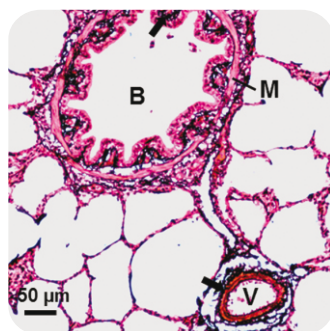
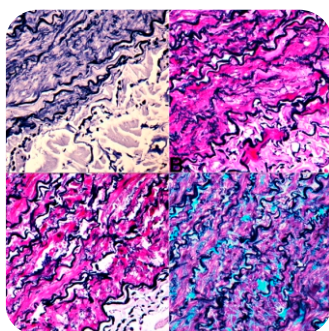
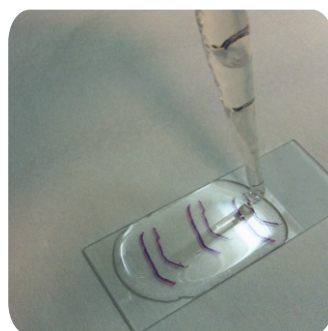
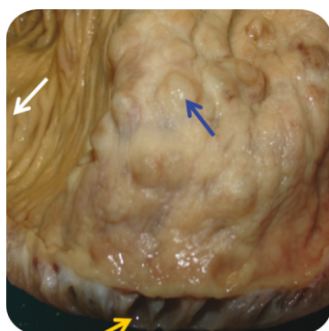


# mícron

Revista Técnica de Anatomia Patológica



Nº16 - Ano 15 - Maio de 2012

Levamos até si  
o que é  
verdadeiramente  
importante



## Leica Bond-III™

Sistema Totalmente  
Automático para  
Imunohistoquímica  
e Hibridação *In Situ*

**Máximo Desempenho  
para uma Coloração  
Mais Rápida, Melhor e  
Mais Eficiente.**

- Elevada qualidade e reprodutibilidade das colorações
- Até 50% mais rápido
- Processamento contínuo de lâminas
- Flexibilidade na execução das técnicas de Imunohistoquímica e Hibridação *In Situ*
- Facilidade de gestão dos contentores de reagentes auxiliares
- Maior eficiência na gestão de reagentes com a indicação em tempo real do volume de cada contentor
- Utilização de pequenos volumes de reagentes devido à tecnologia *Covertile™*
- Gama completa de anticorpos Prontos a Usar pré-otimizados para a Plataforma Bond
- Aberto à utilização de anticorpos primários
- Sistema de detecção por polímero
- Separação de resíduos perigosos e não perigosos



## EDITORIAL

Caros leitores,

A Equipa Editorial da **mícron** - Revista Técnica de Anatomia Patológica congratula-se com a apresentação da edição nº16 da revista.

É com imenso prazer que constatamos o interesse dos estudantes e profissionais da área de Anatomia Patológica na publicação de artigos científicos na nossa revista, o que se reflectiu no número de artigos que recebemos para esta edição.

Neste número são apresentados sete artigos científicos, sendo o primeiro referente a um Caso Clínico de Pneumatose Quística Intestinal.

Os restantes são artigos Originais de Investigação que se centram no estudo dos melhores procedimentos a adoptar em áreas relevantes no diagnóstico e investigação em Anatomia Patológica, como são: a fixação em cérebro fetal; a descalcificação em microondas; a aplicação de um protocolo combinado de Verhoeff & Tricrómio de Masson; a utilização de uma coloração alternativa de prata-metenamina para demonstração de membranas basais; a aplicação de métodos alternativos para detecção de fungos e a descrição técnica do modo de realização de técnicas imunocitoquímicas em lâminas previamente coradas.

Nesta edição criámos um novo “Espaço de Opinião”, onde os autores poderão debater sobre diferentes temáticas que considerem relevantes para o aperfeiçoamento científico na nossa área. Neste número serão apresentados argumentos sobre o termo mais correcto a adoptar quando falamos do fixador vulgarmente designado formol: será Formalina ou Formol?

Visto estarmos num período de transição em relação à adopção do novo Acordo Ortográfico, nesta edição foram publicados artigos com as duas versões, de acordo com a escolha dos autores. Em edições posteriores será, apenas, adoptado o novo Acordo Ortográfico.

Esperamos que esta edição da **mícron** corresponda às expectativas de todos os leitores, reiterando o nosso agradecimento pela colaboração de todos os estudantes e profissionais da área de Anatomia Patológica na publicação de artigos científicos na nossa revista.

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**

Paula Melanda  
Alexandre Salvador  
Cristiana Carneiro  
Luís Cirnes  
Magda Albuquerque  
Mateus Cresso  
Patrícia Grilo  
Pedro Pereira  
Sérgio Gomes  
Teresa Ferreira

ISSN: 0874-1433

Depósito Legal: 328185/11

**Periodicidade**

Revista Anual

**Tiragem**

550 exemplares

**Design e produção**

Carla Solange Pinto

**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 **mícron**.

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

**Destinatários**

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

**Subscrição**

Sócios da APTAP: Distribuição gratuita

Não Sócios da APTAP:

Estudantes (Formação base) - 5€

Profissionais - 7,5€

**Declaração de Propósito**

A **mícron** - Revista Técnica de Anatomia Patológica, tem como propósito a publicação de artigos originais de investigação, de revisão e casos clínicos no âmbito das Ciências da Saúde, com particular relevância para a Anatomia Patológica. Pretende constituir-se como o reflexo da qualidade do exercício, contribuir para a formação dos profissionais e desempenhar um papel preponderante no desenvolvimento científico e tecnológico. A **mícron** está 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

	Aspectos Macroscópicos da Pneumatose Quística Intestinal - Estudo de Caso _____	05
	Comparação da fixação em Formol Vs Formol-zinco nas propriedades histoquímicas e imunocitoquímicas do cérebro fetal _____	09
	Formalina ou Formol? - O termo mais correcto. _____	14
	Descalcificação em Microondas com Ácido nítrico a 5% e RDO _____	16
	<i>Verhoeff</i> & Tricrómio de <i>Masson</i> - Aplicações e Importância de um Protocolo Combinado _____	23
	Utilização de fontes não convencionais de material micótico para detecção de fungos em histoquímica _____	28
	Demonstração de membranas basais com uma coloração alternativa de prata-metenamina em rim e pulmão _____	32
	Imunocitoquímica em biópsias prostáticas a partir de lâminas previamente coradas o método de transferência de tecido _____	38
	Normas de Publicação _____	45

O **Grupo de Interesse em Citologia (GIC)** pretende dinamizar a área da Citologia no âmbito da **Associação Portuguesa de Técnicos de Anatomia Patológica (APTAP)**.

Os principais objetivos do GIC são:

- **Aproximar os técnicos de Anatomia Patológica que exercem funções na área da Citologia, da APTAP;**
- **Promover formação na área da Citologia.**

O GIC convida todos os Técnicos de Anatomia Patológica a colaborar com este projecto. Façam sugestões e intervenham na página do *Facebook*, para que este projeto se possa manter ativo e expandir.

## O GIC

Ana Ferreira  
Ana Ribeiro  
Andreia Gameiro  
Bruno Santos  
Cátia Ribeiro  
Cátia Silva  
Inês Silva  
João Boto  
Maria José Praça  
Rúben Roque

## CONTATOS

[grupocitologia@gmail.com](mailto:grupocitologia@gmail.com)  
[grupocitologia/facebook.com](https://www.facebook.com/grupocitologia/)





## Aspectos Macroscópicos da Pneumatose Quística Intestinal - Estudo de Caso

Ana L. Marques<sup>1</sup>, João L. Palma<sup>1</sup>, Patrícia I. Grilo<sup>1</sup>, Ana S. Luís<sup>1</sup>, Maria E. Figueira<sup>1</sup>, Nzinga N. Gomes<sup>1</sup>, Mário R. Palma<sup>1</sup>, Celina S. Oliveira<sup>1</sup>, Filipa M. Antunes<sup>1,2</sup>

1 - Unidade de Anatomia Patológica - Hospital CUF Descobertas

2 - Serviço de Anatomia Patológica - Instituto Português de Oncologia Francisco Gentil - CROL

Correspondência para Ana Marques - e-mail: analjm@gmail.com

### RESUMO

A Pneumatose Quística Intestinal afecta principalmente o cólon e possui características macroscópicas patognomónicas, com presença de múltiplos quistos preenchidos por gás, na parede do trato gastrointestinal, que lhe confere aspecto de “favo de mel”.

Neste estudo de caso foi realizado o exame macroscópico de uma peça de sigmoidectomia pertencente a uma mulher de 81 anos com episódio de volvo da sigmoideia, na qual se observou uma área de mucosa com perda do normal pregueamento e aspecto mamilonado. Na parede cólica existiam múltiplos quistos sem conteúdo que histologicamente estavam delimitados por histiócitos, células gigantes multinucleadas e algumas células inflamatórias. Estes achados, conjuntamente com a análise macroscópica, conduziram ao diagnóstico de Pneumatose Quística Intestinal.

**PALAVRAS-CHAVE:** Anatomia Patológica, Macroscopia, Patologia Gastrointestinal, Pneumatose Quística Intestinal.

### INTRODUÇÃO

#### Caso Clínico

Apresenta-se o caso clínico de uma doente de 81 anos com antecedentes de oclusão intestinal, que recorreu ao Serviço de Atendimento Permanente do Hospital Cuf Descobertas por dor abdominal. A doente foi internada devido a oclusão intestinal por volvo da sigmoideia. Procedeu-se à distorção do volvo por colonoscopia e à terapêutica com laxantes e enemas.

A doente foi posteriormente seguida em consulta, tendo-se repetido os episódios de sub-occlusão já conhecidos antes do primeiro internamento. Realizou-se nova colonoscopia esquerda (com introdução do colonoscópio até aos 50 cm) onde foi identificada uma área de aspecto multinodular difuso da mucosa entre os 20 e os 35 cm, com áreas de hiperémia, intervalada por zonas de mucosa com aspecto normal. A hipótese destas lesões corresponderem a Pneumatose foi referida no relatório. Procedeu-se a colectomia esquerda laparoscópica por volvo da sigmoideia recidivante.

#### Patologia

A Pneumatose Quística Intestinal (PQI), também conhecida por Pneumatosis Cystoides Intestinalis ou Pneumatose *Coli* [1], é uma situação clínica

rara em que existem cavidades quísticas preenchidas por gás na parede do trato gastrointestinal (TGI) [2].

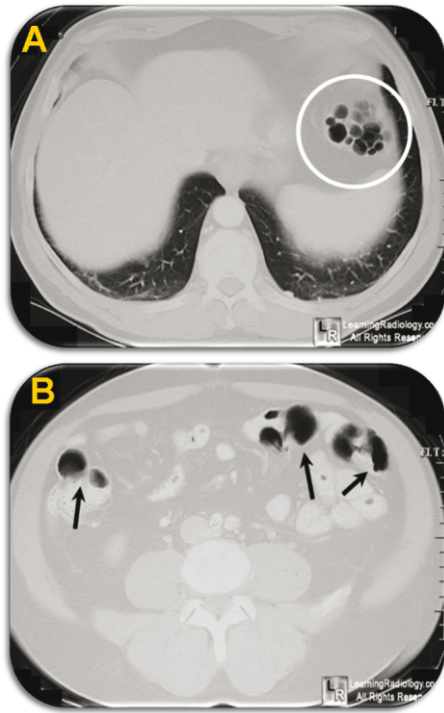
A realização de exames necrópticos demonstra que a incidência desta patologia é de 0.03% na população geral [3].

A PQI é normalmente identificada inicialmente numa radiografia ou tomografia computadorizada (TC) abdominal, sendo considerada como achado e não diagnóstico, já que a sua etiologia varia de condição benigna a doença do TGI fulminante [4]. Na Figura 1 [5] pode-se observar o aspecto de uma TC abdominal onde se identificam quistos com conteúdo gasoso.

Quando ocorre em crianças a PQI está usualmente associada com enterocolite necrotizante e pode ser fatal, podendo também estar associada a fibrose quística ou patologias cardíacas congénitas [6,7].

Nos adultos pode apresentar-se sob uma de duas formas conhecidas: a forma primária, mais rara e que se apresenta como um achado idiopático, ou a forma secundária (cerca de 85%) que aparece associada a doença pulmonar crónica obstrutiva, obstrução intestinal, esclerodermia, entre outros [2,7].

A PQI primária afecta usualmente o cólon descendente, enquanto a secundária tipicamente envolve o intestino delgado, podendo no entanto ocorrer por todo o TGI,



**Figura 1 -** Quistos com conteúdo gasoso identificados na parede intestinal do cólon descendente proximal (círculo branco) em A e a nível do abdômen inferior (setas negras) em B, numa TC. A forma, densidade e localização são características de PQJ.

envolvendo o cólon, estômago ou ainda o esófago [4].

No caso estudado o mais provável é que a PQJ seja secundária aos episódios de volvo, patologia na qual uma ansa da sigmoideia se dobra a nível do mesentério, causando obstrução e podendo levar a uma isquémia secundária [8].

Para compreender o aparecimento das cavidades quísticas surgiram várias teorias explicativas ao longo das décadas, uma das quais considera o deslocamento do ar libertado de bolhas nas doenças obstrutivas pulmonares ao longo dos planos retroperitoneais e o seu encarceramento na parede das ansas intestinais [2]. Outras teorias explicativas assentam na produção do gás no lúmen, por bactérias intestinais [1,2], ou por criptas de Lieberkühn inflamadas, penetrando através da muscular da mucosa, sendo posteriormente acumulado sob a forma de quistos submucosos [7]. Esta passagem do gás produzido pode estar associada ao aumento da pressão intraluminal que ocorre nas patologias de base ou pode ainda dever-se à introdução de gás durante um exame endoscópico [8].

Cerca de 50% dos casos tem resolução espontânea em várias semanas, com reabsorção do gás, mas havendo recorrência ocasional ou sendo as lesões severas, pode ser necessário recorrer a uma colectomia do segmento envolvido [2,8], como no caso apresentado.

Tanto clínica como histologicamente a PQJ pode

ser confundida com doenças inflamatórias intestinais [1]. Esta patologia é geralmente segmentar e macroscopicamente a porção intestinal envolvida pode parecer esponjosa ou crepitante se os quistos forem de localização subserosa, podendo ser reconhecidos ainda no espécimen fechado. Em secção a parede intestinal tem aspecto em “favo de mel”, uma vez que se identificam múltiplos quistos preenchidos por gás. Individualmente os quistos podem ser milimétricos ou atingir dimensões entre 1-2 cm de diâmetro. Usualmente não se identificam comunicações com o lúmen [9].

Os quistos podem atingir qualquer camada da parede intestinal mas encontram-se localizados principalmente na submucosa ou na subserosa. A mucosa suprajacente aos espaços aéreos apresenta-se normalmente elevada e por vezes com aspecto pseudolipomatoso, uma vez que pode assemelhar-se à lipomatose, enquanto que a muscular própria está normalmente poupada [2]. Na Figura 2 pode-se observar o aspecto macroscópico da PQJ.



**Figura 2 -** Segmento de cólon com 25 cm de comprimento onde se observam múltiplas cavidades quísticas sem conteúdo e de paredes internas lisas observadas em secção transmural. As cavidades não apresentam comunicações entre si, nem continuidade com o lúmen cólico.

Histologicamente os espaços quísticos estão, na sua maioria, revestidos por células achatadas de origem mesenquimatosa ou histiocítica. Pode haver reacção inflamatória focal e, nos casos relacionados com doença da mucosa, há uma tendência para uma maior proliferação macrófágica e de células gigantes de corpo estranho [2].

A Anatomia Patológica além de permitir a confirmação diagnóstica de PQJ pode contribuir para o diagnóstico etiológico final e diferenciar de outras formas com apresentação macroscópica semelhante, nomeadamente a doença de Crohn, com a qual se deve fazer um diagnóstico diferencial [2,7].

O objectivo deste trabalho é apresentar um caso clínico de PQJ e focar os principais aspectos macroscópicos e histológicos desta patologia.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Análise Macroscópica e Protocolo de Colheita

Foi realizado o exame macroscópico de uma peça, fixada em formol neutro tamponado a 10%, identificada como “sigmoidectomia”, com a seguinte informação clínica: “Episódio de volvo da sigmoideia”, que incluiu descrição macroscópica, baseada na literatura [8].

Efectuou-se descrição das dimensões e aspecto da peça, da área de mucosa afectada e dos quistos encontrados em secção transmural; colheram-se vários fragmentos para 14 cassetes, onde se amostraram os anéis de anastomose (2 cassetes), as lesões quísticas (6), a mucosa “normal” (2), e os gânglios linfáticos (4). Foram captadas imagens ilustrativas do aspecto macroscópico da peça operatória.

### Técnica Histológica

Os fragmentos seleccionados foram colocados em formol neutro tamponado a 10% durante cerca de 24h tendo sido posteriormente sujeitos a processamento *overnight*. Após a inclusão e microtomia as lâminas foram coradas com coloração de rotina Hematoxilina & Eosina no colorador automático para observação no microscópio óptico.

### Técnica Imunohistoquímica

Para confirmação do revestimento dos espaços aéreos por células de origem histiocítica, foi posteriormente realizada a imunomarcagem com o anticorpo monoclonal CD68 da NeoMarkers® (clone PG-M1), numa diluição de 1/100, através do sistema de detecção Bond Polymer Refine Detection (Leica Bond™), num dos blocos representativos da lesão, que resultou numa marcação de grânulos citoplasmáticos. Foram igualmente captadas imagens representativas da histologia da patologia.

## RESULTADOS

### Análise Macroscópica

A análise macroscópica da peça de sigmoidectomia permitiu a observação de um segmento cólico com 25 cm de comprimento. Após a abertura da peça foi identificada uma área de mucosa com cerca de 10 cm de maior eixo na qual se verificou perda do normal pregueamento e aspecto mamilonado, como se pode observar na Figura 3. A área anteriormente descrita distava 7 cm da margem mais próxima. A restante mucosa mantinha o aspecto macroscópico normal. Em secção, na parede cólica, existiam múltiplos

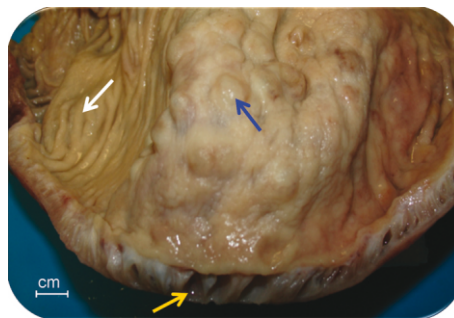


Figura 3 - Secção transmural a demonstrar múltiplas cavidades quísticas sem conteúdo (seta amarela) e a mucosa com uma área de aspecto mamilonado (seta azul). A mucosa adjacente (seta branca) está macroscopicamente normal.

quistos sem conteúdo e sem continuidade com o lúmen cólico, os maiores com 1 cm de diâmetro, de localização essencialmente submucosa, e que conferiam à parede um aspecto em “favo de mel”.

Na gordura peri-cólica isolaram-se 21 gânglios linfáticos, o maior com 6 mm de maior eixo.

### Análise Histológica

Na análise histológica observaram-se múltiplos espaços quísticos sem conteúdo ao nível da submucosa da parede cólica (Figura 4), delimitados por macrófagos e células gigantes multinucleadas, próximas das quais se observaram algumas células inflamatórias (Figura 5).

A mucosa cólica subjacente às cavidades quísticas revelou áreas com alterações isquémicas relacionáveis com volvo da sigmoideia (Figura 4).

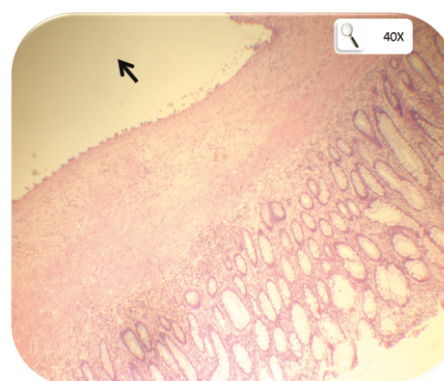
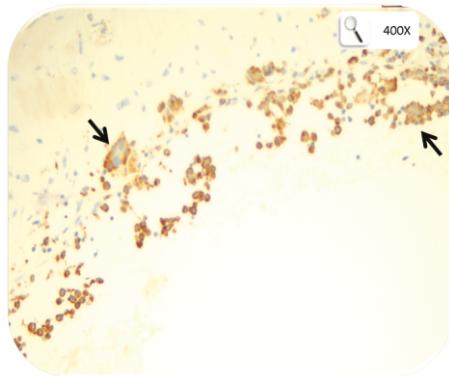


Figura 4 - Pode observar-se a existência de cavidades quísticas (seta negra) sem conteúdo, na parede cólica, (40x).

Os anéis de anastomose não apresentavam focos de lesão e a mucosa adjacente era histologicamente normal.

