

XII Congresso Técnico de Anatomia Patológica



# ***HAMMERSMITH: UMA ALTERNATIVA NO PROCESSAMENTO DE BIÓPSIAS OSTEOMEDULARES***

Katia Reis; Rute Matos; Ana Rodrigues; Nicole Inácio; Ana Lourenço; Sofia Loureiro dos Santos

Espinho, Maio 2011

# Introdução

- Processamento histológico de **biópsias osteomedulares (BO)** é fundamental no diagnóstico de Hematopatologia
- Necessário controlar **Fixação/Descalcificação** para manter preservação



Protocolos **Formol/RDO** são comumente utilizados



Artefactos processuais variados



- ↓ Detalhe Nuclear
- ↓ Basofilia
- ↓ Preservação

# Introdução (Cont.)

Protocolo *Hammersmith* surge como alternativa com **resultados positivos**

NARESH, K. N. (2008)



- **Questão de Investigação:**

Qual o protocolo de fixação/descalcificação (Formol/RDO ou *Hammersmith*) que permite uma melhor preservação tecidular em biópsias osteomedulares?

- **Objectivo Geral:**

Comparar a qualidade da preservação tecidular e os artefactos processuais em BO com os protocolos Formol/RDO e *Hammersmith*.

# Introdução (Cont.)

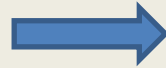
## Objectivos Específicos:

- Verificar se existem diferenças estatisticamente significativas entre os protocolos Formol/RDO e *Hammersmith* em BO na Coloração H&E
- Verificar se existem diferenças estatisticamente significativas entre os protocolos Formol/RDO e *Hammersmith* em BO com técnicas de Imunohistoquímica.
- Verificar se existem diferenças estatisticamente significativas entre os protocolos Formol/RDO e *Hammersmith* em BO com técnicas de Histoquímica.

# Revisão da Literatura

## Biópsias Osteomedulares:

- Tecido ósseo esponjoso
- Crista ilíaca posterior/anterior
- Componente calcificada



Trabéculas, Osteoclastos, Osteoblastos, Células progenitoras, etc.



**Fixação  
+  
Descalcificação**



### **Fixadores:**

Formol  
Bouin Hollande  
Solução Zenker

### **Descalcificadores:**

Ác. Fórmico  
Ác. Acético  
RDO

MORAL, R.G. (1993); BAIN, B.J. (2010); CARSON, F.L. (1997)

# Revisão da Literatura (Cont.)

## Protocolo *Hammersmith*

### Fixador AZF (24 horas)

Cloreto de Zinco.....	12,5g
Formaldeído a 40% .....	150 mL
Ácido Acético Glacial.....	7,5 mL
Água Destilada.....	perfazer até 1000 mL

### Descalcificador Gooding & Stewart (6 horas)

Formaldeído a 40%.....	50 mL
Ácido Fórmico a 100%.....	100 mL
Água Destilada.....	.850 mL

NARESH, K.N, (2008)

# Metodologia

## Tipo de Estudo

- Experimental, ou de Nível IV, quantitativo

*“ (...) estudar se o efeito esperado de uma variável independente se produz numa situação controlada.”*

*Fortin, 2009*

## Amostragem

- Amostragem Não-Probabilística por Selecção Racional

## Variáveis:

- Independente: Protocolo de Fixação/Descalcificação
- Dependente: Preservação tecidular das BO

# Metodologia (Cont.)

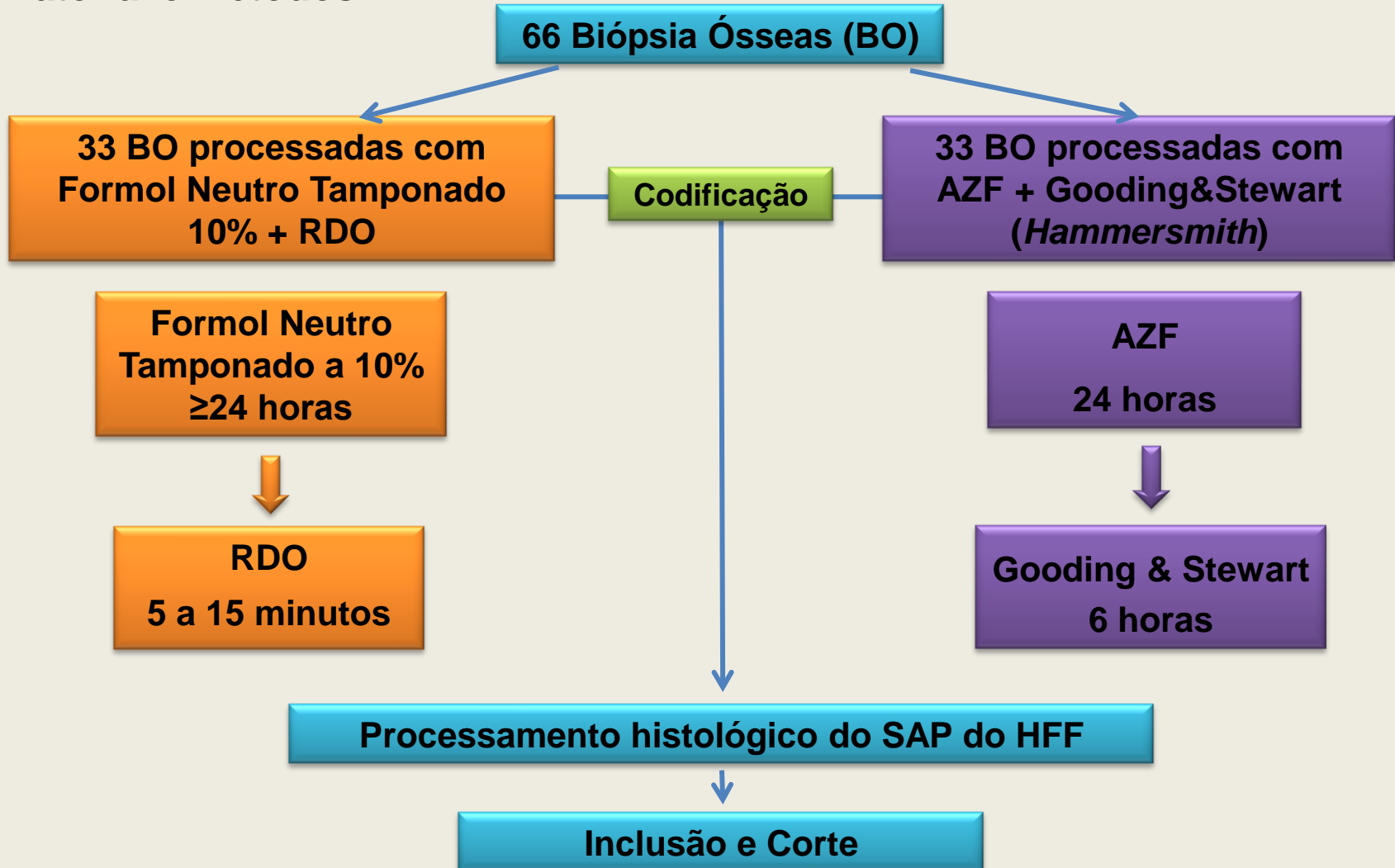
## Variáveis Estranhas:

- Tempo de fixação (Formol/RDO);
- Amostras diferentes (pacientes e patologias distintos);
- Condições de processamento e inclusão;
- Subjectividade dos observadores;
- Problemas de corte ➡ RDO no bloco



