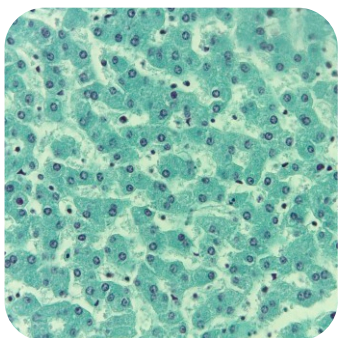
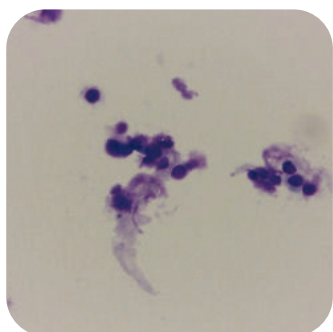


# mícron

Revista Técnica de Anatomia Patológica



Nº17 - Ano 16 - Maio de 2013



## EDITORIAL

Caros leitores,

apresentamos a edição nº17 da **mícron** - Revista Técnica de Anatomia Patológica.

Para nós, enquanto Equipa Editorial da **mícron**, tem sido gratificante poder, ano após ano, publicar a actividade científica relevante que se tem vindo a efectuar na área de Anatomia Patológica.

Neste número são apresentados quatro artigos Originais de Investigação. O primeiro centra-se nas áreas de actuação da Fetopatologia e Antropologia Forense, dando um contributo relevante para a determinação da idade fetal à data da morte.

Seguidamente é apresentado um estudo sobre a comparação de três métodos de pós-processamento e o seu efeito na coloração de May-Grünwald Giemsa.

O terceiro artigo científico incide sobre o processo de fixação dos tecidos, fazendo uma comparação entre a fixação em formalina e em fixador molecular e a sua influência em diferentes técnicas histoquímicas.

Os autores do último artigo de investigação propõe-nos novas abordagens na intervenção do Técnico de Anatomia Patológica em comunidades escolares, demonstrando o contributo que este grupo profissional pode dar na transmissão de conhecimentos associados ao consumo do álcool em jovens adolescentes.

Nesta edição da revista **mícron**, foi ainda criado um novo “Espaço Informativo”, onde damos especial ênfase ao documento consenso resultante da reunião de um painel de especialistas, com vista à construção e estabelecimento de linhas de orientação técnica para a “determinação do status HER2 em carcinoma da mama para a realidade portuguesa”.

Esperamos que esta edição da **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>

**Directora**

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

Depósito Legal: 328185/11

**Periodicidade**

Revista Anual

**Tiragem**

550 exemplares

**Design e produção**

[www.linosousabox.com](http://www.linosousabox.com)

**Execução gráfica**

Extra Cor - Artes Gráficas, Lda.

**Reprodução**

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

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**

Sócios da APTAP: Distribuição gratuita

Não Sócios da APTAP:

Estudantes (Formação base) - 5€

Profissionais - 7,5€

**Declaração de Propósito**

A **micron** - 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 **micron** está direccionada para os profissionais de Anatomia Patológica que exercem nas 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

|                                                                                     |                                                                                                                                                                  |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
|    | Contributo para a estimativa da idade fetal à data da morte na população portuguesa                                                                              | 04 |
|    | Coloração de May-Grünwald Giemsa em amostras de secreções brônquicas processadas em ThinPrep®: comparação de três métodos de pós-processamento                   | 09 |
|  | Comparação da Fixação em Formalina e em Fixador Molecular e sua Influência em Técnicas Histoquímicas em Tecido Hepático                                          | 16 |
|  | Novas abordagens na intervenção do Técnico de Anatomia Patológica em comunidades escolares: Conhecimentos Associados ao Consumo do Álcool em Jovens Adolescentes | 23 |
|  | Recomendações técnicas para a determinação imuno-histoquímica do <i>status</i> HER2 em carcinoma da mama - Consenso Português                                    | 28 |
|                                                                                     | Normas de Publicação                                                                                                                                             | 41 |



## Contributo para a estimativa da idade fetal à data da morte na população portuguesa

Cristiana Carneiro<sup>1,2,3,4</sup>, Francisco Curate<sup>5</sup>, Paula Borralho<sup>1,3,4</sup>, E. Cunha<sup>2,6</sup>

1 - Serviço de Anatomia Patológica - Hospital Garcia de Orta, EPE

2 - Delegação Sul do Instituto Nacional de Medicina Legal

3 - Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa

4 - Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa

5 - Centro de Investigação em Antropologia e Saúde Departamento de Ciências da Vida (Antropologia), Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade de Coimbra

6 - Departamento de Ciências da Vida Universidade de Coimbra/ Centro de Ciências Forenses

Correspondência para Cristiana Carneiro - e-mail: cristianacarneiro@sapo.pt

### RESUMO

A estimativa da idade gestacional (IG) em restos cadavéricos fetais é importante em contextos forenses. Para esse efeito, os especialistas forenses recorrem à avaliação do padrão de calcificação dentária e/ou ao estudo do esqueleto. Neste último, o comprimento das diáfises de ossos longos é um dos métodos mais utilizados, sendo utilizadas equações de regressão de obras pouco atuais ou baseadas em dados ecográficos, cujas medições diferem das efetuadas diretamente no osso.

Este trabalho tem como objetivo principal a obtenção de equações de regressão para a população Portuguesa, com base na medição das diáfises de fémur, tíbia e úmero, utilizando radiografias post-mortem.

A amostra é constituída por 80 fetos de IG conhecida. Tratando-se de um estudo retrospectivo, os casos foram selecionados com base nas informações clínicas e anatomopatológicas, excluindo-se aqueles cujo normal crescimento se encontrava efetiva ou potencialmente comprometido.

Os resultados confirmaram uma forte correlação entre o comprimento das diáfises estudadas e a IG, apresentando o fémur a correlação mais forte ( $r=0.967$ ;  $p<0,01$ ). Assim, foi possível obter uma equação de regressão para cada um dos ossos estudados.

Concluindo, os objetivos do estudo foram atingidos com a obtenção das equações de regressão para os ossos estudados. Pretende-se, futuramente, alargar a amostra para validar e consolidar os resultados obtidos neste estudo.

**PALAVRAS-CHAVE:** Fetos, Estimativa da idade, Diáfises de osso longos, Radiografia, Equações de regressão, Antropologia Forense

### INTRODUÇÃO

A Antropologia Forense (AF) pode ser definida genericamente como a aplicação de métodos e conhecimentos da antropologia física ou biológica a questões médico-legais [1-3]. Tradicionalmente, esta área das ciências forenses era aplicada a restos cadavéricos em fase de esqueletização ou completamente esqueletizados. Atualmente, a definição é alargada de modo a incluir a colaboração no estudo de cadáveres em variados estados de decomposição e de indivíduos vivos [2], ou seja, nos últimos anos a AF tem vindo a aumentar as suas competências, as metodologias utilizadas têm sido aprimoradas e o campo de atividade foi consideravelmente alargado; por outras

palavras, tal como acontece com outras ciências forenses, a AF é multidisciplinar e está em franca expansão [4].

Em Portugal, a inexistência de uma licenciatura específica em Antropologia Forense implica que o seu ensino seja feito essencialmente a nível pós-graduado. Alguns exemplos disso são a presença do módulo de Antropologia Forense em cursos do 2º ciclo (Mestrado em Medicina Legal e Ciências Forenses), Curso de Pós-Graduação em Antropologia Forense e o 3º ciclo (Doutoramento) em Antropologia da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra, que tem 3 ramos de especialização, sendo um deles a Antropologia Forense [5].

Na prática, quando se trata de analisar restos cadavéricos, o que inclui os casos aos quais esta

investigação se dirige, os principais objetivos prendem-se com a identificação positiva de restos esqueletizados, calcinados ou em avançado estado de decomposição através do estabelecimento do perfil biológico e da detecção de fatores de individualização. Sempre que possível são perscrutadas as circunstâncias da morte. O perfil biológico é estabelecido por quatro parâmetros fundamentais: idade à data da morte, afinidade populacional, sexo e estatura [6].

O estabelecimento do perfil biológico reveste-se de maior dificuldade quando se trata de indivíduos não adultos, grupo no qual se incluem fetos e recém-nascidos (RN), a população-alvo deste estudo. De todos os parâmetros supracitados, a estimativa da idade à data da morte de indivíduos não adultos é aquele que tem resultados mais fiáveis [7]. Este parâmetro é de extrema importância e, quando se trata de fetos e RN, deve ser o mais preciso possível, designadamente para a determinação da viabilidade fetal (potencial de sobreviver fora do útero após o parto), sendo que o limiar para a sobrevivência fora do útero, nas melhores condições atuais, se situa entre as 22 e as 23 semanas de gestação [8]; para apoiar a investigação de casos de aborto sendo que, segundo a Organização Mundial de Saúde, considera-se 'aborto' uma interrupção de gravidez antes que o feto atinja a viabilidade [8] e o Código Penal Português considera "Crime contra a vida intrauterina" o aborto nas condições descritas no Artigo 140º [9]; para apoiar a investigação de casos de infanticídio, que inclui "mãe que matar o filho durante ou logo após o parto e estando ainda sob a sua influência perturbadora" e "exposição ou abandono" que resulte na morte do RN, conforme consta nos Artigos 136º e 138º do Código Penal Português, respetivamente [9].

Para determinar a idade em indivíduos sub-adultos, de modo geral, utilizam-se dois métodos: o desenvolvimento da dentição e o crescimento e maturação do esqueleto. O desenvolvimento da dentição provê informação mais fidedigna do que o do esqueleto, pelo que se considera mais sensato utilizar preferencialmente o primeiro parâmetro cujos resultados devem ser cruzados com os do segundo [10, 11].

Este estudo debruça-se sobre o comprimento das diáfises de três ossos longos: o fémur, a tíbia e o úmero. A utilização destas estruturas neste tipo de estudo justifica-se por vários fatores:

- São considerados os maiores e mais robustos e portanto mais resistentes à

decomposição o que os torna mais facilmente recuperáveis [11, 12];

- O comprimento das diáfises aumenta proporcionalmente com o comprimento corporal total do feto, estando esta relação presente desde o início do processo de ossificação [12];

- Outros ossos são mais difíceis de identificar em fetos, por não apresentarem os aspetos anatómicos que os tornam característicos no adulto [12];

- A medição destas estruturas é muito mais simples de realizar do que a medição de ossos chatos com curvaturas e ângulos [12].

Nesta área, a obra de Fazekas e Kósa, "Forensic Fetal Osteology", publicada em 1978, continua a ser a referência, apesar de atualmente haver a necessidade de realizar estudos para a criação de valores de referência para cada população [12, 13]. Além disso, o trabalho realizado por aqueles autores (Fazekas e Kósa) é baseado numa amostra constituída por ossos secos provenientes de 138 fetos. A amostra não é documentada, ou seja, não existem informações sobre a idade gestacional, sendo a sua determinação baseada somente na bem conhecida relação entre as medições realizadas e o consequente cálculo do comprimento do feto, a partir do qual se extrapola a idade [11, 12]; assim, são necessárias duas fórmulas para o cálculo da IG.

O presente estudo tem como objetivo principal a criação de equações de referência para a população Portuguesa para a estimativa da idade de fetos e recém-nascidos ou nados-mortos, através da medição radiográfica das diáfises de ossos longos. Para validar os resultados, procedeu-se à comparação entre a equação obtida para o fémur e as equações obtidas por outros estudos de referência.

Pretende-se assim contribuir para suprir uma lacuna relativa à uniformização dos parâmetros utilizados para a determinação da idade à data da morte em fetos [14]. Este dado é particularmente importante, pois quando se pretende traçar um perfil biológico, é imprescindível aplicar dados de comparação baseados em amostras recentes e específicas para a população-alvo [15].

## MATERIAIS E MÉTODOS

Sendo este trabalho um estudo retrospectivo que se baseia nos dados recolhidos no decurso habitual de autópsia clínica fetal para a qual foi obtida autorização, não houve contato adicional com os fetos, apenas com os processos.

Garantiu-se, também, o anonimato dos titulares dos dados. Por estes motivos, considerou-se prescindível o consentimento informado.

Foram selecionados fetos e nados-mortos aos quais se realizou autópsia clínica no Serviço de Anatomia Patológica do Hospital Garcia de Orta, E.P.E, em Almada. A amostra foi escolhida a partir de autópsias efetuadas entre 2001 e 2010.

Foram incluídos no estudo fetos:

- De gravidezes vigiadas e com IG conhecida (determinada por ecografia obstétrica);
- Sem restrição de crescimento intrauterino diagnosticada;
- Sem cromossomopatias ou malformações envolvendo os membros;
- Apresentando vários graus de maceração, excluindo-se aqueles cujo óbito aparentava ter ocorrido há mais de uma semana;
- De gravidezes gemelares, sem crescimento discordante, com IG inferiores a 32 semanas.

As radiografias foram disponibilizadas através de uma aplicação informática, designada Centricity®, da General Electric Company, pelo que se optou por imprimir e efetuar as medições em papel. O instrumento de medição foi uma régua de metal com graduação a 0,5 milímetros (mm).

Obtiveram-se as medidas máximas das diáfises do úmero, do fémur e da tíbia. Sempre que possível, a medição foi feita com o feto na posição anteroposterior (AP), de modo a evitar a sobreposição das estruturas ósseas (Figura 1); quando isso não foi possível, recorreu-se à imagem de perfil (Figura 2).

Os dados recolhidos foram analisados com recurso à aplicação informática SPSS® (Statistical Package for the Social Sciences) versão 17.0, para Windows®.



Figura 1 - Radiografia típica - posição anteroposterior



Figura 2 - Radiografia típica - posição lateral

A análise do erro intra-observador (reiterabilidade) e o erro inter-observador (reprodutibilidade), aplicando o erro técnico da medida (TEM) [16], foi efetuada com base numa amostra da população de estudo escolhida aleatoriamente, constituída por radiografias de quinze fetos.

A distribuição da amostra, no que diz respeito às medidas obtidas para cada diáfise, foi avaliada pelos testes de Kolmogorov-Smirnov e Shapiro-Wilk. A homogeneidade das variâncias foi avaliada pelo teste de Lavene.

Procedeu-se à análise das relações lineares entre as variáveis contínuas comprimento da diáfise e IG pelo coeficiente de correlação de Pearson ( $r$ ) e o coeficiente de determinação ( $r^2$ ) que indica a proporção da variação que pode ser explicada pela regressão, sendo possível obter equações de regressão.

Por fim, foram comparadas duas equações calculadas para o fémur por outros autores com a equação obtida neste estudo.

## RESULTADOS

Para aferir a reiterabilidade e a reprodutibilidade foram calculados o erro intra-observador e o erro inter-observador. Os resultados mostraram, em ambas as situações, que os valores eram aceitáveis (Tabela I). Concluiu-se, deste modo, que o método de medição utilizado é válido.

Considerou-se que as variáveis estudadas apresentam uma distribuição gaussiana e homogeneidade das variâncias. Assim, os testes estatísticos aplicados neste estudo são paramétricos.

O coeficiente de correlação de Pearson ( $r$ ) mostrou um grau de relação linear muito forte entre as variáveis IG e as medidas do fémur, da tíbia e do úmero, pois o valor aproxima-se de 1.

| Osso  | Erro intra-observador<br>(repetibilidade, em %) | Erro inter-observador<br>(reprodutibilidade, em %) |
|-------|-------------------------------------------------|----------------------------------------------------|
| Fêmur | 0.405                                           | 0.61                                               |
| Tíbia | 0.747                                           | 0.86                                               |
| Úmero | 1.091                                           | 1.07                                               |

Tabela I - Valores obtidos para os erros intra e inter-observador nas medições efetuadas

O fato de ser um valor positivo indica que à medida que uma variável aumenta, a outra também aumenta. O valor mais elevado, ou seja, a associação mais forte existe entre o fêmur e a IG ( $r=0,967$ ;  $p=0,000$ ). A correlação entre a IG e o comprimento da tíbia é também muito robusto ( $r=0,959$ ;  $p=0,000$ ) tal como acontece com o úmero ( $r=0,964$ ;  $p=0,000$ ).

O coeficiente de determinação ( $r^2$  Linear) é 0,935 para o fêmur, ou seja, 93,5% da variação do comprimento do fêmur correlaciona-se com a idade gestacional (em semanas). O mesmo acontece para a tíbia (0,919 ou 91,9%) e para o úmero (0,929 ou 92,9%). Pode-se, portanto, concluir que as equações de regressão podem ser de grande utilidade na estimativa da IG a partir do comprimento das diáfises estudadas, visto o valor de  $r^2$  ser muito próximo de 1 [17, 18].

As equações de regressão obtidas neste estudo para cada uma das diáfises estudadas, tendo como objetivo a estimativa da IG em semanas, estão registadas na Tabela II.

Por fim, a nova equação foi comparada com duas fórmulas que utilizam o fêmur (considerado o osso mais diretamente relacionado com o comprimento fetal e com a IG) para estimativa da idade fetal: a de Scheuer e Black, por pertencer a uma obra de referência nesta área, e a de Adalian, por utilizar um método e uma população semelhantes ao presente estudo [11, 19]. Todos os estudos são baseados em imagens radiográficas e utilizaram amostras

identificadas, nomeadamente no que diz respeito à IG. A análise dos resíduos (diferença entre valor calculado e valor real) obtidos pelas três equações mostra que não existem diferenças muito evidentes na predição da IG entre a equação de Adalian e a equação do atual estudo, rondando a média dos resíduos uma diferença de cerca de 1,5 semana entre a IG real e a IG estimada em ambos os casos. A equação de Scheuer e Black apresenta tendência para sobrestimar a IG, sendo a média da diferença entre IG real e estimada de 2,74 semanas.

## DISCUSSÃO

Os resultados obtidos e descritos neste estudo confirmam que existe uma correlação linear alta entre a IG e o comprimento de cada uma das diáfises em estudo. O valor mais elevado foi obtido para o fêmur ( $r=0,967$ ;  $p=0,000$ ), o que indica que a medição desta diáfise é a mais fiável por se relacionar mais com a IG. Esta conclusão vai ao encontro dos resultados obtidos por outros trabalhos nesta área [19-21]. Estes resultados permitiram estabelecer uma equação de regressão para cada osso em estudo, pois os coeficientes de correlação ( $r^2$ ) estão muito próximos de 1, o que corresponde a dizer que o aumento do comprimento das diáfises se correlaciona de forma muito robusta com o aumento da idade gestacional (93,5%

| Osso  | Equação de regressão                                            | Erro |
|-------|-----------------------------------------------------------------|------|
| Fêmur | $IG = 9.020 + (0.365 \times \text{comprimento do fêmur em mm})$ | 0.56 |
| Tíbia | $IG = 8.845 + (0.429 \times \text{comprimento da tíbia em mm})$ | 0.65 |
| Úmero | $IG = 7.215 + (0.445 \times \text{comprimento do úmero em mm})$ | 0.64 |

IG= idade gestacional em semanas

Tabela II - Equações de regressão obtidas para cada um dos três ossos estudados

para o fémur, 91,9% para a tíbia e 92,9% para o úmero).

A nova equação de regressão obtida para o fémur foi comparada com as fórmulas de Scheuer e Black [11] e de Adalian [19], permitindo afirmar que a sua utilização é válida, sendo particularmente importante o facto de ser baseada numa amostra

identificada retirada da população Portuguesa, apresentando todas as condições para poder ser testada numa amostra mais alargada.

Futuramente pretende-se aumentar a amostra e incluir a medição de outros ossos longos. Para além disso, para garantir a possibilidade de aplicação das equações em diferentes cenários, planeia-se testá-las em osso seco.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Cunha, E., Cattaneo, C. Forensic Anthropology and Forensic Pathology: the State of the Art, in Schmitt, A., Cunha, E., Pinheiro, J. Forensic Anthropology and Medicine: complementary sciences from recovery to cause of death. New Jersey: Humana Press; 2006.
2. Ubelaker, D. H. Introduction to Forensic Anthropology in Schmitt, A., Cunha, E., Pinheiro, J. Forensic Anthropology and Medicine: complementary sciences from recovery to cause of death. New Jersey: Humana Press; 2006.
3. Iscan, M. Y. Global Forensic Anthropology in the 21st Century. Forensic Sci Int 2001; 117: 1-6.
4. Cattaneo, C. Forensic Anthropology: developments of a classical discipline in the new millennium. Forensic Science International 2007; 165: 185-193.
5. Cunha, E. Contribuição para el conocimiento del desarrollo actual de la Antropología Forense en Portugal. Cuad Med Forense 2008; 14 (53-54): 201-211.
6. Cattaneo, C., Salsarola, D. Human Remains and Identity. Wiley Encyclopedia of Forensic Science; 2009.
7. Lewis, M. E., Flavel, A. Age Assessment of Child Skeletal Remains in Forensic Contexts, in Schmitt, A., Cunha, E., Pinheiro, J. Forensic Anthropology and Medicine: complementary sciences from recovery to cause of death. New Jersey: Humana Press; 2006.
8. Neves, C. A interrupção da gravidez, os direitos do feto no limiar da viabilidade e a assimetria legislativa na União Europeia. Acta do V Encontro Luso-Brasileiro de Bioética. Porto, 2008.
9. Código Penal 2009 (Internet). Verbo Jurídico, 2009 (acedido a 27 de Novembro de 2010); <http://www.verbojuridico.com/download/codigopenal2009-v1.pdf>
10. Ubelaker, D. H. Estimating Age at Death from Immature Human Skeletons: An Overview. J Forensic Sci 1987; 32 (5): 1254-1263.
11. Scheuer, L., Black, S. Developmental Juvenile Osteology. London: Elsevier; 2000.
12. Fazekas, I. G., Kósa, F. Forensic Fetal Osteology. Budapeste: Akadémiai Kiadó; 1978.
13. Baccino, E., Schmitt, A. Determination of Adult Age at Death in the Forensic Context, in Schmitt, A., Cunha, E., Pinheiro, J. Forensic Anthropology and Medicine: complementary sciences from recovery to cause of death. New Jersey: Humana Press; 2006.
14. Cunha, E., Baccino, E., Martrille, L., Ramsthaler, F., Prieto, J., Schuliar, Y., Lynnerup, N., Cattaneo, C. The problem of aging human remains and living individuals: A review. Forensic Science International 2009; 193: 1-13.
15. Dirkmaat, D. C., Cabo, L. L., Ousley, S. D., Symes, S. A. New Perspectives in Forensic Anthropology. Yearbook of Forensic Anthropology 2008, 51: 33-52.
16. Perini, T. A., Oliveira, G. L., Ornellas, J. S., Oliveira, F. P. Technical Error of measurement in anthropometry. Rev Bras Med Esporte 2005; 11(1): 86-90.
17. Pereira, A. SPSS - Guia prático de utilização, 7ª edição. Lisboa: Edições Sílabo; 2008.
18. Martinez, L. F., Ferreira, A. I. Análise de dados com SPSS: Primeiros passos, 3ª edição. Lisboa: Escolar Editora; 2010.
19. Adalian, P., Piercecchi-Marti, M.-D., Bourliere-Najean, B., Panuel, M., Fredouille, C., Dutour, O., Leonetti, G. Postmortem Assessment of Fetal Diaphyseal Femoral Length: Validation of a Radiographic Methodology. J Forensic Sci 2001; 46 (2): 215-219.
20. Warda, A. H., Deter, R. L., Rossavik, I. K., Carpenter, R. J., Hadlock, F. P. Fetal fémur length: a critical reevaluation of the relationship to menstrual age. Obstetrics and Gynecology, 1985; 66 (1): 69-75.
21. Ziyilan, T., Murshid, K. A. An assessment of femur growth parameters in human fetuses and their relationship to gestacional age. Turk. J. Med. Sci. 2003; 33: 27-32.