Os gânglios linfáticos não tinham alterações. Com carácter meramente ilustrativo e não diagnóstico foi efectuada imunomarcagem com CD68 que comprovou a origem histiocítica das

células de revestimento dos múltiplos quistos e facilitou a sua visualização (Figura 5).



*Figura 5 - A imunomarcção com CD68 permite comprovar a origem histiocítica das células que revestem as cavidades quísticas (setas negras apontam para células gigantes multinucleadas) (400x).*

## DISCUSSÃO

Alguns dos achados macroscópicos deste caso, como o aspecto da mucosa, são comuns a algumas patologias do TGI, como doença de Crohn, lipomatose ou PQI. Porém, o aspecto em “favo de mel” da parede intestinal é característico de PQI, o que permitiu desde logo a orientação para o diagnóstico que foi posteriormente confirmado pelo estudo histológico. A Figura 6 [10] demonstra uma peça de colectomia com doença de Crohn em que é evidente a possível semelhança de aspectos macroscópicos da mucosa entre as duas patologias. Neste caso é a ausência da parede em “favo de mel” que permite excluir macroscopicamente a PQI.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. David O, Jakate S. Residents' Page Pathologic Quiz Case. Arch Pathol Lab Med 1999; 123:354-357.
2. Soares P et al. Casos Clínicos Pneumatosis Cystoides Intestinalis. Arquivos de Medicina 2005; 19(3):97-101.
3. Ho L, Paulson E, Thompson W. Pneumatosis Intestinalis in the Adult: Benign to Life-Threatening Causes. AJR 2007; 188:1604-1613.
4. Marshak R et al. Pneumatosis Cystoides Coli. Gastrointestinal Radiology 1977; 2:85-89.
5. Learning Radiology. Recognizing the basics. Pneumatosis Cystoides Intestinalis Primary Pneumatosis Intestinalis (case 347/2009). <http://www.learningradiology.com> (18fev2010).
6. Pathology Outlines. Pneumatosis Cystoides Intestinalis. <http://pathologyoutlines.com> (18fev2010).
7. Rosai and Ackerman's Surgical Pathology. 9th Ed. Mosby; 2003.
8. Allen D. & Cameron R. Histopathology Specimens. Clinical, Pathological and Laboratory Aspects. Springer; 2004.
9. Feczko P. et al. Clinical Significance of Pneumatosis of the Bowel Wall. RadioGraphics 1992; 12:1069-1078.
10. PathoPic Crohn's disease. Pathorama. <http://alf3.urz.unibas.ch/pathopic/e/getpic-fra.cfm?id=004472> (12abr2012).



*Figura 6 - Peça operatória de colectomia com doença de Crohn, onde se observa mucosa ingurgitada, com padrão “pedra-de-calçada”. Este aspecto pode ser confundido com as alterações da mucosa numa PQI.*

A correlação entre os dados clínicos, os achados macroscópicos e a análise histológica permitiram concluir que a parede intestinal continha lesões de PQI e a mucosa cólica alterações isquémicas relacionáveis com volvo da sigmoideia.

Para se efectuar uma análise macroscópica de qualidade é necessário fixar determinados padrões macroscópicos, pois existem patologias com características patognomónicas que orientam desde logo tanto a colheita de fragmentos, como o próprio diagnóstico, como no caso apresentado.

Com o incremento de competências por parte dos Técnicos de Anatomia Patológica na área da Macroscopia, é de extrema relevância uma formação constante bem como o intercâmbio de conhecimentos entre serviços.

## AGRADECIMENTOS

Prof<sup>a</sup>. Dra. Paula Borralho, Dra. Ana Afonso, Dr. Rafael Cabrera.



# Comparação da fixação em Formol Vs Formol-zinco nas propriedades histoquímicas e imunocitoquímicas do cérebro fetal

Bárbara V Gonçalves<sup>1</sup>, Isa D. Imperial<sup>1</sup>, Lara A. Santos<sup>1</sup>, Raquel B. Ilgenfritz<sup>2</sup>

1 - Escola Superior de Saúde Egas Moniz

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

Correspondência para Bárbara Gonçalves - e-mail: bavacrgo@gmail.com

## RESUMO

O exame de cérebros fetais é realizado em casos de morte fetal de causa desconhecida ou em casos de malformações. É realizado o exame macroscópico do cérebro fetal e das suas estruturas internas através da dissecação do órgão. O estudo microscópico é relevante para a observação do desenvolvimento e da correta localização das estruturas que compõe o cérebro, assim como na observação de malformações vasculares ou de tumores, para os quais as técnicas de histoquímica e de imunocitoquímica podem ser muito úteis.

O exame macroscópico do cérebro fetal é difícil devido à sua consistência amolecida, que se mantém mesmo após fixação com o formol a 10%. A utilização de formol-zinco na fixação acrescenta firmeza ao tecido, facilitando em muito o manuseio dos tecidos no exame macroscópico.

O objetivo geral deste estudo consistiu em comparar os efeitos da fixação em formol-zinco e em formol a 10% nas técnicas de diagnóstico complementar (histoquímica e imunocitoquímica).

Foram estudadas 20 amostras, 10 fixadas em formol e 10 fixadas em formol-zinco, coletadas entre os anos de 2006 e 2010.

Os resultados obtidos sugerem que a fixação com o formol-zinco não altera as propriedades tintoriais ou imunocitoquímicas das amostras, sendo portanto tão bom quanto o formol a 10% para o estudo microscópico deste material, mas com a vantagem de facilitar o exame macroscópico.

**PALAVRAS-CHAVE:** Fixação, Formol-zinco, Histoquímica, Imunocitoquímica, Autópsia fetal

## INTRODUÇÃO

O exame de cérebros fetais é realizado em casos em que a morte fetal não tem causa conhecida ou em casos de malformações. É realizado o exame macroscópico do cérebro fetal e das suas estruturas internas através da dissecação do órgão. O estudo microscópico é relevante para a observação do desenvolvimento dos feixes neuronais e da correta localização das estruturas que compõe o cérebro, assim como na observação de malformações vasculares ou de tumores, para os quais as técnicas de histoquímica e de imunohistoquímica podem ser muito úteis [1].

Nas autópsias fetais, existe uma considerável dificuldade na dissecação dos cérebros. Por este motivo e porque a utilização de um meio de fixação que permita um bom exame macroscópico é importante para um diagnóstico preciso, em 2009 o Serviço de Anatomia Patológica do Hospital Garcia de Orta passou a

usar como rotina do serviço a fixação dos cérebros em formol-zinco, baseado no estudo realizado por Encha-Razavi *et al* [2].

Tendo em conta que na literatura disponível as referências sobre a utilização do formol-zinco e o seu efeito nas propriedades histoquímicas e imunocitoquímicas em tecido humano provêm de estudos cujos parâmetros e condições de investigação não foram uniformizados, concluímos tratar-se de uma questão pertinente, servindo de base para um estudo de investigação em condições controladas e padronizadas [3-7].

A maceração (processo de autólise intra-uterina) pode originar artefatos característicos e alterar as propriedades histoquímicas e imunocitoquímicas dos tecidos. Após o parto, o processo de autólise continua à temperatura ambiente, podendo ser consideravelmente abrandado pela refrigeração do feto e pela fixação precoce dos tecidos. Contudo, as alterações macroscópicas e microscópicas podem ser estudadas para a estimativa do tempo decorrido entre a morte

fetal e a fixação. Mesmo fetos com marcada maceração podem ser estudados, sendo possível identificar algumas alterações após um exame de autópsia minucioso. A avaliação da maceração no nosso estudo é importante para excluir um possível viés originado na qualidade da amostra (casos e controlos) [1].

Em 1994, Beckstead apresentou um fixador à base de zinco, sem ligações cruzadas ou agentes coagulantes, mas com qualidades morfológicas mantidas [8].

O formol-zinco é um excelente fixador pois tem as qualidades não-coagulantes fixadoras de formol e as propriedades coagulantes fixadoras do zinco, podendo ser utilizado em todos os tecidos [9]. Reforça a fixação nuclear e citoplasmática prevenindo artefatos e preservando tanto a morfologia como as estruturas moleculares especialmente sensíveis à ação do formol, mantendo a sua imunorreatividade. É mais rápido e torna as macromoléculas suficientemente rígidas para suportar a desidratação. Raramente é necessária a recuperação antigénica e os anticorpos primários podem ser diluídos 2-10 vezes mais que o habitual. Retém a imunorreatividade após armazenamento a longo prazo, e pode ser utilizado com formol a 10% ou com formol neutro tamponado. O formol-zinco é utilizado como um fixador primário [8-10].

O objectivo do estudo é comparar o efeito do formol-zinco e do formol a 10% nas propriedades histoquímicas e imunocitoquímicas do tecido fetal.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Seleção da Amostra**

Foram utilizados blocos de parafina de cérebros fetais. Estes diferiram apenas no tipo de fixador; em metade dos casos foi utilizado o formol a 10% (10 controlos) e nos restantes o formol-zinco (10 casos), sendo no total 20 blocos (N=20), um de cada caso.

Todos os blocos sofreram o processamento histológico (desidratação, diafanização e impregnação), sendo o procedimento protocolado de acordo com o utilizado no serviço. Como se tratou de casos de arquivo, pode ter ocorrido pequenas variações no processo.

Foram selecionados casos consecutivos com mais de 20 semanas de idade gestacional, dentro do período de 2006 a 2010, sendo excluídos casos com maceração severa.

Realizaram-se lâminas coradas em Hematoxilina-Eosina, do Sistema Nervoso Central e de tecido

renal dos casos e dos controlos. Para realizar a qualificação e a quantificação do grau de maceração do feto usaram-se os cortes de hematoxilina-eosina do tecido renal, devido à maior sensibilidade deste às alterações de autólise e maceração, de modo a selecionarmos os casos e controlos que apresentavam melhor preservação, sendo excluídos aqueles com maceração severa [1].

### **Fixadores**

Os fixadores utilizados foram o formol tamponado a 10%, solução comercial da Bio-Optica, e formol-zinco (mistura alcoólica), solução comercial da Thermo Scientific, cujos ingredientes ativos são: sulfato de zinco, formol, metanol. Não foi possível obter as referências e os lotes dos fixadores devido ao longo intervalo decorrido entre a fixação e a seleção da amostra.

### **Seleção das Colorações**

Neste estudo foram realizadas três técnicas, duas histoquímicas, o Chromotrope Aniline Blue (CAB) e o Violeta de Cresil, e uma técnica imunocitoquímica, a Sinaptofisina, aplicadas ao tecido do cérebro fetal dos casos e controlos. Na escolha das técnicas a utilizar, optou-se por aquelas que identificavam as estruturas principais do cérebro fetal e que são mais utilizadas neste tipo de rotina. Realizaram-se algumas lâminas teste, com cortes de diferentes espessuras (3  $\mu$ m e 5  $\mu$ m), tendo-se melhores resultados com cortes de 5  $\mu$ m, devido à melhor visualização da morfologia histológica e dos cortes.

### **Colheita de Dados**

Cada uma das lâminas realizadas foi observada ao microscópio ótico composto e avaliada por dois anatomopatologistas e um técnico de anatomia patológica experiente, utilizando uma tabela de avaliação graduada (Tabela I), elaborada e validada para o tipo de amostra e técnicas executadas. Os parâmetros utilizados foram a preservação morfológica, a preservação do corte, a sensibilidade, a intensidade e a marcação inespecífica. Foi atribuído a cada amostra um valor arbitrário de 0 a 4, onde 0 corresponde a inadequado para interpretação e 4, excelente para interpretação. Os avaliadores não sabiam em nenhum momento a que grupo pertencia cada lâmina.

### **Avaliação Estatística**

O teste estatístico utilizado foi o Teste sobre igualdade de valores esperados de populações independentes com distribuição arbitrária e variância desconhecida.

	Preservação Morfológica	Preservação do corte	Sensibilidade	Intensidade <sup>a)</sup>	Marcação inespecífica
0	Ausência de preservação morfológica que invalida a avaliação	Ausência de preservação do corte que invalida a avaliação	0% de estruturas marcadas	Nula	Presença de marcação inespecífica que invalida a avaliação
1	-----	-----	1% - 25% de estruturas marcadas	Fraca	-----
2	Ausência de preservação morfológica que não invalida a avaliação	Ausência de preservação do corte que não invalida a avaliação	26% - 50% de estruturas marcadas	Moderada	Presença de marcação inespecífica que não invalida a avaliação
3	-----	-----	51% - 90% de estruturas marcadas	Forte	-----
4	Preservação morfológica	Preservação do corte	90% - 100% de estruturas marcadas	Muito forte	Ausência de marcação inespecífica

a) Histoquímica: Afinidade Tintorial; Imunocitoquímica: Especificidade

Tabela I - Critérios de avaliação

## RESULTADOS

Relativamente à coloração histoquímica CAB, o formol apresenta uma média de 2,89 e o formol-zinco 3,01 (Gráfico I). O valor-p é de 0,83.

Para a coloração histoquímica Violeta de Cresil, o formol apresenta uma média de 3,4 e o formol-zinco 3,63 (Gráfico I). O valor-p é de 1,00.

Já na marcação imunocitoquímica da Sinaptofisina, observa-se uma discrepância nos valores relativos ao formol e ao formol-zinco: o formol apresenta uma média de 2,74 enquanto o formol-zinco apresenta uma média de 3,32 (Gráfico I). Nos parâmetros de preservação morfológica, de preservação do corte e de intensidade, tanto o formol quanto o formol-zinco apresentam uma média acima de 3. Na marcação inespecífica, ambos têm uma média de 4. Na sensibilidade há uma diferença entre os dois fixadores: o formol apresenta uma média de 1,63, enquanto o formol-zinco apresenta uma média de 3,13 ( $p=1,00$ ). Os valores distintos do formol-zinco estão de acordo com a literatura sobre as vantagens da utilização do formol-zinco como fixador para as técnicas de imunocitoquímica [4,5,8-10].

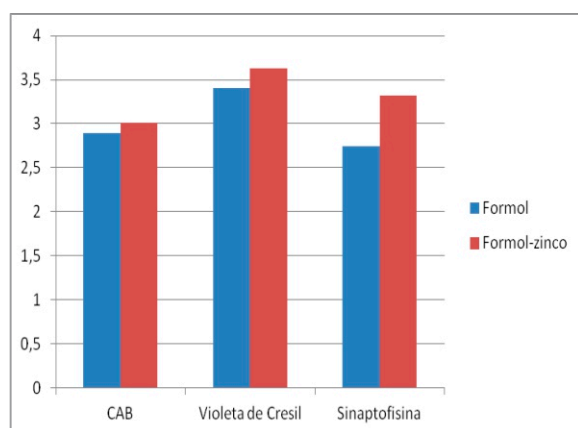


Gráfico I - Média total de cada coloração para cada fixador (em Y valores de 0 a 4 de acordo com a Tabela I)

No geral, a média total das colorações, relativamente ao formol, é de 3,01, relativamente ao formol-zinco é de 3,32, ligeiramente superior ao formol (Gráfico II).

Estes valores de p não nos permitem aceitar nem rejeitar que o formol-zinco é melhor que o formol, uma vez que quanto mais perto de 0,1 for o valor p, maior é a evidência da hipótese, o que não se verifica com valores próximos de 1.

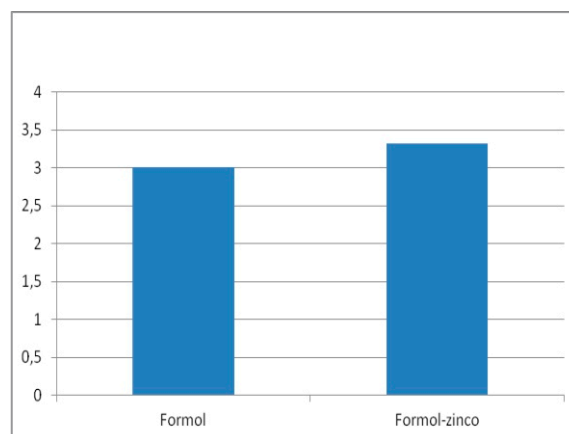


Gráfico II - Média total de cada fixador (em Y valores de 0 a 4 de acordo com a Tabela I)

## DISCUSSÃO

Neste estudo tentámos diminuir a subjetividade com o recurso ao “estudo cego” e à utilização de tabelas numéricas com os diferentes critérios a avaliar.

As técnicas de coloração utilizadas limitam-se às características de cada coloração, ou seja, a coloração CAB é específica para o colagénio e o Violeta de Cresil, por sua vez, é específico para substância de Nissl e neurofibrilas. Porém a partir destes achados é possível inferir que as propriedades histoquímicas de outras colorações apresentariam as mesmas alterações, ou alterações semelhantes às encontradas neste estudo.

Existiu dificuldade em encontrar o mesmo

número de blocos fixados em formol e em formol-zinco com maceração ligeira, o que pode ter influenciado ligeiramente os resultados (dois casos com maceração moderada no grupo fixado com formol contra apenas um no grupo de formol-zinco). Pelo mesmo motivo não foi possível realizar uma generalização dos resultados obtidos, devido a  $n=20$  ser um valor baixo para cálculos de aproximação, quando o ideal seria  $n>30$ .

Na imunomarcagem da Sinaptofisina observou-se que a utilização do formol-zinco conduz a uma melhoria de qualidade ao nível visual, principalmente, nos parâmetros de sensibilidade e de intensidade, comparativamente à utilização do formol a 10%. Este achado está de acordo com o descrito na literatura, de que a fixação com formol-zinco melhora as técnicas de imunocitoquímica [4,5,8-10].

Nas colorações histoquímicas a melhoria de qualidade com a utilização de formol-zinco em relação à utilização do formol não é tão significativa.

Os resultados obtidos sugerem que a fixação com o formol-zinco não altera as propriedades tintoriais ou imunocitoquímicas das amostras, sendo portanto tão bom quanto o formol a 10% para o estudo microscópico deste material, mas com a vantagem de facilitar o exame macroscópico.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Finkbeiner, Ursell and Davis. Autópsia em patologia Atlas e texto. 1ª Edição, Roca, 2006.
2. Encha-Razavi, Gonzales, Laquerrie et al. A practical approach to the examination of the malformed fetal brain: Impact on genetic counselling. Pathology (February 2008) 40 (2), pp. 180 187
3. Dapson. Fixation for the 1990's: a review of needs and accomplishments. Biotechnic & Histochemistry, 1993, 68:75-82.
4. Herman, et al. Zinc formalin fixative for automated tissue processing. Journal of Histotechnology, 1988, 11:85-89.
5. L'Hoste, et al. Using zinc formalin as a routine fixative in the histology laboratory. Laboratory Medicine, 1995, 26:210-214
6. Mythily Srinivasan, Daniel Sedmak, Scott Jewell. Effect of Fixatives and Tissue Processing on the Content and Integrity of Nucleic Acids. American Journal of Pathology, 2002, December; 161(6): 1961-1971. PMID: PMC1850907
7. Werner M., Chott A., Fabiano A., Battifora H. Effect of formalin tissue fixation and processing on immunohistochemistry. American Journal of Surgical Pathology, 2000, Jul; 24(7):1016-9.
8. Wester K., Asplund A., Bäckvall H., Micke P., Derveniece A., Hartmane I., et al. Zinc-based fixative improves preservation of genomic DNA and proteins in histoprocessing of human tissues. Laboratory Investigation, 2003, Jun; 83(6):889-99
9. Anatech, "Anatech ZnF", Zinc Formalin Fixatives. 22 Março 2011.  
<http://www.anatechltusa.com/productlit/ZnFlit.html> (22mar2011)
10. Anatech, "The innovator", Do you ever see this? 2004. 22 Março 2011.  
[http://www.anatechltusa.com/Innovators/Innovator6\\_04.pdf](http://www.anatechltusa.com/Innovators/Innovator6_04.pdf) (22mar2011)

#### AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, gostaríamos de agradecer à nossa orientadora, Dr.<sup>a</sup> Raquel Ilgenfritz, por todo o seu apoio e dedicação ao longo destes meses, bem como pelos seus ensinamentos, paciência e capacidade de orientação.

À Dr.<sup>a</sup> Maria José Brito (Diretora do Serviço de Anatomia Patológica do Hospital Garcia de Orta), por ter autorizado a realização deste estudo no laboratório de Anatomia Patológica do Hospital Garcia de Orta.

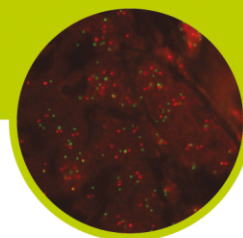
À Dr.<sup>a</sup> Joana Nogueira (Médica Interna do Serviço de Anatomia Patológica do Hospital Garcia de Orta), pela ajuda na avaliação final das lâminas.

Ao Dr. Carlos Quintana, pela sua avaliação final das lâminas e posteriores sugestões.

Ao Técnico José Ruivo e à Roche, pela cedência do dispensador do anticorpo anti-Sinaptofisina, sem o qual não seria possível a realização deste trabalho.