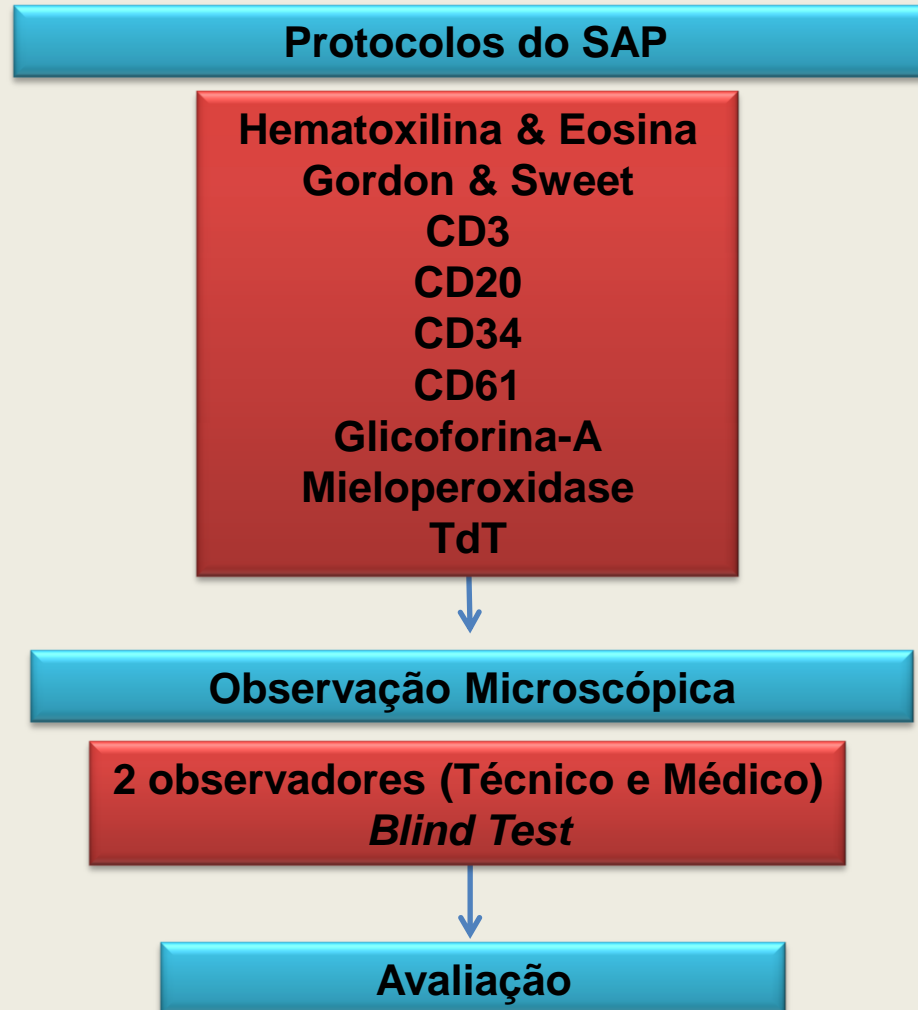
# Metodologia (Cont.)

## Material e Métodos



# Metodologia (Cont.)

## Material e Métodos (Cont.)



# Metodologia (Cont.)

## Material e Métodos (Cont.)

### Avaliação

Utilizou-se uma **escala de avaliação**, com diferentes factores de ponderação

#### Hematoxilina & Eosina

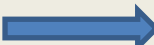

- a) Artefactos de Corte (0 a 3)
- b) Detalhe nuclear (0 a 3)
- c) Detalhe Citoplasmático (0 a 3)
- d) Diferenciação coloração (0 a 3)

#### HQM e IHQ

- a) Preservação Tecidular (0 a 3)
- b) Marcação Específica (0 a 3)
- c) Intensidade (0 a 3)
- d) Contraste (0 a 3)
- e) Fundo (0 a 3)

# Metodologia (Cont.)

## Tratamento de Dados:

- Teste não paramétrico *Mann-Whitney* ( $\alpha=0,05$ ), software SPSS versão 17
- **Score** H&E =  $a + (2xb) + c + d$   (0 a 15)
- **Score** IHQ/HQM =  $a + (2xb) + (2xc) + d + e$   (0 a 21)

$$\text{Score Final} = \text{Score H\&E} + \text{Score HQM} + \text{Score IHQ}$$

# Resultados

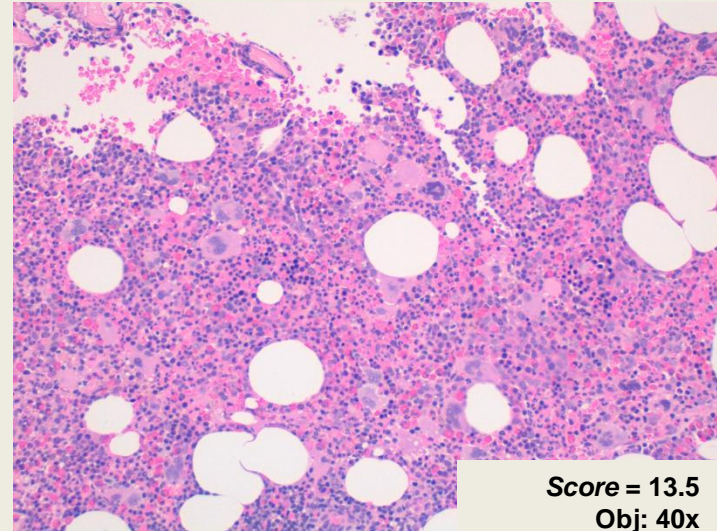
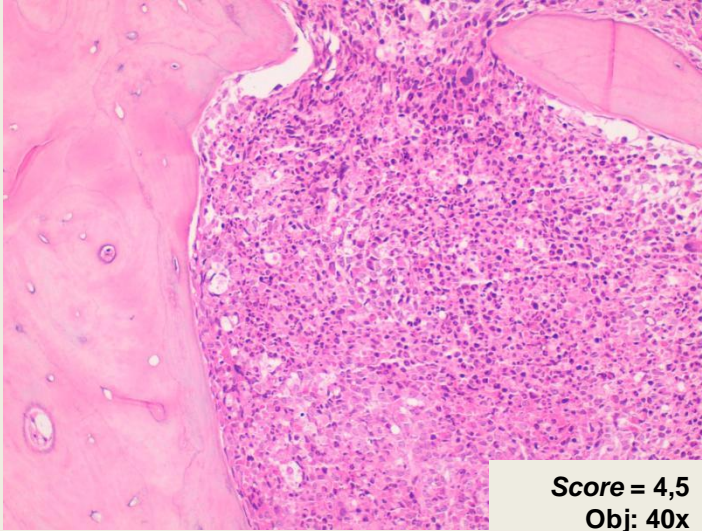
	Score mediando Formol/RDO	Score mediano Hammersmith	
H & E	9.4	12.9	$p = 0,000$
Gordon & Sweet	16.7	18.1	$p = 0,000$
CD3	15.9	16.2	$p = 0,41$
CD20	16.2	17.5	$p = 0,004$
CD34	16.2	17.2	$p = 0,084$
CD61	13.7	16.0	$p = 0,009$
Glicoforina-A	17.0	19.0	$p = 0,000$
Mieloperoxidase	15.2	17.2	$p = 0,000$
TdT	15.2	17.8	$p = 0,000$