# Coloração de May-Grünwald Giemsa em amostras de secreções brônquicas processadas em ThinPrep®: comparação de três métodos de pós-processamento

Ana B. Ferreira<sup>1</sup>, Joana S. Carvalho<sup>1</sup>, Mário M. Matos<sup>1</sup>, Rúben R. Roque<sup>1,2</sup>

1 - Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa - Instituto Politécnico de Lisboa

2 - Instituto Português de Oncologia de Lisboa Francisco Gentil

Correspondência para Joana Carvalho - e-mail: joanavaleviegas@sapo.pt

## RESUMO

O processamento de amostras citológicas em meio líquido e a coloração de May-Grünwald Giemsa (MGG) fazem parte da rotina em anatomia patológica. Na origem desta investigação esteve a possibilidade do uso desta coloração em amostras processadas em ThinPrep® (TP). Estudou-se a fase compreendida entre o processamento de amostras em TP e a coloração com MGG - pós-processamento. O objetivo do estudo consistiu em avaliar diferentes métodos de pós-processamento em amostras de secreções brônquicas processadas pela metodologia TP e coradas com MGG.

Utilizaram-se 32 amostras de secreções brônquicas, processadas em TP. De cada amostra obtiveram-se três lâminas, nas quais se aplicaram três métodos de pós-processamento: secagem ao ar; imersão em solução salina de tampão Tris; imersão em etanol a 96%. Realizou-se a coloração de MGG e as lâminas foram avaliadas por três avaliadores independentes, relativamente à constituição da amostra e qualidade da coloração. Este último parâmetro resultou da soma da pontuação obtida para os detalhes nuclear e citoplasmático (escala de 0 a 4 valores). Aplicaram-se os testes estatísticos One-Way ANOVA ( $p=0,05$ ) e de Tukey.

Para a qualidade de coloração, os métodos imersão em solução tampão, imersão em etanol a 96% e secagem ao ar obtiveram a pontuação média de 2,39 ( $s=1,309$ ), 2,15 ( $s=1,248$ ) e 1,22 ( $s=1,250$ ), respetivamente. Verificou-se que existia diferença estatisticamente significativa entre o método secagem ao ar e os métodos imersão em solução tampão e em etanol a 96% ( $p=,000$ ).

O pós-processamento por secagem ao ar demonstrou qualidade da coloração não aceitável, ou seja pontuação média inferior a 2 valores. Pelo contrário, os pós-processamentos por imersão em solução tampão e em etanol a 96% apresentaram qualidade de coloração aceitável, podendo ser utilizados na rotina laboratorial para coloração com MGG de amostras processadas em TP.

**PALAVRAS-CHAVE:** Amostras citológicas, ThinPrep®, Coloração de May-Grünwald Giemsa, Pós-processamento

## INTRODUÇÃO

O processamento de amostras de ginecologias pela metodologia ThinPrep® tem sido bastante aplicado na última década e sua utilização em amostras de citologia não ginecológica tem ganho popularidade, havendo estudos que referem valores de sensibilidade e especificidade superiores a 90% [1]. Este método apresenta diversas vantagens, reportadas em estudos que o comparam com a utilização de esfregaços convencionais [1-5].

Na generalidade dos laboratórios de Anatomia Patológica (AP), a coloração de Papanicolaou

(PAP) é a mais utilizada em amostras de citologia. Esta coloração é aplicada em lâminas cujas células são previamente fixadas em etanol a 96%, ou outro reagente com características semelhantes [6-7]. Assim, quando uma amostra é processada no ThinPrep®, após a transferência das células para a lâmina, esta é depositada num copo recetor que contém etanol a 96% [3].

Existe outra coloração comumente utilizada em citopatologia - a coloração de May-Grünwald Giemsa (MGG). Tem como característica permitir a visualização de forma pormenorizada de diversas características citoplasmáticas, a evidênciação de material extracelular e a

visualização de microorganismos e é aplicada em lâminas secas ao ar [7-9]. Recentemente foram publicados estudos que reportam a utilização da coloração de MGG em amostras sujeitas ao processamento no ThinPrep®, com obtenção de bons resultados na qualidade final das lâminas [10-11].

O processamento das amostras citológicas no equipamento ThinPrep® e a coloração de MGG são dois procedimentos da técnica citológica que, em conjunto, seriam vantajosos na rotina laboratorial. De forma a investigar esta temática, considerou-se pertinente estudar a fase compreendida entre o processamento no ThinPrep® e a coloração da amostra com MGG, designada por pós-processamento. Esta fase tem como função a preparação das células para a coloração de MGG, após processamento das amostras no ThinPrep®. A questão para a qual se pretendeu obter resposta foi: qual o método de pós-processamento para lâminas processadas no ThinPrep® que permite obter melhor coloração de MGG?

Foram, então, selecionados três métodos de pós-processamento distintos: secagem ao ar, imersão em solução salina de tampão Tris (TBS) e imersão em etanol a 96%. A escolha do método de pós-processamento por secagem ao ar foi devida ao facto de a coloração em causa ser aplicada em lâminas secas ao ar. Para além disso, num estudo efetuado anteriormente, em que se realizou a coloração de MGG em amostras processadas no ThinPrep®, os autores optaram por deixar as lâminas secar ao ar [5]. Por sua vez, a escolha da imersão em solução tampão esteve relacionada com a utilização, no mesmo estudo, de uma solução tampão fosfato de sódio, como primeiro passo da coloração de MGG. Por fim, a utilização de etanol a 96% baseou-se no facto de ser recomendada, pelo fabricante do equipamento ThinPrep®, a imersão da lâmina nessa solução imediatamente após o processamento.

Tendo em conta a questão de investigação formulada, o objetivo geral deste estudo consistiu em avaliar o desempenho dos métodos de pós-processamento por secagem ao ar, imersão em solução tampão e etanol a 96% em amostras de secreções brônquicas processadas no ThinPrep® e coradas com MGG.

Os objetivos específicos foram, entre os três métodos:

1. Comparar a presença de sangue e/ou detritos, muco, microorganismos e estruturas acelulares;
2. Comparar cada parâmetro de avaliação da qualidade da coloração de MGG - detalhe nuclear e detalhe citoplasmático;
3. Comparar as pontuações da qualidade da coloração de MGG;
4. Identificar qual o método que possui a média mais elevada da pontuação da qualidade da coloração de MGG.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Casos em Estudo

Para testar os três métodos de pós-processamento, foram selecionadas amostras de secreções brônquicas. Uma vez que para se realizar o processamento no ThinPrep® as amostras devem ter no mínimo 20 ml, estabeleceu-se como critério de elegibilidade um volume igual ou superior a 15 ml, perfazendo-se até aos 20 ml com metanol sempre que necessário. Foram, então, selecionadas 32 amostras de secreções brônquicas fixadas em PreservCyt®, que tivessem volume igual ou superior a 15 ml e cujas lâminas de arquivo apresentassem boa celularidade.

### Procedimento Experimental

O processamento foi realizado no processador ThinPrep® 2000 da mesma forma para todas as amostras, seguindo as indicações do fabricante. O copo recetor da lâmina encontrava-se vazio (Lâminas A), com solução tampão (Lâminas B) ou com etanol a 96% (Lâminas C), consoante o método de pós-processamento a aplicar.

Depois de serem retiradas do processador, as lâminas foram sujeitas aos métodos de pós-processamento. As lâminas A secaram ao ar à temperatura ambiente no mínimo durante 10 minutos, as B permaneceram 30 segundos no copo recetor com solução tampão e as C ficaram 10 minutos num recipiente com etanol a 96%. Tanto as lâminas B como as C secaram ao ar à temperatura ambiente, no mínimo durante 10 minutos. Todas as lâminas foram coradas e montadas no equipamento Tissue-Tek® Prisma®/Film®, da Sakura®.

### Recolha de Dados

As lâminas foram avaliadas ao microscópio ótico, com recurso a uma grelha de avaliação, tendo em conta os parâmetros: presença de sangue e/ou detritos, muco, microorganismos e estruturas acelulares, detalhes nuclear e citoplasmático e qualidade da coloração de MGG (Tabela I).

Por forma a avaliar se o instrumento de medida construído era adequado ao objeto de estudo, foi realizado um pré-teste ao mesmo. O pré-teste permitiu também reduzir a influência da variabilidade inter-observador.

Foram selecionados três observadores, técnicos de AP experientes na observação microscópica de lâminas de amostras processadas no ThinPrep® e de lâminas de secreções brônquicas, pertencentes ao mesmo serviço de AP.

Uma vez que se consideraram independentes as observações dos três observadores, foi obtido um total de 288 eventos.

| Avaliação da amostra          |   |                                                                                                                                                                                                                                                                 |
|-------------------------------|---|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Sangue e/ou detritos          | 0 | Ausente(s).                                                                                                                                                                                                                                                     |
|                               | 1 | Presente(s), que obscurece(m) a avaliação.                                                                                                                                                                                                                      |
|                               | 2 | Presente(s), que não obscurece(m) a avaliação.                                                                                                                                                                                                                  |
| Muco                          | 0 | Ausente.                                                                                                                                                                                                                                                        |
|                               | 1 | Presente em quantidade moderada.                                                                                                                                                                                                                                |
|                               | 2 | Presente em quantidade abundante.                                                                                                                                                                                                                               |
| Micro-organismos              | 0 | Ausentes.                                                                                                                                                                                                                                                       |
|                               | 1 | Presentes, corados de forma inadequada. Ou seja, não é possível distinguir claramente a sua forma e/ou particularidades.                                                                                                                                        |
|                               | 2 | Presentes, corados de forma adequada. Ou seja, é possível distinguir claramente a sua forma e particularidades.                                                                                                                                                 |
| Estruturas acelulares         | 0 | Ausentes.                                                                                                                                                                                                                                                       |
|                               | 1 | Presentes, corados de forma inadequada. Ou seja, não é possível distinguir claramente a sua forma e/ou particularidades.                                                                                                                                        |
|                               | 2 | Presentes, corados de forma adequada. Ou seja, é possível distinguir claramente a sua forma e particularidades.                                                                                                                                                 |
| Avaliação da coloração de MGG |   |                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| Detalhe nuclear               | 0 | Inadequado. Ou seja, não se distingue de forma clara o padrão de cromatina nem se identifica a membrana nuclear.                                                                                                                                                |
|                               | 1 | Moderadamente adequado. Ou seja, não é possível distinguir claramente o padrão de cromatina ou identificar a membrana nuclear.                                                                                                                                  |
|                               | 2 | Totalmente adequado. Ou seja, é possível distinguir claramente o padrão de cromatina e identificar a membrana nuclear.                                                                                                                                          |
| Detalhe citoplasmático        | 0 | Inadequado. Ou seja, não se distingue de forma clara os limites nem as particularidades do citoplasma (como por exemplo a vacuolização nos macrófagos e nas células caliciformes ou a presença de placa terminal e de cílios nas células cilíndricas ciliadas). |
|                               | 1 | Moderadamente adequado. Ou seja, não é possível distinguir claramente os limites do citoplasma ou as particularidades do mesmo.                                                                                                                                 |
|                               | 2 | Totalmente adequado. Ou seja, permite distinguir de forma clara os limites do citoplasma e as particularidades do mesmo.                                                                                                                                        |

Tabela 1 - Grelha de avaliação e respetiva legenda

### Procedimentos Estatísticos

Definiu-se a variável aleatória qualidade da coloração de MGG como a soma da pontuação obtida nos parâmetros detalhe nuclear e detalhe citoplasmático, podendo a mesma tomar valores entre 0 e 4.

Os parâmetros da avaliação da amostra não foram tidos em conta para a qualidade da coloração de MGG, na medida em que, como os mesmos poderiam não estar presentes nas amostras, poderia surgir algum enviesamento de resultados.

Estabeleceu-se um valor limite, ou *cut-off*, para a classificação da qualidade da coloração. Determinou-se que uma qualidade aceitável da coloração não deveria admitir nenhum dos dois parâmetros avaliados com valor 0 - "Inadequado" -, tendo obrigatoriamente uma pontuação igual ou superior a 2.

Foi efetuada análise descritiva dos dados e aplicado o teste paramétrico One-Way ANOVA. De modo a identificar quais as médias que diferiam significativamente entre si, utilizou-se o post-hoc de Tukey.

Para verificar se, de entre os métodos de pós-processamento estudados, algum possuía uma média mais elevada de pontuações, foi obtido um gráfico de médias.

## RESULTADOS

### Avaliação da Amostra

Relativamente ao parâmetro sangue e/ou detritos, verificou-se que nos três métodos de pós-processamento houve maior frequência absoluta de observações "Presente, que obscurece a avaliação" e menor de observações "Presente, que não obscurece a avaliação". Para além disso, constatou-se que o método de pós-processamento por imersão em solução tampão foi o que apresentou maior frequência absoluta de observações "Presente, que não obscurece a avaliação".

No caso do parâmetro muco, os três métodos de pós-processamento apresentaram maior frequência absoluta de observações "Presente, em quantidade moderada" e menor de observações "Presente, em quantidade abundante".

Maioritariamente, todos os métodos permitiram, uma coloração adequada dos microorganismos.

A influência do pós-processamento na evidenciação das estruturas acelulares não difere de método para método. No entanto, os métodos estudados não propiciaram, na maioria dos casos observados, uma coloração adequada das estruturas.

### Avaliação da Coloração de MGG: Detalhe Nuclear e Detalhe Citoplasmático

Relativamente ao parâmetro detalhe nuclear, constatou-se que o método de pós-processamento por secagem ao ar apresentou maior frequência absoluta de observações "Moderadamente adequado". No caso do método de pós-processamento por imersão em solução tampão, houve maior frequência absoluta de observações "Totalmente adequado" e o pós-processamento por imersão em etanol a 96% apresentou maior frequência absoluta de observações "Moderadamente adequado" (Gráfico I, A).

Quanto ao parâmetro detalhe citoplasmático, verificou-se que o método de pós-processamento por secagem ao ar apresentou maior frequência absoluta de observações "Inadequado" e os métodos por imersão em solução tampão e por imersão em etanol a 96% obtiveram maior frequência absoluta de observações "Moderadamente adequado" (Gráfico I, B).

Nos métodos de pós-processamento em estudo, constatou-se que em nenhuma observação se considerou em simultâneo o detalhe nuclear como "Totalmente adequado" e o detalhe citoplasmático como "Inadequado", e vice-versa. Assim, foi possível considerar, para a qualidade da coloração de MGG, dois pontos como o valor mínimo para a sua aceitação.

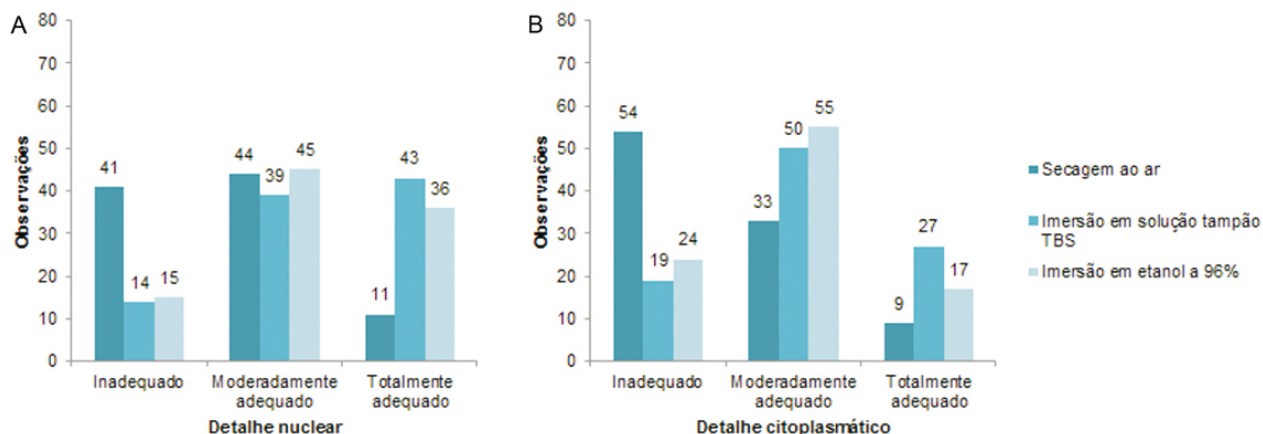


Gráfico I - A: Frequências absolutas das observações para o parâmetro detalhe nuclear

B: Frequências absolutas das observações para o parâmetro detalhe citoplasmático

No método de pós-processamento por secagem ao ar, houve maior frequência absoluta de observações em que se consideraram ambos os detalhes “Inadequado” (38 observações em 96 possíveis).

No método de pós-processamento por imersão em solução tampão, houve maior frequência absoluta de observações em que se consideraram ambos os detalhes “Moderadamente adequado” (30 em 96). No entanto, o número de observações em que ambos os detalhes foram considerados “Totalmente adequado” foi bastante próximo ao anterior (27 em 96).

Quanto ao método de pós-processamento por imersão em etanol a 96%, também houve maior frequência absoluta de observações em que se consideraram ambos os detalhes “Moderadamente adequado” (33 em 96).

### Avaliação da Coloração de MGG: Qualidade da Coloração de MGG

Verificaram-se diferenças na qualidade da coloração de MGG consoante o método de pós-processamento aplicado, pois o método de pós-processamento por secagem ao ar levou à obtenção de maior número de observações classificadas como “Qualidade da coloração de MGG não aceitável” (57 em 96) e os métodos por imersão em solução tampão e por imersão em etanol a 96% permitiram obter, maioritariamente, “Qualidade da coloração de MGG aceitável” (73 em 96 e 69 em 96, respetivamente) (Gráfico II). As Figuras 1, 2 e 3 evidenciam a qualidade da coloração de MGG nas células das lâminas submetidas a pós-processamento por secagem ao ar, por imersão em solução tampão e por imersão em etanol a 96%, respetivamente.