THREE HOURS THIRTY MINUTES

IT'S ABOUT TIME



## Dako apresenta Instant Quality FISH

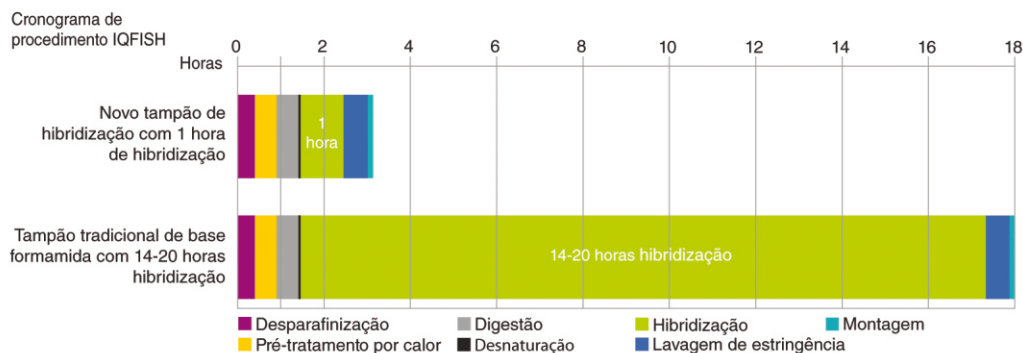
### Quando se trata de diagnóstico de cancro, o tempo é crucial

Tempo perdido é a causa de atraso na entrega de resultados. Técnicas longas e demoradas impedem o médico de iniciar o tratamento dos seus pacientes. E sim, tempo também representa a eficiência necessária para gerir os procedimentos laboratoriais com sucesso.

### Agora, uma nova tecnologia\* da Dako mudará as regras do tempo

IQFISH pharmDx™ kits proporcionam a flexibilidade e controlo necessários para planear o fluxo de trabalho laboratorial duma forma mais eficiente e oferecer um serviço melhor e mais rápido.

### De mais de 17 horas para três horas e trinta minutos



O gráfico ilustra a forma como o IQFISH, com apenas uma hora de hibridização, reduz o tempo de teste de mais de 17 horas para apenas três horas e trinta minutos. Isto permite novas possibilidades de eficiência laboratorial mantendo a elevada qualidade dos resultados.

Visite [www.dako.com/iqfish](http://www.dako.com/iqfish) para mais informações

**Luso Palex**  
LusoPalex, Unipessoal Lda





## Formalina ou Formol? O termo mais correcto.

Carina Ladeira<sup>1,2</sup>

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

2 - Centro de Investigação e Estudos em Saúde Pública

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

Com a finalidade de visualizar microscopicamente células e tecidos no estado mais perto possível do estado *in vivo*, aquando a remoção dos espécimes biológicos de um organismo vivo, é realizada a etapa de fixação.

A fixação realiza-se em Anatomia Patológica por várias razões, nomeadamente para impedir os processos de autólise e putrefacção, normais no estado *post-mortem*, preservando a amostra biológica. Assim sendo, o fixador deve inibir biomoléculas, em especial, enzimas proteolíticas que digerem e danificam as estruturas celulares. Para além desse facto, o fixador evita o fenómeno de putrefacção, pois apresenta toxicidade para os microorganismos mais comuns (bactérias, em particular), que podem existir numa amostra de tecido ou que de outro modo poderiam colonizar o tecido.

O formaldeído (HCHO) é um gás, constituído por pequenas moléculas que se dissolvem rapidamente na água, na qual ao se combinarem quimicamente formam o metil hidrato, HO-CH<sub>2</sub>-OH [1]. É nesta forma que o formaldeído existe em solução aquosa e a reactividade química é a mesma que a do formaldeído. As moléculas de metil hidrato reagem umas com as outras e combinam-se formando polímeros. O líquido conhecido como formalina possui cerca de 37-40% de formaldeído e 60-63% de água, com a maioria do formaldeído sob a forma de polímeros de baixa densidade e polímeros de elevada densidade, os quais são insolúveis, sendo comercializados sob a forma de sólido branco - o paraformaldeído (Kiernan, 2000).

O termo formalina refere-se à solução que contém 37% - 40% de formaldeído em solução aquosa. O termo “formol”, encontrado em alguns livros e comumente utilizado nos laboratórios de Anatomia Patológica, é errado, uma vez que a terminação -ol, sugere incorrectamente que o formaldeído é um álcool [2].

Desta forma e face a esta informação, deveríamos adoptar o termo científico “formalina” em substituição à terminologia incorrecta, mas utilizada na gíria dos laboratórios de Anatomia Patológica, “formol”, por forma a actualizar os nossos conhecimentos.

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Kiernan, J.A. Formaldehyde, formalin, paraformaldehyde and glutaraldehyde: What they are and what they do. *Microscopy Today* 2000. Vol.1 pp. 8-12.
2. Kiernan, J. A. *Histological and histochemical methods*. 2008. 4 ed. UK: Scion.



## Formalina ou Formol? O termo mais correcto.

Membros da Comissão Científica da APTAP

Correspondência para Paula Melanda - e-mail: paulamelanda@sapo.pt

Com o objetivo de simplificar a designação de compostos químicos à volta do Mundo, em 1919 foi criada, em Genebra, a International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC). Trata-se de uma organização não-governamental (ONG) dedicada à Química, e é a autoridade que desenvolveu as regras para a nomenclatura de compostos químicos [1].

O formaldeído é o aldeído mais simples (HCHO) que se encontra no estado gasoso e é segundo a nomenclatura IUPAC denominado Metanal, da combinação de Metano, devido ao número de carbonos da estrutura, com o sufixo -al, devido ao grupo funcional principal, formilo (RCOH).

O formaldeído, sendo um gás, é frequentemente vendido em solução aquosa com o nome comum de formol tamponado, um composto de 37-40% de formaldeído, água, metanol (impede a precipitação dos polímeros) e sais.

Habitualmente nos laboratórios de Anatomia Patológica a solução utilizada como fixador é tamponada de modo a reduzir o rendimento da reação de hidratação do metanal, que é sensível à adição de ácidos ou bases que mudam a polaridade da molécula, evitando a degradação da solução fixadora ao longo do tempo.

Mas afinal qual é a designação mais correta? Estudando os aldeídos em relação à sua reatividade com água, depressa se chega à conclusão que estes sofrem reações de hidratação, com ou sem catálise. Ao fazer-se reagir um aldeído com água, o aldeído sofre uma reação de adição onde o principal produto de reação é um hidrato (no caso do formaldeído, é o hidrato de formaldeído). Este hidrato é, nada mais nada menos, que um *gem-diol*, ou seja um composto que apresenta dois grupos hidroxilo (-OH), grupo este característico de álcoois [2].

Olhando então para os dois nomes em dúvida, o nome formol, não tem qualquer erro, pois apresenta o prefixo -ol, prefixo usado nas regras de nomenclatura desenvolvidas pela IUPAC quando o grupo funcional principal é um grupo hidroxilo (-OH).

O termo formalina, apesar de ser usado frequentemente, não consta da lista de nomenclaturas dos produtos químicos [3].

### AGRADECIMENTOS

Agradecemos a colaboração da Engenheira Química Sofia Correia e da estudante de Ciências Farmacêuticas, na Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, Ana Teresa Alves.

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. IUPAC nomenclature of organic chemistry-

[http://old.iupac.org/reports/provisional/abstract04/favre\\_310305.html](http://old.iupac.org/reports/provisional/abstract04/favre_310305.html) (02/05/2012)

2. MCMURRY, J. Aldeídos e Cetonas Adição nucleófila de H<sub>2</sub>O: Hidratação. In Química Orgânica. Tradução Santos, J.P., Souza, J.A., Oliveira, L.C., Silva, L.M., Hess, S.C.- Revisão de Conteúdo Alencastro, R.B. 4ª Edição, Editora LTC, Rio de Janeiro. Vol 2, Cap 19.8, pp 94-97

3. TOMÉ, A. Introdução à nomenclatura dos compostos orgânicos. 2010, Escolar editora



# Descalcificação em Microondas com Ácido nítrico a 5% e RDO

Ana P. Duarte<sup>1</sup>; Inês Direito<sup>1</sup>; Carina Ladeira<sup>1,2</sup>

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

2 - Centro de Investigação e Estudos em Saúde Pública (CIESP)

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

## RESUMO

A descalcificação é um processo longo que requer dias ou mesmo meses, no entanto, com o recurso a microondas (MW), este processo pode ser diminuído. O principal objectivo desta investigação foi diminuir a duração do processo de descalcificação recorrendo à utilização de MW, mantendo a qualidade morfológica do tecido. Efectuou-se a comparação do método convencional com o protocolo com recurso a MW. Foram testadas duas soluções descalcificadoras, RDO e ácido nítrico a 5%.

Testou-se a acção destes descalcificadores em osso compacto e osso esponjoso de suíno, uma vez que estes se assemelham na sua constituição histológica às amostras humanas. As amostras foram fixadas em formalina tamponada a 10%, descalcificadas, processadas e incluídas em parafina. Foram efectuados cortes em micrótomo de corrediça e corados com Hematoxilina-Eosina.

As lâminas histológicas obtidas foram avaliadas por 4 observadores independentes com recurso a uma grelha de avaliação de acordo com os seguintes parâmetros: preservação tecidular, intensidade de coloração e contraste. Os resultados obtidos demonstraram não haver diferenças significativas entre os protocolos em estudo, e que a utilização de MW acelera o processo de descalcificação. Verificou-se que a descalcificação em MW de osso esponjoso com RDO (30,167) possui o *score* mais elevado e que o menor *score* foi obtido na descalcificação de rotina de osso compacto com RDO (6,750).

A descalcificação em MW permite a obtenção de lâminas histológicas de qualidade comparável às obtidas com o método convencional e permite reduzir a duração do processo de descalcificação, podendo ser aplicado à rotina do laboratório de anatomia patológica.

**PALAVRAS-CHAVE:** Descalcificação, Ácido nítrico 5%, RDO, Microondas

## INTRODUÇÃO

O estudo do tecido ósseo ou calcificado, através da técnica de rotina histológica requer uma etapa de descalcificação após a fixação, de modo a que o cálcio inorgânico seja removido da matriz orgânica de colagénio e, conseqüentemente, se possam obter cortes destes tecidos [1, 2].

Um dos métodos de descalcificação consiste na imersão dos fragmentos a descalcificar em agentes químicos ácidos que se ligam aos iões cálcio, produzindo combinações solúveis na água, eliminadas pela lavagem e/ou neutralizadas [3,5]. Segundo Bancroft & Gamble (2008), a escolha do descalcificador é influenciada por quatro factores: urgência do caso, grau de mineralização, extensão da investigação e técnicas de coloração requeridas [3]. Qualquer ácido provoca alguns danos nos tecidos, especialmente no que diz respeito à sua coloração, especialmente a nível de basofilia

nuclear. Este problema é tanto mais evidente quanto mais fortes forem as soluções ácidas e quanto maior a duração da descalcificação [3].

O RDO é a solução comercializada mais difundida actualmente. É utilizado sobretudo para descalcificar peças pequenas e biópsias ósseas [5]. Pequenos fragmentos ósseos podem ser descalcificados num período de 1 a 2 horas e fragmentos de maiores dimensões em cerca de 6 horas [11]. É rápido mas possui pouco poder de penetração [4].

O ácido nítrico é considerado um ácido forte, sendo o mais utilizado nos processos de descalcificação. Tem excelentes resultados, quer em rapidez, quer na conservação tecidular [5, 12, 13]. É utilizado sobretudo para descalcificar peças grandes, porque penetra bem nos tecidos [5]. Amostras com cerca de 0,5mm de espessura podem ser descalcificadas num período de tempo entre 30 minutos a 2 horas, enquanto que amostras muito espessas podem

requerer 6 horas ou mais, à temperatura ambiente, até à sua completa descalcificação [13].

Os processos de descalcificação convencionais são morosos, podendo levar dias a meses [6]. Este intervalo de tempo pode ser decisivo, no que diz respeito à morfologia do tecido e à sua antigenicidade, e pode também ser o suficiente para atrasar um relatório clínico [1].

A utilização de MW para processos como a descalcificação já foi introduzida há alguns anos, no entanto não existe uma aplicação generalizada à rotina hospitalar [8]. Estudos apoiam o facto de que a utilização de MW acelera o processo de descalcificação, sem que haja comprometimento da estrutura tecidual. Além do mais a utilização deste método não diminui a antigenicidade do tecido, nem impossibilita a sua utilização em técnicas de hibridização *in situ* [1], porque as MW não são fortes o suficiente para alterar ligações covalentes ou para quebrar as pontes de hidrogénio, permanecendo a arquitectura celular intacta [6, 9].

Tinling *et al* (2004), demonstraram que existe um aumento da taxa de descalcificação devido à exposição constante a MW e que esta é independente da temperatura. O mecanismo pelo qual a energia de MW torna constante a taxa de equilíbrio é ainda indeterminado [7]. Estudos sugerem que as MW induzem um aumento de temperatura que é responsável pelo aumento da taxa de descalcificação, uma vez que há um aumento da difusão da solução de descalcificação no tecido. Outros estudos defendem que a acção das MW não é aumentar a difusão da solução descalcificadora, mas sim promover uma maior disposição dos iões cálcio ( $Ca^{2+}$ ) neste agente, devido ao campo electromagnético formado [6].

Neste estudo foi então avaliada a possibilidade de reduzir a duração do processo de descalcificação com recurso à utilização de MW, com o propósito de diminuir o período de tempo necessário para a saída de um resultado clínico. O principal objectivo desta investigação foi diminuir a duração do processo de descalcificação recorrendo à utilização de MW, mantendo a qualidade morfológica do tecido. Para tal, efectuou-se a comparação do método convencional com o protocolo com recurso a MW, utilizando como soluções descalcificadoras o RDO e o ácido nítrico a 5%.

## MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo foi realizado no laboratório de Histopatologia do Hospital Egas Moniz (HEM) e na Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa (ESTeSL) mediante um pedido prévio de autorização, tendo em conta todas as considerações ético-legais.

O material biológico utilizado consistiu em 36 amostras de origem suína e sem manifestações patológicas.

Foram obtidas peças ósseas de tíbia, perónio e costelas de suíno. As peças foram cortadas na porção média com o auxílio de uma serra circular vibratória e de um torno, no HEM.

Foram colhidos 36 fragmentos: 12 fragmentos de osso compacto, da diáfise de cada uma das três tíbias (quatro fragmentos por peça), com dimensões de 3cm x 2cm x 0,4cm; 12 fragmentos de osso esponjoso, da epífise de cada uma das três tíbias (quatro fragmentos por peça), com dimensões de 3cm x 1,9cm x 0,3cm; 12 fragmentos de costela com dimensões de 0,2cm x 1,5cm x 1cm e realizada a fixação com formalina a 10% tamponada.

As amostras foram transportadas até ao laboratório de histopatologia da ESTeSL, onde foram então separadas e colocadas em cassetes, devidamente identificadas.

O método descrito por Dimitrius Pitol *et al* (2007) foi adaptado e utilizado para realizar a calibração do forno MW através da utilização de blocos solidificados de TBX/Agar/Giemsa 0,5% [6] de forma a mapear os pontos quentes e a zona fria do MW.

Procedeu-se à descalcificação de rotina de metade das amostras (n=18), tanto com RDO (n=9) como com ácido nítrico a 5% (n=9). Foi estabelecido, *a priori*, um período máximo de 3 dias de descalcificação, no fim do qual as amostras que não estivessem descalcificadas não seriam avaliadas. Imergiram-se as cassetes em 300ml de solução descalcificadora. A solução foi agitada duas vezes por dia. O controlo da descalcificação foi realizado, pelo mesmo investigador, com o auxílio de um bisturi, de hora a hora durante as primeiras 6 horas, após as quais foi feito de 24 em 24 horas.

A descalcificação das amostras em MW (n=18), em RDO e em ácido nítrico a 5%, foi realizada segundo o método proposto por Madden e Henson [10]. Estabeleceu-se, *a priori*, um limite de 8 ciclos de irradiação, ao fim dos quais as amostras

que não estivessem descalcificadas não seriam avaliadas. Pré aqueceu-se 300ml de descalcificador (num recipiente de 600ml) a 800W durante 25 segundos. As cassetes com as amostras foram colocadas num cesto de plástico e mergulhadas na solução descalcificadora aquecida. Realizou-se agitação vinte vezes com agitador magnético. O recipiente contendo o descalcificador foi introduzido num banho de gelo, que já se encontrava na zona fria do forno MW, por forma a finalizar o processo de descalcificação. Do lado oposto colocou-se um recipiente com 100ml de água destilada e irradiou-se a 200W durante 15 minutos (1º ciclo), 300W durante 15 minutos (2º ciclo), 400W durante 10 minutos (3º ciclo) e 200W durante 10 minutos (4º ciclo). Finalmente, o recipiente foi retirado do MW, mas como a descalcificação não estava completa repetiu-se o 4º ciclo (do 5º ao 8º ciclos). O controlo da descalcificação foi feito com o auxílio de um bisturi no final de cada um dos ciclos. No final de ambos os processos de descalcificação os fragmentos dentro das cassetes foram lavados em água corrente durante 15 minutos.

O processamento foi realizado no processador MICRON® e os blocos impregnados e incluídos em parafina e cortados em micrótoimo de corredeira Leica SM 2000 R a 3 µm. Os cortes obtidos foram colocados em lâminas devidamente identificadas, codificadas numericamente, de modo a não influenciar a posterior avaliação. Todas as lâminas foram coradas manualmente com a coloração de Hematoxilina-Eosina.

A avaliação das lâminas foi efectuada de forma cega por 4 observadores independentes. Para tal, utilizou-se uma grelha de avaliação (escala

de 0-4 valores) com os seguintes parâmetros: preservação tecidular (arquitetura tecidular, detalhe citoplasmático, detalhe nuclear, integridade da membrana citoplasmática e integridade da membrana nuclear); intensidade de coloração (capacidade de promover a visualização das estruturas tecidulares de forma evidente, de modo a perceber se há perda das capacidades tinturiais) e contraste (núcleo vs citoplasma).

Atribuíram-se factores de ponderação da seguinte forma:  $score\ final = 2x\ (preservação\ tecidular) + (intensidade\ de\ coloração) + (contraste)$ , sendo que o score mínimo = 0, o score máximo = 48 e o score  $\leq 24$  foi considerado não satisfatório.

Os resultados obtidos foram submetidos a análise estatística através do Software Informático SPSS 19.0 tendo sido aplicadas as seguintes medidas estatísticas: Estatística Descritiva, teste One-Way-ANOVA e o teste post-hoc de Gabriel Gabriel, mantendo-se um nível de confiança de 95%. Foi aplicado o teste de Levene para verificar a homogeneidade das variâncias, necessário para realizar o teste One-Way-ANOVA.

## RESULTADOS

Verificou-se que os protocolos com recurso a MW foram os que tiveram menor duração, sendo o mais rápido a descalcificação de fragmentos de osso compacto e esponjoso com RDO com MW em 1,167 horas e o mais lento o protocolo convencional com ácido nítrico a 5% em osso compacto com a duração de 51 horas (Gráfico I).

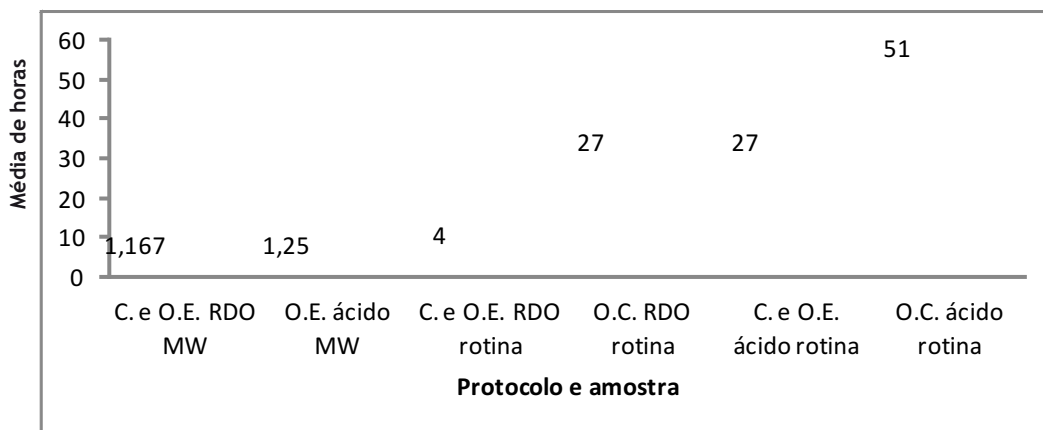


Gráfico I - Dados referentes à duração do processo de descalcificação

Legenda: O.E. RDO MW - descalcificação em MW de osso esponjoso com RDO; C. RDO - descalcificação de rotina de costela com RDO; O.E. ácido - descalcificação de rotina de osso esponjoso com ácido nítrico 5%; O.E. RDO - descalcificação de rotina de osso esponjoso com RDO; C. ácido - descalcificação de rotina de costela com ácido nítrico 5%; C. RDO MW - descalcificação em MW de costela com RDO; O.E. ácido MW - descalcificação em de MW osso esponjoso com ácido nítrico 5%; O.C. ácido - descalcificação de rotina de osso compacto com ácido nítrico 5%; O.C. RDO - descalcificação de rotina de osso compacto com RDO

Os resultados obtidos para os *scores* finais foram classificados numa escala de 49 unidades numeradas de 0 (mínimo) a 48 (máximo).

