legenda das Tabelas, Quadros e Gráficos não deve exceder as 40 palavras. Todas as abreviaturas devem ser explicadas em nota de rodapé. Devem ser indicadas as unidades de medida de todos os valores.

#### g) Legendas das Figuras

Devem ser escritas numa página separada, com duas linhas de espaço entre cada legenda.

O tamanho das legendas não deve exceder as 50 palavras.

#### h) Figuras

As Figuras (ilustrações, figuras e/ou fotografias) devem ser numeradas segundo a ordem em que se encontram no texto, em numeração árabe, identificadas como "Figura" e a sua posição no texto devidamente mencionada.

Na legenda deve vir mencionada a técnica realizada, bem como a ampliação das figuras.

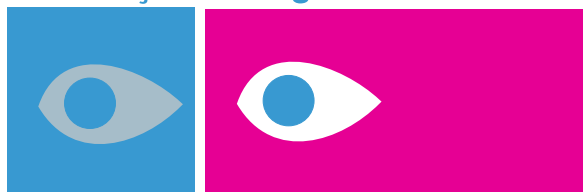
As Figuras (a cores ou a preto e branco) devem ser gravadas e enviadas em ficheiros TIFF ou JPEG, em tamanho real, dimensões 8x8 cm e com resolução de 300dpi.

Todas as imagens devem ser enviadas em ficheiros separados e não incluídas no texto.

Os **ARTIGOS DE REVISÃO** são estruturados em INTRODUÇÃO, APRESENTAÇÃO DO TEMA, REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS, Tabelas e Figuras. O texto não deve ultrapassar as 2500 palavras, excluindo o resumo (que não deverá exceder as 200 palavras) e ter, no máximo, 60 referências bibliográficas.

A descrição de **CASOS CLÍNICOS** será aceite sempre que relevantes nas áreas de interesse publicadas na mícron e que de alguma forma constituam um contributo valioso em termos tecnológicos e científicos. Os casos clínicos não podem ultrapassar as 1500 palavras, 10 referências bibliográficas e não devem conter mais do que 1 página A4 para tabelas, quadros e figuras.

**Associação Portuguesa de Técnicos**



de ***Anatomia Patológica***

Rua Rodrigues Sampaio nº30C 5ºEsq. 1150-280 Lisboa  
[www.aptap.pt](http://www.aptap.pt) - [micron@aptap.pt](mailto:micron@aptap.pt)