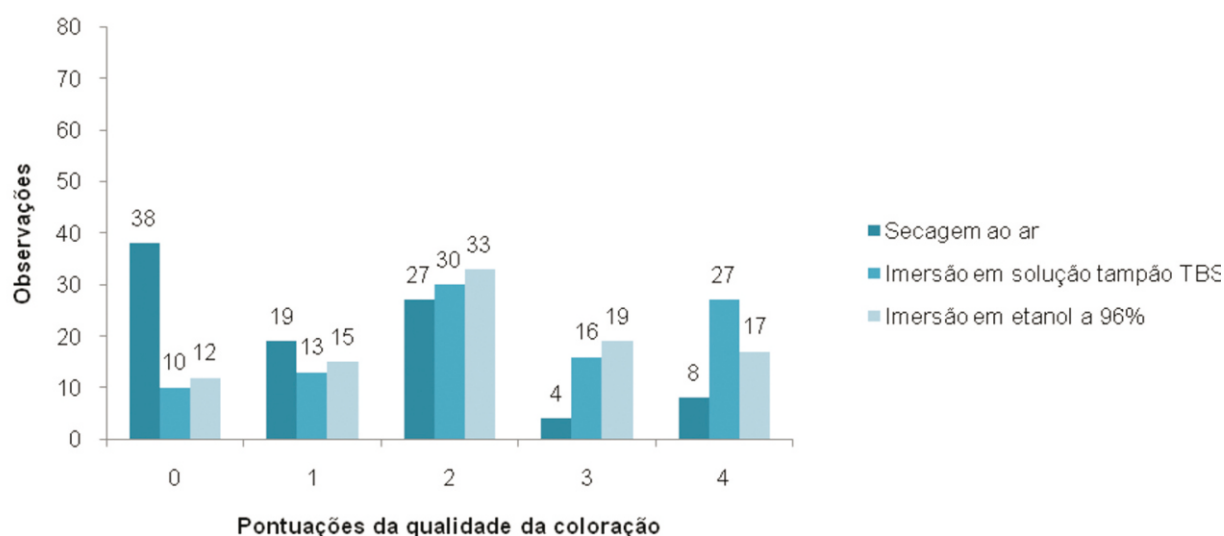


Gráfico II - Frequências absolutas das pontuações da qualidade da coloração de MGG

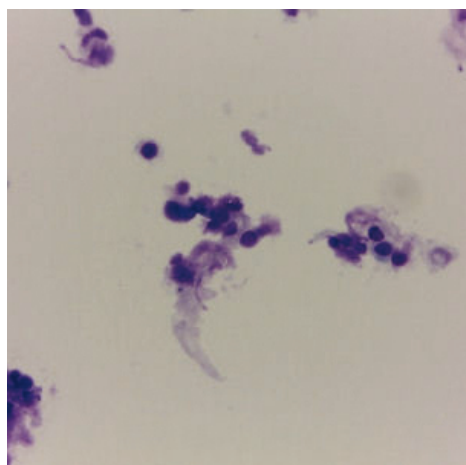


Figura 1 - Células submetidas a pós-processamento por secagem ao ar (MGG, 400x)

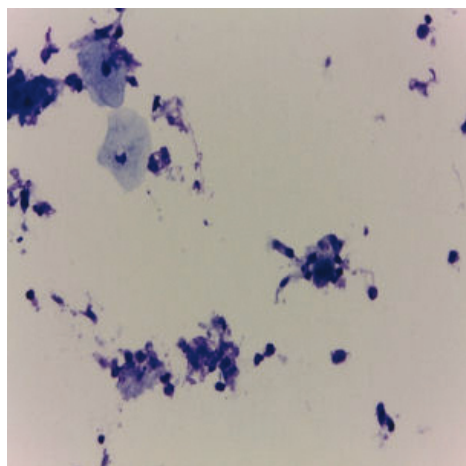


Figura 2 - Células submetidas a pós-processamento por imersão em solução tampão TBS (MGG, 400x)

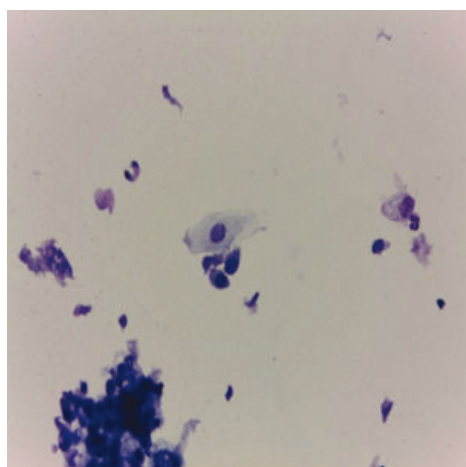


Figura 3 - Células submetidas a pós-processamento por imersão em etanol a 96% (MGG, 400x)

Para além disso, verificou-se que o método de pós-processamento por imersão em solução tampão apresenta a média de pontuação da qualidade da coloração de MGG mais elevada e o método por secagem ao ar apresenta a média mais baixa (Gráfico III).



Gráfico III - Gráfico de médias da qualidade da coloração de MGG

As diferenças na qualidade da coloração de cada método de pós-processamento são estatisticamente significativas ( $\alpha = 0,05$ ). O teste de Tukey permitiu identificar que existiam diferenças estatisticamente significativas entre o método de pós-processamento por secagem ao ar e os métodos de pós-processamento por imersão em solução tampão e por imersão em etanol a 96%.

No entanto, não existem diferenças estatisticamente significativas entre o método de pós-processamento por imersão em solução tampão e o método de pós-processamento por imersão em etanol a 96%.

## DISCUSSÃO

Verificou-se que os métodos de pós-processamento estudados não têm uma elevada influência nos parâmetros da avaliação da amostra. No que diz respeito à avaliação da coloração de MGG, o método de pós-processamento por imersão em solução tampão foi o método que permitiu obter melhores resultados.

No entanto, como os métodos de imersão em solução tampão e de imersão em etanol a 96% apresentaram uma qualidade de coloração aceitável e não diferiram entre si de forma estatisticamente significativa, ambos poderão ser utilizados na rotina laboratorial.

Importa referir que os autores consideraram que a escassa literatura relacionada com as temáticas abordadas neste estudo dificultou a comparação dos resultados obtidos com os de outros estudos realizados.

De acordo com as conclusões desta investigação, considera-se que seria interessante analisar outros métodos de pós-processamento, comparando-os com os estudados. Para além disso, a aplicação dos mesmos métodos de pós-processamento utilizando outro tipo de amostras citológicas, nomeadamente de citologia aspirativa por agulha fina, poderia trazer outras conclusões relevantes.

### Agradecimentos

Aos observadores das lâminas e aos que realizaram o pré-teste da grelha de avaliação, Doutora Paula Borralho, Técnica Rita Sousa, Técnica Andreia Adriano, Técnica Carla Pinheiro e Técnica Maria José Praça.

Ao Professor Amadeu Ferro e à Professora Carina Fortes, pelo esclarecimento de diversas dúvidas. Ao Laboratório de Citopatologia do Instituto Português de Oncologia de Lisboa Francisco Gentil pelo apoio prestado.

Por fim, à Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa, nomeadamente na pessoa da Professora Paula Mendonça, pela autorização da utilização do Laboratório de Microscopia.

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Anninos D, Brountzos E, Christoni Z, Georgoulakis J, Karakitsos P, Panayiotides J et al. The role of liquid-based cytology in the investigation of thyroid lesions. *Cytopathology* 2008;19(1):11-18.
2. Hoda R. Non-Gynecologic Cytology on Liquid-Based Preparations: A Morphologic Review of Facts and Artifacts. *Diagn Cytopathol* 2007;35(10):621-634.
3. Bell V, Chiu B, Leung C. Comparison of ThinPrep and Conventional Preparations: Nongynecologic Cytology Evaluation. *Diagn Cytopathol* 1996;16(4):368-371.
4. Duncan L, Forrest L, Jr W, Hubbard E, Stewart, L. Evaluation of Thyroid Fine-Needle Aspirations: Can ThinPrep Be Used Exclusively to Appropriately Triage Patients Having a Thyroid Nodule? *Diagn Cytopathol* 2010;39(5):341-8.
5. Cochand-Priollet B, Dahan H, Polivka M, Prat J, Thienpont L, Wassef M et al. Thyroid fine needle aspiration: the morphological features on ThinPrep slide preparations. Eighty cases with histological control. *Cytopathology* 2003;14(6):343-9.
6. Bibbo M, Wilbur D. *Comprehensive Cytopathology*. 3ª ed. Reino Unido: Saunders Elsevier; 2008.
7. Keebler C, Somrak T. *The manual of cytotechnology*. 7ª ed. Hong Kong: ASCP Press; 1993.
8. Orell S, Sterrett G, Walters M, Whitaker D. *Manual and atlas of fine needle aspiration cytology*. 1ª ed. Hong Kong: Churchill Livingstone; 1986.
9. Brauer E, Bruggeman C, Drent M, Jacobs J, Nieman F. Test Characteristics of Acridine Orange, Gram, and May-Grünwald Giemsa Stains for Enumeration of Intracellular Organisms in Bronchoalveolar Lavage Fluid. *J Clin Microbiol* 1999;37(2):427-429.
10. Mygdakos N, Nikolaidou S, Tamiolakis D, Tzivilaki A. Liquid Based Preparation (LBP) cytology versus Conventional Cytology (CS) in FNA samples from breast, thyroid, salivary glands and soft tissues. Our experience in Crete (Greece). *Rom J Morphol Embryol* 2009;50(2):245-520.
11. Alfaro M, Bratti M, Castle P, Dunn S, Herrero R, Hildesheim, A et al. Stability of archived liquid-based cervical cytologic specimens. *Cancer* 2003;99(2):89-96.

# GRUPO INTERESSE EM MACROSCOPIA

---



Caros colegas,

No sentido de ajustar o interesse científico em Anatomia Patológica e em conciliação com as necessidades exigidas pela realidade desta ciência e as conquistas alcançadas pelos técnicos de Anatomia Patológica, considerou-se pertinente e necessária a criação de um grupo dedicado à partilha de conhecimentos científicos nos domínios da área de macroscopia.



A área de macroscopia reflecte a raiz da Anatomia Patológica retratando o início desta ciência, sendo, por isso, de extrema importância a certificação, credibilidade, dedicação e formação contínua dos seus intervenientes.

Este grupo e todos os seus frutos, nomeadamente cursos e formações, contribuirão fortemente para o desenvolvimento pedagógico e científico de todos os interessados, essencialmente daqueles que praticam as suas actividades na área da macroscopia.



Deste modo, aguardamos a sua participação e interesse nos nossos projectos, contribuindo para o desenvolvimento e enriquecimento da área de macroscopia.

Os melhores cumprimentos,

## Grupo de Interesse em Macroscopia

Ana Margarida Santos

Ana Marques

Filipa Antunes

João Palma

Leontino Lampreia

Luís Antunes

Marta Cordeiro

Nélia Nunes

Rute Matos





# Comparação da Fixação em Formalina e em Fixador Molecular e sua Influência em Técnicas Histoquímicas em Tecido Hepático

Ana Catarina Correia<sup>1</sup>, Susana Patrícia Mendonça<sup>1</sup> e Carina Ladeira<sup>1,2</sup>

1 - Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa, Instituto Politécnico de Lisboa

2 - Centro de Investigação e Estudos em Saúde Pública, Universidade Nova de Lisboa

Correspondência para Carina Ladeira - e-mail: carina.ladeira@estesl.ipl.pt

## RESUMO

A Formalina 10% Tamponada (FNT 10%) é considerada o fixador de eleição nos Laboratórios de Anatomia Patológica. Contudo, a exposição a esta substância acarreta riscos para a saúde dos técnicos. A International Agency for Research on Cancer (IARC) classificou-a como cancerígeno humano e estudos relevam uma correlação positiva entre a exposição a formaldeído e o desenvolvimento de leucemia e leucemia mielóide. Torna-se relevante alterar o processo de fixação substituindo a FNT 10% por outros fixadores melhorando estas questões.

Como tal, desenvolveram-se fixadores à base de outros compostos químicos que não formaldeído, como o Fixador Molecular Universal (UMFIX) que tem como base metanol e polietilenoglicol e que é usualmente utilizado com um processador rápido de micro-ondas.

Pretende-se comparar as diferenças entre a fixação por FNT 10% e a fixação por UMFIX, em tecido hepático processado em processador rápido de micro-ondas, para as colorações de Hematoxilina-Eosina (H&E), Tricrómio de Gomori, Reticulina e PAS, através da qualidade final das lâminas testadas.

A coloração de H&E foi a única que apresentou diferenças estatisticamente significativas entre os dois fixadores ( $p=0,032$ ;  $\alpha<0,05$ ; Mann-Whitney). O UMFIX apresenta-se como um substituto da FNT 10% para o processamento rápido em micro-ondas, pois além de apresentar lâminas com uma qualidade final semelhante ou superior às da FNT 10%, ultrapassa os riscos referidos.

**PALAVRAS-CHAVE:** FNT 10%, UMFIX, Hematoxilina-Eosina, Tricrómio de Gomori, Reticulina, PAS

## INTRODUÇÃO

A primeira etapa da técnica histológica denomina-se fixação, e é essencial para a realização de todos os passos subsequentes. Os tecidos vivos quando retirados do seu meio natural iniciam processos de degradação, como a autólise e a putrefação, sendo por isso imprescindível interromper estes processos, já que estes não são reversíveis, de forma a preservar os tecidos. Assim, a fixação tem como objetivo recriar nos tecidos as condições do seu meio de origem, tentando que o tecido visto ao microscópio, após a técnica histológica, possua as mesmas características que teria no estado *in vivo* [4-7].

O fixador de eleição nos Laboratórios de Anatomia Patológica (AP) é o formaldeído, por ser o mais conhecido no meio hospitalar, o menos dispendioso e de mais fácil obtenção. Este é um gás incolor, muito inflamável que quando solubilizado em água (até 40%) denomina-se formalina. Ao sofrer reações químicas, torna-se ácida, deteriorando as

colorações, nomeadamente histoquímicas, sendo necessária a utilização de Formalina Tamponada a 10% (FNT 10%) [2-6, 8-12].

Problemas associados a este fixador, como riscos para a saúde e degradação de RNA têm vindo a despertar nos investigadores a vontade de otimizar o processo de fixação substituindo a FNT 10% por outros fixadores, melhorando concomitantemente a higiene e segurança dentro dos Laboratórios de AP [6,13].

Assim, foram concebidos fixadores à base de outros compostos químicos que não o formaldeído, como é o caso do fixador molecular universal (UMFIX). Este fixador tem como base metanol e polietilenoglicol e, normalmente, é utilizado com um processador rápido de micro-ondas [5,13-14]. A sua grande desvantagem, comparativamente com a FNT 10%, é o seu elevado custo [3,4,15].

É colocada a questão de baixo custo *versus* segurança, devendo a escolha basear-se nas necessidades, volume de trabalho e equipamentos de segurança disponíveis no serviço.

Existe escassa literatura acerca do UMFIX relativamente aos seus efeitos nos tecidos, nas etapas seguintes da técnica histológica, nomeadamente nas colorações especiais e de rotina Hematoxilina-Eosina (H&E) e, finalmente em relação a medidas de segurança. Marcas que comercializam este produto, como é o caso da Sakura®, referem que este fixador apresenta ótimos resultados em colorações especiais, de rotina, Imunohistoquímica (IHQ) e técnicas de Biologia Molecular [2,12,15].

Assim, propôs-se analisar a influência de cada fixador, aliado ao processador Tissue-Tek® Xpress® x120 da Sakura®, nas colorações de H&E e de histoquímica. A escolha residiu em tecido hepático por apresentar características que permitem utilizar várias colorações, ser de fácil obtenção e manuseamento. Desta forma, foi também necessário que as colorações histoquímicas tivessem pertinência no diagnóstico de patologias associadas a este tecido, decidindo-se testar as colorações histoquímicas que geralmente se aplicam rotineiramente às biopsias hepáticas: Tricrómio de Gomori, para reconhecer o grau de fibrose em patologias como a hepatite B e C, doença do fígado gordo, doença alcoólica do fígado e doenças biliares crónicas; Modificação da Coloração de Gomori e Snook, de modo a demonstrar o grau de necrose celular presente; e, a coloração de Periodic Acid Schiff (PAS), que revela a presença de glóbulos alpha-1 antitripsina nos hepatócitos, células de armazenamento nas doenças de Gaucher e Niemann-Pick e ainda anormalidades na membrana basal do ducto biliar em doenças biliares [4,16-24].

Questiona-se então se a qualidade final das lâminas fixadas com UMFIX será menor, igual ou maior quando comparada com as lâminas de tecidos fixados em FNT 10%, em processamento rápido de micro-ondas.

## MATERIALE MÉTODOS

Foi selecionado tecido hepático de vários suínos como amostra, cujo tempo decorrido entre a sua morte e a fixação foi de 24 horas. Retirou-se 10 amostras para cada coloração a realizar, perfazendo um total de 40 amostras diferentes tendo cada as dimensões de 2cm de comprimento por 2cm de largura por 0,4cm de espessura. Todas as amostras foram processadas no Tissue-Tek® Xpress® x120 da Sakura® e foram incluídas em parafina. Foi efetuado um bloco histológico para cada amostra, a partir do qual foram obtidas duas secções, uma para cada coloração. Ao todo foram preparadas 80 secções histológicas que se constituíram como unidades de análise. O corte histológico de todos os blocos em estudo foi realizado de forma sucessiva, tendo sido utilizado o mesmo micróto mo definido para corte com espessura de 2 µm. As colorações histoquímicas foram realizadas no Tissue - Tek® Prisma™/Film™ da Sakura®. Optou-se por realizar 4 colorações: PAS (Periodic Acid-Schiff (PAS) Stain Kit, Artisan™ código AR165), Reticulina/ Fast Red (Reticuline/ Nuclear Fast Red Stain Kit, Artisan™ código AR179), Tricrómio de Gomori (Gomori's Green Trichome Stain Kit, Artisan™ código AR166) e H&E para cada um dos fixadores (FNT 10% e UMFIX). Em conjunto com as lâminas de coloração histoquímica seguiram também 3 lâminas com um corte de fígado de blocos-teste, uma para cada coloração histoquímica, destinada a servir como lâmina-controlo. Para eliminar a maior quantidade possível de variáveis, foram utilizados aparelhos de coloração H&E e coloração histoquímica automatizados [25,26].

A avaliação das lâminas foi efetuada por três observadores independentes. Quantificou-se a qualidade final de cada uma das lâminas, para cada coloração, pela sua observação microscópica e com recurso a uma tabela de avaliação. Cada parâmetro obteve uma pontuação entre 0 e 4 (Tabela I).

| <b>Parâmetros H&amp;E</b>                | <b>Preservação da arquitetura celular</b>                                                                                                                                                                                 | <b>Coloração nuclear</b>                   | <b>Coloração citoplasmática</b>                 | <b>Presença de artefactos</b> | <b>Retração celular</b> | <b>Contraste entre as cores</b> |
|------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------|-------------------------------------------------|-------------------------------|-------------------------|---------------------------------|
| <b>Parâmetros Técnicas Histoquímicas</b> | <b>Preservação da arquitetura celular</b>                                                                                                                                                                                 | <b>Coloração de estruturas específicas</b> | <b>Coloração de outras estruturas celulares</b> | <b>Presença de artefactos</b> | <b>Retração celular</b> | <b>Contraste entre as cores</b> |
| <b>Factor de Ponderação</b>              | 3/4                                                                                                                                                                                                                       | 1                                          | 1                                               | 1/2                           | 3/4                     | 1                               |
| <b>Algoritmo</b>                         | Contraste de coloração + Coloração nuclear/estruturas específicas + Coloração citoplasmática/outras + (3/4 x Preservação da arquitetura) + (3/4 x Retração celular) + (1/2 x Presença de artefactos) = <i>Score</i> Final |                                            |                                                 |                               |                         |                                 |

Tabela I - Parâmetros, Factores de Ponderação e Algoritmo utilizados

Efetuu-se a análise dos resultados através do software informático de análise estatística informático IBM® SPSS® Statistics 20.0. Foi aplicado o teste estatístico de hipóteses de Mann-Whitney ( $\alpha=0,05$ ).

## RESULTADOS

Os *scores* finais foram introduzidos no programa estatístico IBM SPSS Statistic 20.0 e calcularam-se como medidas de dispersão os mínimos e máximos; como medida de tendência central calculou-se a mediana e calculou-se a dispersão quartal como medida de posição para cada um dos tipos de fixador e para cada uma das colorações (Tabela II).

Para a coloração de H&E o mínimo obtido na fixação com UMFIX foi de 15,5 e de 16,5 na fixação com FNT 10% enquanto os máximos obtidos foram de 20,0 (UMFIX) e de 18,0 (FNT 10%). A mediana relativa à FNT 10% foi de 16,5 e ao UMFIX foi de 18,0, tendo assim tido os totais mais elevados no geral. No entanto, para os dois fixadores, os resultados obtidos foram bastante próximos, sendo os valores da dispersão quartal baixos.

Na coloração de Tricrómio de Gomori o mínimo obtido foi 0,0 (FNT 10%) e de 10,5 (UMFIX), enquanto os máximos foram de 18,0 e 19,0 respetivamente. A média das medianas para o UMFIX foi mais elevada que a da FNT 10%, tendo-se assim considerado que o UMFIX originou

melhores resultados.

Quanto à coloração Reticulina os mínimos foram de 12,0 (UMFIX) e de 13,5 (FNT 10%) enquanto os máximos foram de 20,0 e de 19,0 respetivamente.

O mínimo obtido para a coloração PAS foi 12,0 (FNT 10%) e 12,5 (UMFIX) enquanto o máximo foi 16,5 e 17,0 respetivamente. A média das medianas foi novamente mais elevada para o UMFIX, nas duas últimas colorações.

Em seguida, foi realizada a inferência estatística, de forma a comparar as classificações obtidas pelas colorações dependendo do tipo de fixador utilizado, para verificar se algum dos dois fixadores possui classificações mais elevadas que o outro. Para tal, utilizou-se o teste estatístico de Mann-Whitney (Tabela III). No caso em estudo, pretende-se comparar apenas os resultados obtidos entre os dois fixadores, para cada coloração.

Pode-se verificar que os únicos valores *p* inferiores ao nível de significância (0,05) são os da coloração de H&E para o observador 1 ( $p=0,032$ ) e para o observador 2 ( $p=0,032$ ), rejeitando-se assim a hipótese nula para estes dois casos, e aceitando-se para os casos restantes.