O Gráfico II apresenta os valores médios dos *scores* finais, verificando-se que a descalcificação em MW de osso esponjoso com RDO (30,167) possui o *score* mais elevado e que o menor *score* foi obtido na descalcificação de rotina de osso compacto com RDO com 6,750.

Foram ainda comparadas as médias dos *scores* finais para o protocolo convencional e o protocolo utilizando MW (Gráfico III). Tendo em conta os valores médios para cada tipo de protocolo é possível constatar que o protocolo de rotina tem uma média final superior (27,42) à

média final do protocolo que utiliza MW (24,76).

O protocolo convencional apresentou resultados com maior homogeneidade comparativamente com os resultados do protocolo com MW, desvio padrão = 0,74 vs 4.71, respectivamente. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os dois protocolos ( $p=0,433 > p=0,05$ , teste t).

Tendo em conta os valores médios para cada tipo de descalcificador é possível constatar que o RDO tem uma média final ligeiramente superior (22,93) à média final do ácido nítrico 5% (22,35), como verificado no Gráfico IV.

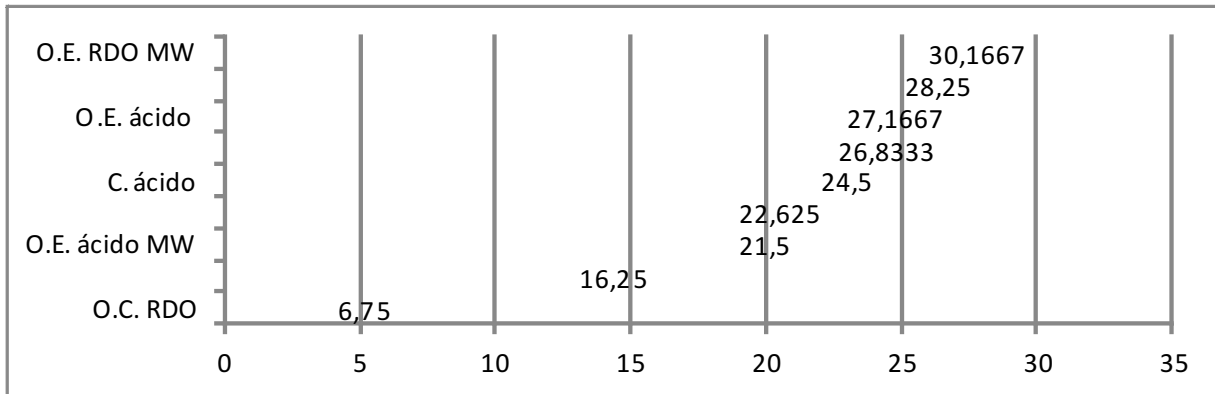


Gráfico II - Valores médios dos *scores* finais

Legenda: O.E. RDO MW - descalcificação em MW de osso esponjoso com RDO; C. RDO - descalcificação de rotina de costela com RDO; O.E. ácido - descalcificação de rotina de osso esponjoso com ácido nítrico 5%; O.E. RDO - descalcificação de rotina de osso esponjoso com RDO; C. ácido - descalcificação de rotina de costela com ácido nítrico 5%; C. RDO MW - descalcificação em MW de costela com RDO; O.E. ácido MW - descalcificação em de MW osso esponjoso com ácido nítrico 5%; O.C. ácido - descalcificação de rotina de osso compacto com ácido nítrico 5%; O.C. RDO - descalcificação de rotina de osso compacto com RDO

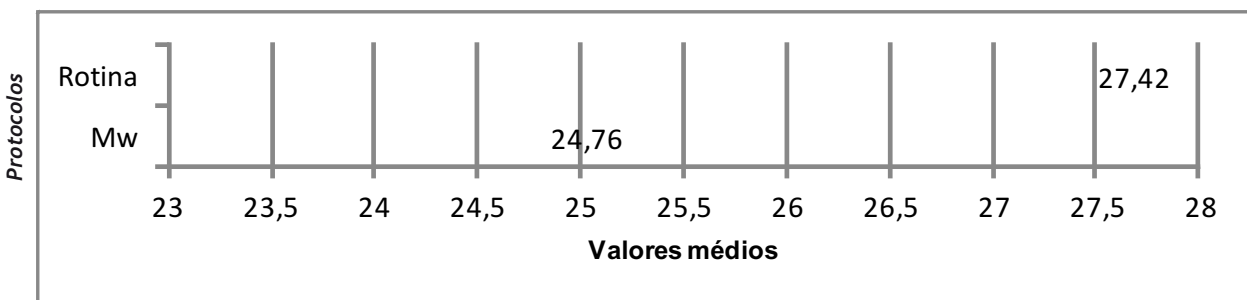


Gráfico III - Valores médios finais dos protocolos utilizados

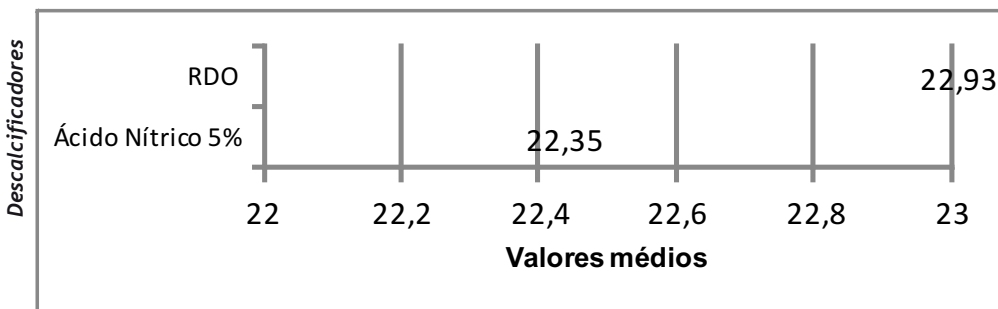


Gráfico IV - Valores médios finais dos descalcificadores utilizados

O RDO apresentou uma maior dispersão de resultados comparativamente com o ácido nítrico a 5%, desvio padrão = 9,46 vs 4,68, respectivamente. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os dois agentes descalcificadores ( $p=0,916 > p=0,05$ , teste t).

## DISCUSSÃO

Tendo em conta os resultados apresentados e o estado de arte actual sobre esta temática, pode dizer-se que foi possível diminuir a duração do processo de descalcificação de osso, utilizando-se as MW. As amostras que seguiram este protocolo obtiveram menores períodos de descalcificação (1,167 horas para costelas e osso esponjoso em RDO e 1,25 horas para osso esponjoso em ácido nítrico a 5%).

É importante referir que as amostras descalcificadas obtidas através do protocolo de descalcificação com uso de MW foram inferiores ( $n=7$ ) em número às amostras descalcificadas obtidas com o protocolo de descalcificação de rotina ( $n=13$ ). Tal poderá ficar a dever-se ao número de ciclos de irradiação em MW, que apesar de corroborarem com o descrito na literatura para a descalcificação com RDO [14], se mostraram insuficientes. Este facto poderá ser apoiado pela utilização de um tipo diferente de RDO que o utilizado no protocolo descrito na literatura - *Full Strength* RDO [15, 16].

A utilização de um banho de gelo para arrefecimento da solução descalcificadora poderá ter influenciado o tempo de descalcificação, já que este foi utilizado para reduzir o aumento da temperatura gerado pelas MW durante o processo [6]. Para alguns autores o tempo de descalcificação depende da temperatura no MW, assim sendo, altas temperaturas permitem uma descalcificação mais rápida pois o aumento da temperatura no sistema acelera o processo de difusão [6, 8]. No entanto, Kok & Boon (1990), postulam que o aumento da taxa de difusão deve-se a um aumento na energia vibracional ou a uma alteração do estado de polarização da solução descalcificadora induzido pelas MW, mesmo na ausência de um aumento significativo da temperatura [7].

De um modo geral a descalcificação com RDO obteve um valor médio ligeiramente superior ao obtido com a utilização de ácido nítrico a 5%, apoiando o facto da qualidade da coloração e dos detalhes histológicos após o seu uso ser excelente [5], no entanto não existiram diferenças significativas, concluindo que os resultados obtidos com o protocolo de rotina e o protocolo realizado em MW são idênticos.

Verificou-se ainda que a utilização de MW não influencia a coloração das lâminas, uma vez que os resultados obtidos com este método são comparáveis com os do método convencional. Assim sendo, com a utilização do MW não há perda acentuada das afinidades tinturiais dos tecidos. Este facto é justificado pela energia de MW não ser forte o suficiente para alterar ligações covalentes ou para quebrar as pontes de hidrogénio, logo a arquitectura celular permanece intacta [9].

A descalcificação em MW é um método útil que poderá ser aplicado aos laboratórios de anatomia patológica como parte da técnica histológica ou mesmo em laboratórios de pesquisa, já que este método permite a obtenção de resultados em tudo comparáveis aos obtidos com o método convencional, no que diz respeito à qualidade final da lâmina histológica.

Como estudos futuros, sugere-se a avaliação da influência do processo de descalcificação por MW e a aplicação de técnicas imunocitoquímicas.

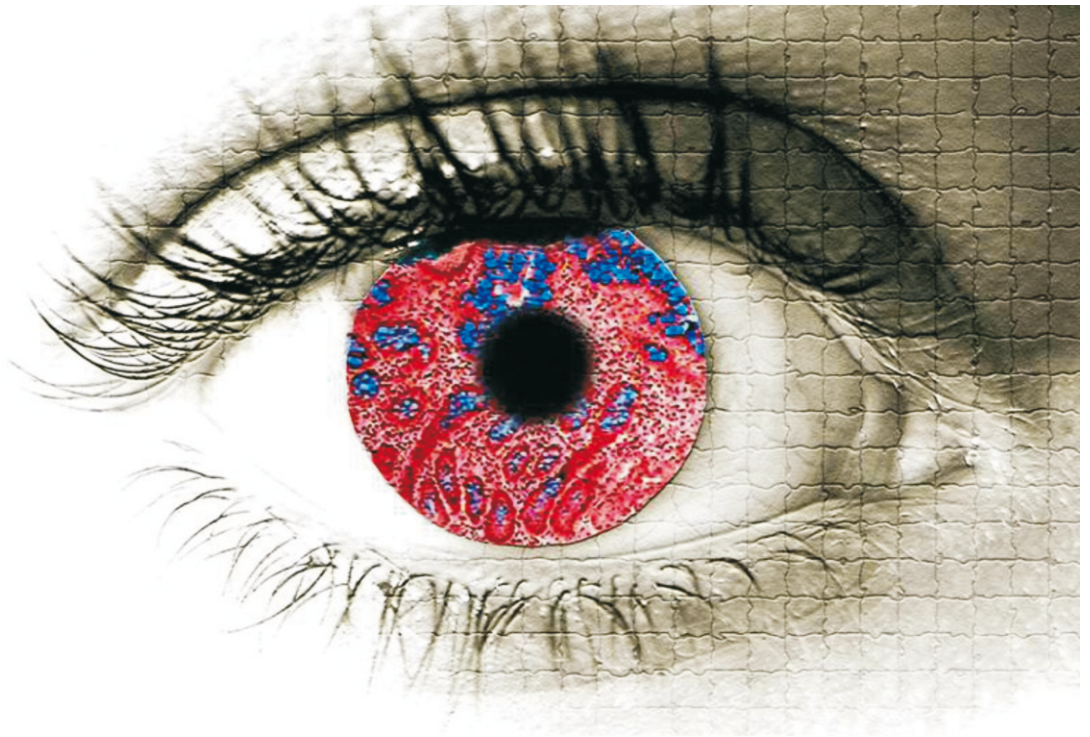
## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a toda a equipa de Técnicos que integram o Serviço de Anatomia Patológica do Hospital Egas Moniz, em especial à Ana Sofia Lopes e ao auxiliar de acção médica Carlos Gaspar. Agradecem também à Paula Casimiro, Gilberto Matias, Teresa Ferreira, Cristiana Carneiro e Amadeu Ferro.

**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

1. Gruntz S L, English V, Expedited bone throughput using microwave decalcification. In Experimental Pathology Laboratories. 11 de Junho de 2010. [http://www.sakura-america.com/histologic/pdf/11\\_Jun.pdf](http://www.sakura-america.com/histologic/pdf/11_Jun.pdf) (2jun2011)
2. Lorreille O, Diegoli T.M, Irwin J, Coble M., Parsons T. High efficiency DNA extraction from bone by total demineralization, Forensic Science International: Genetics I 2007; p191-195
3. Bancroft J D, Gamble M. Connective Tissues and Stains. Theory and Practice of Histological Techniques. 6ª Ed. Nova Iorque: Churchill Livingstone; 2008.
4. Seeley T, Stephens T, Tate P. Histologia: O Estudo dos Tecidos. Anatomia & Fisiologia. 6ª Ed. Loures: Lusociência; 2003.
5. Ladeira, C. Textos de apoio da disciplina de Técnica Laboratorial em Anatomia Patológica I Descalcificação. Texto inédito. Lisboa: Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa, Área Científica de Anatomia Patológica, 2008.
6. Pitol D M, Caetano F.H, Lunardi, L.O. Microwave-induced fast decalcification of rat bone for electron microscopic analysis: an ultrastructural and cytochemical study. Braz. Dent. J. 2007. vol.18 no.2
7. Tinting S.P, Giberson R.T., Kullar R.S. Microwave exposure increases bone demineralization rate independent of temperature. Journal of Microscopy 2004,215: 230235.
8. Keithley E.M., Truong T., Chandronait B., Billings P. B. Immunohistochemistry and microwave decalcification of human temporal bones. Heating Research 2000; 148: 192-196.
9. Weisberger E. C., Hilburn M., Johnson B., Nguyen C. Intraoperative Microwave Processing of Bone Margins During Resection of Head and Neck Cancer. Arch Otolaryngol Head Neck Surg 2001; 127.
10. Giberson R.T., Demaree Jr R.S. Microwave Techniques and Protocols. New Jersey: Humana Press Inc., 2001.
11. Kohout K. RDO. 26 de Janeiro 2007. <http://www.rdo-apex.com/pdfs/RDODecalc.pdf> (1jan2011).
12. Silva B. Descalcificação do Tecido ósseo em EDTA. 22 de Maio de 2010. <http://xa.yimg.com/kq/groups/13188249/527721534/name/Descalcifica%C3%A7%C3%A3o+de+tecido+%C3%93sseo+em+edta.pdf> (6abril2011).
13. IHC World. Decalcification Solutions for Bone. 1999. [http://www.ihcworld.com/\\_protocols/histology/decalcification\\_solution.htm](http://www.ihcworld.com/_protocols/histology/decalcification_solution.htm) (22mai2011).
14. EBScience. Rapid Bone Decalcification Procedure. 2003. [http://www.ebsciences.com/staining/bn\\_decal.htm](http://www.ebsciences.com/staining/bn_decal.htm) (2jan2011).
15. Apex Engineering Products Corporation. RDO. 3 de Agosto de 2009. RDO. [http://www.rdo-apex.com/t\\_procedures.html](http://www.rdo-apex.com/t_procedures.html) (22maio2011).
16. Callis, G. RDO. 12 de Novembro de 1999. <http://www.histosearch.com/histonet/Nov99/decalcificationquestions.html> (22maio2011).

X  
I  
I  
C  
O  
N  
G  
R  
E  
S  
S  
O  
P  
A  
T  
O  
L  
Ó  
G  
I  
C  
O  
T  
É  
C  
N  
I  
C  
O



25, 26 e 27 de Maio  
Centro de Artes e Espectáculos  
Figueira da Foz

A Anatomia Patológica Numa Dinâmica  
Multidisciplinar

Comissão Organizadora  
Ana Luísa Vilas Boas  
Márcia Gomes  
M. Manuela Monteiro  
Marta Isabel Ribeiro



Associação Portuguesa de Técnicos



de Anatomia Patológica



## Verhoeff & Tricrómio de Masson: Aplicações e Importância de um Protocolo Combinado

Bruno Santos<sup>1</sup>, Amélia Silva<sup>2</sup>, Rosa Gouveia<sup>2,3</sup>, Sânciã Ramos<sup>2</sup>

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

2 - Centro Hospitalar de Lisboa Ocidental, EPE (CHLO)

3 - Instituto Nacional de Medicina Legal, I.P.

Correspondência para Bruno Santos - e-mail: brunosantos89@gmail.com

### RESUMO

Sendo os tecidos e os seus constituintes celulares incolores torna-se necessário recorrer a técnicas que permitam corar as diferentes estruturas. As colorações especiais permitem discriminar algumas delas, assumindo extrema importância na caracterização de determinadas patologias, nomeadamente as cardiovasculares. Nestas, são indispensáveis colorações como a de *Verhoeff*, para demonstrar fibras elásticas, e o Tricrómio de *Masson*, para diferenciar músculo, colagénio e eritrócitos.

Foi assim estabelecido como objetivo deste trabalho otimizar um protocolo combinado das técnicas de *Verhoeff* e Tricrómio de *Masson* verificando a validade desta abordagem em patologias cardiovasculares.

Ajustou-se um protocolo de coloração combinado de *Verhoeff* & Tricrómio de *Masson* aplicado a cortes histológicos correspondentes a placa de ateroma em aorta abdominal. Para controlo dos resultados obtidos foram também efetuadas para a mesma placa de ateroma Hematoxilina-Eosina, *Verhoeff*, Tricrómio de *Masson* e imunomarcagem com o anticorpo anti-Actina do músculo liso. As lâminas resultantes da aferição do protocolo foram observadas de forma independente por duas patologistas.

Esta coloração combinada permite a caracterização simultânea de fibras elásticas, músculo, colagénio e eritrócitos, surgindo como uma ferramenta valiosa no estudo de patologias cardiovasculares. Trata-se, pois, de um método mais rápido e menos oneroso do que o *Verhoeff* e o Tricrómio de *Masson* em separado, acrescentando a possibilidade de rentabilizar amostras tecidulares de pequenas dimensões, uma vez que se realizam as duas técnicas no mesmo corte histológico. É também possível a visualização de miofibroblastos sem recurso a Imunohistoquímica e como permite a distinção dos componentes tecidulares com ótimo contraste, é excelente para Histomorfometria.

**PALAVRAS-CHAVE:** *Verhoeff*, Tricrómio de *Masson*, Histoquímica, Patologia cardiovascular; Histomorfometria

### INTRODUÇÃO

Os tecidos e os seus constituintes são incolores, sendo necessário recorrer a técnicas, como as “colorações especiais”, que permitam corar e discriminar as diferentes estruturas celulares [1]. Estas técnicas assumem extrema importância na caracterização de patologias, nomeadamente as cardiovasculares, sendo de destacar para estas a técnica de *Verhoeff* para evidenciar fibras elásticas, e o Tricrómio de *Masson* para diferenciar músculo, colagénio e eritrócitos [2].

#### *Verhoeff*

As fibras elásticas são coradas tanto por corantes ácidos como básicos, sendo inúmeras as técnicas disponíveis para a sua demonstração. O *Verhoeff* é o método mais utilizado [1, 3].

A solução de *Verhoeff* é composta por Hematoxilina, Cloreto de Ferro e Iodina. Sendo as fibras elásticas fortemente interligadas por pontes dissulfito, após um tratamento oxidativo pela Iodina, estas são convertidas em derivados aniónicos de ácido sulfónico, extremamente basofílicos e capazes de reagir com corantes básicos como a Hematoxilina. Concentrações elevadas de eletrólitos na solução corante potenciam a reação e inibem a ligação do corante à cromatina e ao RNA ribossomal [3].

Esta técnica pode ser combinada com uma simples coloração de contraste, ou com uma coloração tricrómica para tecido conjuntivo, sendo habitualmente utilizada a Picrofucsina de *Van-Gieson* [1]. A técnica de *Verhoeff* pode, no entanto, ser contrastada por uma modificação do Tricrómio de *Masson*. A combinação das duas técnicas facultava informação e detalhes

importantes sobre a constituição dos tecidos, surgindo como uma ferramenta valiosa no estudo de várias patologias, nomeadamente patologia cardiovascular, em biópsias e peças cirúrgicas ou em material de autópsia [4, 5].