Existem **diferenças estatisticamente significativas** em todas as colorações/marcações excepto o CD3 e CD34

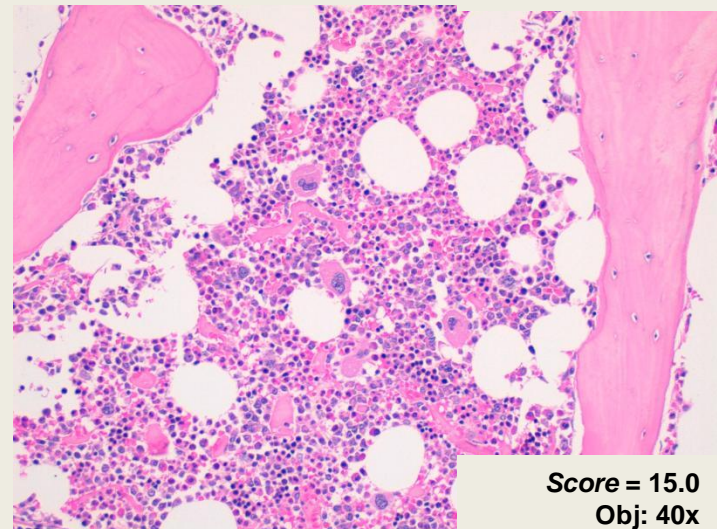
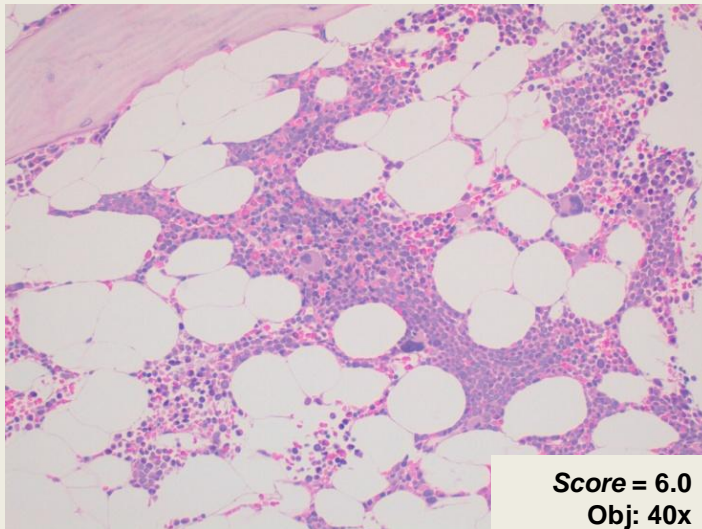
# Resultados (Cont.)

## Hematoxilina & Eosina

Formol/RDO



Hammersmith

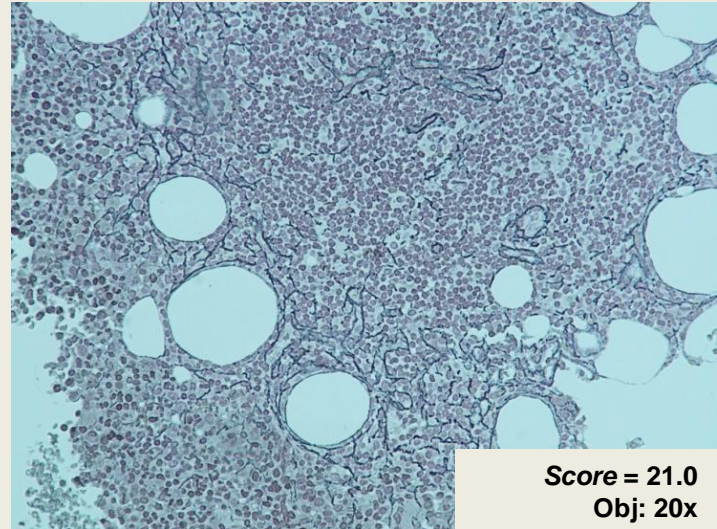
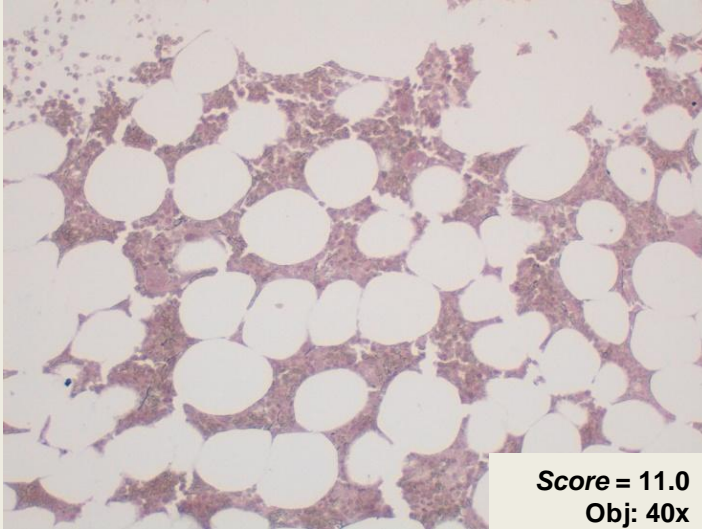




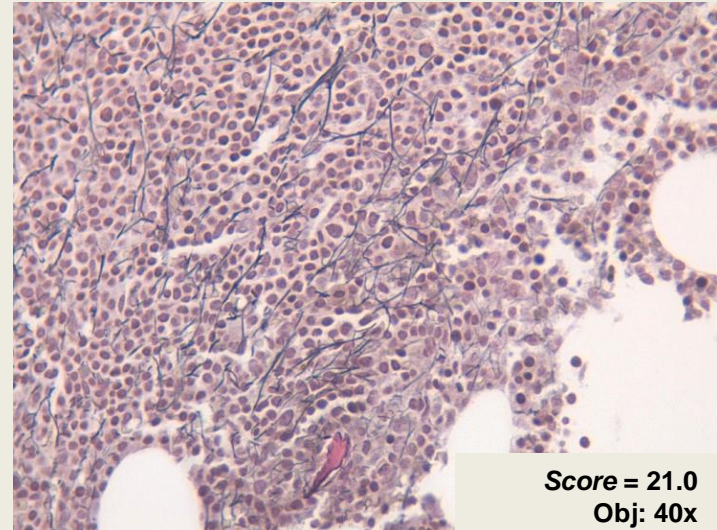
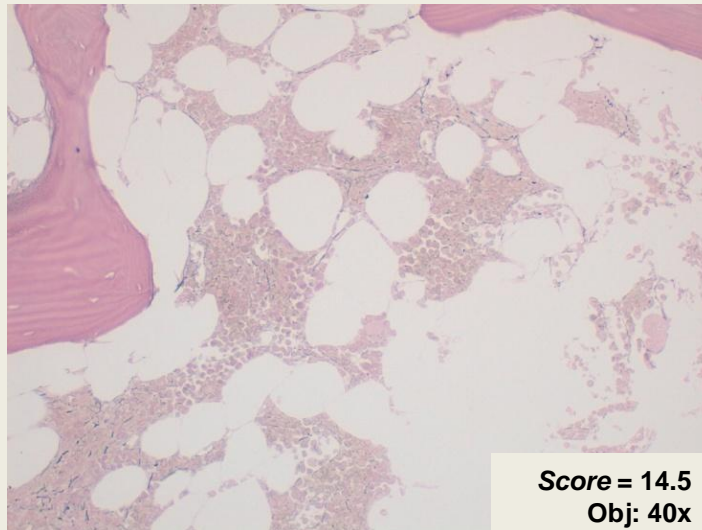
# Resultados (Cont.)