Verifica-se assim apenas a existência de diferenças estatisticamente significativas nas classificações atribuídas às lâminas coradas com H&E entre os dois fixadores onde o UMFIX apresentou melhores resultados.

| Coloração por Observador | Tipo de Fixador |      |         |                   |       |      |         |                   |
|--------------------------|-----------------|------|---------|-------------------|-------|------|---------|-------------------|
|                          | 10% NBF         |      |         |                   | UMFIX |      |         |                   |
|                          | Min.            | Max. | Mediana | Dispersão quartal | Min.  | Max. | Mediana | Dispersão quartal |
| HEO1                     | 16,5            | 18,0 | 16,5    | 0,0               | 18,0  | 18,0 | 18,0    | 0,0               |
| HEO2                     | 16,5            | 18,0 | 16,5    | 0,0               | 18,0  | 18,0 | 18,0    | 0,0               |
| HEO3                     | 16,5            | 16,5 | 16,5    | 0,0               | 15,5  | 20,0 | 18,0    | 2,0               |
| TGO1                     | 0,0             | 18,0 | 16,5    | 1,0               | 13,5  | 19,0 | 15,0    | 1,5               |
| TGO2                     | 0,0             | 18,0 | 16,5    | 1,0               | 13,5  | 19,0 | 15,0    | 1,5               |
| TGO3                     | 0,0             | 14,0 | 12,0    | 12,5              | 10,5  | 18,0 | 15,5    | 5,0               |
| RO1                      | 16,5            | 19,0 | 18,0    | 2,5               | 13,0  | 20,0 | 19,0    | 1,0               |
| RO2                      | 16,5            | 19,0 | 18,0    | 2,5               | 13,0  | 20,0 | 19,0    | 1,0               |
| RO3                      | 13,5            | 19,0 | 14,5    | 2,0               | 12,0  | 18,0 | 15,0    | 1,5               |
| PAO1                     | 14,5            | 16,5 | 14,5    | 1,5               | 16,0  | 17,0 | 16,0    | 0,5               |
| PAO2                     | 14,5            | 16,5 | 14,5    | 1,5               | 16,0  | 17,0 | 16,0    | 0,5               |
| PAO3                     | 12,0            | 16,0 | 15,5    | 2,0               | 12,5  | 17,0 | 17,0    | 3,0               |

Tabela II - Mínimos, máximos, medianas e dispersões quartais calculadas a partir dos *scores* finais para cada fixador e para cada observador. Legenda: HE - Hematoxilina-Eosina, TG - Tricrómio de Gomori, R - Reticulina, PA - PAS, O-Observador

## Resumo Teste de Hipóteses

|   | Hipótese Nula                                                        | Sig.              |    | Hipótese Nula                                                        | Sig.              |
|---|----------------------------------------------------------------------|-------------------|----|----------------------------------------------------------------------|-------------------|
| 1 | A distribuição de HEO1 é igual dentro da categoria do mesmo fixador. | ,032 <sup>1</sup> | 7  | A distribuição de RO1 é igual dentro da categoria do mesmo fixador.  | ,548 <sup>1</sup> |
| 2 | A distribuição de HEO2 é igual dentro da categoria do mesmo fixador. | ,032 <sup>1</sup> | 8  | A distribuição de RO2 é igual dentro da categoria do mesmo fixador.  | ,548 <sup>1</sup> |
| 3 | A distribuição de HEO3 é igual dentro da categoria do mesmo fixador. | ,151 <sup>1</sup> | 9  | A distribuição de RO3 é igual dentro da categoria do mesmo fixador.  | ,690 <sup>1</sup> |
| 4 | A distribuição de TGO1 é igual dentro da categoria do mesmo fixador. | ,548 <sup>1</sup> | 10 | A distribuição de PAO1 é igual dentro da categoria do mesmo fixador. | ,151 <sup>1</sup> |
| 5 | A distribuição de TGO2 é igual dentro da categoria do mesmo fixador. | ,548 <sup>1</sup> | 11 | A distribuição de PAO2 é igual dentro da categoria do mesmo fixador. | ,151 <sup>1</sup> |
| 6 | A distribuição de TGO3 é igual dentro da categoria do mesmo fixador. | ,151 <sup>1</sup> | 12 | A distribuição de PAO3 é igual dentro da categoria do mesmo fixador. | ,310 <sup>1</sup> |

Significâncias assintóticas são demonstradas.

O nível de significância é ,05.

Tabela III - Teste de Hipóteses de Mann-Whitney para classificações atribuídas pelos 3 avaliadores às lâminas fixadas com 10% NBF e UMFIX, respectivamente, para todas as colorações efetuadas.  
 Legenda: HE - Hematoxilina-Eosina, TG - Tricrômio de Gomori, R - Reticulina, PA - PAS, O-Observador

## DISCUSSÃO

Embora a preservação histomorfológica que o UMFIX faculta não seja idêntica à da FNT 10%, é relatado que essas diferenças são *minor*. É descrito que o UMFIX apresenta um brilho mais intenso na coloração de H&E, o que não afeta o estabelecimento de um diagnóstico correto [2,27]. Contudo, é preciso ter em consideração que os fixadores aldeídos, como a FNT 10%, têm sido utilizados ao longo dos anos, proporcionando a familiarização das suas propriedades histopatológicas por parte de médicos-patologistas e de técnicos de AP, podendo dificultar a avaliação de lâminas fixadas com UMFIX.

Sabe-se que os fixadores coagulantes (como o UMFIX) conferem maior porosidade ao tecido que os fixadores não coagulantes (como o formaldeído). Assim, os fixadores coagulantes são benéficos para a impregnação em parafina, pois as suas moléculas penetram mais facilmente o tecido. Contrariamente, o *cross-linking* das pontes de metileno que ocorre devido à ação do formaldeído torna mais difícil a penetração de parafina [7].

Os resultados obtidos indicam que o FNT 10% confere bons resultados para todas as colorações realizadas [7]. No entanto, para este fixador, as classificações atribuídas à coloração de H&E

foram as mais elevadas, contrastando com os valores mais baixos da classificação da qualidade das colorações atribuídos à coloração de Tricrômio de Gomori. Esta diferença pode dever-se ao facto dos técnicos e patologistas estarem familiarizados com a coloração de H&E, fixada com FNT 10% por ser uma coloração de rotina. Tendo em conta que a coloração de Tricrômio de Gomori assenta na conjugação da permeabilidade do tecido com o tamanho das moléculas de corante e que a FNT 10% não torna o tecido muito permeável, as baixas classificações atribuídas (*score* 0.0) ao parâmetro da coloração das estruturas específicas e coloração de outras estruturas podem dever-se ao facto da malha proteica estar menos permeável. A fixação com formaldeído também cria *cross-linking* entre as pontes de metileno, logo as moléculas de corante têm maior dificuldade em atingir as células alvo, podendo diminuir a qualidade desta coloração [28].

Para a fixação com UMFIX, os observadores atribuíram resultados mais homogêneos entre as colorações, como esperado, já que este sendo um fixador coagulante não irá apresentar as mesmas limitações na coloração de Tricrômio de Gomori que ocorre com a fixação com formaldeído (Figura 1).

Quando comparando as classificações entre os dois fixadores, verifica-se que as classificações

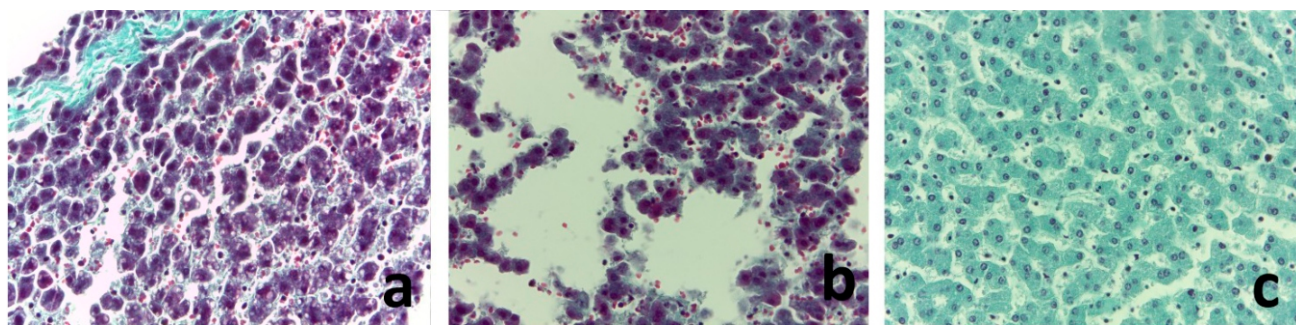


Figura 1 - a) Lâmina Tricrômio de Gomori fixada com FNT 10% cujo score foi de 0.0, sendo notória a presença de muitos artefactos (400x)  
b) Lâmina Tricrômio de Gomori fixada com FNT 10% cujo score foi de 0.0, onde se verifica a ausência de preservação morfológica (400x)  
c) Lâmina Tricrômio de Gomori fixada com UMFIX (400x)

da H&E para o UMFIX são superiores às da fixação com FNT 10%, o que é concordante com a literatura. Tal sucede, pois o UMFIX apresenta melhores capacidades de preservação dos ácidos nucleicos que a FNT 10%, facilitando a ligação da hematoxilina a estes constituintes [29].

Como tal, pode afirmar-se que o UMFIX apresenta resultados mais uniformes inter-observadores e intra-observadores, apresentando uma mais-valia na sua utilização na rotina laboratorial, onde é necessário haver uniformidade na qualidade final das lâminas.

O Tissue-Tek® Xpress® x120 da Sakura® possui como reagente o UMFIX, podendo ser o principal motivo para a discrepância de resultados entre a FNT 10% e o UMFIX em relação à preservação morfológica.

No caso da coloração de H&E, a atribuição de *scores* mais baixos nas lâminas cujos tecidos foram fixados em FNT 10%, prende-se essencialmente pelo parâmetro da preservação da arquitetura celular, enquanto o UMFIX conferiu uma preservação de morfologia ótima, na maioria das suas lâminas.

A H&E é a coloração *standard* para a interpretação de tecido hepático, permitindo

observar o aspeto geral do tecido, decidindo a necessidade de elaborar colorações especiais a fim de estabelecer um diagnóstico correto.

Desta forma, é imperativo que todos os detalhes estruturais sejam visualizados de forma correta, a partir de uma preservação da morfologia ótima e de uma intensidade de coloração adequadas. Desta forma, o fixador que mais se adequou a estas necessidades foi o UMFIX (Figura 2).

Na coloração de Tricrômio de Gomori, tendo-se calculado a média das medianas, verificou-se que o UMFIX apresentou melhores resultados que a FNT 10%, como era de esperar pelas reações acima descritas.

Em relação à coloração de Reticulina, apesar de o parâmetro de intensidade de coloração de estruturas específicas atribuir melhores resultados à FNT 10%, não houve claras diferenças entre os dois fixadores nos restantes parâmetros (Figura 3).

Finalmente, em relação à coloração de PAS, revelaram-se novamente melhores resultados de preservação morfológica para o UMFIX, porém melhores resultados de coloração de estruturas específicas para a FNT 10%, não tendo existido diferenças nos restantes parâmetros (Figura 4).

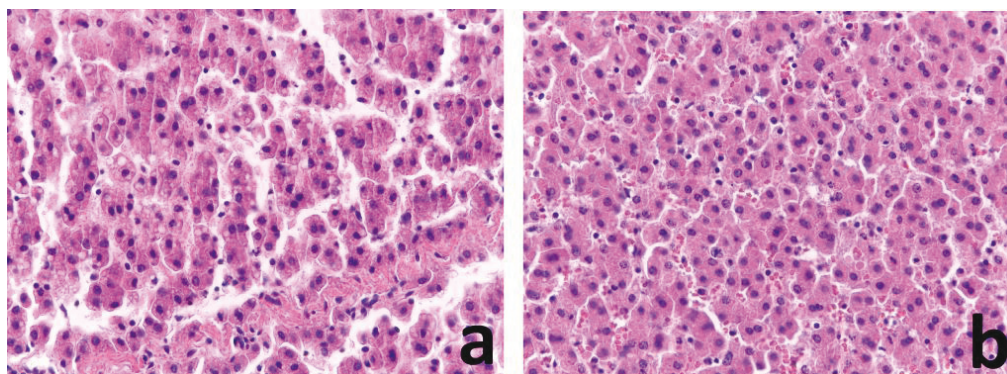


Figura 2 - a) Lâmina H&E fixada com FNT 10% (400x); b) Lâmina H&E fixada com UMFIX (400x)

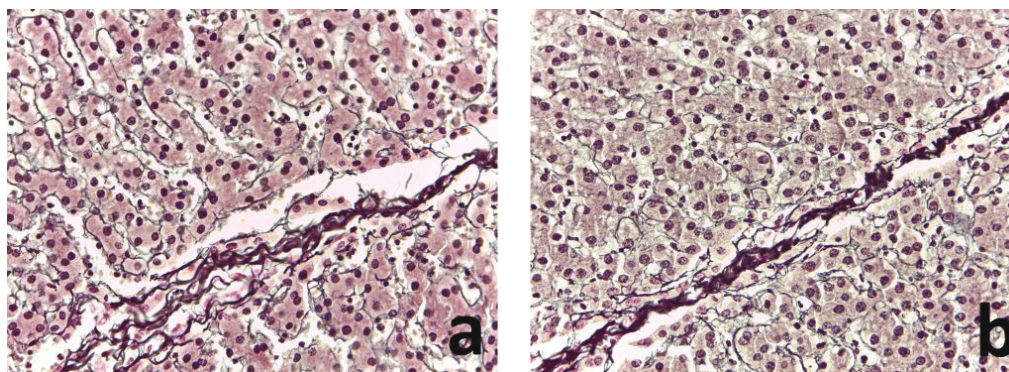


Figura 3 - a) Lâmina Reticulina fixada com FNT 10% (400x); b) Lâmina Reticulina fixada com UMFIX (400x)

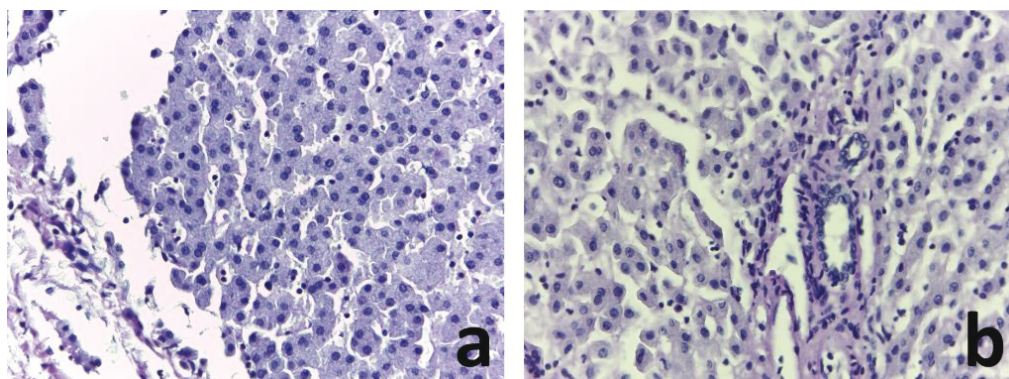


Figura 4 - a) Lâmina PAS fixada com FNT 10% (400x); b) Lâmina PAS fixada com UMFIX (400x)

Concluiu-se que, para além de ser uma excelente substituição para a FNT 10% por motivos de segurança para os profissionais que o utilizam diariamente, a qualidade final das lâminas, cujos tecidos são fixados com UMFIX, no geral, é superior à da FNT 10% na utilização de um processador rápido micro-ondas, para as variáveis estudadas.

#### AGRADECIMENTOS

Ao Serviço de Anatomia Patológica do Hospital da Luz, pela disponibilidade e materiais fornecidos e às Técnica Carla Vieira e Nélia Nunes, pela avaliação das lâminas obtidas. À professora Elisabete Carolino, pelo auxílio na interpretação dos dados estatísticos.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. IARC, Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans Volume 88 (2006) Formaldehyde, 2-Butoxyethanol and 1-tert-Butoxypropan-2-ol, WHO Press, 2006
2. Formaldehyde and Leukemia: Epidemiology, Potential Mechanisms, and Implications for Risk Assessment. 51. Environmental and Molecular Mutagenesis.2010; 181-191.
3. Ladeira, C. Tecnologias Laboratoriais em Anatomia Patológica I - Fixação. Texto inédito. Lisboa: Instituto Politécnico de Lisboa, Departamento das Ciências e Tecnologias Laboratoriais e Saúde Comunitária da Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa, 2008
4. Bancroft, J., Gamble, M. Theory and Practice of Histological Techniques; (5ª Edição). Churchill-Livingstone, 2002
5. Pal, L.; Shankar, SK. Pathology laboratory in Formalin free system, 1999, Recuperado em 2012, agosto 1, de [www.pathoindia.com](http://www.pathoindia.com).
6. Introduction to tissue fixation, Histology Lecture #2, Recuperado em 2012, agosto 1, de <http://histologycourse.com/Tissue%20Fixation-Lecture%2012.pdf>
7. Nowacek, J. Chapter 16 - Fixation and Tissue Processing, Dako, 141-152, Recuperado em 2012, agosto 1, de [http://www.dako.com/08066\\_12may10\\_webchapter16.pdf](http://www.dako.com/08066_12may10_webchapter16.pdf)
8. Nassiri, M.; Ramos, S.; Zohourian, H.; Vincek, V.; Morales, A.; Nadji, M. Preservation of biomolecules in breast cancer tissue by a formalin-free histology system, BMC Clinical Pathology 2008, 8:1

**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

9. Crome, D. Formaldehyde Fixatives. Celular Imaging Core, South Enviromental Health Sciences Center, University of Arizona, 1997, Recuperado em 2012, agosto 1, de <http://swehsc.pharmacy.arizona.edu/exppath/resources/pdf/Formaldehyde.pdf>
10. Kiernan, J. Formaldehyde, formalin, paraformaldehyde and glutaraldehyde: What they are and what they do. Department of Anatomy & Cell Biology, University of Western Ontario, London, Canada N6A 5C1. Recuperado em 2012, agosto 1 de <http://publish.uwo.ca/~jkiernan/formglut.htm>
11. Formaldehyde, Stains File. Recuperado em 2012, agosto 1 de <http://stainsfile.info/StainsFile/prepare/fix/agents/formalin.htm>
12. Baker, J. Principles of biological microtechnique. Methuen, London, UK, 1958
13. Warmington, A., Wilkinson, J.; Riley, C. Evaluation of ethanol-based fixatives as a substitute in a diagnostic clinical laboratories. J Histotechnol 200, 23:299-308
14. Sakura Finetek Europe. BR-Xpress, 2006. Recuperado em 2012, janeiro 7, de <http://www.sakura.eu/cms/products/subcat/Brochure%20Xpress%20spread.pdf>
15. Boto, J. Estudo Comparativo de Metodologias de Fixação em Processamento Histológico Rápido. Texto inédito. Lisboa: Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa, Área Científica de Anatomia Patológica, 2009.
16. Saxena, R. Chapter 12 - Special Stains in Interpretation of Liver Biopsies. Dako 107-118. Recuperado em 2012, agosto 1, de [http://www.dako.com/08066\\_12may10\\_webchapter12.pdf](http://www.dako.com/08066_12may10_webchapter12.pdf)
17. Lefkowitz, J. Special stains in diagnostic liver pathology. Semin Diagn Pathol 2006 Aug-Nov, 23(3-4): 190-8
18. Ladeira, C. Métodos e Técnicas Histoquímicas - Colagéio. Texto inédito. Lisboa: Instituto Politécnico de Lisboa, Departamento das Ciências e Tecnologias Laboratoriais e Saúde Comunitária da Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa, 2008
19. Gomori's Green Trichrome Stain Kit, Artisan™. Dako. Recuperado em 2012, agosto 1 de [http://www.dako.com/dist/ar41/p234914/prod\\_products.htm](http://www.dako.com/dist/ar41/p234914/prod_products.htm)
20. Ladeira, C. Métodos e Técnicas Histoquímicas - Reticulina. Texto inédito. Lisboa: Instituto Politécnico de Lisboa, Departamento das Ciências e Tecnologias Laboratoriais e Saúde Comunitária da Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa, 2008
21. Reticulin/Nuclear Fast Red Stain Kit, Artisan™. Dako. Recuperado em 2012, agosto 1 de [http://www.dako.com/dist/ar41/p224461/prod\\_products.htm](http://www.dako.com/dist/ar41/p224461/prod_products.htm)
22. Ladeira, C. Métodos e Técnicas Histoquímicas - Pigmentos. Texto inédito. Lisboa: Instituto Politécnico de Lisboa, Departamento das Ciências e Tecnologias Laboratoriais e Saúde Comunitária da Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa, 2008
23. Ladeira, C. Métodos e Técnicas Histoquímicas - Glicogénio. Texto inédito. Lisboa: Instituto Politécnico de Lisboa, Departamento das Ciências e Tecnologias Laboratoriais e Saúde Comunitária da Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa, 2008
24. Periodic Acid-Schiff (PAS) Stain Kit, Artisan™. Dako. Recuperado em 2012, agosto 1 de [http://www.dako.com/dist/ar41/p224459/prod\\_products.htm](http://www.dako.com/dist/ar41/p224459/prod_products.htm)
25. Tissue-Tek® Prisma®/Film® Automated Slide Stainer and Coverslipper, Sakura, Recuperado em 2012, agosto 1 de <http://www.sakura-america.com/products/tisstek-prismafilm.html>
26. Artisan™ Link Pro Special Staining System. Dako. Recuperado em 2012, agosto 1 de [http://www.dako.com/dist/ar41/p235760/prod\\_products.htm](http://www.dako.com/dist/ar41/p235760/prod_products.htm)
27. Nassiri M.; Nadji M. Experience with a Molecular-friendly Histology System for Preservation of Biomolecules in Breast Cancer Tissue. 2008. Recuperado em 2012, agosto 1 de [http://www.dako.com/index/knowledgecenter/kc\\_publications/kc\\_publications\\_connection/kc\\_publications\\_connection12.htm/28827\\_2008\\_connection12\\_molecular-friendly\\_histology\\_for\\_biomolecules\\_breast\\_cancer\\_nassiri\\_nadji.pdf](http://www.dako.com/index/knowledgecenter/kc_publications/kc_publications_connection/kc_publications_connection12.htm/28827_2008_connection12_molecular-friendly_histology_for_biomolecules_breast_cancer_nassiri_nadji.pdf)
28. Mason, J.; O'Leary T. Effects of formaldehyde fixation on protein secondary structure: a calorimetric and infrared spectroscopic investigation. J Histochem Cytochem. 1991 Feb;39(2):225-9
29. Nadji, M.; Nassiri, M.; Vincek, V.; Kanhoush, R.; Morales, A. Immunohistochemistry of Tissue Prepared by a Molecular-Friendly Fixation and Processing System 2005 - Volume 13 - 3 - 277-282



# Novas abordagens na intervenção do Técnico de Anatomia Patológica em comunidades escolares: Conhecimentos Associados ao Consumo do Álcool em Jovens Adolescentes

Patrícia Dôro<sup>1</sup>, Ana Rocha<sup>1</sup>, Flávia Santo<sup>1</sup>, Ana Sousa<sup>1</sup>, Paula Mendonça<sup>1</sup>, Francisco Costa<sup>2</sup>

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

2 - CESNOVA - Centro de Estudos de Sociologia da Universidade Nova de Lisboa

Correspondência para Paula Mendonça - e-mail: paula.mendonca@estesl.ipl.pt

## RESUMO

**Introdução:** Atualmente, o consumo abusivo de álcool nos jovens inicia-se precocemente. Todavia, os problemas de saúde e os comportamentos de risco associados podem ser prevenidos ou reduzidos através de programas escolares efetivos. Neste contexto, os Técnicos de Anatomia Patológica (TAP), podem contribuir para proporcionar conhecimentos que promovam estilos de vida saudáveis.