### Tricrómio de Masson

Muitas técnicas disponíveis para a caracterização diferencial do tecido conjuntivo designam-se por Colorações Tricrómicas, sendo usadas para diferenciar fibras de colagénio e fibras musculares [3]. O método mais utilizado é o Tricrómio de Masson que tem por base a utilização de corantes em soluções ácidas e envolve: coloração dos núcleos com Hematoxilina, coloração dos citoplasmas com corante vermelho, diferenciação com ácido fosfotúngstico ou fosfomolibdico e coloração das fibras de colagénio com verde ou azul [1].

O princípio da coloração diferencial destas estruturas deve-se à formação, após a fixação, de redes proteicas tridimensionais insolúveis, com diferentes características: os eritrócitos possuem uma rede densa apenas com poros pequenos, enquanto as fibras musculares formam uma estrutura mais aberta com poros maiores; já o colagénio mostra a rede menos densa. Estas estruturas estão diretamente relacionadas com as reações dos corantes com os tecidos, uma vez que moléculas corantes com “baixo” peso molecular penetram e coram qualquer uma das três estruturas; moléculas de peso “intermédio” penetram no músculo e no colagénio; e as moléculas com “maior” peso apenas coram o colagénio, deixando o músculo e os eritrócitos por corar. Regra geral, sempre que moléculas corantes com pesos moleculares diferentes possuam dimensões que lhes permitam, a ambas, penetrar a mesma estrutura, prevalece a molécula de peso superior [3].

A fixação em Formaldeído, utilizada na rotina, não produz bons resultados com o Tricrómio de Masson sendo que, o tratamento dos tecidos com Ácido Pícrico permite melhorar a intensidade e o brilho da coloração [3].

### Objetivo

Com base nestes princípios, foi definido como objetivo otimizar um protocolo combinado das técnicas de Verhoeff e Tricrómio de Masson verificando a validade desta abordagem em patologias cardiovasculares.

### MATERIALE MÉTODOS

Tendo por base os princípios desta metodologia

combinada descrita na literatura e os protocolos a uso nos Serviços de Anatomia Patológica dos Hospitais de Santa Cruz e de Egas Moniz, circunscrito aos reagentes disponíveis no Serviço de Anatomia Patológica do Hospital de Santa Cruz, foram elaborados possíveis protocolos combinados de Verhoeff e Tricrómio de Masson. Algumas das variáveis testadas foram: 1) a ordem de execução das técnicas, 2) o tratamento do corte com Ácido Pícrico (quer entre as duas técnicas quer antes de ambas) e 3) a duração dos diferentes passos.

Estes foram aplicados a cortes histológicos correspondentes a placa de ateroma em aorta abdominal humana fixada em Formol tamponado a 10% e impregnada em Parafina, num total de 29 lâminas. Para controlo da intensidade e especificidade da coloração combinada foram também efetuadas, para a mesma placa de ateroma, as seguintes técnicas: Hematoxilina-Eosina (H&E), Verhoeff, Tricrómio de Masson e imunomarcação com o anticorpo monoclonal de ratinho anti-Actina do músculo liso, clone 1A4 (Dako) diluído a 1:300 em TBS, por método de polímero indireto (Dako REAL™ EnVision™ Detection System, Peroxidase/DAB+, Rabbit/Mouse) em aparelho automático Techmate Horizon (Dako). As lâminas obtidas foram observadas ao microscópio ótico (de forma independente) por duas patologistas e avaliadas qualitativamente para os seguintes parâmetros:

- **Intensidade:** Ausência de coloração (classificação inferior), Coloração muito fraca, Coloração fraca, Coloração moderada, Coloração intensa, Coloração muito intensa (classificação superior);
- **Especificidade:** Sem estruturas coradas (classificação inferior), Apenas estruturas inespecíficas coradas, Estruturas específicas e inespecíficas coradas, Apenas estruturas específicas coradas (classificação superior).

### RESULTADOS

Verificou-se que quando a técnica do Tricrómio de Masson é executada antes da técnica de Verhoeff apenas permanecem marcadas as fibras elásticas, sendo as restantes estruturas descoradas com a aplicação da solução de Verhoeff. No entanto, quando a técnica de Verhoeff é executada em primeiro lugar observa-se a marcação de todas as estruturas pretendidas.

Relativamente ao tratamento dos cortes com Ácido Pícrico, este não se apresentou uma mais-valia, uma vez que interferiu com a marcação das fibras elásticas.

Foi assim eleito o protocolo patente na *Tabela 1* por se tratar do único cuja respetiva lâmina obteve, com unanimidade, a classificação superior para ambos os parâmetros. Por outras palavras, a única que apresentou coloração muito intensa e tendo apenas as estruturas específicas coradas.

Antes de serem corados com o protocolo combinado eleito, apenas se conseguem distinguir nos cortes as fibras elásticas, devido à sua refringência (Figura 1A). Após a incubação com a solução de *Verhoeff* observam-se as fibras elásticas a negro (Figura 1B), apresentando o restante tecido uma coloração pouco discriminativa. Depois de aplicada a solução de Fucsina-Orange, o tecido exhibe uma tonalidade rosa, exceto as fibras elásticas que permanecem a negro (Figura 1C). A diferenciação com Ácido Fosfotúngstico permite descorar o colagénio, mantendo o músculo corado (Figura 1D) e, por último, o contraste com Verde Luz cora o colagénio de verde, atribuindo um tom violeta ao músculo e mantendo as fibras elásticas a negro (Figura 2).

Assim, este protocolo combinado cora as fibras elásticas e os núcleos de preto, as fibras musculares e o citoplasma de violeta, o colagénio de verde, e os eritrócitos de vermelho (Figura 2A). Além disso, é também possível demonstrar calcificações que coram de azul-escuro (Figura 2B).

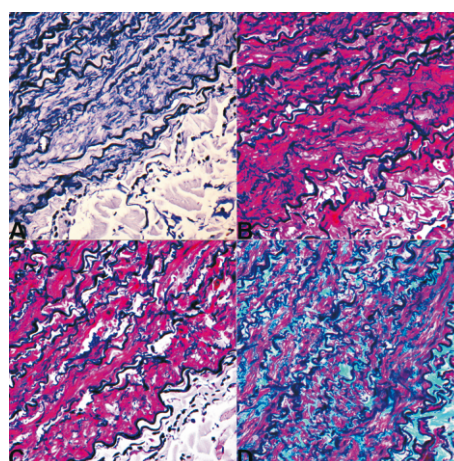
Comparando este método (Figura 3A) com as colorações utilizadas em rotina, a H&E não permite discriminar as 3 estruturas (Figura 3B), o *Verhoeff* permite a demonstração das fibras elásticas e uma fraca evidência das fibras musculares e das fibras de colagénio (Figura 3C) e com o Tricrómio de *Masson* apenas se observam as fibras musculares e as fibras de colagénio (Figura 3D).

A componente do Tricrómio de *Masson* confere à técnica combinada capacidade para, igualmente, identificar miofibroblastos (Figura 4A), que são células com propriedades contráteis por co-diferenciação muscular, cuja avaliação é importante nos casos de aterosclerose. Na H&E (Figura 4B) e no *Verhoeff* (Figura 4C), estas não se encontram evidenciadas. A imunomarcagem para o anticorpo anti-Actina do músculo liso permite confirmar que as células identificadas correspondem de facto a miofibroblastos (Figura 4D).

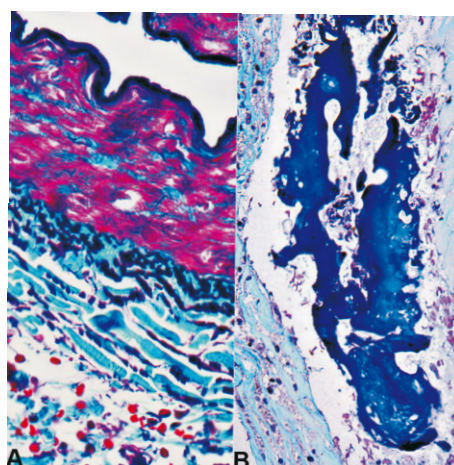
1.	Desparafinar e hidratar até à água	
2.	Incubar com a solução de <i>Verhoeff</i>	20 min.
3.	Lavar em água corrente	
4.	Diferenciar com Cloreto de Ferro aquoso a 2% (até permanecerem apenas coradas as fibras elásticas)	
5.	Lavar em água corrente	
6.	Colocar em Etanol a 95%	5 min.
7.	Lavar com água destilada	
8.	Corar com solução de Fucsina-Orange	10 min.
9.	Lavar com água destilada	
10.	Diferenciar com Ácido Fosfotúngstico a 1%	5 min.
11.	Lavar com água destilada	
12.	Contrastar com Verde Luz	7 min.
13.	Lavar com água destilada	
14.	Diferenciar com Ácido Acético a 1%	3 seg.
15.	Desidratar, clarificar e montar	

**Nota:** Todas as soluções utilizadas foram preparadas pelos autores com reagentes Merck.  
 - A Solução de *Verhoeff* (preparada extemporaneamente) é composta por 10mL de Hematoxilina a 5% em Etanol Absoluto, 4mL de Cloreto de Ferro aquoso a 10% e 4mL de Iodina Forte (2g Iodina re-sublimada, 4g de Iodeto de Potássio, 100mL Água destilada)  
 - A Solução de Fucsina-Orange é composta por 1g de Fucsina Ácida, 0,4g de Orange G, 1mL de Ácido Acético e 300 mL de Água destilada  
 - O Verde Luz é composto por 2g de Light Green Yellow em 100mL de Ácido Acético a 1%

*Tabela 1 - Protocolo combinado Verhoeff & Tricrómio de Masson.*



*Figura 1 - Sequência da coloração com o protocolo combinado Verhoeff-Tricrómio de Masson.*  
 A- Corte descorado.  
 B- Incubação com solução de *Verhoeff*.  
 C- Incubação com solução de Fucsina-Orange.  
 D- Diferenciação com Ácido Fosfotúngstico.  
 (*Verhoeff-Tricrómio de Masson*, 400x)



*Figura 2 - Pormenor das diferentes cores observadas com a técnica combinada.*  
 A- Artéria muscular para-aórtica e tecido conjuntivo envolvente (*Verhoeff-Tricrómio de Masson*, 400x).  
 B- Calcificação (*Verhoeff-Tricrómio de Masson*, 200x).

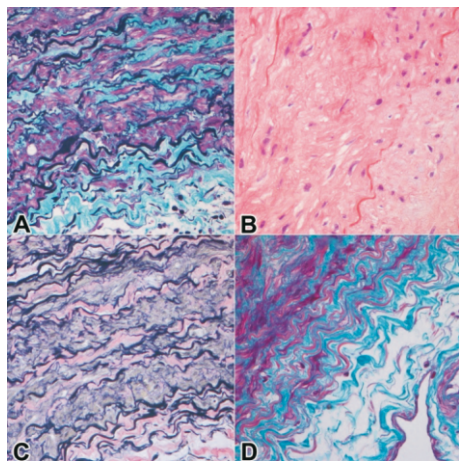


Figura 3 - Parede da artéria corada com diferentes técnicas.

- A- Verhoeff-Tricrómio de Masson.  
 B- Hematoxilina-Eosina.  
 C- Verhoeff.  
 D- Tricrómio de Masson. (400x)

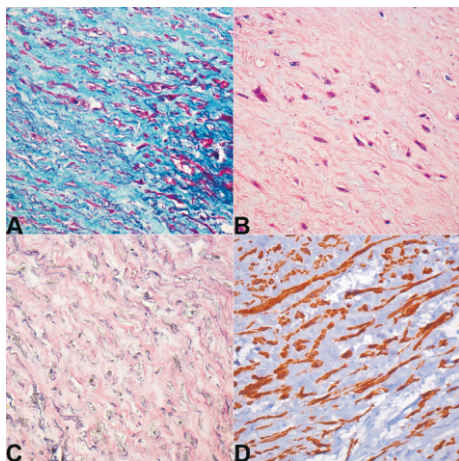


Figura 4 - Miofibroblastos da placa de ateroma com diferentes técnicas para comparação.

- A- Verhoeff-Tricrómio de Masson.  
 B- Hematoxilina-Eosina.  
 C- Verhoeff.  
 D- Imunomarcagem anti-Actina do músculo liso, clone 1A4 (Dako). (400x)

## DISCUSSÃO

A bibliografia existente acerca deste método combinado é escassa e não foi possível aos autores acederem a um protocolo previamente testado. Como tal, tendo por base os princípios de coloração de ambas as técnicas, os autores otimizaram o seu próprio protocolo.

Este assume extrema importância em patologias cardiovasculares, nomeadamente em placas de ateroma, para avaliação da espessura da íntima, caracterização mais detalhada do tipo e constituição da placa (ateroma/fibroateroma), bem como a sua antiguidade, incluindo ainda a identificação de miofibroblastos, aneurismas para avaliação da perda de elastina, dissecções

da aorta, cardiomiopatias, patologia valvular; e síndrome de Marfan [2, 6].

Um aspeto importante desta técnica combinada consiste no facto do seu ótimo contraste de cores poder ser mais adequado para análise histomorfológica, nomeadamente, na determinação da espessura da íntima e do rácio das camadas íntima/média com menor margem de erro nas leituras, do que a técnica de Verhoeff contrastada com a solução de Picrofucsina de Van-Gieson [7-12].

Assim, concluiu-se que:

1. Foi possível otimizar um protocolo combinado das técnicas de Verhoeff e de Tricrómio de Masson que demonstrasse simultaneamente fibras elásticas, musculares e de colagénio com ótimo contraste, sendo mais vantajoso que a técnica do Verhoeff utilizada isoladamente;

2. Com este método é possível a visualização de miofibroblastos sem recurso a técnicas imunocitoquímicas;

3. Rentabilizam-se amostras de pequenas dimensões, como no caso de biópsias de transplante (material diminuto que deve ser cortado a vários níveis e dos quais se passarão apenas a fazer duas lâminas: H&E e técnica combinada de Verhoeff & Tricrómio de Masson);

4. É um método mais rápido e menos oneroso que as duas técnicas em separado, visto apenas se realizar uma lâmina por caso, bem como, suprimir a utilização de alguns reagentes (solução de Van-Gieson de contraste na técnica de Verhoeff e Hematoxilina de Weigert para coloração dos núcleos no Tricrómio de Masson). Afigura-se-nos, pois, tratar-se de uma otimização de técnicas de Histoquímica com aplicação prática, bons resultados e vantagens económicas.

## AGRADECIMENTOS

Ao Serviço de Anatomia Patológica do Hospital de Santa Cruz, em particular às Técnicas Armandina Manuel e Filomena Lopes, ao Serviço de Anatomia Patológica do Hospital Egas Moniz e, por fim, à Técnica Sara Marques.

**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

1. Drury R, Wallington E. Carleton's Histological Techniques. 5ª ed. Oxford : Oxford University Press, 1980.
2. Gouveia R. Preparação de Espécimes Cardiovasculares: Breves Notas. Texto Inédito. Lisboa: 1999.
3. Bancroft J, Gamble M. Theory and Practice of Histological Techniques. 6ª ed. Philadelphia: Elsevier, 2008.
4. O'Connor W, Valle S. A combination Verhoeff's elastic and Masson's trichrome stain for routine histology. *Stain Technology* 1982 July; 57(4): 207-10. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6183794> (13fev2011)
5. Caceci T, Masson Trichrome & Verhoeff Stain. VM8054: Veterinary Histology. Agosto 2008. <http://education.vetmed.vt.edu/curriculum/VM8054/Labs/Lab2/Examples/exvrmass.htm> (13fev2011)
6. Kumar V, Cotran R, Robbins S. Robbins Basic Pathology. 7ª ed. USA: Saunders, 2003.
7. Kortelainen M, Särkioja T. Extent and Composition of Coronary Lesions and Degree of Cardiac Hypertrophy in Relation to Abdominal Fatness in Men Under 40 Years of Age. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology (Journal of the American Heart Association)* 1997; 17: 574-579. <http://atvb.ahajournals.org/cgi/content/full/17/3/574> (13fev2011)
8. Kortelainen M, Särkioja T. Extent and Composition of Coronary Lesions in Relation to Fat Distribution in Women Younger Than 50 Years of Age. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology (Journal of the American Heart Association)* 1999; 19: 695-699 <http://atvb.ahajournals.org/cgi/content/full/19/3/695> (13fev2011)
9. Amabile P, et al. In vivo vascular engineering of vein grafts: directed migration of smooth muscle cells by perivascular release of elastase limits neointimal proliferation. *Journal of Vascular and Interventional Radiology* 2002 July; 13(7): 709-15. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12119330> (26fev2011)
10. Alves H, et al. Comparação histomorfométrica entre as artérias mamária interna, ramo perfurante da mamária interna e toracodorsal e implicação clínica na reconstrução microcirúrgica da mama. 42º Congresso Brasileiro de Cirurgia Plástica 2005. <http://www.sbcpsc.org.br/anais/42/paginas/296.htm> (26fev2011)
11. Blanco M, et al. Histomorphometry of umbilical cord blood vessels in preeclampsia. *Journal of Clinical Hypertension (Greenwich)* 2011 January; 13(1): 30-4. [Http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21214719](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21214719) (26fev2011)
12. Naidu S, Sengupta S. Histomorphometric changes in the vessel wall at the site of amputation in diabetic patients do they influence healing of stump?. *Journal of Orthopaedic Surgery* 2005; 13(1): 3-7. <http://www.josonline.org/pdf/v13i1p3.pdf> (26fev2011)



# Utilização de fontes não convencionais de material micótico para detecção de fungos em histoquímica

Cláudia Pen Freitas<sup>1</sup>; Pedro Pereira<sup>2,3</sup>

1 - Laboratório de Imunocitoquímica e Biologia Molecular, Serviço de Anatomia Patológica - Centro Hospitalar de Lisboa Central, EPE

2 - Unidade de Neuromusculares, Instituto de Medicina Molecular, Faculdade de Medicina de Lisboa;

3 - Laboratório de Neuropatologia, Centro Hospitalar Lisboa Norte, EPE - Hospital de Santa Maria

Correspondência para Cláudia Pen Freitas - e-mail: penfreitas@gmail.com

## RESUMO

A utilização de testes de controlo para a presença de fungos em material histológico é condicionada pelo acesso a material proveniente de doentes com infecções fúngicas. De modo a obter material micótico para controlo positivo em técnicas histoquímicas, descreve-se um método de obtenção de fungos a partir de bolor do pão.

A preparação dos controlos positivos de bolor realizou-se mediante as metodologias de *Cell block* e de HistoGel™, tendo as amostras sido processadas na rotina habitual de um laboratório de Anatomia Patológica.

Após a realização da técnica de Grocott constatou-se que as amostras processadas por HistoGel™ mostraram maior concentração de fungos. Não obstante, os dois métodos utilizados cumpriram satisfatoriamente os requisitos exigidos à partida, tendo-se mostrado económicos, de fácil obtenção e seguros, podendo ser úteis na obtenção de fungos para controlos positivos em técnicas histoquímicas.

**PALAVRAS CHAVE:** Fungos, Grocott, Testes controlo, Histoquímica, HistoGel™, Cell block

## INTRODUÇÃO

A cultura de fungos apresenta-se actualmente como o “gold standard” do diagnóstico das infecções causadas por este patógeno, permitindo uma caracterização genotípica rigorosa da sua espécie e consequente identificação de uma linha terapêutica adequada [1-3], o que é importante sobretudo numa altura em que se observa o aumento da resistência a anti-fúngicos [4]. Não obstante, as técnicas de detecção de fungos em amostras citológicas e secções histológicas são utilizadas com frequência como uma primeira linha de diagnóstico, uma vez que possibilitam a obtenção de resultados rápidos e fiáveis sobre a existência de infecção fúngica, permitindo orientar o tratamento de forma correcta e atempada.

Como nem todos os fungos são detectáveis pela coloração de Hematoxilina e Eosina, especialmente quando presentes em pequenas quantidades, realizam-se colorações histoquímicas que permitam a visualização do microorganismo e ocasionalmente permitam a

identificação com base em características morfológicas [5,6]. As colorações *Periodic Acid Schiff* e *Grocott* são provavelmente as mais usadas já que virtualmente permitem a detecção de todos os fungos [6]. Contudo, a utilização destas técnicas é limitada pela disponibilidade de material histológico que possa ser utilizado como controlo positivo, de forma a garantir a fiabilidade dos resultados [7].

A obtenção deste material é muitas vezes condicionada pela disponibilidade de doentes humanos com infecções fúngicas ou por restrições éticas ao uso de material sem autorização prévia e consentimento informado dos mesmos. Idealmente, o laboratório deveria dispor de um meio de acesso facilitado a amostras biológicas de fungos.

No presente trabalho foram seleccionados dois métodos para processamento das amostras, o *Cell block* (Thermo Scientific Shandon Cytoblock *Cell block*) e o HistoGel™ (Thermo Scientific Richard-Allan Scientific HistoGel™) que são os procedimentos mais utilizados em laboratórios de Anatomia Patológica para processamento e inclusão de material citológico.