## Gordon & Sweet

Formol/RDO



Hammersmith

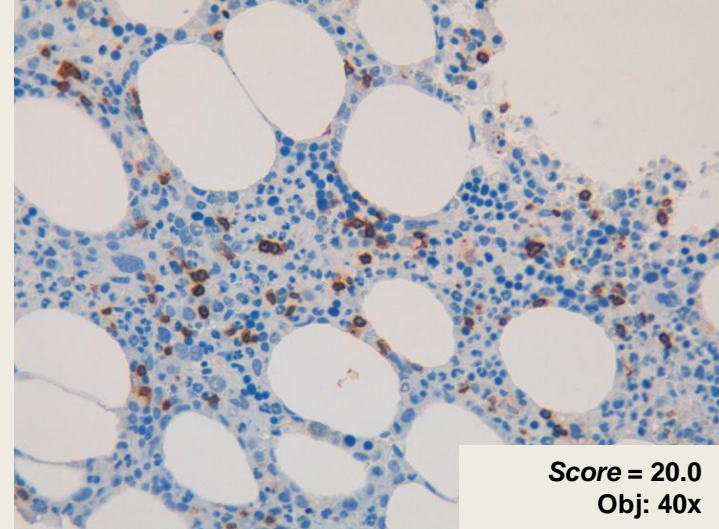
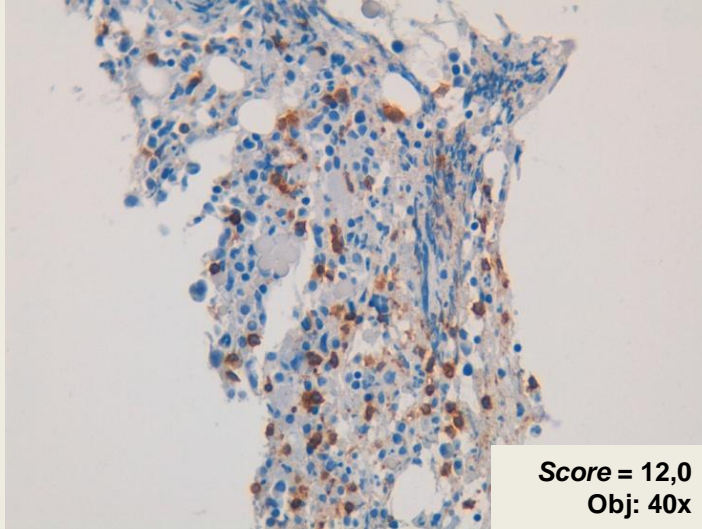




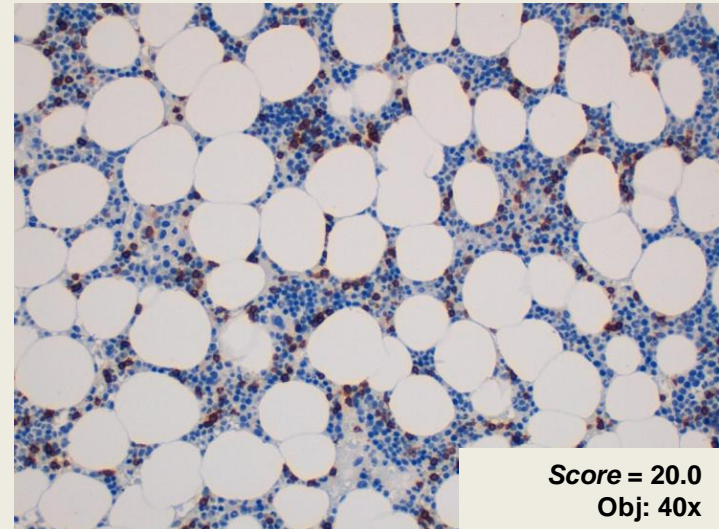
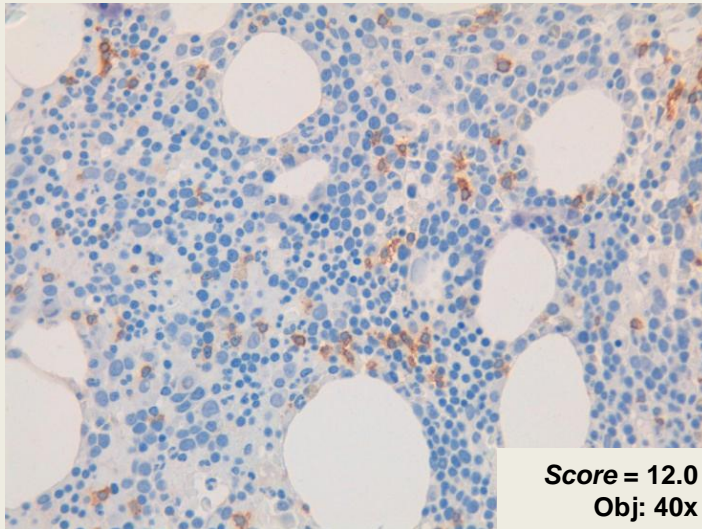
# Resultados (Cont.)

## CD3

Formol/RDO



Hammersmith

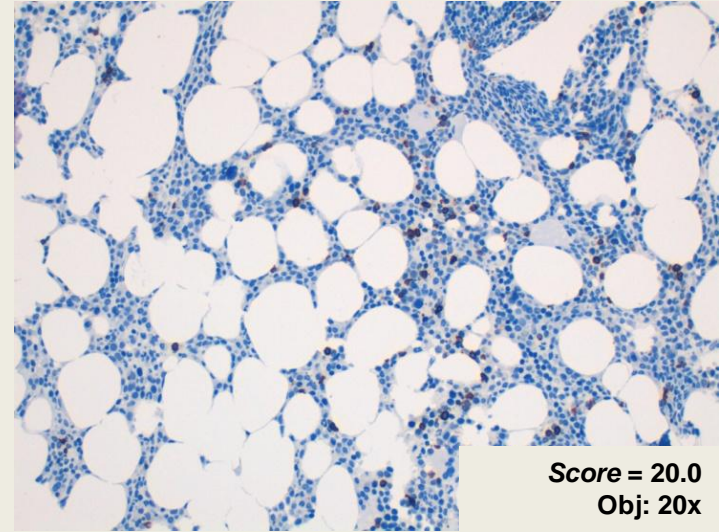
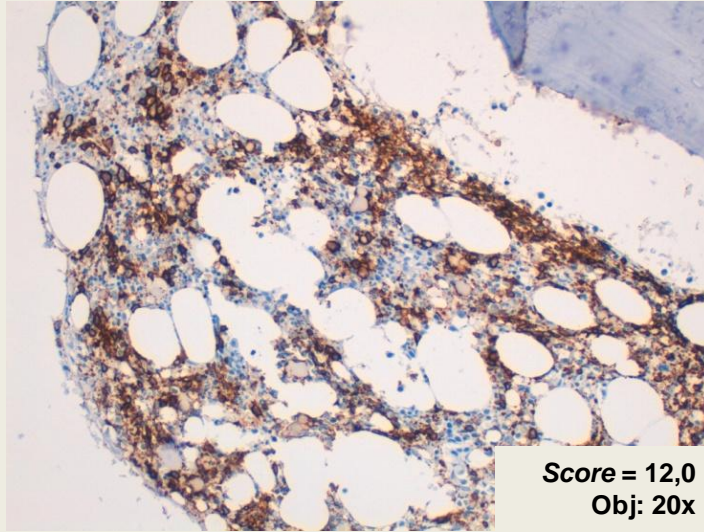