**Objetivos:** Procurou-se perceber o papel do TAP na promoção de comportamentos saudáveis nos alunos de 9º ano dos Agrupamentos de Escolas da Portela e Moscavide e Visconde Juromenha e, posteriormente, como pode o reforço dos conhecimentos relacionados com o álcool potenciar a adoção de estilos de vida saudáveis.

**Métodos:** Aferiram-se, através de questionário, as práticas de consumo, crenças relativas ao álcool e conhecimentos dos alunos sobre as repercussões no organismo. O questionário foi aplicado ao Grupo de Estudo (GE), após a ministração de uma ação de informação e esclarecimento (AIE), e ao Grupo de Controlo (GC), sem a participação na ação.

**Resultados e Discussão:** Verificou-se um score médio de 48,8% para o GE e de 46,2% para o GC. A diferença entre GE e GC apenas foi estatisticamente significativa no Agrupamento de Escolas da Portela e Moscavide, onde a AIE conduziu a um aumento do nível de conhecimentos.

**Conclusões:** A intervenção do TAP nas escolas permite, através de AIE's com abordagens práticas, uma maior retenção de informação. Os conhecimentos teóricos aliados à prática permitem que os adolescentes desenvolvam uma perceção informada sobre os impactos do álcool na saúde contribuindo para determinar a adoção de estilos de vida saudáveis.

**PALAVRAS-CHAVE:** Promoção de Saúde; Comportamentos de Risco; Adolescentes

## INTRODUÇÃO

A promoção da saúde traduz-se na “capacitação das pessoas e comunidades para modificarem os determinantes da saúde em benefício da própria qualidade de vida” [1,2] e permite sobretudo prevenir. Uma das suas limitações relaciona-se com a participação das pessoas e a subsequente mudança de comportamentos [2,3]. Em Portugal, é vital a implementação de programas que permitam a adoção de comportamentos saudáveis face a substâncias aditivas como o álcool. O consumo deste inicia-se precocemente entre os 11 e os 13 anos e cerca de 20% dos jovens não associa risco ao *binge drinking* [4,5]. Este facto adquire maior relevância se considerarmos que o abuso do álcool é,

atualmente, a terceira causa de morte e um fator agravante ou diretamente causador de cerca de 1/4 do conjunto global de doenças. De facto, o efeito cancerígeno do álcool está definido, existindo uma relação entre o consumo de álcool e o cancro primário do fígado [6,7].

Os problemas de saúde e os comportamentos de risco associados ao consumo nocivo podem ser prevenidos ou reduzidos através de programas de saúde escolar efetivos. Apelar à participação dos jovens nas decisões de forma consciente e informada dos riscos deve ser o mecanismo escolhido para a prevenção [5,8,9].

A promoção da saúde e a prevenção da doença têm uma abordagem privilegiada em ambiente escolar. Por ser um local propício a transmissão e partilha de informação, facilita a aquisição de

conhecimentos que podem gerar comportamentos saudáveis num processo que sustente a autonomia de decisão.

Os profissionais de saúde, como os TAP, podem intervir na promoção da saúde e prevenção da doença através da partilha de conhecimento e utilizando a prática como meio demonstrativo das consequências dos estilos de vida não saudáveis [10].

Ao mesmo tempo que se aprofundam as áreas existentes da Anatomia Patológica, assiste-se à emergência de novas perspetivas que são desafiantes para os TAP. Como tal, os saberes existentes devem adequar-se a novas áreas (e.g. educação para a saúde) acrescentando novas valências à profissão, sem receio de se perder a identidade.

Neste contexto, o estudo descritivo-correlacional apresentado teve como meta aferir a importância da intervenção do TAP na promoção de saúde em adolescentes, no âmbito do consumo de álcool e as suas repercussões. A intervenção foi realizada na comunidade educativa do 9º ano de escolaridade dos Agrupamentos de Escolas da Portela e Moscavide (AEPM) e Visconde de Juromenha (AEVJ), ambas situadas na sub-região da Grande Lisboa. A mesma visou a realização de uma AIE quanto às repercussões do consumo de álcool no organismo humano, especialmente a nível hepático, abordando, através da exposição de órgãos com patologias (metodologias ativas), os temas hepatite alcoólica, esteatose, cirrose e carcinoma hepatocelular.

Para a apreciação do TAP como promotor da saúde foram aferidos comportamentos e conhecimentos existentes, quanto ao consumo de álcool e as suas repercussões, em todos os alunos em estudo considerando a sua participação ou não na AIE.

## MATERIAL E MÉTODOS

### População, Amostragem e Amostra

A população-alvo do estudo foram os alunos do 9º ano, com idade mínima de 13 anos de ambos os géneros na sub-região da Grande Lisboa. Na impossibilidade de aceder à totalidade da população-alvo optou-se por uma seleção por conveniência dos alunos dos AEPM e AEVJ.

Fazendo uso da amostragem em cachos [11] foram escolhidos entre as turmas dois grupos distintos: um GE avaliado após a participação na AIE e um GC avaliado sem a participação na AIE. Esta opção permitiu-nos verificar a relação entre a participação na ação e o nível de conhecimento. O número total de participantes

no estudo foi de 310 alunos, 151 indivíduos constituíram o GE e 159 faziam parte do GC, segundo a Tabela I. Todos os participantes possuíam um consentimento informado para participação no estudo assinado pelo encarregado de educação.

| Agrupamentos Escolares | Grupos em Estudo |     | Total |
|------------------------|------------------|-----|-------|
|                        | GC               | GE  |       |
| AEPM                   | 122              | 115 | 237   |
| AEVJ                   | 37               | 36  | 73    |
| Total                  | 159              | 151 | 310   |

Tabela I - Amostra do Estudo

### Métodos e Instrumentos de Recolha de Dados

Foram aplicados dois questionários anónimos e confidenciais em três etapas:

#### Etapa 1

O questionário A foi respondido por 28 indivíduos e teve como objetivo a orientação da ação realizada. Este questionário consistiu num conjunto reduzido de questões e demonstrou as principais lacunas em termos de conhecimento sobre a temática em estudo, orientando os conteúdos a explorar na AIE.

#### Etapa 2

Foi aplicado o questionário B, que aborda as práticas de consumo, crenças sobre o álcool e conhecimentos referentes às repercussões no organismo. Este questionário foi aplicado ao GC antes da participação na AIE. O questionário apresentava uma estrutura dividida em três partes:

- Caracterização da amostra que compreende a informação geral do participante no estudo. Questões adaptadas do questionário ESPAD [7].
- Práticas de consumo e crenças associados ao consumo de álcool. Questões baseadas no ESPAD [7], na Monografia “Agentes Comunitários de Saúde: Expectativas e Crenças acerca do Uso de Álcool” [12] e no artigo “Representações Sociais sobre o Álcool em Estudantes do Ensino Superior” [13].
- Conhecimentos quanto às consequências prejudiciais do consumo de álcool no organismo. Questões validadas pelos investigadores.

#### AIE

A AIE baseou-se no uso de metodologias descritivas, recorrendo à apresentação de informação sobre o consumo do álcool por exposição oral com auxílio de meios visuais, e de

metodologias ativas, onde a informação foi transmitida através da visualização de lâminas com secções de fígado ao microscópio ótico e visualização e manuseamento de fígados de porco, com patologias simuladas.

### *Etapa 3*

Foi aplicado o questionário B ao GE três semanas após a sua participação na AIE.

As diferentes datas de aplicação do questionário garantem que os resultados obtidos derivam apenas da AIE e não do conhecimento intrínseco dos participantes [14].

### **Tratamentos Estatísticos**

O tratamento estatístico dos dados foi efetuado com recurso ao programa IBM SPSS Statistics, versão 20.0 para Windows.

O nível de conhecimento foi calculado com base na soma das cotações atribuídas às questões referentes aos conhecimentos. As cotações foram atribuídas numa escala de 0 a 20 valores. A pontuação total máxima é de 615 e a mínima de 0. Este valor é transformado em percentagem para facilitar a leitura, originando o *score*. Os *scores* foram estudados através da aplicação do teste t-Student para amostras independentes com um n superior a 30.

O intervalo de confiança foi de 95% e o nível de confiança de 0,05.

## **RESULTADOS**

Os resultados apresentados encontrar-se-ão divididos em 4 grupos: caracterização da amostra, crenças de consumo, práticas de consumo e nível de conhecimentos.

As crenças de consumo e a caracterização da amostra foram abordadas apreciando a amostra total, pois estes dados foram recolhidos apenas para auxiliar a compreensão dos resultados obtidos ao nível dos conhecimentos.

Dos 310 questionários aplicados, 6 foram excluídos do estudo por preenchimento incorreto e impercetível.

### **Caracterização da Amostra**

Os questionários foram aplicados a 152 indivíduos do género feminino e 152 do género masculino, com idades compreendidas entre os 13 e 17 anos de idade, tendo sido a idade mais frequente os 14 e 15 anos, representando 78,8% da amostra.

### **Crenças sobre o Consumo de Alcool**

Dos adolescentes, 56,2% integram o álcool num contexto nocivo afirmando que o consumo

prejudica a saúde. No entanto, 66,7% consideram “provável” sentirem-se relaxados e mais felizes após o consumo. Apenas 20,5% dos participantes pensam ser “muito provável” serem incapazes de parar com o consumo se continuarem a beber.

### **Práticas de Consumo de Alcool**

#### *AEPM*

Dos estudantes do AEPM cerca de 79,5% já consumiram bebidas alcoólicas. Destes, 98,9% têm 14 ou mais anos de idade. A idade mais comum de início de consumo de vinho é 12 anos, de cerveja 13 anos e de bebidas destiladas e *shots* 14 anos. Cerca de 45,8% dos inquiridos consideram “muito fácil” o acesso à cerveja e 31,2% ao vinho. O acesso a *shots* e às bebidas destiladas foi considerado “moderadamente fácil” em 23,2% e 23,5% dos inquiridos, respetivamente.

#### *AEVJ*

Dos estudantes do AEPM cerca de 83,3% já consumiram bebidas alcoólicas, tendo todos estes 14 ou mais anos de idade. A idade mais comum de início de consumo de cerveja é 9 anos ou menos, de vinho e *shots* 14 anos e de bebidas destiladas 15 anos. Cerca de 69,0% dos inquiridos consideram “muito fácil” o acesso à cerveja, 45,9% ao vinho e 28,1% às bebidas destiladas. O acesso a *shots* foi considerado “moderadamente fácil” em 26,9% dos inquiridos.

### **Nível de Conhecimento**

No GC a média de *scores* foi de 46,2%, com um desvio padrão de 14,1%. No GE a média de *scores* foi de 48,8%, com um desvio padrão de 14,2%. Não se verificou uma diferença estatisticamente significativa entre as médias de *scores* dos alunos que frequentaram a AIE e dos alunos que não a frequentaram considerando a amostra geral.

#### *AEPM*

No AEPM obteve-se no GC uma média de *scores* de 46,9%, com um desvio padrão de 13,9% e no GE a média de *scores* foi de 50,9%, com um desvio padrão de 13,0%. Assim, neste agrupamento e

scolar observa-se uma diferença estatisticamente significativa entre as médias de *scores* do GC e GE.

Relativamente às patologias, a associação do consumo de álcool à cirrose foi efetuada por 64,5% dos indivíduos do GE e 35,5% do GC. No caso do hepatocarcinoma, esta relação verificou-se em 51,2% dos sujeitos do GE e 48,8%

do GC.

**AEVJ**

No AEVJ obteve-se no GC uma média de *scores* de 43,9%, com um desvio padrão de 14,9% e no GE a média de *scores* foi de 42,4%, com um desvio padrão de 16,1%. Assim, neste agrupamento escolar não se obteve uma diferença estatisticamente significativa entre as médias de *scores* do GC e GE.

A associação do consumo de álcool ao hepatocarcinoma foi efetuada por 80,1% dos indivíduos do GE e 67,6% de GC. A cirrose não foi associada ao consumo de álcool por 55,6% dos alunos.

## DISCUSSÃO

Apesar do reconhecimento do álcool como substância prejudicial à saúde, as expectativas positivas quanto ao consumo sobrepõem-se à informação sobre os malefícios desta droga [15,16]. Os dados obtidos permitem sustentar o álcool como fator de integração social, libertando os adolescentes do estigma do consumo [5,6,14,15].

A facilidade de acesso às bebidas alcoólicas fundamenta a quantidade e o tipo de consumo precoce. A cerveja surge como a bebida mais experimentada, mas perto surgem as bebidas destiladas [17,18]. Este facto está relacionado com a integração de novas bebidas na cultura dos jovens portugueses [6].

Apreciando os valores relativos ao consumo percebe-se que, embora os alunos tenham iniciado o consumo de álcool precocemente, estes não apresentam um padrão que provoca dano ao persistir, como nos casos de *binge drinking* [19,20].

Os resultados do estudo revelam que o GE da amostra geral obteve um nível de conhecimento superior ao GC. No entanto, esta diferença não foi estatisticamente significativa. Estes

resultados podem ser justificados pelo fato da AIE efetuada se inserir em intervenções de curta duração e baixa intensidade, tornando-a menos eficaz [21].

As diferenças que se verificaram nos AEPM e AEVJ podem dever-se às diferenças das AIE, pois no AEPM esta foi expositiva e prática, enquanto no AEVJ apenas foi expositiva. As intervenções onde se utilizam meios práticos para a transmissão de conhecimentos são mais efetivas que as intervenções puramente expositivas [12,22]. A importância da parte prática é, ainda, evidente nas associações entre o consumo alcoólico e as patologias hepáticas, verificando-se um aumento dos alunos do GE que estabelecem a relação entre a cirrose e o hepatocarcinoma, exemplos mostrados na parte prática, e o consumo de álcool.

O TAP possui um campo de conhecimentos único referente às patologias, o que torna as metodologias ativas usadas na AIE algo natural. A AIE conduziu ao aumento do nível de conhecimentos no AEPM, onde a parte prática foi efetuada. Logo, a introdução do TAP nas equipas de promoção da saúde em comunidades escolares permite, através da abordagem prática, potenciar a retenção de informação, tendo impacto positivo nos comportamentos futuros.

Concluímos que os TAP deveriam integrar equipas promotoras de saúde, em comunidades escolares e afins. Os profissionais deveriam valorizar as novas valências de interação social, sem receio de perda de identidade da profissão, acrescentando, assim, mais-valias às suas competências profissionais.

## AGRADECIMENTOS

Agradecemos aos AEPM e AEVJ, na pessoa das professoras Carla Ferreira e Pilar Garcia, coordenadores dos Projetos de Educação para a Saúde pelo apoio e disponibilidade.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Czeresnia, D. Ações de Promoção à Saúde e Prevenção de Doenças: o Papel da ANS, 2003. Recuperado em 2012, janeiro 14, de <http://www.bvsde.paho.org/bvsacd/cd65/AcoesPromocaoSaude.pdf>.
2. Mulgan, G. The art of public strategy: mobilizing power and knowledge for the common good. Oxford: Oxford University Press; 2009
3. Costa, Francisco Lima, et al (2012a), Should participation be seen as a common good? Local institutional capabilities for sustainable mobility', Atlas proceedings of 18th APDR Congress - Innovation and Regional Dynamics, 14th-16th June 2012, Faro, University of Algarve, ISBN 978-989-9635-3-3.
4. Martins, M. A Promoção da Saúde: Percursos e Paradigma, 2005. Recuperado em 2012, janeiro 14, de <http://repositorio.ipcb.pt/bitstream/10400.11/93/1/A%20Promo%C3%A7%C3%A3o%20da%20sa%C3%BAde.pdf>.

5. Cabral, L. Alcoolismo Juvenil. Viseu: Millenium, 2004
6. Adès, J; Lejoyeux, M. Comportamentos Alcoólicos e seu Tratamento. Lisboa: Climepsi Editores, 1997.
7. Hibell, B. et al. The ESPAD Report 2007 - Alcohol and Other Drug Use Among Students in 35 European Countries, 2008. Recuperado em 2011, dezembro 29, de [http://www.espad.org/documents/Espad/ESPAD\\_reports/The\\_2003\\_ESPAD\\_report.pdf](http://www.espad.org/documents/Espad/ESPAD_reports/The_2003_ESPAD_report.pdf).
8. Instituto da Droga e da Toxicodependência, I.P. Inquérito Nacional ao Consumo de Substâncias Psicoativas na População Geral, Portugal 2007. Lisboa: Universidade Nova de Lisboa, CEOS-FCSH, 2007.
9. Mello, M; Barrias, J; Breda, J. Álcool e Problemas Ligados ao Álcool em Portugal. Lisboa: Direção-Geral de Saúde, 2001.
10. Direção-Geral da Saúde. Programa Nacional de Saúde Escolar, 2006. Recuperado em 2011, dezembro 28, de <http://www.min-saude.pt/NR/rdonlyres/4612A602-74B9-435E-B720-0DF22F70D36C/0/ProgramaNacionaldeSa%C3%BAdedeEscolar.pdf>;
11. Fortin, M. Fundamentos e Etapas do Processo de Investigação. Lisboa: Lusodidacta, 2009.
12. Sobreira, E. Agentes Comunitários de Saúde: expectativas e Crenças acerca do uso de álcool. Texto inédito. Ribeirão preto: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, 2009.
13. Cabral, L. Representações Sociais sobre o Álcool em Estudantes do Ensino Superior. Revista Referência, 2007; 4; 69-78.
14. Hebbal, M. et al. Evaluation of Knowledge and Plaque Scores in School Children Before and After Health Education. Dental Research Journal, 2011; 8; 189-196.
15. Instituto da Droga e da Toxicodependência, I.P. Consumo de Substâncias: Estilos de Vida? À procura de um Estilo? Lisboa: Universidade Técnica de Lisboa, 2008.
16. Amaral, A. Parâmetros psicométricos do Inventário de expectativas e Crenças Pessoais Acerca do Álcool para adolescentes. Psico-USF, 2009; 14, 2, 167-176
17. Feijão, F. Adolescentes e Consumo de Substâncias Psicoativas: o Tempo e o Território enquanto Fatores Subjacentes às Dinâmicas de Consumo em Portugal e na Europa. Revista Toxicodependências, 2007; 13; 1; 59-80.
18. Feijão, F. A epidemiologia do consumo de álcool entre adolescentes escolarizados a nível nacional e nas diferentes regiões geográficas. Revista Toxicodependências. 2010; 16; 1; 29-46.
19. Conselho da União Europeia. Estratégia da EU de Luta contra a Droga (2005-2012). Texto Inédito. Bruxelas: Secretariado Geral do Conselho da União Europeia, 2004.
20. Oliveira, M. Estudo de crenças e expectativas acerca do álcool em estudantes universitários. International Journal of Clinical and Health Psychology, 2007; 7, 2; 421-433.
21. World Health Association, Global Strategy to Reduce Harmful Use of Alcohol. Recuperado em 2012, janeiro 7, de [http://www.who.int/substance\\_abuse/activities/gsrhua/en/index.html](http://www.who.int/substance_abuse/activities/gsrhua/en/index.html).
22. Matos, M. Texto de Apoio à Disciplina de Seminários de Integração em Anatomia Patológica. Texto inédito. Lisboa: Escola Superior da Tecnologia da Saúde de Lisboa, Área Científica de Anatomia Patológica, 2008.