Apesar de o *Cell block* ser o método mais utilizado na prática laboratorial, o HistoGel™ tem vindo a ser testado como melhor alternativa essencialmente devido a dois aspectos: não requer fixação livre de fosfatos, e permite obter uma maior concentração de material com boa morfologia histológica.

Pretende-se assim com este trabalho conseguir um método de obtenção de fungos e consequente processamento histológico desse material, que permita a sua utilização regular como controlo positivo na detecção de fungos por colorações histoquímicas.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram extraídos fungos de material em decomposição, obedecendo aos seguintes critérios: ser um método barato e de fácil acesso, sem implicações ético-legais, e que não constitua um perigo para a saúde humana.

A colheita de fungos fez-se por raspagem de pão em decomposição (Figura 1), numa *hotte*, para um tubo tipo falcon com água destilada. Em seguida procedeu-se à sua centrifugação durante 5 minutos a 1000 rpm (é possível colher directamente material micótico e não recorrer à centrifugação). Parte do material foi processado em *Cell block* (Thermo Scientific Shandon Cytoblock *Cell block*) e parte em HistoGel™ (Thermo Scientific Richard-Allan Scientific HistoGel™).

Para o *Cell block* decantou-se a água e colocou-se formol a 10% (livre de fosfatos). Procedeu-se a uma nova centrifugação durante 5 minutos a 2800 rpm tendo-se realizado o protocolo recomendado pelo fabricante. Processou-se no processador automático de tecidos Shandon Pathcentre, a partir do álcool a 70% (Figura 2).

Para o HistoGel™ decantou-se a água e colocou-se formol tamponado a 10%. Centrifugou-se a amostra e adicionou-se ao *pellet* obtido HistoGel™ liquefeito (no microondas a 540W durante 40 segundos). Homogeneizou-se e centrifugou-se a 4000 rpm durante 1 minuto. Colocou-se no congelador durante 3 minutos para solidificação. Desenformou-se o *pellet* do tubo de centrífuga obtendo-se um cone que se seccionou longitudinalmente pelo vértice e que foi colocado numa cassette histológica e processado no programa de biópsias habitual do laboratório (Figura 3).

Nos blocos obtidos realizaram-se cortes histológicos com 3 µm de espessura e colocaram-se em lâminas Superfrost™, tendo em seguida sido corados seguindo a técnica de *Grocott* [7]. Foi utilizado um controlo positivo de pulmão

infectado com fungos (*Aspergillus fumigatus*-Figura 4A).



Figura 1 - Obtenção de bolor a partir de pão.

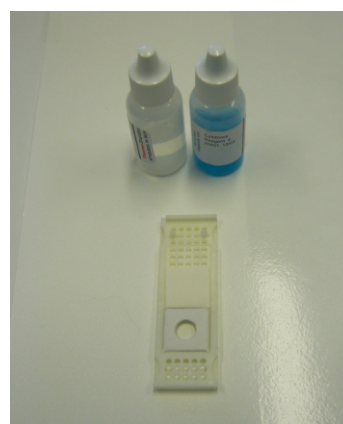


Figura 2 - Fungos do pão pela metodologia *Cell block*

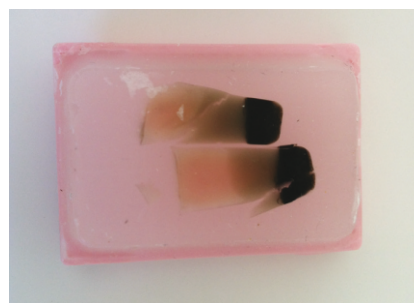


Figura 3 - Fungos do pão pela metodologia HistoGel™

## RESULTADOS

Verificou-se que é possível a detecção histoquímica de fungos tanto em lâminas provenientes de *Cell block* (Figura 4B e 4C) como de HistoGel™ (Figura 4D e 4E) com a técnica de *Grocott*. O método de HistoGel™ apresenta contudo, maior concentração de fungos nas amostras processadas e não necessita de fixação livre de fosfatos, o que facilita a sua implementação, não havendo necessidade de mudar métodos estabelecidos, ou utilizar reagentes diferentes dos habituais na rotina laboratorial.

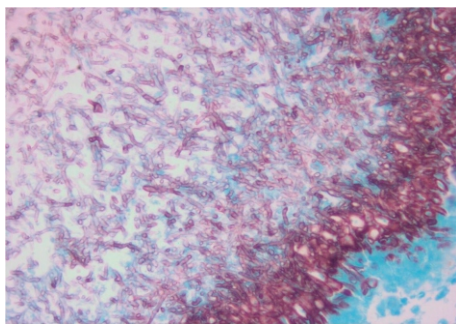


Figura 4A- Controlo positivo, pulmão, Aspergiloma, Grocott (400x)

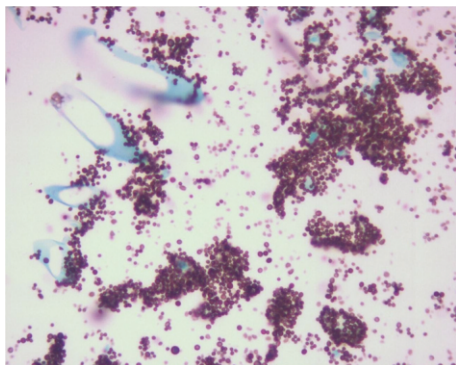


Figura 4B - Fungos do pão, Cell block, Grocott (100x)

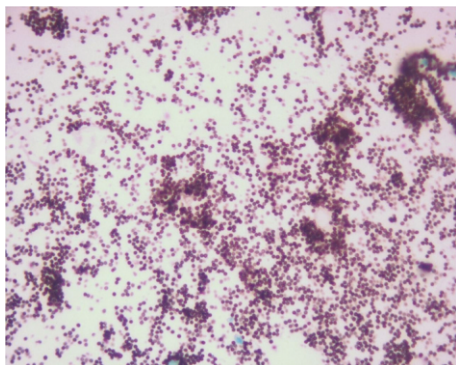


Figura 4C - Fungos do pão, Cell block, Grocott (100x)

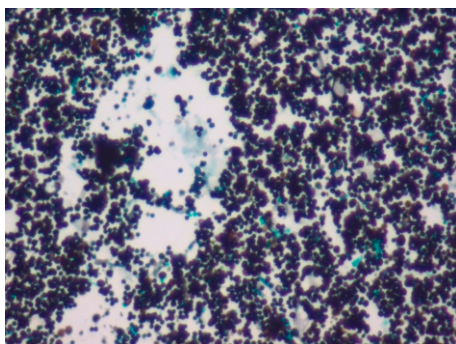


Figura 4D - Fungos do pão, HistoGel™, Grocott (400x )

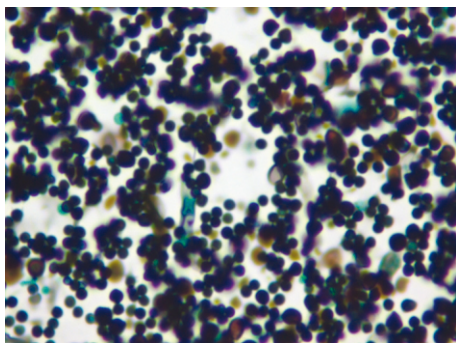


Figura 4E - Fungos do pão, HistoGel™, Grocott (1000x)

## DISCUSSÃO

Tendo em conta a elevada densidade de fungos obtida pela raspagem do pão, a escolha do método poderá depender dos recursos do laboratório e das preferências dos utilizadores, já que tanto o *Cell block* como o *HistoGel™* foram considerados satisfatórios, sem dificuldades de utilização ou de manipulação.

Comprovámos que os métodos utilizados cumpriram satisfatoriamente os requisitos exigidos à partida, sendo de baixo custo, fácil obtenção e seguros. Realizaram-se técnicas simples, que utilizam materiais de uso corrente em laboratórios de Anatomia Patológica, e que permitem a identificação das estruturas micóticas sem a necessidade de alteração de qualquer protocolo já estabelecido na rotina laboratorial.

Conclui-se que os métodos testados podem ser úteis na obtenção de fungos para controlos positivos em técnicas histoquímicas e que têm aplicação num laboratório de Anatomia Patológica. Os autores consideram ainda que a utilização de *HistoGel™* é mais vantajosa para o processamento histológico de material micótico para realização da técnica de *Grocott*.

## AGRADECIMENTOS

Os autores gostariam de agradecer às técnicas Alexandra Gonçalves e Ana Lúcia Ponte pela realização das técnicas de *HistoGel™* e de *Grocott* respectivamente, ao coordenador José Ferreira da Silva e ao director Dr. Mário Oliveira, do Serviço de Anatomia Patológica do Centro Hospitalar de Lisboa Central, EPE, pela cedência do espaço e dos materiais do laboratório.

**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

1. Abbott, J. J., Hamacher, K. L. and Ahmed, I. (2006). In situ hybridization in cutaneous deep fungal infections: a valuable diagnostic adjunct to fungal morphology and tissue cultures. *Journal of Cutaneous Pathology*, 33: 426-432.
2. Montone, K. T., LiVolsi, V. A., Lanza, D. C., Kennedy, D. W., Palmer, J., Chiu, A. G., Feldman, M. D., et al. (2011). In situ hybridization for specific fungal organisms in acute invasive fungal rhinosinusitis. *American Journal of Clinical Pathology*, 135(2), 190-199
3. LATGE, J. P. (1999). *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis. *Clinical microbiology reviews*, 12(2): 310.
4. Vandeputte, P; Ferrari, S; Coste, A.T (2012). Antifungal resistance and new strategies to control fungal infections. *International Journal of Microbiology*, 2012:713687
5. Woods, G.L.; Walker, D.H; (1996). Detection of infectious agents by use of cytologic and histologic stains. *Clinical Microbiology Reviews*. 9:382-404.
6. McGinnis, M. R. (1992). Diagnosing fungal infections using histopathology. *Clin. Adv. se Treat. Fungal Infect.* 3:1116.
7. Bancroft, J.D; Gamble, M. (2002). *Theory and Practice of Histological Techniques*. (5th Ed.), Editors Churchill Livingstone, New York (NY) 725 pp.



# Demonstração de membranas basais com uma coloração alternativa de prata-metenamina em rim e pulmão

## Coloração alternativa de prata-metenamina

Liliana S. Raimundo<sup>1</sup>, Sofia O. Silva<sup>1</sup>, Albina D. Resende<sup>1,2</sup>

1 - Departamento das Tecnologias de Diagnóstico e Terapêutica, Instituto Politécnico de Saúde do Norte (IPSN), CESPU, Gandra - Portugal

2 - Laboratório de Estudos Celulares, Moleculares e Analíticos (LECEMA), Centro Interdisciplinar de Investigação Marinha e Ambiental (CIIMAR), Porto - Portugal

Correspondência para Liliana S. Raimundo - e-mail: liliana-raimundo@live.com

### RESUMO

A membrana basal, camada glicoproteica, constitui o suporte físico dos epitélios. Alterações nas estruturas e função das membranas basais são observadas em várias patologias, nomeadamente, nas síndromes renais. A técnica de prata-metenamina, específica para marcação de membranas basais, contribui para o diagnóstico de patologias, principalmente da glomerulonefrite membranosa, glomerulonefrite membranoproliferativa ou diabetes, onde este folheto da matriz extracelular pode aparecer mais espessado.

O tempo do diagnóstico é um fator importante não só para o paciente que se encontra dependente do diagnóstico, como para medir a eficácia do laboratório de anatomia patológica. Assim, o desenvolvimento de técnicas que diminuam os tempos de procedimento sem comprometer os resultados é um dos caminhos a seguir para melhorar a resposta às patologias e necessidades dos pacientes. Neste trabalho aperfeiçoamos a técnica de coloração de prata-metenamina com o objetivo de reduzir o tempo de execução permitindo uma resposta mais rápida às necessidades dos pacientes. Neste sentido, foram aplicados em cortes de rim e pulmão de ratinho dois protocolos alternativos ao protocolo *standard* de prata-metenamina, nos quais a incubação na estufa foi substituída por uma incubação em banho-maria e no micro-ondas, respetivamente. Além disso, a concentração de alguns reagentes foi também modificada. O protocolo alternativo da coloração de prata-metenamina em banho-maria revelou excelentes resultados, uma vez que as imagens observadas foram semelhantes às obtidas com o protocolo *standard*, mas com uma redução bastante significativa do tempo de execução da técnica.

**PALAVRAS-CHAVE:** Glicoproteínas, Coloração de prata-metenamina, Lâmina basal, Epitélio

### INTRODUÇÃO

As membranas basais são encontradas em todos os tecidos do corpo humano como uma matriz flexível, separando células epiteliais, endoteliais ou mesoteliais dos tecidos conjuntivos, das células musculares ou de células do tecido nervoso, sendo a sua principal função o suporte físico dos epitélios. A membrana basal não é homogênea, estando dividida em três camadas: lâmina rara, lâmina densa e lâmina reticular, em que o conjunto da lâmina rara e lâmina densa constituem a lâmina basal [1]. A lâmina rara é composta por glicoproteínas complexas e encontra-se adjacente à base das células epiteliais, sendo a sua adesão estabelecida pela existência de

integrinas. A lâmina densa é composta por uma rede de microfibrilas, predominando o colagénio tipo IV associado a grande quantidade de glicoproteínas, nomeadamente de laminina e fibronectina, e de pequenas quantidades de proteoglicanos ricos em sulfato de heparano. A lâmina reticular é vista como uma rede de elementos fibrosos, nomeadamente de fibras reticulares ou colagénio tipo III associadas a proteínas e glicoproteínas, contínua com as fibras subjacentes ativas do tecido conjuntivo [2,3].

Alterações nas estruturas e função das membranas basais são observadas em várias patologias, nomeadamente nas síndromes renais. A espessura da membrana basal varia consoante o tecido, embora presente

normalmente entre 15 e 50 nm. A membrana basal glomerular (MBG) é particularmente espessa num adulto saudável, podendo apresentar até 350 nm. Em casos de nefropatia membranosa ou diabetes, as membranas basais dos glomérulos são ainda mais evidentes, dada a sua maior espessura. Para uma análise mais correta destas estruturas, existem várias técnicas histoquímicas específicas disponíveis [2].

A coloração é uma etapa fundamental em histologia, uma vez que os tecidos necessitam de diferenciação ótica. Com a coloração de hematoxilina-eosina (HE), a maioria dos cortes histológicos apresenta pouco contraste para as membranas basais tornando difícil o diagnóstico de patologias que tenham estas estruturas como referência. Dado o seu conteúdo rico em hidratos de carbono, as membranas são fortemente positivas para a técnica de prata-metenamina. Esta técnica permite demonstrar os polissacarídeos da membrana basal bem como da parede celular microbiana [4].

A técnica de prata-metenamina evidencia a membrana basal, tornando possível a visualização de alterações na sua estrutura e função [4]. Pela observação em microscopia ótica de cortes histológicos renais de pacientes com glomerulonefrite membranoproliferativa (GNMP) ou glomerulonefrite membranosa (GNM), verifica-se que a alteração das membranas basais em espessura é similar em ambas as patologias, embora nos cortes com GNMP também se verifique proliferação das células glomerulares [2].

O tempo do diagnóstico é um fator importante não só para revelar o estado do doente, mas também para traduzir a eficácia do laboratório de anatomia patológica onde se processam as amostras que irão permitir esse mesmo diagnóstico. Assim, o desenvolvimento de técnicas que diminuam os tempos de coloração sem comprometer a credibilidade dos resultados é um dos objetivos prementes para melhorar os tempos de resposta à patologia [5].

A técnica de prata-metenamina consiste numa reação de redução da prata pelos constituintes das membranas basais, depois da oxidação dos grupos 1,2-glicol, pelo ácido periódico, levando à produção de aldeídos. Estes aldeídos reduzem os iões de prata a prata metálica, tornando-a visível. A viragem é feita com cloreto de ouro e a prata não reduzida é removida com hipossulfito de sódio. Deste modo, é produzido um precipitado de prata nas membranas basais [4,6].

Tendo em conta os conhecimentos expostos, este trabalho teve como objetivo aperfeiçoar a

técnica de prata-metenamina com o intuito de reduzir o tempo de execução e assim permitir uma resposta mais rápida em patologias específicas com vantagens para os doentes.

## MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo foi realizado nos laboratórios de Anatomia Patológica do Instituto Politécnico de Saúde do Norte.

### Amostragem e Processamento dos Tecidos

O material biológico consistiu em amostras de rim e pulmão de ratinho processadas para obtenção de cortes histológicos. As amostras foram fixadas em formol tamponado a 10% durante 48 h e submetidas a um processamento automático, consistindo numa desidratação em série crescente de álcoois seguida de uma diafanização em xilol, terminando numa impregnação dos tecidos em parafina.

De cada bloco foram realizados seis cortes de 4 µm, dois para aplicação do protocolo *standard* de prata-metenamina [5,7] e quatro para aplicação do protocolo alternativo (dois cortes em que se utilizou o banho-maria e nos outros dois o micro-ondas [4]).

### Coloração *Standard* de Prata-Metenamina

Os cortes foram submetidos a ácido periódico a 0,5% durante 15 minutos. Seguiu-se uma incubação com solução prata-metenamina durante 90 minutos, numa estufa a 60°C. A solução de prata-metenamina foi preparada imediatamente antes da sua utilização, a partir de uma solução *stock* de prata-metenamina com 10% de solução de borato de sódio a 5% (a solução *stock* tinha a seguinte composição: metenamina a 3% com 4,8% de nitrato de prata a 5%.) Após a incubação adicionou-se cloreto de ouro a 0,2% durante 20 minutos, período em que ocorreu a viragem de castanho a negro. Os cortes foram então incubados em hipossulfito de sódio a 3% durante 2 minutos. Por último, os cortes foram contrastados com vermelho nuclear durante 3 minutos. Entre cada um dos passos da técnica foi efetuada uma lavagem em água destilada. A coloração *standard* de prata-metenamina tem a duração de aproximadamente 2 horas e 10 minutos [5,7].

### Coloração Alternativa de Prata-Metenamina em Banho-maria

Os cortes foram submetidos a ácido periódico a 2% durante 5 minutos e incubados em solução de prata-metenamina (descrita anteriormente) num banho-maria a 80°C, durante 30 minutos.

Após a incubação adicionou-se cloreto de ouro a 1% durante 1 minuto, verificando-se a viragem. Incubou-se em hipossulfito de sódio a 3% durante 2 minutos e finalmente contrastou-se com eosina durante 3 minutos. Entre cada passo da técnica foi efetuada uma lavagem em água destilada. Esta coloração alternativa de prata-metenamina tem a duração de aproximadamente 41 minutos.

#### Coloração Alternativa de Prata-Metenamina por Micro-ondas

Os cortes foram submetidos a ácido periódico a 2% durante 5 minutos e incubados em solução de prata-metenamina colocando-os num micro-ondas a 450W durante 4 minutos. Após a incubação adicionou-se cloreto de ouro a 1% durante 1 minuto, de forma a ocorrer a viragem. Incubou-se em hipossulfito de sódio a 3% durante 2 minutos e finalmente contrastou-se com eosina durante 3 minutos. Entre cada passo da técnica foi efetuada uma lavagem em água destilada. Esta coloração alternativa de prata-metenamina por micro-ondas tem a duração de aproximadamente 15 minutos [4].

#### Montagem e Observação

Após a aplicação das várias técnicas de coloração descritas, os cortes foram montados com Entellan®, observados e fotografados num microscópio ótico Zeiss A1 com uma câmara fotográfica AxioCam IC3 acoplada ao microscópio.

### RESULTADOS

Pela observação dos cortes histológicos de rim submetidos aos protocolos aplicados, as membranas dos epitélios dos túbulos renais e glomérulos renais apresentaram-se coradas de negro e as restantes estruturas apresentaram-se coradas de rosa (Figuras 1 a 4). No entanto, nos cortes onde se aplicou a técnica alternativa de prata-metenamina em banho-maria, os núcleos apresentaram-se mais evidentes (Figuras 2 e 4) quando comparados com os observados nos cortes onde se aplicou o procedimento *standard* (Figuras 1 e 3). As estruturas coradas de rosa apresentaram-se com tonalidades diferentes consoante a técnica utilizada, sendo um rosa mais claro nos cortes submetidos à técnica *standard* em comparação com os da técnica alternativa (Figuras 1 a 4).

Paralelamente, resultados similares foram visualizados nos cortes de pulmão (Figuras 5 a 8). Os cortes histológicos, de ambos os tecidos, submetidos à coloração alternativa de prata-metenamina por micro-ondas, apresentaram-se muito danificados, impedindo uma identificação clara das estruturas (Figuras 9 e 10). Mesmo nas

situações em que foi possível a sua identificação, as alterações morfológicas das mesmas eram bem evidentes.