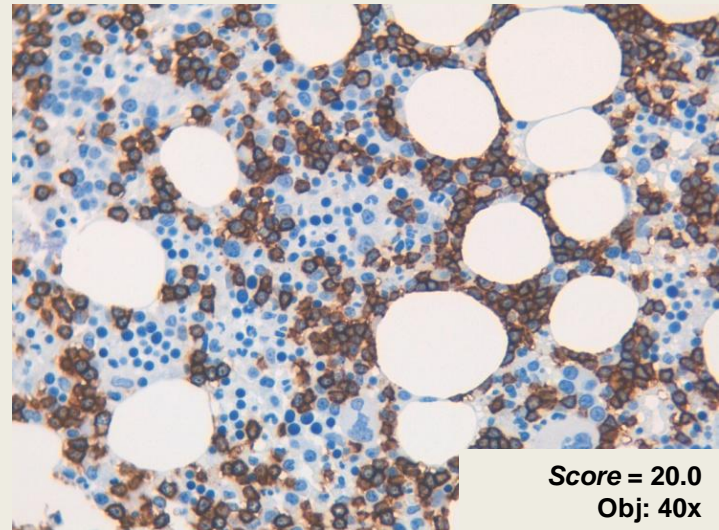
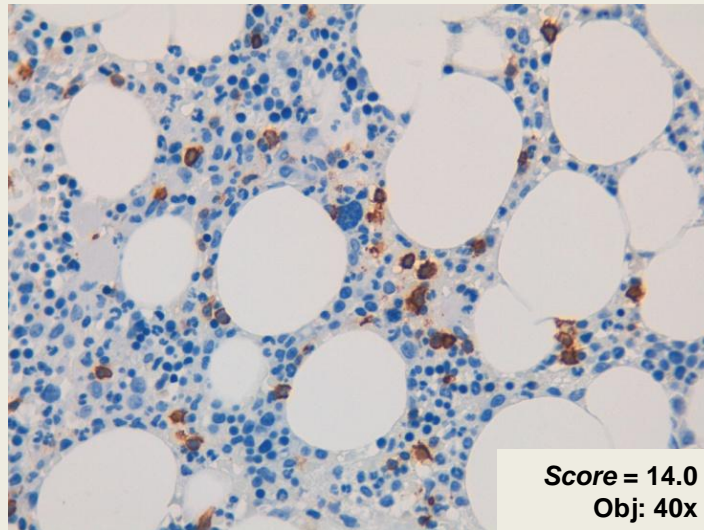
# Resultados (Cont.)

## CD20

Formol/RDO



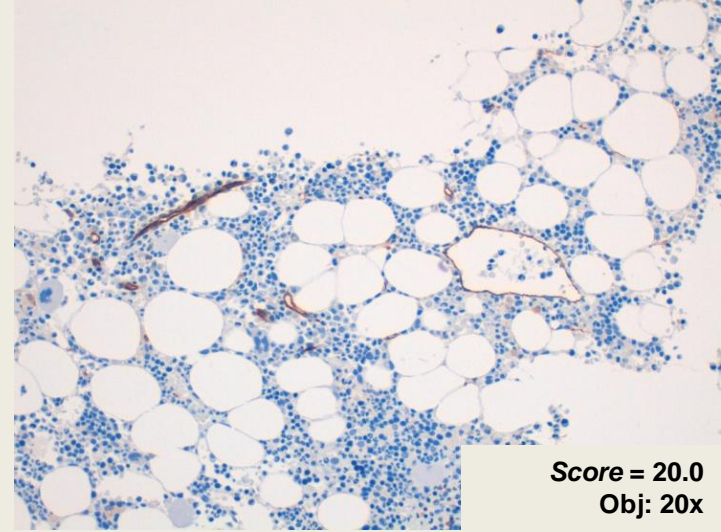
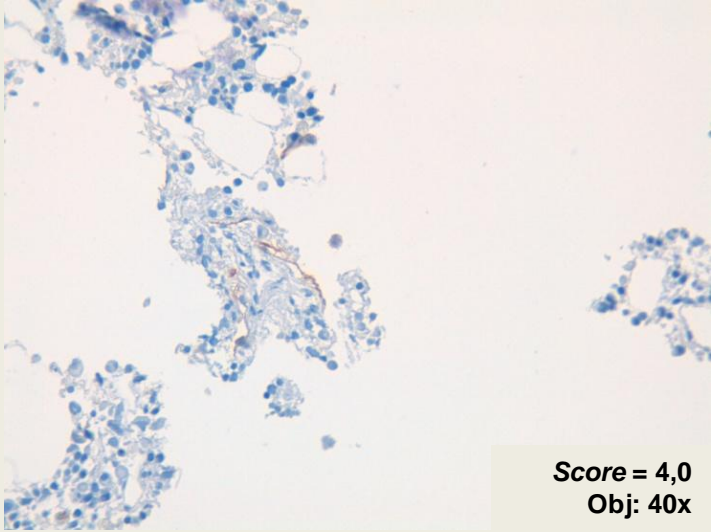
Hammersmith



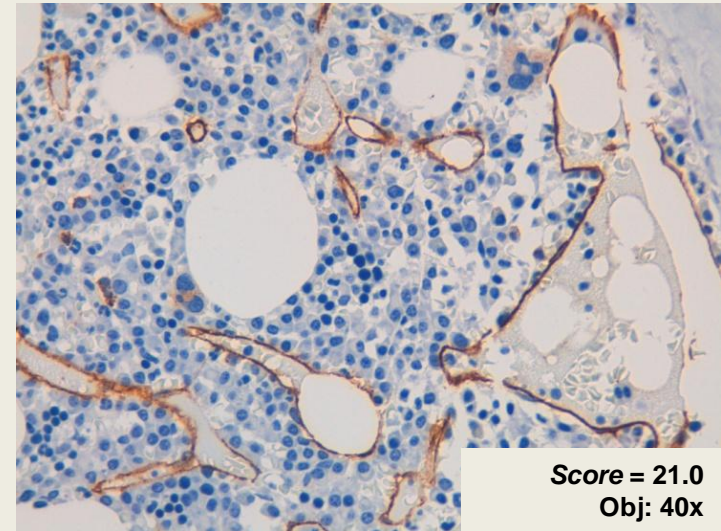
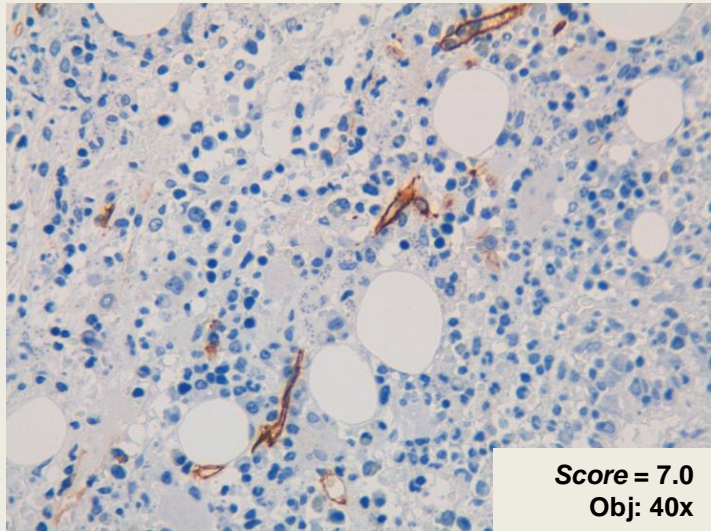
# Resultados (Cont.)