# Recomendações técnicas para a determinação imuno-histoquímica do *status* HER2 em carcinoma da mama - Consenso

## Autores:

Mário Maia-Matos, *Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa*  
 Amadeu Ferro, *Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa*  
 Alexandra Teixeira, *Hospital de Faro*  
 Ana Coias, *Hospital Garcia de Orta*  
 Ana C. Fernandes, *Centro Hospitalar de Setúbal*  
 A. Cristina Gavinho, *Centro Hospitalar de Vila Nova de Gaia*  
 Ana Cunha, *Instituto Português de Oncologia de Lisboa*  
 Ana F. Santos, *Centro Hospitalar de Lisboa Ocidental*  
 Ana Isabel Silva, *Hospital Prof. Doutor Fernando Fonseca*  
 Ana L. Marques, *Hospital CUF Descobertas*  
 Ana Vilas Boas, *Instituto Português de Oncologia de Coimbra*  
 Ana Margarida Rodrigues, *Hospital Prof. Doutor Fernando Fonseca*  
 Ana Margarida Lopes, *Hospital Prof. Doutor Fernando Fonseca*  
 Ana Paula Tavares, *Centro Hospitalar de Lisboa Ocidental*  
 Ana Melanda, *Centro Hospitalar Leiria Pombal*

Ana Rute Fernandes, *Roche Sistemas de Diagnóstico*  
 Salomé Pereira, *Centro Hospitalar de S. João*  
 Ana Teodósio, *Instituto Português de Oncologia de Coimbra*  
 Anabela Penela, *Hospital de Faro*  
 Filipe Teixeira, *Centro Hospitalar de Vila Nova de Gaia/Espinho*  
 Carmelina Ramos, *Hospital Distrital de Santarém*  
 Catarina Araújo, *Hospital de Faro*  
 Daniel H. Almeida, *Centro de Diagnóstico Anátomo-Patológico*  
 Daniela Alves, *Unidade Local de Saúde de Matosinhos*  
 Dina Leitão, *Faculdade de Medicina da Universidade do Porto, Instituto de Patologia e Imunologia Molecular da Universidade do Porto*  
 M. Edite Figueira, *Hospital CUF Descobertas*  
 Estela Martins, *Unidade Local de Saúde de Matosinhos*  
 Fátima P. Silva, *Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra*  
 Filipa Areia, *Instituto Português de Oncologia de*

*Lisboa*  
 Helena Simões, *Centro Hospitalar Lisboa Norte*  
 Ilda Simões, *Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra*  
 Joana R. Cunha, *Unidade Local de Saúde de Matosinhos*  
 Lúcia Carrão, *Centro Hospitalar Lisboa Norte*  
 Manuel Lourenço, *Centro Hospitalar do Barlavento Algarvio*  
 Manuela Henriques, *Instituto Português de Oncologia de Coimbra*  
 Manuela D. Soares, *Centro Hospitalar Barreiro Montijo*  
 Mara Santos, *Centro Hospitalar Lisboa Norte*  
 Amélia Silva, *Centro Hospitalar Lisboa Ocidental*  
 Salomé Pessoa, *Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra*  
 Maria Teresa Assunção, *Instituto Português de Oncologia de Coimbra*  
 Mariana Ganhão, *Centro Hospitalar de S. João*  
 Marta Roquette, *Centro Hospitalar Lisboa Ocidental*  
 Nuno Silva, *Hospital Dr. Nélcio Mendonça*  
 Patrícia Mendes, *Instituto Português de Oncologia*

*de Lisboa*  
 Paula Borges, *Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra*  
 Paula Casimiro, *Serviços de Assistência Médico-Social do Sindicato dos Bancários do Sul e Ilhas, Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa*  
 Paula Laranjeiro, *Centro Hospitalar Lisboa Ocidental*  
 Paulo Teixeira, *Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra*  
 Renata Vieira, *Instituto Português de Oncologia do Porto*  
 Rosa Garcia, *Hospital Dr. Nélcio Mendonça*  
 Ruth Sardinha, *Hospital do Espírito Santo de Évora*  
 Marisa Sá, *Centro Hospitalar Lisboa Norte*  
 Sónia Carretas, *Centro Hospitalar de Setúbal*  
 Teresa Franco, *Centro Hospitalar Lisboa Ocidental*  
 Teresa Lacerda, *Centro Hospitalar Lisboa Central*  
 Teresa Pereira, *Instituto Português de Oncologia de Lisboa*  
 Vasco Serra, *Instituto Português de Oncologia de Coimbra*

Correspondência para Mário Maia-Matos - e-mail: mario.matos@estesl.ipl.pt

## RESUMO

A determinação imuno-histoquímica do *status* HER2 é um elemento fundamental para o diagnóstico, prognóstico e indicação terapêutica em carcinoma da mama. A inconsistência de resultados da técnica imuno-histoquímica levou ao estabelecimento, em alguns países, de recomendações para melhorar a performance do teste.

Com o objetivo de criar recomendações adaptadas à realidade portuguesa, a área científica de Anatomia Patológica, Citológica e Tanatológica da Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa e a Associação Portuguesa de Técnicos de Anatomia Patológica reuniram um painel de especialistas para a construção e estabelecimento de linhas de orientação técnica para a determinação do *status* HER2 em carcinoma da mama para a realidade portuguesa.

O painel recomenda que o teste seja devidamente planeado do ponto de vista humano e material, com ênfase acentuado no controlo e garantia da qualidade de reagentes e procedimentos. A fase pré-analítica é apontada como essencial para a qualidade do teste, nomeadamente um reduzido tempo de isquémia a frio, tempos mínimos de fixação de 6h para biópsias e 24h para peças cirúrgicas e máximo de 96h para ambas, bem como um controlo de qualidade de todos os reagentes utilizados. São estipulados critérios de seleção de controlos, bem como critérios de avaliação da qualidade da técnica, elementos fundamentais para se rastrear problemas na fase pós-analítica.

Pretende-se com este documento melhorar a acuidade da determinação do *status* HER2 em carcinoma da mama, podendo selecionar doentes de modo mais adequado, bem como promover o debate e a investigação nesta área.

**PALAVRAS-CHAVE:** HER2; Imuno-Histoquímica, Recomendações Técnicas, Carcinoma da Mama, Fase Pré-Analítica, Qualidade

## INTRODUÇÃO

Ao gene do recetor de fator de crescimento epidérmico humano 2 (com o nome oficial de ERBB2 de acordo com a HUGO Genome Nomenclature Committee, mas comumente chamado HER2) codifica para um membro família de recetores de tirosina cinase encontrando-se amplificado em cerca de 18-20% dos tumores da mama. A amplificação deste gene é o mecanismo primário de sobre expressão de HER2, sendo encontrado nestes tumores níveis anormalmente altos de expressão desta proteína [1,2]. A sinalização da proteína HER2 promove a proliferação do ciclo celular e evasão da apoptose, estando a sua sobre expressão associada a pior prognóstico em doentes com diagnóstico de carcinoma da mama e que não receberam terapêutica sistémica adjuvante (taxas mais elevadas de recorrência e metástase) [3,4]. Tornou-se assim um importante fator de prognóstico e alvo terapêutico em carcinoma da mama, principalmente para encaminhamento terapêutico com Herceptin®/trastuzumab. O estabelecimento desta terapêutica nas vertentes adjuvante ou neoadjuvante, e até em doença metastática, tem vindo a acentuar a importância da determinação do *status* HER2 em carcinoma da mama de modo a melhor responder às necessidades dos doentes [2,5-7]. O impacto desta determinação tem sido crescente também com a introdução de novas terapêuticas dirigidas (como o Perjeta®/pertuzumab) bem como na classificação de formas mais agressivas de carcinoma da mama, como os tumores triplos negativos [8-13].

Desde os primeiros ensaios que a imuno-histoquímica é a metodologia de eleição para a determinação do *status* da proteína HER2 e posterior seleção de pacientes para a terapêutica com trastuzumab, tornando-se daí em diante o método validado para determinação do *status* HER2 em carcinoma da mama [1,14,15]. Tendo em conta a raiz semi-quantitativa do ensaio, foram identificadas várias inconsistências entre os resultados da avaliação do *status* da proteína e do gene, sendo a sua origem essencialmente de ordem técnica, nomeadamente relacionada com más práticas na fase pré-analítica e analítica [16,17]. Deste modo torna-se de extrema importância definir linhas de orientação para a correta performance das metodologias de determinação do *status* HER2, tal como tem sido estabelecido em diversos países em todo o mundo [1,18-22]. Neste sentido a área científica de Anatomia Patológica, Citológica e Tanatológica da Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa

(APCT-ESTeSL) e a Associação Portuguesa de Técnicos de Anatomia Patológica (APTAP) reuniram um painel de especialistas para a construção e estabelecimento de linhas de orientação técnica para a determinação imuno-histoquímica do *status* HER2 em carcinoma da mama para a realidade portuguesa.

## Objetivo

Pretende-se com este documento criar linhas de orientação técnicas para a construção, validação e manutenção do teste imuno-histoquímico para determinação do *status* HER2 em carcinoma da mama, no que diz respeito à realidade portuguesa. Todas as orientações aqui descritas têm em conta o estado da arte atual no que diz respeito à determinação imuno-histoquímica do *status* HER2 em carcinoma da mama, bem como a experiência pessoal e académica de cada um dos membros do painel de especialistas que a subscrevem.

## Intenções do Consenso

As orientações práticas submetidas a consenso pretendem ser declarações sistemáticas desenvolvidas para ajudar os profissionais de saúde na tomada de decisões sobre os cuidados de saúde apropriados a circunstâncias clínicas precisas. Para ser exequível, uma orientação deve possuir características específicas como: confiabilidade, validade, reprodutibilidade, aplicabilidade clínica, flexibilidade, clareza, possibilidade de revisão e documentação. Estas orientações podem ser úteis na produção de melhores cuidados e na redução dos custos.

Ao formular recomendações técnicas para a determinação do *status* HER2 em carcinoma da mama, a APCT-ESTeSL e a APTAP consideraram estes princípios do desenvolvimento de diretrizes.

No entanto, é importante notar que estas não têm sempre em consideração todas as particularidades, mas pretendem designar a situação ideal para a prestação de melhores cuidados de saúde. Também não se destinam a substituir o julgamento técnico em relação a situações particulares ou situações clínicas especiais, mas a dar guias que permitam sustentar essas mesmas decisões.

A publicação destas recomendações técnicas para a determinação do *status* HER2 em carcinoma da mama permitem uma discussão mais alargada sobre o tema e a eventual criação de linhas de orientação não exclusivamente técnicas, identificando questões importantes e lacunas na literatura que permitam lançar temas para futuras investigações.

## APRESENTAÇÃO DO TEMA

## Composição do Pannel de Especialistas

A APCT-ESTeSL e a APTAP reuniram um pannel de 57 técnicos de Anatomia Patológica, Citológica e Tanatológica de diversos laboratórios de Anatomia Patológica portugueses (públicos e privados). A composição final do pannel estabeleceu-se após cada membro cumprir todos os critérios previamente estipulados, nomeadamente:

I. Deter o título profissional de Técnico de Anatomia Patológica, Citológica e Tanatológica;

II. Possuir experiência laboratorial na determinação imuno-histoquímica do *status* HER2 em carcinoma da mama;

III. Ter sido aprovado no curso de formação avançada da ESTeSL “Determinação do *status* HER2 por imunocitoquímica em carcinoma da mama”;

IV. Ter respondido ao questionário de consenso promovido pela APCT-ESTeSL;

V. Ter participado na reunião de consenso “Determinação do *status* HER2 por imunocitoquímica em carcinoma da mama” no dia 20 de Outubro de 2012 promovida pela APCT-ESTeSL e pela APTAP.

As opiniões dos membros do pannel representaram a sua visão individual e não necessariamente a visão do laboratório a que estão associados, seja ele público ou privado. A lista completa dos membros do pannel poderá ser encontrada na Tabela I.

| Membro do pannel             | Instituição                                                                                                            |
|------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Amadeu Ferro, Co-preside     | Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa                                                                       |
| Mário Maia-Matos, Co-preside | Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa                                                                       |
| Alexandra Teixeira           | Hospital de Faro                                                                                                       |
| Ana Coias                    | Hospital Garcia de Orta                                                                                                |
| Ana C. Fernandes             | Centro Hospitalar de Setúbal                                                                                           |
| A. Cristina Gavinho          | Centro Hospitalar de Vila Nova de Gaia                                                                                 |
| Ana Cunha                    | Instituto Português de Oncologia de Lisboa                                                                             |
| Ana F. Santos                | Centro Hospitalar de Lisboa Ocidental                                                                                  |
| Ana Isabel Silva             | Hospital Prof. Doutor Fernando Fonseca                                                                                 |
| Ana L. Marques               | Hospital CUF Descobertas                                                                                               |
| Ana Vilas Boas               | Instituto Português de Oncologia de Coimbra                                                                            |
| Ana Margarida Rodrigues      | Hospital Prof. Doutor Fernando Fonseca                                                                                 |
| Ana Margarida Lopes          | Hospital Prof. Doutor Fernando Fonseca                                                                                 |
| Ana Paula Tavares            | Centro Hospitalar de Lisboa Ocidental                                                                                  |
| Ana Melanda                  | Centro Hospitalar Leiria Pombal                                                                                        |
| Ana Rute Fernandes           | Roche Sistemas de Diagnóstico                                                                                          |
| Salomé Pereira               | Centro Hospitalar de S. João                                                                                           |
| Ana Teodósio                 | Instituto Português de Oncologia de Coimbra                                                                            |
| Anabela Penela               | Hospital de Faro                                                                                                       |
| Filipe Teixeira              | Centro Hospitalar de Vila Nova de Gaia/Espinho                                                                         |
| Carmelina Ramos              | Hospital Distrital de Santarém                                                                                         |
| Catarina Araújo              | Hospital de Faro                                                                                                       |
| Daniel H. Almeida            | Centro de Diagnóstico Anátomo-Patológico                                                                               |
| Daniela Alves                | Unidade Local de Saúde de Matosinhos                                                                                   |
| Dina Leitão                  | Faculdade de Medicina da Universidade do Porto, Instituto de Patologia e Imunologia Molecular da Universidade do Porto |
| M. Edite Figueira            | Hospital CUF Descobertas                                                                                               |
| Estela Martins               | Unidade Local de Saúde de Matosinhos                                                                                   |
| Fátima P. Silva              | Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra                                                                           |
| Filipa Areia                 | Instituto Português de Oncologia de Lisboa                                                                             |
| Helena Simões                | Centro Hospitalar Lisboa Norte                                                                                         |
| Ilda Simões                  | Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra                                                                           |
| Joana R. Cunha               | Unidade Local de Saúde de Matosinhos                                                                                   |
| Lúcia Carrão                 | Centro Hospitalar Lisboa Norte                                                                                         |
| Manuel Lourenço              | Centro Hospitalar do Barlavento Algarvio                                                                               |
| Manuela Henriques            | Instituto Português de Oncologia de Coimbra                                                                            |
| Manuela D. Soares            | Centro Hospitalar Barreiro Montijo                                                                                     |
| Mara Santos                  | Centro Hospitalar Lisboa Norte                                                                                         |
| Amélia Silva                 | Centro Hospitalar Lisboa Ocidental                                                                                     |
| Salomé Pessoa                | Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra                                                                           |
| Maria Teresa Assunção        | Instituto Português de Oncologia de Coimbra                                                                            |
| Mariana Ganhão               | Centro Hospitalar de S. João                                                                                           |
| Marta Roquette               | Centro Hospitalar Lisboa Ocidental                                                                                     |

|                  |                                                                                                                                   |
|------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Nuno Silva       | Hospital Dr. Nélio Mendonça                                                                                                       |
| Patrícia Mendes  | Instituto Português de Oncologia de Lisboa                                                                                        |
| Paula Borges     | Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra                                                                                      |
| Paula Casimiro   | Serviços de Assistência Médico-Social do Sindicato dos Bancários do Sul e Ilhas, Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa |
| Paula Laranjeiro | Centro Hospitalar Lisboa Ocidental                                                                                                |
| Paulo Teixeira   | Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra                                                                                      |
| Renata Vieira    | Instituto Português de Oncologia do Porto                                                                                         |
| Rosa Garcia      | Hospital Dr. Nélio Mendonça                                                                                                       |
| Ruth Sardinha    | Hospital do Espírito Santo de Évora                                                                                               |
| Marisa Sá        | Centro Hospitalar Lisboa Norte                                                                                                    |
| Sónia Carretas   | Centro Hospitalar de Setúbal                                                                                                      |
| Teresa Franco    | Centro Hospitalar Lisboa Ocidental                                                                                                |
| Teresa Lacerda   | Centro Hospitalar Lisboa Central                                                                                                  |
| Teresa Pereira   | Instituto Português de Oncologia de Lisboa                                                                                        |
| Vasco Serra      | Instituto Português de Oncologia de Coimbra                                                                                       |

Tabela I - Membros do painel

### Metodologia de Consenso

Da reflexão efetuada durante o curso de formação avançada foi efetuado um documento provisório que foi submetido a apreciação dos especialistas sob a forma de questionário. O mesmo painel de especialistas reuniu-se no dia 20 de outubro de 2012 nas instalações da ESTeSL, durante a qual se apresentaram e colocaram a discussão individual as declarações propostas pelo documento de trabalho. Foram recebidas contrapropostas, devidamente fundamentadas, dos membros do painel e/ou pedidos de esclarecimento acerca da declaração. Após apresentação da declaração final submetia-se a consenso, podendo cada membro do painel: dar consentimento, afastar-se da decisão permitindo consentimento ou bloquear o consenso levando a nova discussão dos argumentos. Estabelecido o consenso acerca da declaração iniciava-se nova discussão de uma nova declaração. As linhas seguidamente apresentadas foram consensuais aos 57 membros do painel de especialistas presentes na reunião de consenso.

Todos os membros subscritores deste documento declararam não existir qualquer conflito de interesses, comprometendo-se a declarar qualquer interesse financeiro ou outro que possa ser interpretado como constituindo um conflito real, potencial ou aparente.

### Linhas de Orientação Técnica para a Construção, Validação e Manutenção do Teste Imuno-histoquímico para a Determinação do Status HER2 em Carcinoma da Mama

#### 1. Aspetos Gerais

##### 1.1. Planeamento do teste

A implementação do teste de imuno-histoquímica para determinação do *status* HER2 em carcinoma da mama necessita de um

planeamento inicial de modo a garantir que existem todas as condições para um teste fidedigno.

O planeamento deve passar por:

I. Avaliação das necessidades humanas, físicas e materiais para cumprimento das condições mínimas do teste;

II. Estabelecimento de procedimentos adequados em todas as fases do teste, desde a colheita da amostra até ao relatório final;

III. Criação de metodologias de registo, monitorização e rastreabilidade de procedimentos;

IV. Formação de todo o pessoal envolvido no teste (e.g., cirurgiões, enfermeiros, assistentes técnicos, assistentes operacionais, oncologistas, anatomopatologistas e técnicos de Anatomia Patológica, Citológica e Tanatológica);

V. Realização de testes e validação de resultados;

VI. Implementação do teste para diagnóstico;

VII. Planeamento de momentos de revisão de procedimentos e de atualização da formação do pessoal envolvido em todas as fases do teste.

##### 1.2. Registo de procedimentos

O registo de procedimentos é um dos passos fundamentais e deve ser o mais preciso possível de modo a se poder rastrear todo o circuito. Para além das informações clínicas e institucionais devem-se registar vários elementos de acordo com a fase do teste. Todos os registos devem ser efetuados pela pessoa que os executa devendo o seu nome ficar registado na fase respetiva.

##### 1.3. Garantias de qualidade de todos os reagentes

Todos os reagentes utilizados durante o teste devem ser de qualidade certificada, devendo ter maior atenção para aqueles que mais diretamente influenciam os resultados finais, nomeadamente:

### 1.3.1. Solução fixadora

O laboratório que recebe amostras para determinação do *status* HER2 deve indicar a solução fixadora para a qual tem o teste validado (marca e referência). O serviço onde é efetuada a colheita deve respeitar esta indicação e fica responsável por registrar o lote da solução fixadora que utiliza em cada amostra. Devem ser utilizados reagentes “prontos a utilizar”.

### 1.3.2. Agentes de desidratação

Devido à relevância da desidratação é importante monitorizar o número de cassetes que é processado e efetuar substituições regulares dos reagentes de acordo com norma a estabelecer pela instituição. Deve-se ter atenção aos diferentes tecidos, pois estes poderão apresentar taxas diferentes de saturação dos reagentes (etanol, acetona, etc.).

### 1.3.3. Meio de impregnação e inclusão

Deve-se monitorizar a temperatura do meio de impregnação e inclusão de forma a garantir que não sofre ciclos de aquecimento/arrefecimento que provoquem a perda das suas características.

### 1.3.4. Reagentes de imuno-histoquímica

Os reagentes utilizados em imuno-histoquímica devem ser manuseados e acondicionados de acordo com as instruções do fabricante, nomeadamente: conservação no frio, protegido da luz, respeitando as validades e os tipos de recipientes, entre outras.

## 1.4. Condições técnicas e humanas

### 1.4.1. Formação do pessoal.

a) O pessoal envolvido na determinação imuno-histoquímica do *status* HER2 (e.g., cirurgiões, enfermeiros, assistentes técnicos, assistentes operacionais, oncologistas, anatomopatologistas e técnicos de Anatomia Patológica, Citológica e Tanatológica) deve ter formação específica, sobre o teste [23].

b) A formação deve ser oferecida sempre que alguém é integrado no circuito do teste e deve ser regular para todo o pessoal envolvido. A frequência da formação deve ser de acordo com as necessidades do pessoal e com a implementação de novos procedimentos. Esta formação deve incluir temáticas relacionadas com o impacto do teste na vida dos doentes, com os procedimentos do teste e com a parte específica do procedimento em que estão envolvidos.

c) Para o teste ser válido, a fase analítica deve ser executada por um técnico de Anatomia Patológica, Citológica e Tanatológica com experiência na área de imuno-histoquímica (este requisito básico não dispensa a formação contínua) [23].

## 2. Orientações Técnicas para Determinação Imuno-histoquímica do *Status* HER2 em Carcinoma da Mama.

### 2.1. Fase pré-analítica

2.1.1. Colheita, acondicionamento e transporte (Fluxograma I).

#### 2.1.1.1. Aspectos gerais.

a) A determinação imuno-histoquímica do *status* HER2 pode ser efetuada em biópsias bem como em peças cirúrgicas, não devendo ser executado em amostras de citologia (Tabela II) [20,24,25].

b) Na colheita deve-se registar a data e hora de colheita da amostra (início do tempo de isquémia a frio) bem como a temperatura a que fica até ao acondicionamento (quando não é acondicionado imediatamente).

c) Todas as amostras devem ser fixadas numa solução aquosa de formaldeído a 4% (formalina a 10%) tamponada por fosfatos a pH 7.0 num volume mínimo de 4 vezes o volume do tecido a fixar [1,20,28,29].

O tempo de isquémia a frio deve ser reduzido ao mínimo podendo estender-se a um máximo de 60 minutos (Tabela II) [26,27,30,31].

#### 2.1.1.2. Acondicionamento de biópsias.

a) As biópsias devem ser colocadas na solução fixadora imediatamente após a sua colheita, devendo o tempo de fixação ser no mínimo de 6 horas para uma temperatura aproximada de 22 a 26 °C, não devendo exceder as 96 horas de fixação por falta de evidência científica que valide essa opção (Tabela II) [1,27,32,33].

b) As biópsias não devem ser colocadas a 4 °C se estiverem na solução fixadora, pois podem induzir uma fixação inferior à real.

c) Deve-se registar a data e hora de imersão em solução fixadora (se for imediatamente após excisão deve ser indicada a mesma hora da colheita) e a temperatura a que fica sujeita a amostra até ao transporte.