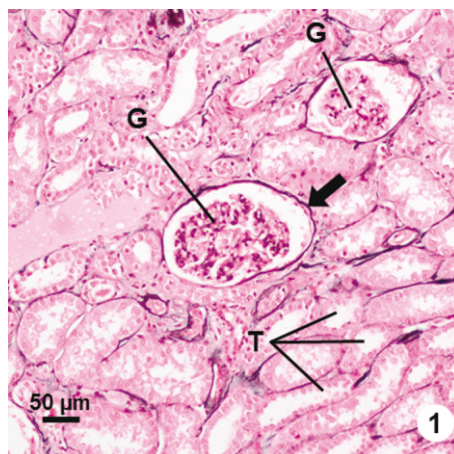


Figura 1 - Corte de rim corado com a técnica *standard* de prata-metenamina. Observa-se o córtex renal com múltiplos glomérulos renais (G) onde também é possível visualizar a membrana basal corada a negro (seta). Também se observam túbulos (T) contorcidos proximais e distais corados de rosa.

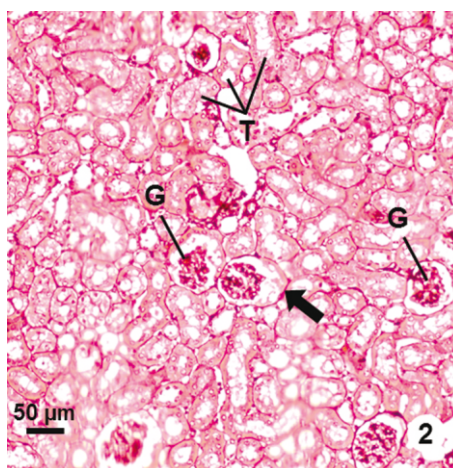


Figura 2 - Corte de rim corado com a técnica alternativa de prata-metenamina em banho-maria. A membrana basal (seta) dos glomérulos renais está corada a negro e os túbulos (T) contorcidos proximais e distais foram corados de rosa.

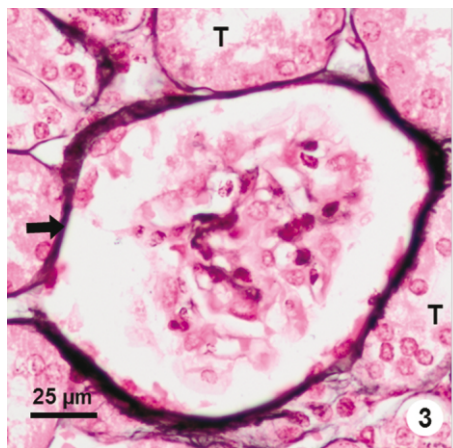
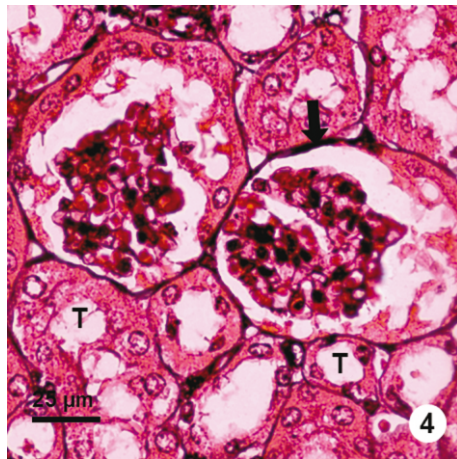
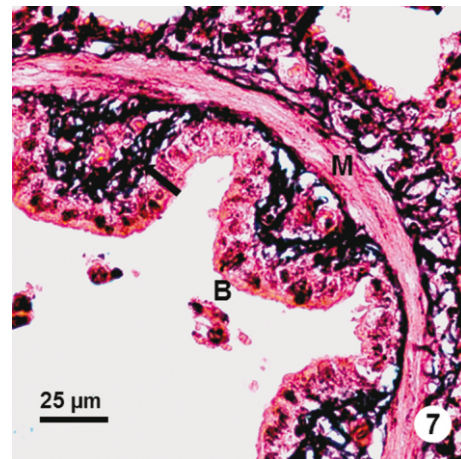


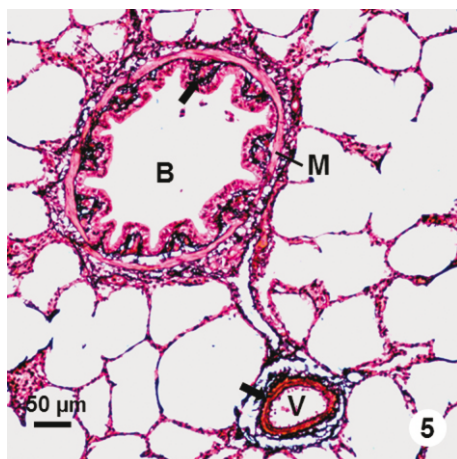
Figura 3 - Corte de rim corado com a técnica *standard* de prata-metenamina. Face à maior ampliação, visualiza-se com mais detalhe a membrana basal (seta) dos glomérulos renais que aparecem marcadas de negro. Os túbulos (T) contorcidos proximais e distais apresentam-se com tonalidade rosa.



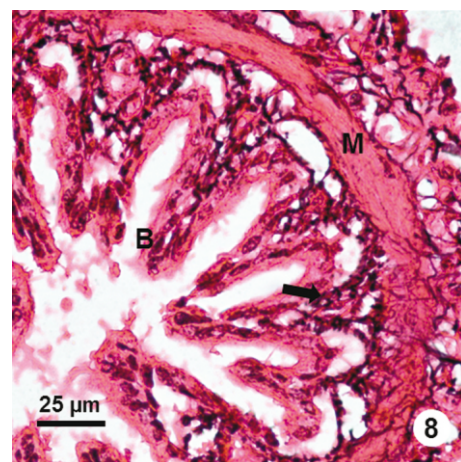
**Figura 4** - Corte de rim corado com a técnica alternativa de prata-metamina em banho-maria com maior ampliação. Visualiza-se com mais pormenor a membrana basal (seta) dos glomerúlos renais corada de negro, em torno do glomerúlo renal e dos capilares glomerulares. Os túbulos (T) contorcidos proximais e distais observam-se também com mais detalhe e corados de rosa.



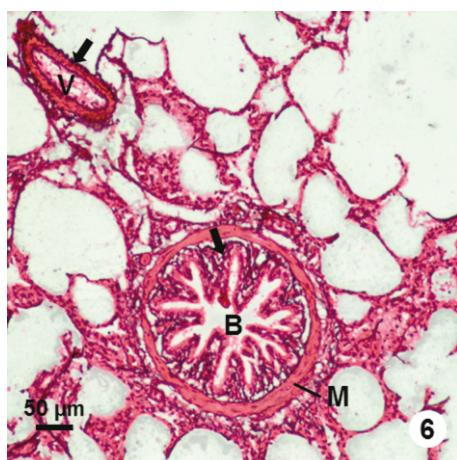
**Figura 7** - Corte de pulmão corado com a técnica standard de prata-metamina com maior detalhe. Apenas se visualiza parte do bronquíolo (B) onde se observa a membrana basal (seta) corada de negro e o seu epitélio corado de rosa. Em torno da membrana basal encontra-se o músculo liso (M), em forma de anel, corado de rosa.



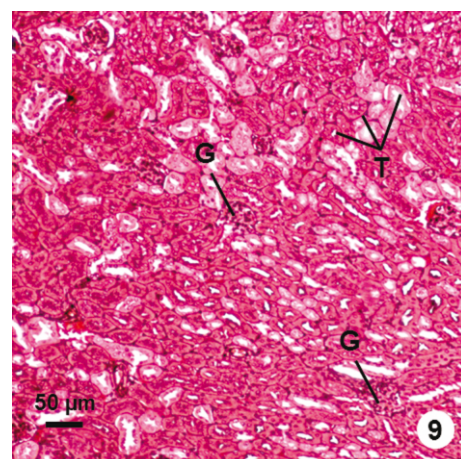
**Figura 5** - Corte de pulmão corado com a técnica standard de prata-metamina. Observa-se o bronquíolo (B) com a membrana basal (seta) com algumas invaginações para o lúmen, corada de negro. O músculo liso (M) em forma de anel está corado de rosa. A membrana basal (seta) do vaso sanguíneo (V) também se apresenta corada de negro.



**Figura 8** - Corte de pulmão corado com a técnica alternativa de prata-metamina em banho-maria com maior ampliação. Visualiza-se a membrana basal (seta) corada de negro, onde é possível verificar a sua aparência reticular. As células do epitélio do bronquíolo (B) aparecem coradas de rosa. Entre as células epiteliais podem observar-se algumas de tonalidade mais escura correspondendo a células caliciformes. A rodear a membrana basal está o músculo liso (M) em forma de anel corado de rosa.



**Figura 6** - Corte de pulmão corado com a técnica alternativa de prata-metamina em banho-maria. Observa-se o bronquíolo (B) com a membrana basal (seta), apresentando invaginações para o lúmen e corada de negro. Em torno da membrana basal encontra-se o músculo liso (M) em forma de anel corado de rosa. A membrana basal (seta) do vaso sanguíneo (V) também se apresenta corada de negro.



**Figura 9** - Corte de rim corado com a técnica alternativa de prata-metamina por micro-ondas. A morfologia do tecido apresenta-se bastante alterada face ao normal, em que os glomerúlos renais (G) não se apresentam bem individualizados dos túbulos (T) contorcidos proximais e distais.

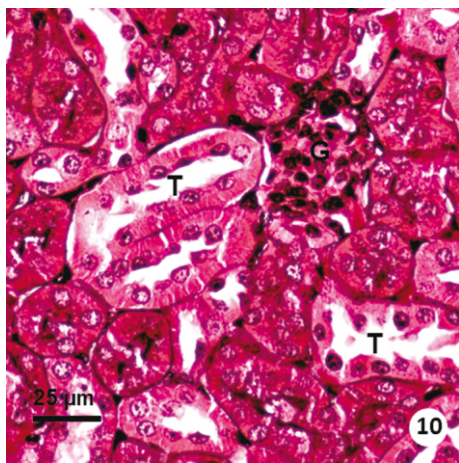


Figura 10 - Corte de rim corado com a técnica alternativa de prata-metenamina por micro-ondas com maior ampliação. As alterações da morfologia do tecido são bem visíveis, em que não se distingue a membrana basal dos glomérulos renais (G), os quais também não se encontram bem individualizados dos túbulos (T) contorcidos proximais e distais.

## DISCUSSÃO

Perante a similaridade dos resultados obtidos com a técnica *standard* e a técnica alternativa em banho-maria, e em ambos os tecidos, em que as membranas basais apareceram marcadas de negro contrastando com as restantes estruturas coradas de rosa, ficamos com a indicação que a técnica alternativa de prata-metenamina em banho-maria é tão fiável quanto a técnica *standard*. O facto de a técnica alternativa se realizar num intervalo de tempo muito mais reduzido torna-a uma técnica de elevada aplicabilidade laboratorial, vantajosa não só para o próprio laboratório, mas também para os pacientes que necessitem da aplicação desta técnica como meio de diagnóstico.

No entanto, e contrariamente aos resultados obtidos por outros autores [4], a aplicação da técnica alternativa por micro-ondas não se revelou uma técnica eficaz, face à destruição observada nos tecidos. Pelo que, a sua aplicação poderia comprometer o diagnóstico histológico dos pacientes.

É de salientar ainda que o aperfeiçoamento da técnica alternativa de prata-metenamina foi efetuado em duas etapas. Numa primeira fase apenas se substituiu a incubação na estufa por uma incubação em banho-maria, reduzindo o tempo dessa mesma incubação e obtendo resultados similares à técnica *standard*. Numa segunda fase, e com o intuito de diminuir ainda mais o tempo de incubação, aumentou-se a concentração dos reagentes, nomeadamente do

ácido periódico e da solução de cloreto de ouro, obtendo-se novamente resultados similares ao procedimento *standard*. Os resultados apresentados foram os obtidos pela técnica alternativa de prata-metenamina com a inclusão dessas duas alterações ao protocolo *standard*, já que consideramos ser esse o protocolo otimizado face ao objetivo principal deste trabalho em reduzir o tempo de aplicação desta técnica.

Em conclusão, o objetivo pretendido com este trabalho foi alcançado. Foi encontrado um protocolo alternativo à técnica de prata-metenamina utilizando um tempo muito inferior ao gasto na técnica *standard*, com obtenção dos mesmos resultados. Assim, o protocolo em que se utilizou o banho-maria é viável e pode ser utilizado como uma boa alternativa na obtenção de um diagnóstico mais rápido, mantendo a qualidade.

## AGRADECIMENTOS

À Mestre Fernanda Garcez, Mestre Patrícia Silva e Dra. Francisca Araújo pela orientação de estágio onde se desenvolveu este trabalho e à Mestre Filipa Ferreira pela ajuda nas micrografias.

Ao Professor Doutor Fernando Ferreira como diretor do departamento e coordenador de curso.

À instituição de ensino que permitiu a utilização dos laboratórios e equipamentos para a elaboração do estudo em questão.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Junqueira LC, Carneiro J. Histologia Básica. 11ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2008.
2. Alpers CE. Kidney and its collecting system. In: Kumar V, Abbas A, Fausto N, Mitchell R., editors. Robbins Basic Pathology. 8ª ed. Philadelphia: Saunders Elsevier; 2007. p.541-577.
3. Lopes L, Sesso R. Revisão/Atualização em Nefrologia Clínica: Aspectos clínicos da glomerulonefrite membranoproliferativa. J Bras Nefrol 1996;18(2):159-162.
4. Bancroft J, Marilyn G. Theory and practice of Histological Techniques. 6ª ed. Edinburg: Churchill Livingstone Elsevier; 2008.
5. Jones D. Nephrotic glomerulonephritis. State University of New York, Upstate Medical Center 1956;33(2):313-329.
6. Rambourg A. An improved silver methenamine technique for the detection of periodic acid-reactive complex carbohydrates with the electron microscope. J Histochem Cytochem 1967;15(7):409-412.
7. Yabuki A, Suzuki S, Matsumoto M, Taniguchi K, Nishinakagawa H. A simple method for the specific detection of Ren-1 renin. Kidney International 2002;62:2294-2299.



**Saúde, Bem-estar e Lazer**



**Proteja, garanta e agilize o seu futuro!  
AGILIDADE ... UM PLANO PARA A VIDA**



**CARTÃO  
DE ASSISTÊNCIA  
MÉDICA E DENTÁRIA**

**por apenas  
5,5€/mês**

- > Sem carências
- > Sem Plafond
- > Uso Imediato
- > Sem limite de idade
- > Sem renovações automáticas
- > Descontos especiais nas especialidades Médicas
- > Tabela de preços própria em Medicina Dentária
- > Clínicas Dentárias de alto padrão à sua escolha

para mais informações contactar: 212 405 660 ou 914 921 410 Carla Pinto



# Imunocitoquímica em biópsias prostáticas a partir de lâminas previamente coradas: o método de transferência de tecido

Carla Brito Lopes<sup>1</sup>; Cláudia Pen Freitas<sup>1</sup>

1 - Laboratório de Imunocitoquímica e Biologia Molecular, Serviço de Anatomia Patológica - Centro Hospitalar de Lisboa Central, EPE.

Correspondência para Cláudia Pen Freitas - e-mail: penfreitas@gmail.com

## RESUMO

O estudo anatomopatológico de biópsias prostáticas é frequentemente apoiado por técnicas imunocitoquímicas. Todavia, limitações no tamanho das amostras levam a que, por vezes, pequenos focos tumorais observados nas primeiras lâminas de Hematoxilina e Eosina (H&E) se percam nos cortes histológicos subsequentes, não permitindo a sua caracterização imunocitoquímica.

Com este trabalho pretende-se demonstrar a viabilidade de um método de transferência de tecido de biópsias prostáticas, previamente coradas com H&E, para lâminas carregadas electrostaticamente que possibilitem a realização de técnicas imunocitoquímicas.

Foram avaliadas 20 biópsias prostáticas com diagnóstico de adenocarcinoma, tendo-se retirado do arquivo do Laboratório de Anatomia Patológica, uma lâmina histológica corada com H&E e o respectivo bloco de parafina. Procedeu-se à transferência dos cortes corados com H&E para lâminas carregadas electrostaticamente e ao corte histológico dos blocos para realização de técnicas imunocitoquímicas com os anticorpos anti - citoqueratina de alto peso molecular (clone 34 $\beta$ E12, designada habitualmente por 34 $\beta$ E12) e anti - *Alpha methylacyl-Coenzyme-A-racemase* (designada habitualmente por AMACR/P504S). Comparou-se a morfologia, observando-se 100% de preservação em todos os casos cortados de novo nos dois anticorpos, 95% no anticorpo anti - citoqueratina de alto peso molecular (clone 34 $\beta$ E12) e 90% no anticorpo anti - *Alpha methylacyl-Coenzyme-A-racemase* (AMACR/P504S) em biópsias transferidas. A qualidade da marcação imunocitoquímica não ficou comprometida com a transferência de tecido nas lesões tumorais que se esperavam marcar. A intensidade da marcação foi maior nas lâminas submetidas a transferência de tecido (*score* 5 em 100% das amostras com 34 $\beta$ E12 e 95% com anti-AMACR comparativamente com *score* 4 em 100% das amostras cortadas de novo, em ambos os anticorpos).

O resultado deste estudo mostra que o método de transferência de tecido é viável em técnicas imunocitoquímicas e que a qualidade da marcação não é afectada no processo.

**PALAVRAS-CHAVE:** Transferência de tecido, Citoqueratina de alto peso molecular (clone 34 $\beta$ E12), *Alpha methylacyl-CoA-racemase* (AMACR/P504S), Imunocitoquímica.

## INTRODUÇÃO

O cancro da próstata é o tumor sólido mais comum diagnosticado em homens na Europa e nos Estados Unidos. Porém, nas duas últimas décadas a taxa de sobrevida aumentou de 67% para 89% [1,2].

O despiste do cancro da próstata através da determinação do antigénio específico da próstata (PSA) no soro e da ecografia prostática, levaram a uma detecção e diagnóstico mais precoce da doença, resultando num tratamento

inicial mais célere com uma melhor sobrevida dos doentes [2].

O diagnóstico final de cancro da próstata é feito através do exame histológico de tecido prostático obtido através de biópsia eco-guiada ou ressecção transuretral [3]. No entanto, a importância de uma detecção cada vez mais precoce do tumor, levou a que os resultados histopatológicos sejam realizados com um número cada vez mais reduzido de glândulas tumorais [4]. A interpretação da morfologia histológica visualizada pela coloração de rotina

no laboratório de anatomia patológica - a Hematoxilina e Eosina (H&E) nem sempre é suficiente para o diagnóstico, razão pela qual se recorre à imunocitoquímica. Os marcadores utilizados na rotina laboratorial são habitualmente uma citoqueratina de alto peso molecular (clone 34 $\beta$ E12 expresso nas glândulas normais da próstata) e um marcador tumoral, anti - *Alpha methylacyl-Coenzyme-A-racemase* (AMACR - sobre expresso no tumor da próstata) [5].

O problema surge quando a necessidade de cortes histológicos sucessivos, leva a que o tumor desapareça do bloco de parafina. Alguns estudos [6,7] referem que esta situação poderia ser evitada se fossem efectuados cortes para lâminas adesivadas aquando do corte para a H&E. Estas lâminas seriam então reservadas para um eventual estudo imunocitoquímico. De acordo com os mesmos autores, este procedimento não garante que as células tumorais possam estar presentes nessas lâminas, já para não mencionar o custo associado ao número de lâminas que ficariam por utilizar. Outros estudos [8,9] referem a possibilidade de se efectuar a técnica imunocitoquímica nas lâminas previamente coradas com H&E mas em 28% dos casos o corte descola durante a execução da técnica perdendo-se a lesão [8].

Em 1993, Mehta P. e Battifora H. descreveram um procedimento que possibilita a transferência de cortes da lâmina de H&E, sempre que o tumor tenha desaparecido do bloco de parafina [10]. Este ficou conhecido como método “*Peel & Stick*”. Posteriormente, vários autores publicaram artigos com aplicações deste método [11,12] e várias modificações têm vindo a ser feitas ao protocolo original, adaptado à realidade e experiência de cada laboratório.

Definiu-se como objectivo geral deste trabalho determinar a viabilidade do método de transferência de tecido para realização de técnicas imunocitoquímicas em biópsias prostáticas. Especificamente pretende-se: a) demonstrar um método de transferência de tecido de biópsias prostáticas previamente coradas com H&E para lâminas carregadas electrostaticamente e b) comparar a qualidade da marcação imunocitoquímica em cortes de biópsias prostáticas, previamente corados com H&E e transferidos para lâminas carregadas electrostaticamente, com novos cortes obtidos do bloco de parafina, avaliando a presença de marcação na lesão tumoral e a intensidade da marcação.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Seleção de amostras para estudo

Foram seleccionados 20 casos de biópsia prostática com diagnóstico de adenocarcinoma. De cada caso retirou-se do arquivo do Laboratório de Anatomia Patológica do Centro Hospitalar de Lisboa Central EPE, o bloco de parafina e a lâmina histológica corada com H&E. O período em que as lâminas se encontravam no arquivo variou entre 6 dias a 6 meses.