## CD34

Formol/RDO



Hammersmith

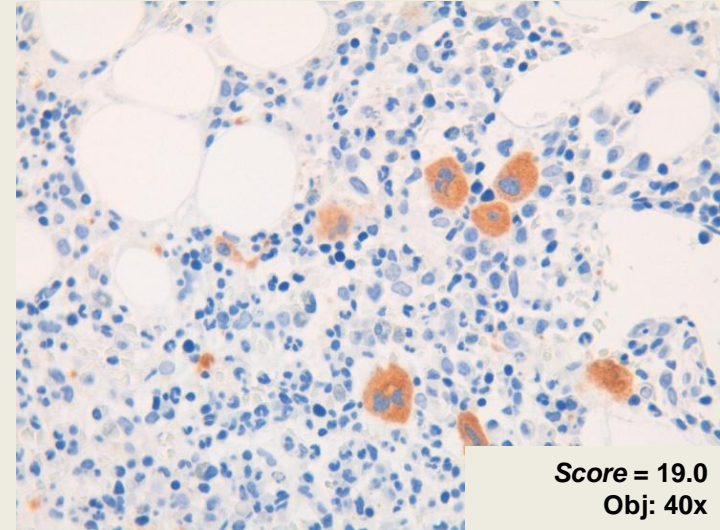
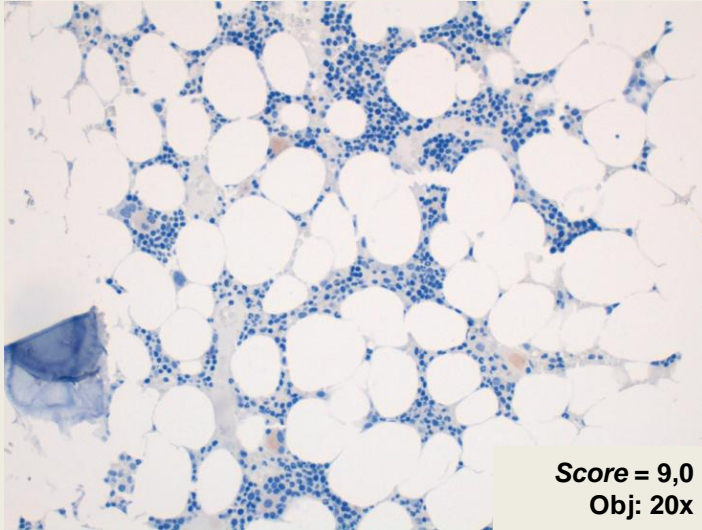




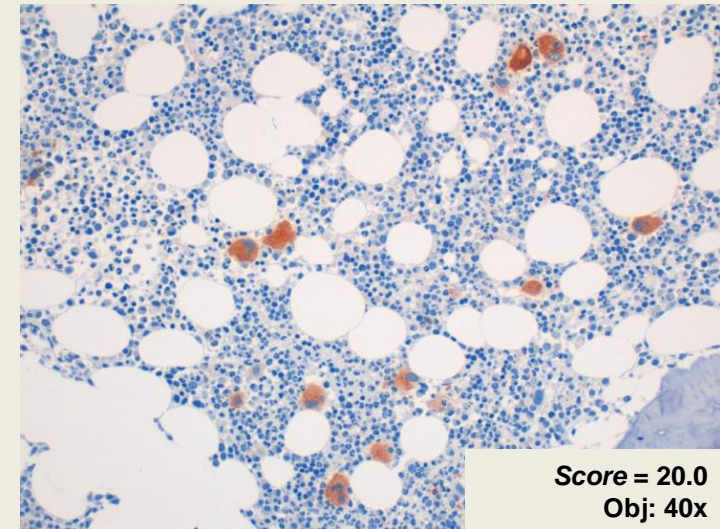
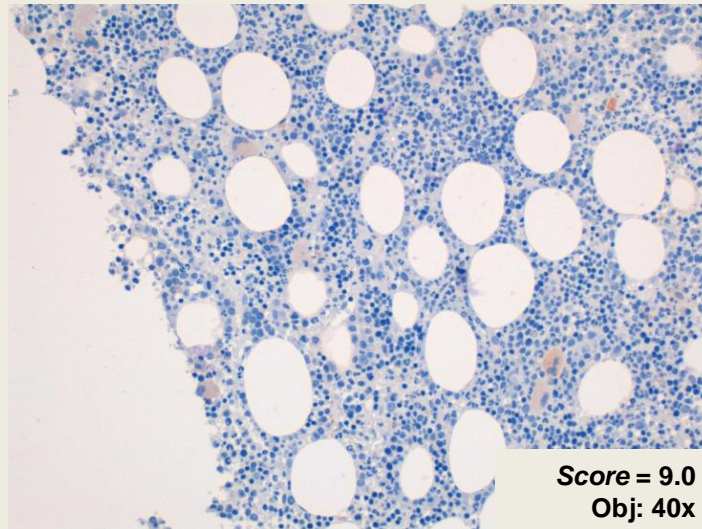
# Resultados (Cont.)

## CD61

Formol/RDO



Hammersmith

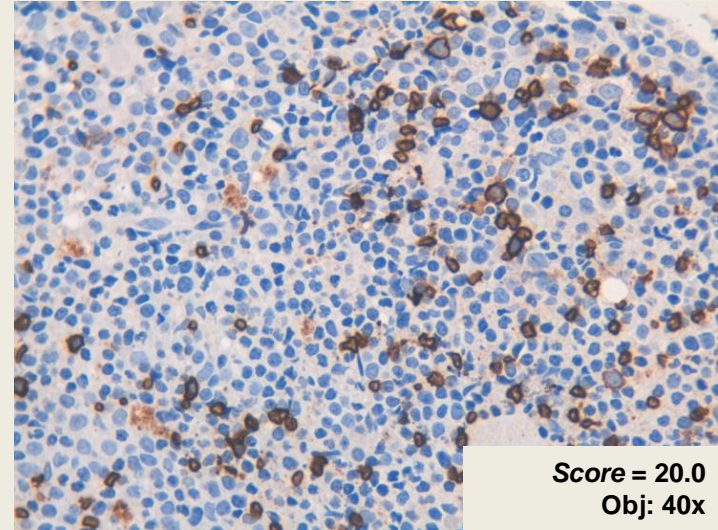
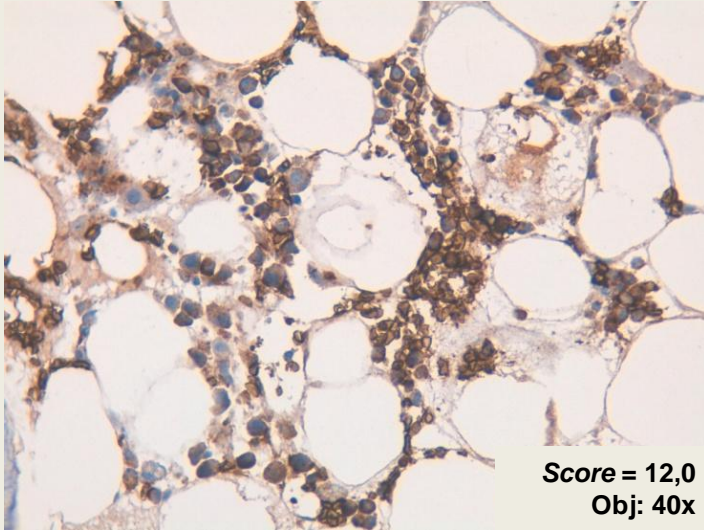