#### 2.1.1.3. Acondicionamento de peças cirúrgicas.

a) As peças cirúrgicas devem ser prontamente seccionadas (ver 2.1.2.2.) e posteriormente imersas em solução fixadora, devendo o tempo de fixação ser no mínimo de 24 horas para uma temperatura aproximada de 22 a 26 °C, não devendo exceder as 96 horas de fixação por falta de evidência científica que valide essa opção (Tabela II) [1,15,20,27,32,33].

b) Quando não for possível a secção imediata (em menos de 60 minutos após excisão cirúrgica), as peças deverão ser refrigeradas a 4 °C, não podendo o tempo de isquémia a frio sob

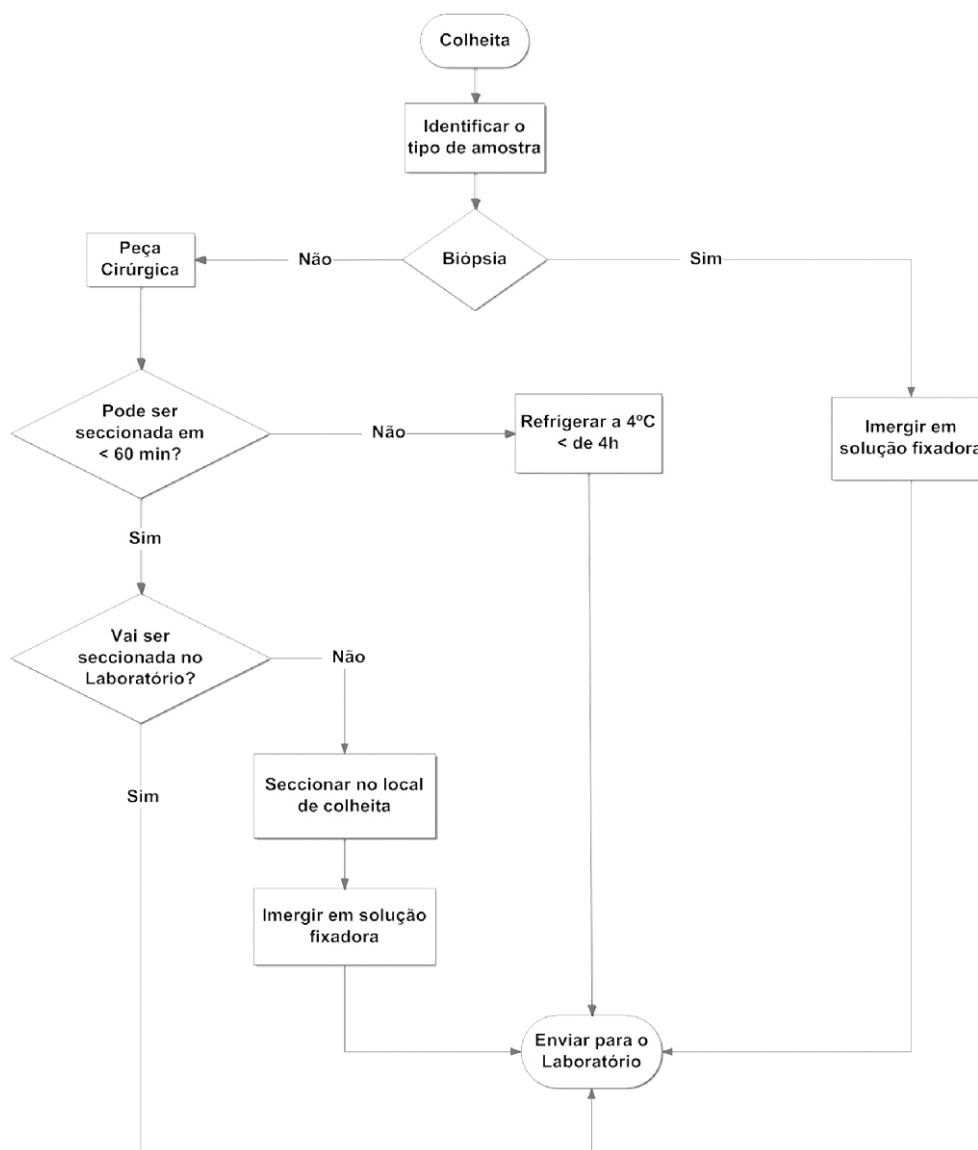
refrigeração ser superior a 4 horas (Fluxograma I) [15,27].

c) Deve-se registrar o método de preservação antes da fixação adequada (indicação da temperatura, data e hora de preservação). Quando o seccionamento da amostra é efetuado fora do laboratório deve-se

indicar a data e hora de início da fixação (final do tempo de isquemia a frio).

#### 2.1.1.4. Transporte.

a) O recipiente a ser utilizado para acondicionamento e transporte deve ser de material não reativo e tampa vedante que



*Fluxograma I - Tomada de decisões no local de colheitas para a preservação de amostras para determinação imuno-histoquímica do status HER2*

| Amostras citológicas                                                                                                                               |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Tempo de isquemia a frio superior a 1h a temperaturas entre 20 °C e 25 °C ou igual ou superior a 4h quando preservadas a 4 °C fora do fixador[27]. |
| Fixação noutras soluções fixadoras que não solução aquosa de formaldeído a 4% (formalina a 10%) tamponada por fosfatos a pH 7 <sup>*</sup> .       |
| Tempos de fixação inferiores a 6 horas para biópsias e a 24 horas para peças cirúrgicas ou superiores a 96 horas para ambos <sup>†</sup> [1,27].   |
| Controlo externo positivo com marcação diferente da esperada.                                                                                      |
| Ductos normais com marcação superior a 1+.                                                                                                         |
| Marcação citoplasmática que obscureça a marcação membranar.                                                                                        |
| Alterações morfológicas que impeçam a avaliação da membrana celular.                                                                               |

*Tabela II - Resumo de critérios de exclusão para determinação imuno-histoquímica do status HER2 em carcinoma da mama*

encerre hermeticamente a solução fixadora e a amostra. Deve estar rotulado com:

I. Identificação da solução fixadora (nome, marca, lote);

II. Sinalização de risco químico e/ou identificação de risco biológico do Global Harmonized System (GHS);

III. Identificação do serviço (identificação do hospital e serviço requisitante);

IV. Identificação da amostra (e.g., número interno do doente, nome completo, tipo de amostra).

b) O transporte de amostras deve ser efetuado no menor tempo possível sob condições de temperatura controlada, respeitando todas as normas de segurança aplicáveis ao transporte de amostras biológicas.

c) Devem ser registadas todas as alterações que tenham impacto na sua preservação (e.g. derrame de solução fixadora, alterações de temperatura superiores a 4 °C).

d) Para peças cirúrgicas não fixadas é aconselhado o transporte a baixa temperatura entre 4 a 8 °C sob condições de vácuo. Deve-se registar a temperatura a que fica sujeita até chegar ao laboratório.

**2.1.2. Receção, macroscopia, fixação, processamento e inclusão (Fluxograma II).**

**2.1.2.1. Receção de amostras no laboratório.**

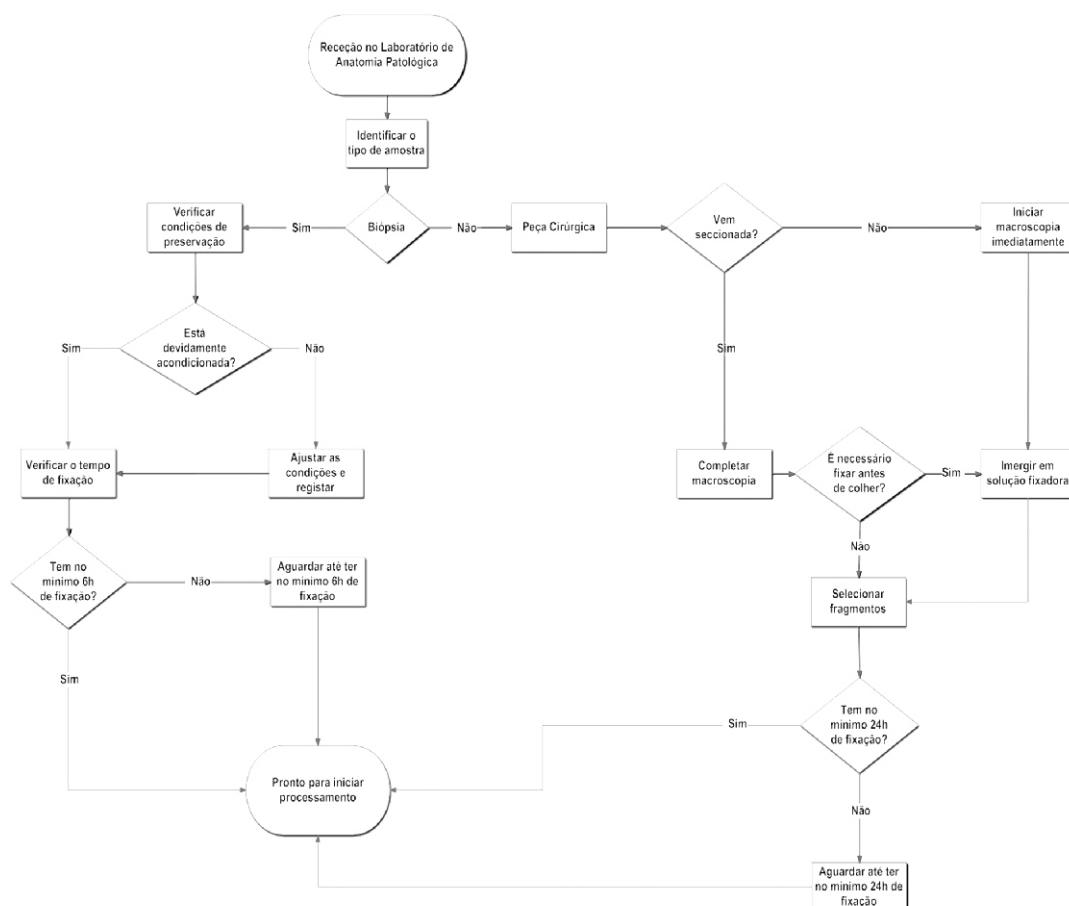
a) A receção das amostras deve ser feita garantindo que todos os procedimentos estabelecidos pelo laboratório como mínimos foram cumpridos durante a colheita, acondicionamento e transporte das mesmas. Deve-se confirmar todos os dados e registar a data e hora da receção no laboratório.

b) Deve-se verificar se as amostras que chegam ao laboratório em fixador possuem solução fixadora em volume adequado. Caso o volume não seja adequado deve-se registar e garantir que durante o restante tempo de fixação o volume é de no mínimo 4 vezes o volume da amostra [1,20,28,29].

**2.1.2.2. Macroscopia.**

a) As peças cirúrgicas não seccionadas chegam a fresco, e devem ser devidamente seccionadas, colocando-se de imediato em solução fixadora de acordo com as condições indicadas anteriormente.

b) Na descrição macroscópica devem-se registar todos os dados da peça de acordo com os



**Fluxograma II - Tomada de decisões no laboratório de Anatomia Patológica para a preservação de amostras para determinação imuno-histoquímica do status HER2**

procedimentos estabelecidos pelo laboratório. Deve-se registar o número de fragmentos colhidos, a sua respetiva localização, a data e hora de imersão na solução fixadora e a temperatura a que ficam sujeitos.

c) Antes de se iniciar o processamento deve-se garantir que as amostras possuem o número mínimo e não ultrapassam o número máximo de horas de fixação (ver 2.1.1.2. e 2.1.1.3.).

### 2.1.2.3. Processamento e inclusão.

a) O processamento das amostras deve ser o mais automatizado possível e a qualidade dos reagentes deve ser monitorizada tendo em conta o número e tipo de amostras que entram em contacto com os mesmos. Deve-se registar o processamento a que cada fragmento é sujeito (pode ser de forma genérica, desde que fiquem registadas todas as alterações ao processamento) [34]. O laboratório deverá monitorizar a qualidade dos reagentes do processamento.

b) Processamentos que utilizem reagentes ou procedimentos alternativos (e.g. substitutos de etanol e xilol, aquecimento de soluções e micro-ondas) devem ser devidamente validados para garantir a fiabilidade dos resultados [1,20,29].

c) Ao processar amostras que devam aguardar no processador mais de 24 horas (dias feriados ou fins de semana) deve-se privilegiar que aguardem o início do processamento em solução fixadora [27]. Deve-se evitar que os fragmentos aguardem em etanol ou em meio de impregnação no estado líquido.

d) A inclusão das amostras deve ser efetuada com brevidade, devendo os blocos ser armazenados a uma temperatura aproximada de 20 a 25°C [20].

## 2.2. Fase analítica

A técnica imuno-histoquímica utilizada deve ser o mais automatizada e uniformizada possível, de modo a diminuir o erro humano e aumentar a monitorização dos procedimentos.

### 2.2.1. Microtomia

a) As condições de microtomia devem ser mantidas ao máximo de análise para análise.

b) A espessura do corte deve ser 2-4µm e a extensão deve ser efetuada em água com uma condutividade controlada, nomeadamente água destilada. A temperatura do banho-maria deve ser constante e monitorizada sendo no máximo 50°C.

c) O tempo e temperatura de adesão devem ser constantes, sendo aconselhável uma

temperatura não superior a 65°C [35].

d) Os cortes de amostras para determinação imuno-histoquímica do *status* HER2 devem ser obtidos o mais próximo possível da realização da determinação. A utilização de cortes histológicos obtidos mais de 6 semanas antes da determinação pode levar a alteração da antigenicidade [1,20,29,35-38].

e) Deve-se registar a data de corte e do método de adesão (o método de adesão pode ser registado de forma genérica desde que se registem todas as alterações ao procedimento).

### 2.2.2. Controlos

a) Nos casos para determinação imuno-histoquímica do *status* HER2 devem-se seleccionar sempre que possível as amostras que possuam ductos mamários normais que possam servir de controlo interno negativo. A imunomarcagem em ductos mamários normais deve ser negativa, ou seja, 0 ou 1+ [1,15].

b) Todas as lâminas deverão ter um controlo externo com casos do laboratório representativos dos quatro tipos de imunomarcagem possíveis, ou seja: dois casos negativos (0 e 1+), um caso borderline (2+) e um caso positivo (3+) [15,39-41]. Este controlo poderá ser construído através de um *tissue microarray* [1]. A avaliação inicial destes casos tem de ser devidamente validada por um anatomopatologista.

### 2.2.3. Técnica imuno-histoquímica

Deve ficar registada a data de execução, bem como todos os elementos referentes à técnica imuno-histoquímica, mesmo se de forma genérica, desde que se registem todas as alterações. Deve ser registado:

I. Método de recuperação antigénica;

II. Métodos de bloqueio de substâncias endógenas;

III. Características da incubação do anticorpo primário (e.g., referência do anticorpo, clone, lote, concentração, tempo e temperatura de incubação);

IV. Método de amplificação de sinal,

V. Método de lavagens;

VI. Características do cromogénio e sua incubação e método de contraste.

### 2.2.4. Recuperação antigénica

a) O método de recuperação antigénica selecionado deverá depender das condições da fase pré-analítica das amostras do laboratório bem como do anticorpo primário e sistema de deteção utilizados [15,34].

b) Independentemente do método selecionado e validado, as condições de

recuperação antigénica devem ser mantidas entre cada teste (e.g. temperatura, volume de solução, tipo de solução de recuperação e quantidade de lâminas). A uniformização de procedimentos diminuirá a variabilidade de resultados e todas as alterações carecem de verificação de fiabilidade do controlo.

#### 2.2.5. Anticorpo primário

a) Recomenda-se a utilização de anticorpos primários ou *kits* de diagnóstico aprovados por entidades reconhecidas, como a Food and Drug Administration (FDA) ou a European Medicines Agency (EMA) [1,15]. A utilização de *kits* aprovados não isenta a validação do teste pelo próprio laboratório.

b) As condições de aplicação do anticorpo devem ser mantidas entre cada teste (e.g., concentração, lote, solução de lavagem, tempo e temperatura de incubação e de lavagens). Todas as alterações carecem de verificação de fiabilidade do controlo.

#### 2.2.6. Sistema de deteção

A seleção do sistema de deteção deve ser feita de acordo com as características do anticorpo primário.

#### 2.2.7. Contraste

O contraste deve ser o suficientemente claro para não obscurecer a marcação específica e o suficientemente intenso para permitir distinguir a morfologia do tecido.

### 2.3. Fase pós-analítica

#### 2.3.1. Gestão de controlo de qualidade.

a) O técnico de Anatomia Patológica, Citológica e Tanatológica deve efetuar um controlo técnico de cada caso, registando a data em que este é realizado e o seu resultado.

b) Deve-se manter um registo de todos os testes não aprovados no controlo de qualidade, bem como do motivo e o modo como evoluíram as possíveis repetições do teste.

c) Os resultados da determinação imuno-histoquímica do *status* HER2 em carcinoma da mama serão tanto mais consistentes ao longo do tempo quanto mais o laboratório for rigoroso no que diz respeito à formação e à existência de pessoal experiente, minimizando a sua rotatividade, mantendo um controlo de qualidade interno e aderindo a um programa de controlo de qualidade externo [1].

##### 2.3.1.1. Boas práticas de avaliação de qualidade.

a) Aconselha-se que o laboratório deva ter pelo menos 250 determinações anuais do

*status* HER2 por imuno-histoquímica para garantir a consistência dos resultados. Laboratórios com números inferiores devem enviar os seus casos para centros de referência que cumpram este valor mínimo [15,42,43].

b) O laboratório deve ter o máximo de estabilidade de pessoal. Quando existe rotatividade, a determinação imuno-histoquímica do *status* HER2 deve ser supervisionada por um técnico experiente, tendo já realizado 250 determinações anuais [1,42,43].

c) A avaliação da qualidade deve ser realizada através de uma análise anual dos registos do laboratório. Podem-se indicar como exemplos de indicadores de qualidade do teste para avaliação anual: o número de repetições por ano e a proporção (%) de determinações 2+ que são amplificadas por hibridização *in situ* (HIS). O número de repetições por ano deve ser o menor possível e a percentagem de determinações 2+ que são amplificadas por HIS deverá ser inferior a 30% [44,45].

##### 2.3.1.2. Critérios de avaliação da qualidade da técnica.

a) A avaliação da qualidade da técnica deve ser efetuada pelo técnico de Anatomia Patológica, Citológica e Tanatológica que realizou a técnica imuno-histoquímica e validada pelo técnico de Anatomia Patológica, Citológica e Tanatológica mais experiente na determinação imuno-histoquímica do *status* HER2 do laboratório.

b) Os critérios a avaliar em todas as amostras deverão ser: morfologia celular, marcação específica e marcação inespecífica. A morfologia celular deve ser mantida o mais íntegra possível. A marcação específica a considerar pode surgir nas células normais dos ductos mamários (1+) e, nas células tumorais do componente invasivo, esta deve ser membranar e de acordo com os seguintes critérios [1,46,47]:

I. Marcação completa, uniforme e intensa para células 3+;

II. Marcação completa, não uniforme ou fraca para células 2+;

III. Marcação obrigatoriamente incompleta e não uniforme ou fraca para células 1+

A marcação de outras células, ou outro tipo de marcação deve ser considerada marcação inespecífica (Tabela II) [1].

c) Estão sujeitos a avaliação da qualidade da técnica o controlo externo, o controlo interno, e o caso em estudo.

d) A avaliação deve iniciar-se pelo controlo externo (ver 2.2.2.), cujos resultados devem ser concordantes com os resultados dados

aos mesmos casos em avaliações anteriores. Qualquer discrepância que implique uma classificação diferente da anterior deve levar à rejeição dos resultados (Tabela II) [1]. Outras alterações devem ser registadas.

e) Na avaliação do controlo interno este deve ser negativo (0 ou 1+), sendo que qualquer resultado equívoco (2+) ou positivo (3+) deve levar à rejeição dos resultados [1]. Outras alterações devem ser registadas.

f) A avaliação do caso deve ser efetuada na componente invasiva do tumor [1]. Deve-se garantir que a morfologia celular é íntegra, que a marcação específica quando presente é inequívoca e que não existe marcação inespecífica.

A presença de marcação citoplasmática é aceitável desde que não obscureça a marcação membranar (Tabela II) [1].

g) O não cumprimento dos critérios de avaliação da qualidade da técnica para o caso, não é critério absoluto de exclusão, mas deve ser objeto de discussão com o anatomopatologista responsável pelo caso.

### 3. Validação do Teste.

Antes de se iniciar a determinação imuno-histoquímica do *status* HER2 para carcinoma da mama, deve-se validar o teste. Para validação da técnica imuno-histoquímica consideram-se

apenas os resultados dicotómicos da determinação do *status* HER2, ou seja os casos negativos (0/1+) e positivos (3+) [1].

#### 3.1. Esquema de validação técnica (Tabelas III e IV e Fluxograma III).

a) A validação do teste é feita por comparação de pelo menos 25 resultados da determinação imuno-histoquímica do *status* HER2 com um teste validado (HIS ou teste de imuno-histoquímica já validado por outra instituição) [1,15].

b) Para validar o teste deve-se calcular a percentagem de concordância que deve ser igual ou superior a 95%.

A percentagem de concordância combina a sensibilidade e especificidade numa mesma medida, calculando-se pelo número total de casos concordantes positivos e negativos sobre o número total de casos avaliados [1].

c) A percentagem de concordância pode ser altamente influenciada pelo número de casos negativos e positivos se os valores da sensibilidade e especificidade não forem semelhantes.