Como grupo de controlo foram utilizados cortes de biópsias prostáticas realizados a partir do bloco de parafina (dois cortes por caso). Para o grupo em estudo foram utilizados cortes de biópsias prostáticas previamente corados com H&E e sujeitos a transferência de tecido (dois cortes por caso). Em ambos os grupos foram utilizadas lâminas carregadas electrostaticamente (SUPERFROST®PLUS, Menzel-Gläser, Thermo Scientific, J1800AMNZ).

### Método de transferência de tecido para realização de técnicas imunocitoquímicas a partir de lâminas coradas com H&E.

A transferência de tecido para lâminas carregadas electrostaticamente realizou-se modificando o método “*Peel & Stick*” [10]. O procedimento encontra-se descrito no Quadro I e é ilustrado na Figura 1.

### Realização da técnica imunocitoquímica

A técnica de imunocitoquímica foi realizada tanto no grupo controlo como no grupo em estudo, seguindo o protocolo habitual do laboratório, em equipamento automático (Ventana BenchMark®ULTRA, utilizando os anticorpos primários monoclonal mouse Anti-Human Cytokeratin HMW High Molecular Weight, clone 34 $\beta$ E12 (Dako-M0630), diluído a 1:50 durante 20 minutos a 37°C e Monoclonal Rabbit Anti-Human AMACR (*a-methylacyl-coenzyme-A racemase*), clone 13H4 (Dako-M3616) diluído a 1:250 durante 32 minutos a 38°C. A inibição da peroxidase endógena, amplificação, revelação e contraste foram realizadas com ultraView Universal DAB Detection Kit (Ventana 760-500). Terminada a técnica imunocitoquímica, as lâminas foram lavadas em água corrente e detergente, desidratadas em concentrações crescentes de álcool (75%, 90% e 99% - Proclínica) durante 1 minuto em cada, diafanizadas em xilol (VWR-28975.291) e montadas com meio de montagem sintético (Quick-D M-Klinipath 7010709T05).

Procedimento de transferência de tecido
1. Seleccionaram-se as secções a transferir na lâmina histológica corada com H&E;
2. Removeu-se a lamela com Xilol (VWR-28975.291) à temperatura ambiente;
3. Cobriram-se as lâminas generosa e totalmente com meio de montagem sintético (Quick-D M-Klinipath -7010709T05) - (Figura 1A);
4. Colocaram-se as lâminas na horizontal, à temperatura ambiente e aguardou-se 24 horas;
5. Colocaram-se as lâminas numa tina de ranhuras com água destilada no frigorífico (4°C). Aguardou-se 24 horas.
6. Com um bisturi, cortou-se o meio de montagem juntamente com os fragmentos pretendidos e colocou-se em lâminas carregadas electrostaticamente (SUPERFROST®PLUS, Menzel-Gläser,Thermo Scientific®, J1800AMNZ) - (Figura 1B a 1H);
7. Colocou-se um peso em cima das lâminas (pelo menos 2 quilos) e aguardou-se 24 horas (Figura 1I);
8. Retirou-se o meio de montagem com xilol.

Quadro I- Procedimento de transferência de tecido a partir de lâminas coradas com H&E para lâminas carregadas electrostaticamente.



Figura 1 - Procedimento de transferência de tecido a partir de lâminas de H&E para lâminas carregadas electrostaticamente. Adaptado do método "Peel & Stick"[10].

A viabilidade do método foi analisada por avaliação microscópica por dois observadores independentes sem conhecimento prévio dos casos. Foram analisados dois parâmetros: a preservação morfológica dos tecidos sujeitos a transferência e submetidos à técnica imunocitoquímica e a qualidade da marcação imunocitoquímica.

Para a preservação morfológica foi considerada a integridade do fragmento de biópsia prostática no grupo sujeito a transferência, comparativamente com o grupo controlo. Foi assinalado numa tabela “+” sempre que a morfologia das biópsias prostáticas se manteve preservada na lâmina transferida e “-“ quando os fragmentos se encontravam ausentes ou incompletos (não preservados).

Para a qualidade da marcação imunocitoquímica considerou-se a presença (“+”) e ausência (“-“) de marcação na zona tumoral e comparou-se a intensidade da marcação mediante a atribuição de scores de acordo com a seguinte escala de avaliação (Tabela I):

score	Escala de avaliação da marcação imunocitoquímica
0	Sem marcação
1	Pouca ou nenhuma marcação das células
2	Marcação fraca sem demonstração de muitas das células que se esperavam marcar
3	Fraca marcação da maioria das células
4	Boa demonstração das células
5	Excelente demonstração das células com o mínimo fundo

Tabela I - Grelha de avaliação da marcação imunocitoquímica para os anticorpos anti-34βE12 e anti-AMARC em biópsias sujeitas a transferência de tecido e no grupo controlo.

Foram considerados como critérios de exclusão a falta de preservação da morfologia na lesão tumoral após a transferência do tecido.

Os resultados foram analisados recorrendo a estatística descritiva utilizando o programa Microsoft®Office Excel 2010.

## RESULTADOS

### Resultados da viabilidade do método de transferência de tecido

A transferência de tecido de biópsias prostáticas previamente coradas com H&E para lâminas carregadas electrostaticamente e a subsequente realização da técnica imunocitoquímica mostrou-se viável em todas as lâminas. Comparando o grupo controlo com o grupo em estudo, observou-se porém que

relativamente ao anticorpo anti-34βE12, uma das biópsias sujeitas a transferência apresentava zonas mal preservadas bem como em duas lâminas relativas ao anticorpo anti-AMARC (preservação morfológica em 95% e 90% respectivamente- Tabela II). Ainda assim a zona da lesão tumoral não foi comprometida, tendo-se incluído as amostras no estudo.

Anticorpo	Preservação morfológica (% de casos)
34βE12	
Grupo controlo	100
Grupo transferido	95
AMARC	
Grupo controlo	100
Grupo transferido	90

Tabela II - Comparação da preservação morfológica do grupo submetido a transferência de tecido e do grupo controlo após realização da técnica imunocitoquímica com os anticorpos anti-34βE12 e anti-AMARC.

### Resultados da marcação imunocitoquímica

Foi observada marcação imunocitoquímica na totalidade das amostras (casos controlo e biópsias sujeitas a transferência de tecido), em ambos os anticorpos em estudo (Tabela III).

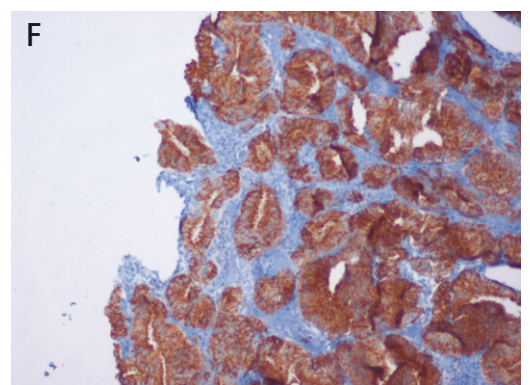
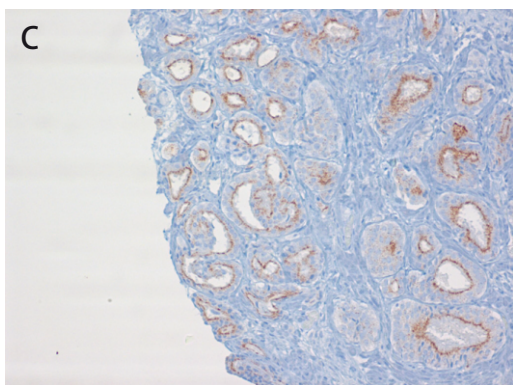
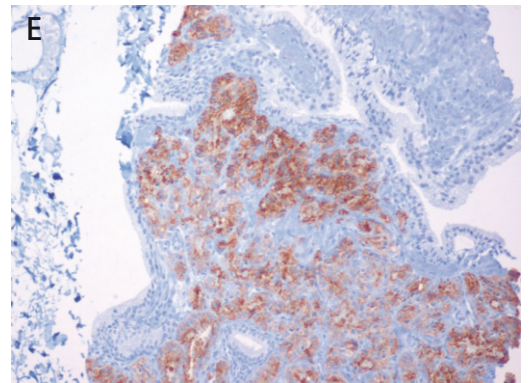
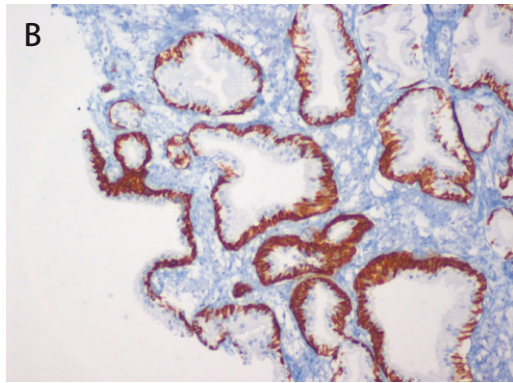
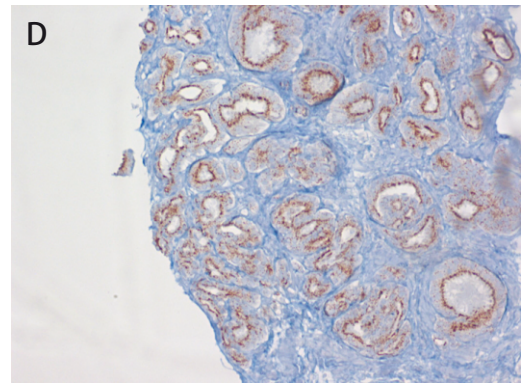
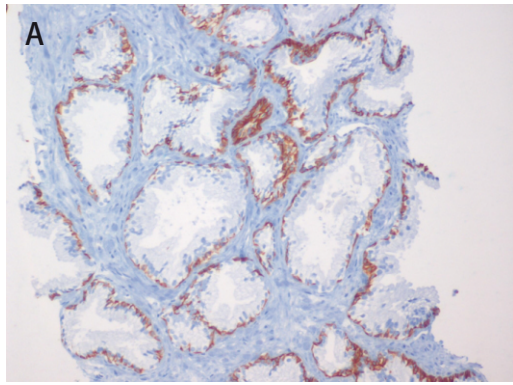
Anticorpo	Marcação imunocitoquímica (% de casos)	
	Presença	Ausência
34βE12		
Grupo controlo	100	0
Grupo transferido	100	0
AMARC		
Grupo controlo	100	0
Grupo transferido	100	0

Tabela III - Comparação da presença de marcação imunocitoquímica dos anticorpos anti-34βE12 e anti-AMARC no grupo controlo e no grupo submetido a transferência de tecido.

Relativamente à intensidade da marcação imunocitoquímica, todas as amostras do grupo controlo (cortadas de novo) apresentaram um score 4 para ambos os anticorpos. As amostras sujeitas a transferência de tecido apresentaram uma marcação imunocitoquímica com maior intensidade do que as do grupo controlo em 100% dos casos marcados com anti-34βE12 e 95% dos casos marcados com anti-AMARC (Tabela IV, Figura 2).

Anticorpo	Intensidade da marcação imunocitoquímica (% de casos)		
	0 a 3	4	5
34βE12			
Grupo controlo	0	100	
Grupo transferido	0		100
AMARC			
Grupo controlo	0	100	
Grupo transferido	0	5	95

Tabela IV - Comparação da intensidade da marcação dos anticorpos anti-34βE12 e anti-AMARC no grupo controlo e no grupo submetido a transferência de tecido.



**Figura 2 - Comparação da intensidade da marcação imunocitoquímica das amostras controlo (A,C,E) com as amostras sujeitas a transferência de tecido (B,D,F)**  
**A e B- Anticorpo anti-34βE12 (100x)**  
**C a F- Anticorpo anti-AMACR (100x)**

## DISCUSSÃO

Há alguns anos que o método de transferência de tecido tem sido usado no nosso laboratório, particularmente em situações que não permitem a realização de novas secções histológicas. O motivo frequente para a realização deste método é o desaparecimento de representatividade tumoral no bloco histológico apesar da visualização da lesão na lâmina de H&E.

Tendo em conta os resultados deste estudo podemos constatar que o método de transferência de tecido permite a realização de técnicas imunocitoquímicas a partir de lâminas previamente coradas com H&E, com uma mínima destruição morfológica.

Para além da metodologia ser viável, os resultados da técnica imunocitoquímica mostraram-se bastante satisfatórios, tendo em consideração que todas as lâminas em estudo apresentaram marcação para os dois anticorpos utilizados.

Os resultados da técnica imunocitoquímica por este método são concordantes com os do método convencional (blocos cortados de novo), contudo, curiosamente observou-se um aumento de intensidade nas lâminas submetidas a transferência de tecido, comparativamente aos casos cortados de novo. A execução do corte histológico por diferentes profissionais e em diferentes equipamentos pode influenciar os resultados [14]. Porém, a consistência dos resultados da marcação imunocitoquímica das várias lâminas não nos permite concluir sobre este resultado. A perda de antigenicidade ao longo do tempo nos blocos histológicos do arquivo, também pode explicar a diferença de intensidade dos dois grupos de lâminas [15,16]. Ainda que não tenham sido observadas diferenças na marcação imunocitoquímica entre lâminas e blocos com 6 meses e 6 dias, esta hipótese só poderá ser comprovada se se aumentar o número de amostras e efectuar um estudo de correlação entre a intensidade da marcação e o tempo de arquivo dos blocos e das lâminas de H&E.

Refere-se como desvantagem da técnica a morosidade (no total demora cerca de uma semana).

Em suma, o método de transferência de tecido de biópsias prostáticas previamente coradas com H&E para lâminas carregadas electrostaticamente mostrou-se viável, com preservação morfológica satisfatória mesmo após a exposição a alta temperatura aquando da realização de técnicas imunocitoquímicas. O presente estudo mostrou ainda que a qualidade

da marcação imunocitoquímica não fica comprometida com a transferência de tecido, em termos de marcação das lesões tumorais esperadas e da intensidade da marcação.

Como demonstrado, a execução do método é simples, acessível a qualquer laboratório de Anatomia Patológica e muito útil, particularmente em casos onde se verifique a perda de pequenos focos tumorais nos cortes histológicos subsequentes do bloco de parafina, mas visíveis nas lâminas de H&E.

## AGRADECIMENTOS

As autoras gostariam de agradecer ao técnico coordenador José Ferreira da Silva e ao director de serviço Dr. Mário Oliveira do Centro Hospitalar de Lisboa Central, EPE, pela cedência do espaço e das condições materiais do laboratório, à Carolina Lelis pelo apoio administrativo na identificação dos casos em estudo e às colegas Elsa Mesquita e Júlia Moura pelo incentivo e por nos substituir na nossa ausência.

**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

1. Jemal, A; Siegel, R; Ward, E; Murray, T; Xu, J; Thun, MJ; Cancer statistics, 2007. *CA Cancer J Clin*; 2007; 57:4366.
2. Stangelberger, A; Margreiter, M; Seitz, C; Djavan, B; Prostate cancer screening markers; *Journal of Men's Health and Gender*; 2007; 4(3):233244.
3. Shin, M; Fujita, M; Yasunaga, Y; Miki, T; Okuyama, A; Aozasa, K; Utility of immunohistochemical detection of high molecular weight cytokeratin for differential diagnosis of proliferative conditions of the prostate; *Int J Urol*; 1998; (5):237-242.
4. Thorson, P; Humphrey, PA; Minimal adenocarcinoma in prostate needle biopsy tissue; *Am J Clin Pathol*; 2000;114:896-909.
5. Martens, Mildred B; Keller, Jeremy H; Routine immunohistochemical staining for high-molecular weight cytokeratin 34B and  $\alpha$ -methylacyl CoA racemase (P504S) in postirradiation prostate biopsies; *Modern Pathology*; 2006; (19):287-290.
6. Hameed, O; Humphrey, PA; Immunohistochemical evaluation of prostate needle biopsies using saved interval sections vs new recut sections from the block-a prospective comparison; *Am J Clin Pathol*; 2009;131:683-688.
7. Green, R; Epstein, JI; Use of intervening unstained slides for immunohistochemical stains for high molecular weight cytokeratin on prostate needle biopsies; *Am J Sur Pathol*; 1999; 23 (5):567-570.
8. Dardik, M; Epstein, JI; Efficacy of restaining prostate needle biopsies with high-molecular weight cytokeratin; *Hum Pathol*; 2000; (31):1155-1161.
9. Kubier, P; Miller, RT; Tissue protection immunohistochemistry - a useful adjunct in the interpretation of prostate biopsy specimens and other selected cases in which immunostains are needed on minute lesions; *Am J Clin Pathol*; 2002;117:194-198.
10. Mehta, P; Battifora, H; How to do multiple immunostains when only one tissue slide is available; The "peel and stick" method; *Applied Immunohistochemistry*; 1993; 1(4): 297-8.
11. Hameed, O; Humphrey, PA; p63/amacr antibody cocktail restaining of prostate needle biopsy tissues after transfer to charged slides a viable approach in the diagnosis of small atypical foci that are lost on block sectioning; *Am J Clin Pathol*; 2005;124:708-715.
12. Anderco, D; Lazar, H; Borda, A; Taban, S; Mic, F; Loghin, A; Dema, A; Immunohistochemistry method preceded by tissue transfer - a reliable alternative to current practice of prostate pathology; *Studia universitatis "vasile goldiș"*; 2010; 20 (2), 11-16.
13. Miller, RT; Technical aspects of diagnostic immunohistochemistry: tricks of the trade; *NSH 1999 Symposium Workshop; Immunohistochemistry, ProPath Laboratory*; 1631; 214-237.
- 14- Leong, A; Quantitative immunohistology: tissue section thickness, another glitch in the path to standardization (editorial); *Lippincott Williams & Wilkins*; 2009;17(6):465-469.
- 15- Watanabe, J; Asaka, Y; Kanamura, S; Relationship between immunostaining intensity and antigen content in sections; *J Histochem Cytochem*; 1996;44(12):1451-1458.
- 16- Fergenbaum J, Garcia-Closas M, Hewitt S, Lissowska J, Sakoda L, Sherman M. Loss of antigenicity in stored sections of breast cancer tissue microarrays. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2004;13:667.

## 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 micron 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.

Living up to Life

**Leica**  
MICROSYSTEMS



## Total Cryosectioning Solutions

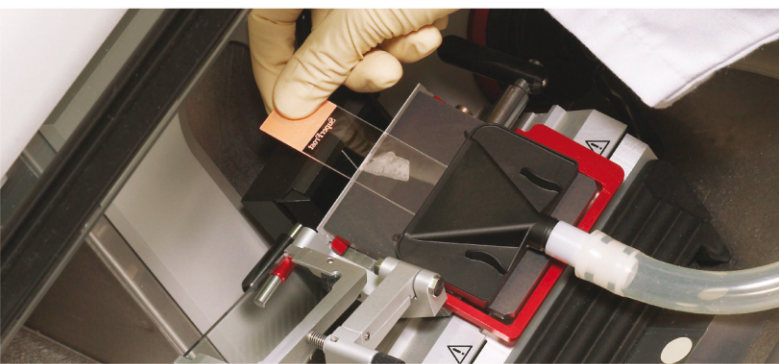
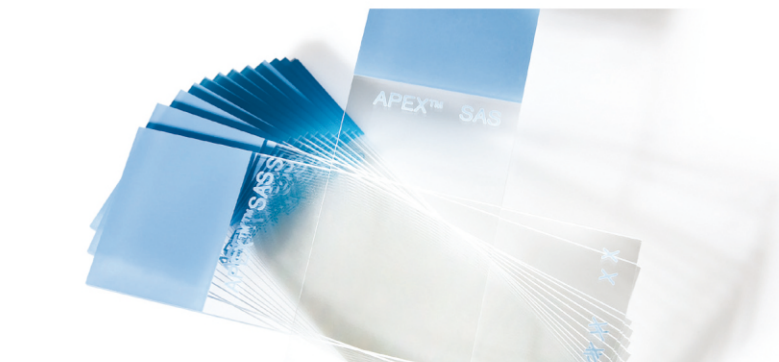
**The Leica CM1950 Cryostat Platform creates a safer laboratory delivering excellent protection from potential biohazard exposure**

- Efficient, certified UVC disinfection
- Vacuum section-waste removal system
- AgProtect™ nanosilver surface coating

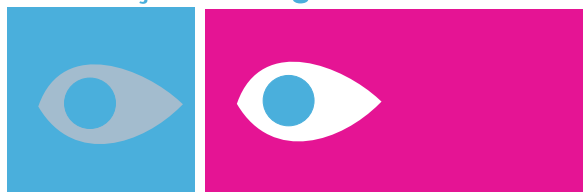
Our Total Histology solutions help you advance workflows, enhance diagnostic confidence and deliver what really matters - better patient care.

[www.leica-microsystems.com](http://www.leica-microsystems.com)

Visit us at the XIII Congresso Técnico de Anatomia Patológica



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)