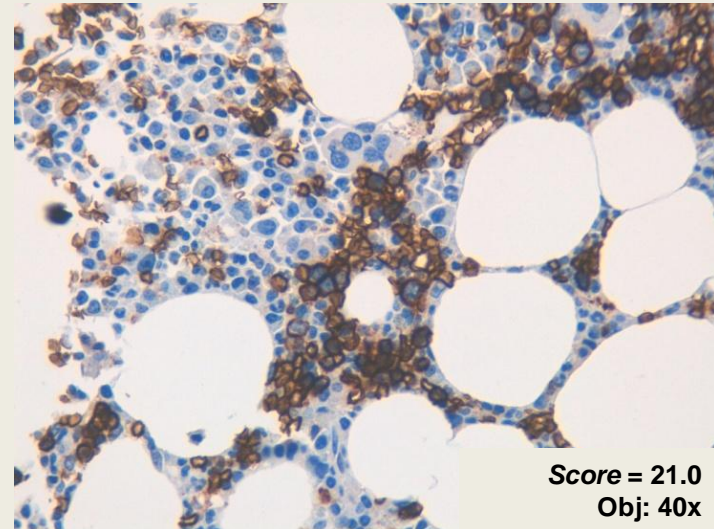
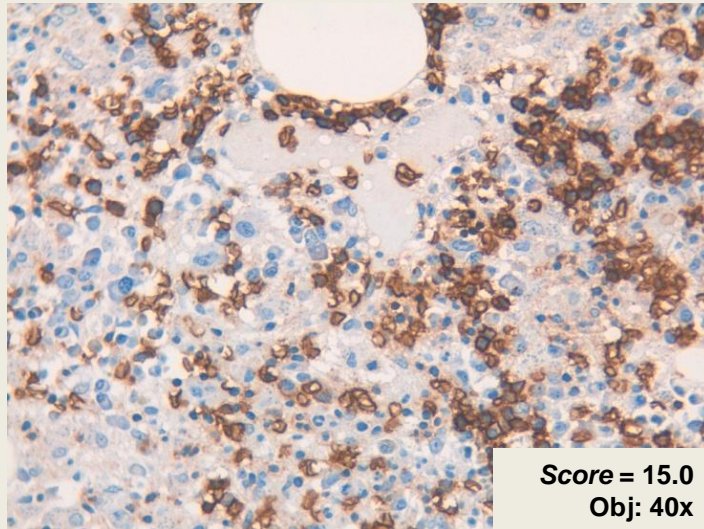
# Resultados (Cont.)

## Glicoforina - A

Formol/RDO



Hammersmith

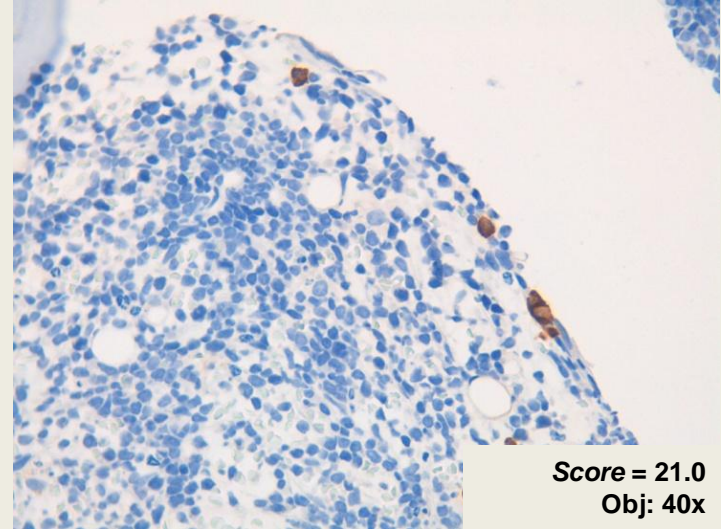
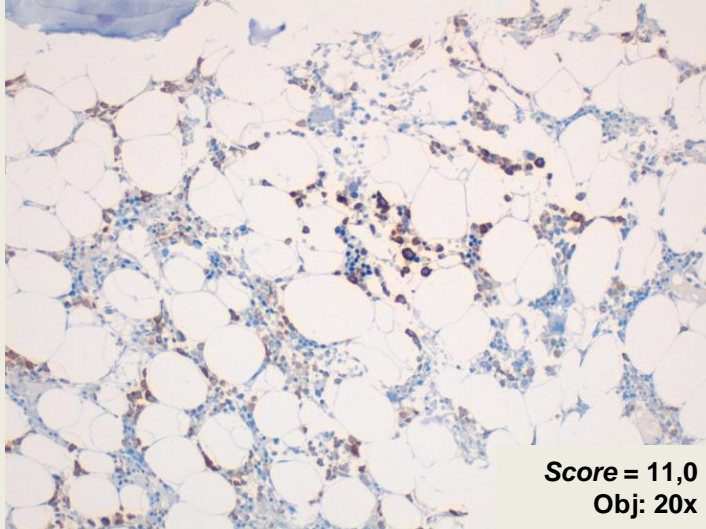




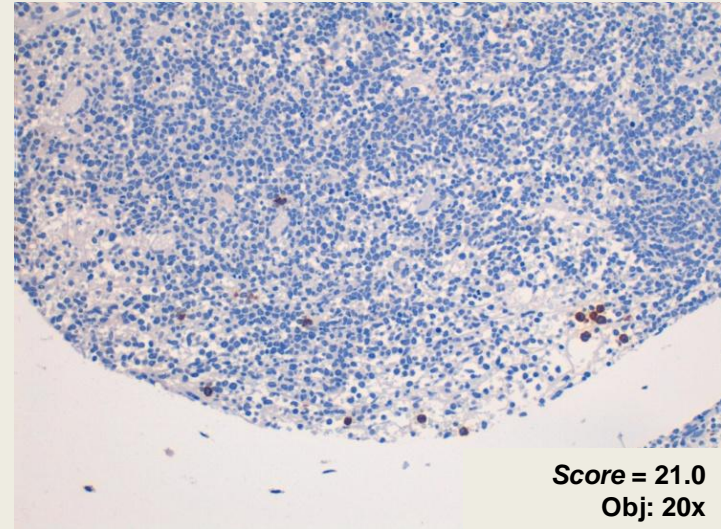
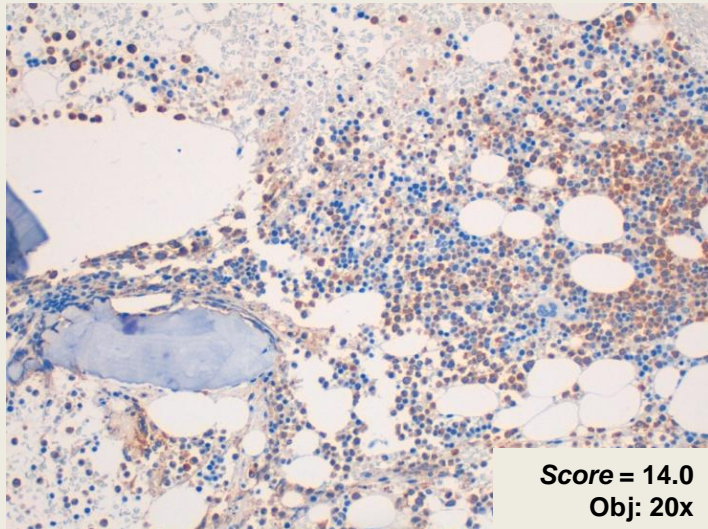
# Resultados (Cont.)