Deste modo, deve-se calcular a sensibilidade e a especificidade, se estas não apresentarem valores semelhantes deve-se garantir uma representação adequada de casos positivos e negativos (pelo menos 30 de cada) [1].

|                    |                 | Teste validado |          |           |
|--------------------|-----------------|----------------|----------|-----------|
|                    |                 | Positivo       | Negativo | Total     |
| Imuno-histoquímica | Resultado       |                |          |           |
|                    | Positivo (3+)   | a              | b        | a+b       |
|                    | Equívoco (2+)   | c              | d        | c+d       |
|                    | Negativo (0/1+) | e              | f        | e+f       |
|                    | Total           | a+c+e          | b+d+f    | Somatório |

Tabela III - Tabela de dupla entrada para cálculos de validação e controlo de qualidade

$$\text{Sensibilidade} = \frac{a}{a+e} \times 100$$

$$\text{Especificidade} = \frac{f}{b+f} \times 100$$

$$\text{Percentagem de concordância} = \frac{a+f}{a+b+e+f} \times 100$$

$$\text{Percentagem de determinações 2+ amplificadas} = \frac{c}{c+d} \times 100$$

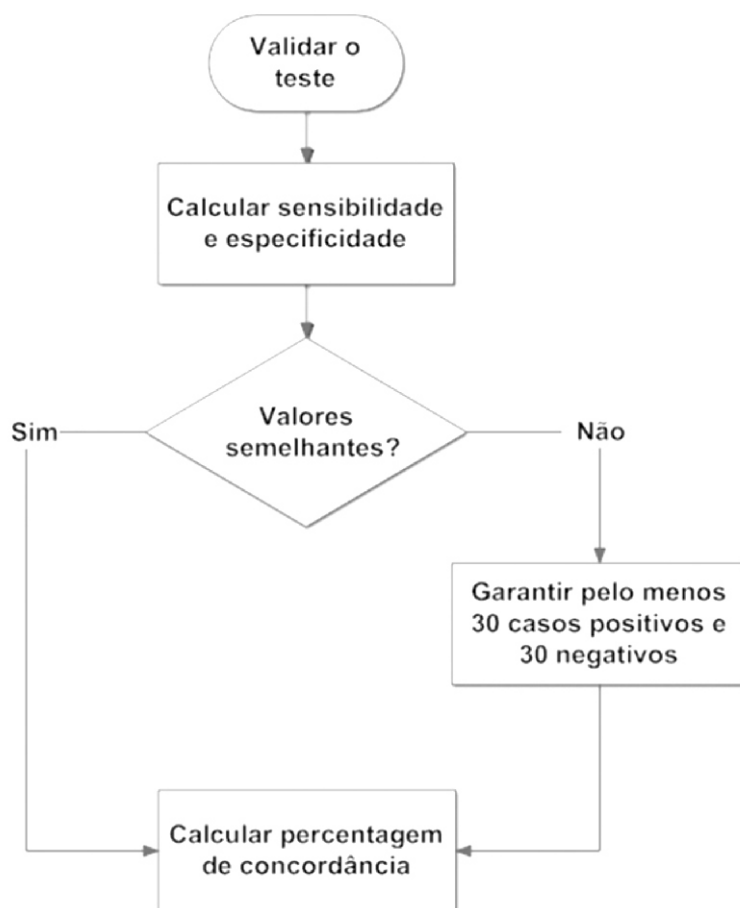
Tabela IV - Formulário

d) Entende-se por sensibilidade a proporção (%) de casos com resultados positivos obtidos quando são avaliados apenas os verdadeiros positivos, calcula-se dividindo o número de casos positivos para ambos os testes pelo número de casos positivos para o teste validado [1].

e) Entende-se por especificidade a proporção (%) de casos com resultados negativos obtidos quando são avaliados apenas os verdadeiros negativos, calcula-se dividindo o número de casos negativos para ambos os testes pelo número de casos negativos para o teste validado [1].

### Nota Final

As normas apresentadas para a fase pré-analítica são virtualmente válidas para os outros marcadores imuno-histoquímicos da mama bem como para HIS [1]. No entanto, deverão ser alvo de apreciação por um painel de especialistas específico.



Fluxograma III - Algoritmo de decisões para calcular a percentagem de concordância para validação do teste

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Wolff AC, Hammond MEH, Schwartz JN, Hagerty KL, Allred DC, Cote RJ, et al. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Guideline Recommendations for Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Testing in Breast Cancer. *Journal of Clinical Oncology*. 2007 Jan 1;25(1):118-45.
2. Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science*. 1987 Jan 9;235(4785):177-82.
3. Press MF, Pike MC, Chazin VR, Hung G, Udove JA, Markowicz M, et al. Her-2/neu expression in node-negative breast cancer: direct tissue quantitation by computerized image analysis and association of overexpression with increased risk of recurrent disease. *Cancer Res*. 1993 Oct 15;53(20):4960-70.
4. Press MF, Bernstein L, Thomas PA, Meisner LF, Zhou JY, Ma Y, et al. HER-2/neu gene amplification characterized by fluorescence in situ hybridization: poor prognosis in node-negative breast carcinomas. *J. Clin. Oncol*. 1997 Aug;15(8):2894-904.
5. Vogel CL, Cobleigh MA, Tripathy D, Gutheil JC, Harris LN, Fehrenbacher L, et al. Efficacy and safety of trastuzumab as a single agent in first-line treatment of HER2-overexpressing metastatic breast cancer. *J. Clin. Oncol*. 2002 Feb 1;20(3):719-26.
6. Baselga J. Phase I and II clinical trials of trastuzumab. *Ann. Oncol*. 2001;12 Suppl 1:S49-55.
7. Arteaga CL. Trastuzumab, an appropriate first-line single-agent therapy for HER2-overexpressing metastatic breast cancer. *Breast Cancer Res*. 2003;5(2):96-100.
8. Baselga J, Cortés J, Kim S-B, Im S-A, Hegg R, Im Y-H, et al. Pertuzumab plus trastuzumab plus docetaxel for metastatic breast cancer. *N. Engl. J. Med*. 2012 Jan 12;366(2):109-19.
9. Keating GM. Pertuzumab: in the first-line treatment of HER2-positive metastatic breast cancer. *Drugs*. 2012 Feb 12;72(3):353-60.
10. Perou CM, Sørli T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, et al. Molecular portraits of human breast

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

tumours. *Nature*. 2000 Aug 17;406(6797):747-52.

11. Hergueta-Redondo M, Palacios J, Cano A, Moreno-Bueno G. "New" molecular taxonomy in breast cancer. *Clin Transl Oncol*. 2008 Dec;10(12):777-85.

12. Zepeda-Castilla EJ, Recinos-Money E, Cuéllar-Hubbe M, Robles-Vidal CD, Maafs-Molina E. [Molecular classification of breast cancer]. *Cir Cir*. 2008 Feb;76(1):87-93.

13. Ruijter TC, Veeck J, Hoon JPJ, Engeland M, Tjan-Heijnen VC. Characteristics of triple-negative breast cancer. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*. 2010 Nov 11;137(2):183-92.

14. Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, Fuchs H, Paton V, Bajamonde A, et al. Use of Chemotherapy plus a Monoclonal Antibody against HER2 for Metastatic Breast Cancer That Overexpresses HER2. *New England Journal of Medicine*. 2001 Mar 15;344(11):783-92.

15. Perry N, Puthaar E, Comissió Europea. European guidelines for quality assurance in breast cancer screening and diagnosis. Luxembourg: Office for Official Publications of the European Communities; 2006.

16. Mass R, Sanders C, Kasian Charlene, Lori Johnson, Tajuana Everett, Steve Anderson. The Concordance Between the Clinical Trials Assay (CTA) and Fluorescence in Situ Hybridization (FISH) in the Herceptin Pivotal Trials. *Proc Am Soc Clin Oncol*. 2000;19(75a).

17. Dolan M, Snover D. Comparison of Immunohistochemical and Fluorescence In Situ Hybridization Assessment of HER-2 Status in Routine Practice. *American Journal of Clinical Pathology*. 2005 May 1;123(5):766-70.

18. Ellis IO. Best Practice No 176: Updated recommendations for HER2 testing in the UK. *Journal of Clinical Pathology*. 2004 Mar 1;57(3):233-7.

19. Hanna W, O'Malley FP, Barnes P, Berendt R, Gaboury L, Magliocco A, et al. Updated recommendations from the Canadian National Consensus Meeting on HER2/neu testing in breast cancer. *CURRENT ONCOLOGY*. 2007 Aug;14(4):149-53.

20. Albanell J, Andreu X, Calasanz MJ, Concha Á, Corominas JM, García-Caballero T, et al. Guidelines for HER2 testing in breast cancer: a national consensus of the Spanish Society of Pathology (SEAP) and the Spanish Society of Medical Oncology (SEOM). *Clinical and Translational Oncology*. 2009 Jun 27;11(6):363-75.

21. Middleton LP, Price KM, Puig P, Heydon LJ, Tarco E, Sneige N, et al. Implementation of American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists HER2 Guideline Recommendations in a tertiary care facility increases HER2 immunohistochemistry and fluorescence in situ hybridization concordance and decreases the number of inconclusive cases. *Arch. Pathol. Lab. Med*. 2009 May;133(5):775-80.

22. Wong NS, Anderson BO, Khoo KS, Ang PT, Yip CH, Lu Y-S, et al. Management of HER2-positive breast cancer in Asia: consensus statement from the Asian Oncology Summit 2009. *Lancet Oncol*. 2009 Nov;10(11):1077-85.

23. Arafah M. HER2/neu Immunostaining in Invasive Breast Cancer: Analysis of False Positive Factors. *Oman Medical Journal [Internet]*. 2010 Oct [cited 2012 Sep 13]; Available from: [http://www.omjournal.org/fulltext\\_PDF.aspx?DetailsID=16&type=fulltext](http://www.omjournal.org/fulltext_PDF.aspx?DetailsID=16&type=fulltext)

24. Nizzoli R, Bozzetti C, Crafa P, Naldi N, Guazzi A, Di Blasio B, et al. Immunocytochemical evaluation of HER-2/neu on fine-needle aspirates from primary breast carcinomas. *Diagnostic Cytopathology*. 2003 Mar;28(3):142-6.

25. Sartelet H. Comparison of liquid based cytology and histology for the evaluation of HER-2 status using immunostaining and CISH in breast carcinoma. *Journal of Clinical Pathology*. 2005 Aug 1;58(8):864-71.

26. Hammond MEH, Hayes DF, Dowsett M, Allred DC, Hagerty KL, Badve S, et al. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer (unabridged version). *Arch. Pathol. Lab. Med*. 2010 Jul;134(7):e48-72.

27. Yildiz-Aktas IZ, Dabbs DJ, Bhargava R. The effect of cold ischemic time on the immunohistochemical evaluation of estrogen receptor, progesterone receptor, and HER2 expression in invasive breast carcinoma. *Modern Pathology*. 2012 Mar 30;25(8):1098-105.

28. Goldstein NS, Hewitt SM, Taylor CR, Yaziji H, Hicks DG. Recommendations for improved standardization of immunohistochemistry. *Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol*. 2007 Jun;15(2):124-33.

29. Gómez-Martín C, Concha Á, Corominas JM, García-Caballero T, García-García E, Iglesias M, et al. Consensus of the Spanish Society of Medical Oncology (SEOM) and Spanish Society of Pathology (SEAP) for HER2 testing in gastric carcinoma. *Clinical and Translational Oncology*. 2011 Sep 3;13(9):636-51.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

30. Khoury T, Sait S, Hwang H, Chandrasekhar R, Wilding G, Tan D, et al. Delay to formalin fixation effect on breast biomarkers. *Modern Pathology*. 2009 Sep 4;22(11):1457-67.
31. Moatamed NA, Nanjangud G, Pucci R, Lowe A, Shintaku IP, Shapourifar-Tehrani S, et al. Effect of Ischemic Time, Fixation Time, and Fixative Type on HER2/neu Immunohistochemical and Fluorescence In Situ Hybridization Results in Breast Cancer. *American Journal of Clinical Pathology*. 2011 Oct 26;136(5):754-61.
32. Tong LC, Nelson N, Tsourgiannis J, Mulligan AM. The effect of prolonged fixation on the immunohistochemical evaluation of estrogen receptor, progesterone receptor, and HER2 expression in invasive breast cancer: a prospective study. *Am. J. Surg. Pathol*. 2011 Apr;35(4):545-52.
33. Yildiz-Aktas IZ, Dabbs DJ, Cooper KL, Chivukula M, McManus K, Bhargava R. The Effect of 96-Hour Formalin Fixation on the Immunohistochemical Evaluation of Estrogen Receptor, Progesterone Receptor, and HER2 Expression in Invasive Breast Carcinoma. *American Journal of Clinical Pathology*. 2012 Apr 20;137(5):691-8.
34. O'Leary T, Fowler C, Evers D, Mason J. Protein fixation and antigen retrieval: chemical studies. *Biotechnic and Histochemistry*. 2009 Oct;84(5):217-21.
35. Thurby, Christina, White, M. Randy, Simutis F, Gillham S, Slinker D. An Improved Method of Tissue Adhesion on Glass Microslides for Immunohistochemical Evaluation by the Use of Selected Tissues from the Dog and Monkey. *The J Histotechnol*. December;32(4):198-201.
36. Henson DE. Loss of p53-immunostaining intensity in breast cancer. *J. Natl. Cancer Inst*. 1996 Aug 7;88(15):1015-6.
37. Jacobs TW, Prioleau JE, Stillman IE, Schnitt SJ. Loss of tumor marker-immunostaining intensity on stored paraffin slides of breast cancer. *J. Natl. Cancer Inst*. 1996 Aug 7;88(15):1054-9.
38. Manne U, Myers RB, Srivastava S, Grizzle WE. Re: Loss of Tumor Marker-Immunostaining Intensity on Stored Paraffin Slides of Breast Cancer. *JNCI Journal of the National Cancer Institute*. 1997 Apr 16;89(8):585-6.
39. Ibarra JA, Rogers LW. Fixation Time Does Not Affect Expression of HER2/neu: A Pilot Study. *American Journal of Clinical Pathology*. 2010 Sep 20;134(4):594-6.
40. Goldsmith JD, Allred DC, Beasley MB, Eisen R, Fulton RS, Gown AM, et al. Fixation Time Does Not Affect Expression of HER2/neu. *American Journal of Clinical Pathology*. 2011 Feb 24;135(3):484-484.
41. Bohn OL, Sanchez-Sosa S, Ibarra JA, Rogers LW. Fixation Time and HER2/neu Assessment. *American Journal of Clinical Pathology*. 2011 May 13;135(6):979-979.
42. Paik S, Bryant J, Tan-Chiu E, Romond E, Hiller W, Park K, et al. Real-World Performance of HER2 Testing--National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Experience. *JNCI Journal of the National Cancer Institute*. 2002 Jun 5;94(11):852-4.
43. Roche PC, Suman VJ, Jenkins RB, Davidson NE, Martino S, Kaufman PA, et al. Concordance Between Local and Central Laboratory HER2 Testing in the Breast Intergroup Trial N9831. *JNCI Journal of the National Cancer Institute*. 2002 Jun 5;94(11):855-7.
44. Mayr D, Heim S, Werhan C, Zeindl-Eberhart E, Kirchner T. Comprehensive immunohistochemical analysis of Her-2/neu oncoprotein overexpression in breast cancer: HercepTest<sup>TM</sup> (Dako) for manual testing and Her-2/neuTest 4B5 (Ventana) for Ventana BenchMark automatic staining system with correlation to results of fluorescence in situ hybridization (FISH). *VirchowsArchiv*. 2009 Jan 24;454(3):241-8.
45. Choritz H, Büsche G, Kreipe H. Quality assessment of HER2 testing by monitoring of positivity rates. *VirchowsArchiv*. 2011 Aug 2;459(3):283-9.
46. Raji A. Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Testing Recommendation. *Journal of Clinical Oncology*. 2007 Sep 1;25(25):4020-1.
47. Hammond ME, Hayes DF, Wolff AC. Clinical Notice for American Society of Clinical Oncology-College of American Pathologists Guideline Recommendations on ER/PgR and HER2 Testing in Breast Cancer. *Journal of Clinical Oncology*. 2011 Apr 18;29(15):e458-e458.

## 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, de revisão e casos clínicos no âmbito das Ciências da Saúde, considerados relevantes para a Anatomia Patológica.

Todo o material para publicação deve ser enviado para o e-mail **micron@aptap.pt**, em documento Word, gravado com o título da publicação.

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

A aceitação dos originais enviados para publicação é condicionada à avaliação pelo 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 efectuado com o devido respeito pela confidencialidade do(s) autor(es).

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

A **micron**, como a maioria das revistas, não aceita trabalhos já publicados ou que tenham sido enviados para publicação noutras revistas, a não ser que estes se façam acompanhar pela devida autorização do editor. No caso de o trabalho ter sido apresentado num encontro científico este pode vir a ser considerado para publicação, desde que não tenha sido publicado na íntegra em qualquer acta 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 Redactores de Revistas Médicas (CIRPM) e adoptadas pela **micron**.

Os **Trabalhos Originais** não devem ter mais de 2000 palavras (excluindo resumo e referências bibliográficas) e 30 referências bibliográficas. As tabelas, quadros, gráficos, ilustrações, figuras e/ou fotografias não podem exceder 2 páginas A4.

Os artigos devem ser estruturados pela seguinte ordem:

- a) Página de título;
- b) Resumo e palavras-chave;
- c) Texto;
- d) Agradecimentos;
- e) Referências bibliográficas;
- f) Tabelas, quadros e gráficos;
- g) Legendas das ilustrações, figuras e/ou fotografias;
- h) Ilustrações, figuras e/ou fotografias;

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.

A **Página de título** deve conter:

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

A segunda página deve conter o **Resumo** (máximo de 250 palavras) e **Palavras-chave** (três a dez).

As páginas seguintes devem ser referentes ao **Texto** que deve ser dactilografado justificado e dividido em:

- INTRODUÇÃO;
- MATERIAL E MÉTODOS;
- RESULTADOS;
- 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-subtítulos 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 actual do conhecimento sobre o tema do artigo e expressar claramente as motivações e objectivos que levaram ao planeamento do trabalho.

Em **MATERIAL E MÉTODOS** deverão ser descritos os critérios de selecção 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 e devem apenas salientar ou resumir as observações mais importantes.

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

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

Os **AGRADECIMENTOS** devem ser dactilografados após o texto principal; os agradecimentos pessoais devem preceder os das instituições.

As **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS** devem ser referenciadas pela ordem que aparecem no texto, devendo ser identificadas em numeração Árabe, ao nível da linha, dentro de parêntesis rectos (ex.: [1,2-4]). A lista de referências deve conter todos os autores até ao máximo de seis; sempre que este número seja ultrapassado, deve-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)

As **Tabelas, Quadros e Gráficos** devem complementar a informação do texto e serem enviados em folha separada. Deve ser mencionada a sua posição no texto, numerados com caracteres Romanos pela ordem que aparecem no texto e ter um título apropriado. Todas as abreviações devem ser explicadas em nota de rodapé.

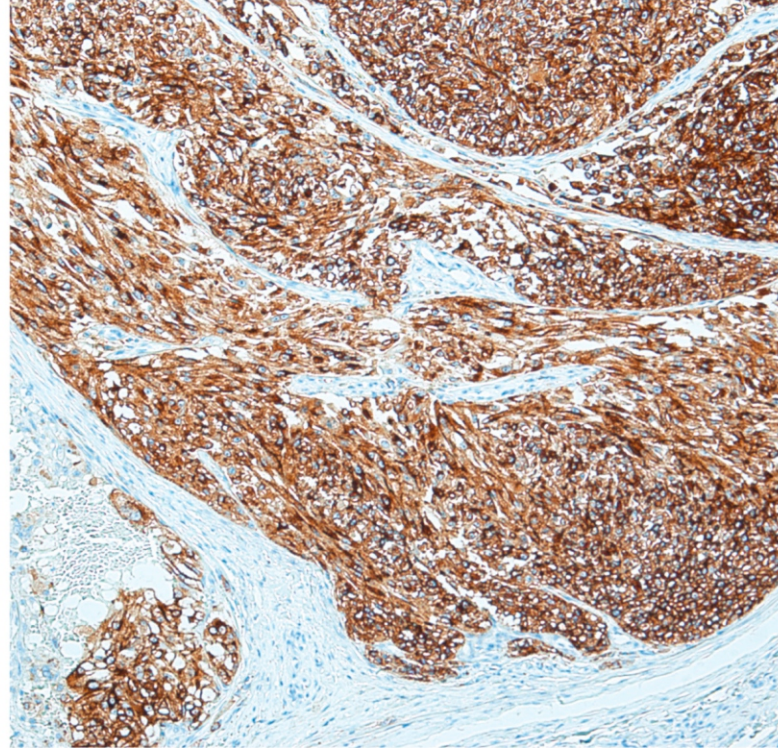
As **Legendas das ilustrações, figuras e/ou fotografias** devem ser escritas em duplo espaço, numa folha separada, com quatro linhas de espaço entre cada legenda.

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. A técnica realizada, bem como a ampliação das figuras apresentadas deverão ser mencionadas. As fotografias a cores ou a preto e branco devem ser 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 no máximo ter 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.



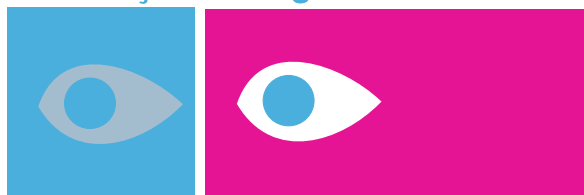
# Leica BOND-III

## Fully automated IHC & ISH

Quality. Speed. Efficiency.

- » Increase diagnostic confidence
- » Provide answers sooner
- » Help more patients and lower costs

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)