## Mieloperoxidase

Formol/RDO



Hammersmith

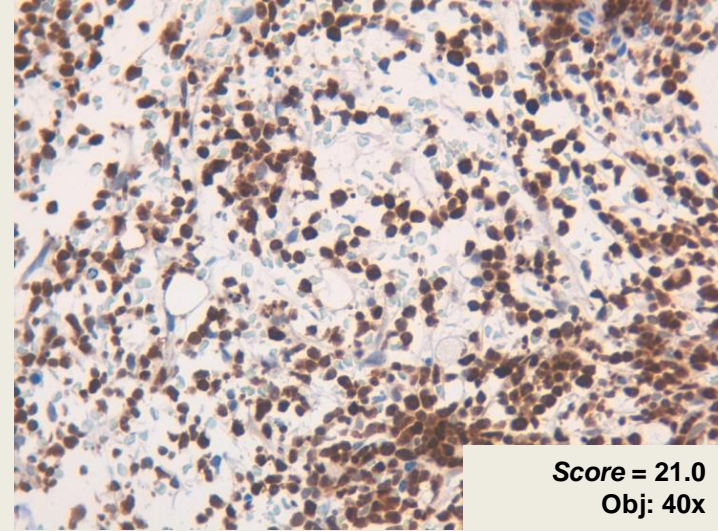
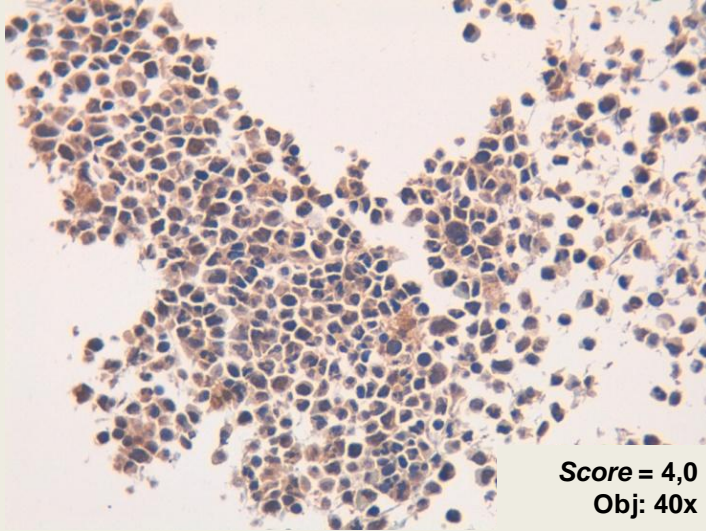




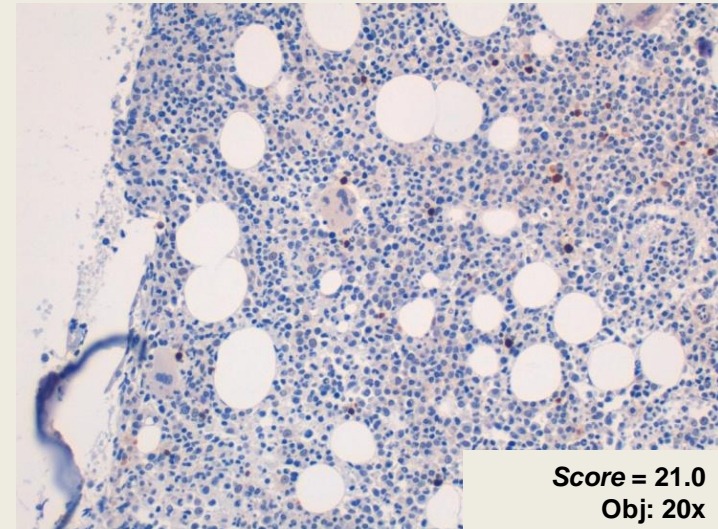
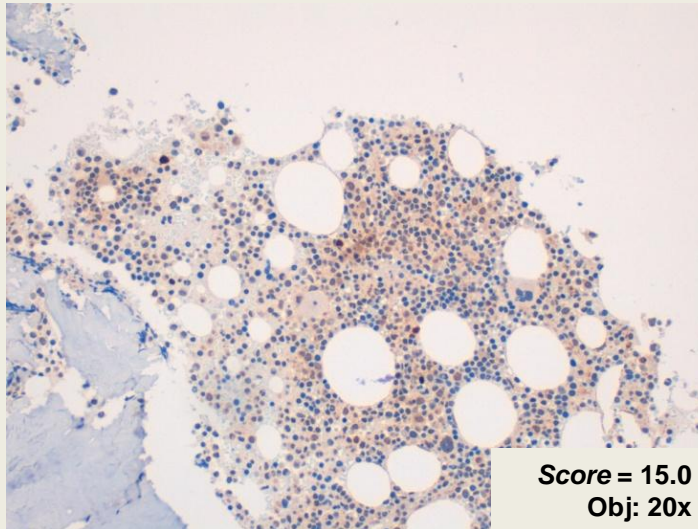
# Resultados (Cont.)

## TdT

Formol/RDO



Hammersmith



# Discussão/Conclusão

- O *Hammersmith* obteve **melhores scores medianos** em todas as colorações e imunomarcações
- Existem **diferenças estatisticamente significativas** em todas as colorações e imunomarcações, excepto o CD3 e CD34



Variáveis estranhas?

Obtiveram-se melhores resultados com o protocolo *Hammersmith* do que com o protocolo Formol/RDO, tanto na preservação tecidular como na minimização de artefactos.

# Discussão/Conclusão (Cont.)

O *Hammersmith* poderá ser uma **boa alternativa** aos protocolos habituais para BO



## Sugestão para Estudos futuros :

- Estudar amostras do mesmo paciente para cada protocolo, mantendo as mesmas condições de processamento, inclusão e corte;
- Avaliar a dificuldade de corte.



# Referências Bibliográficas

- Azevedo, M. (2004). *Teses, Relatórios e Trabalhos Escolares* (4ª ed.). Lisboa: Universidade Católica Editora
- Bain, B.J. e Clark, D.M. (2010). *Bone Marrow Pathology* (4ª ed.). Oxford: Wiley Blackwell
- Carson, F.L. (1997). *Histotechnology: A self-instructional text* (2ª ed.). Chicago: ASCP
- Fortin, M. F. (2009). *O Processo de Investigação: da Concepção à Realização* (2ª ed.). Loures: Lusociência
- Moral, R.G. (1993). *Laboratorio de Anatomia Patológica* (1ª ed.). Madrid: McGraw-Hill
- Naresh, K. N. et al (2006). Optimal processing of bone marrow trephine biopsy: the Hammersmith Protocol. *J.Clin. Pathol.* 2006;59;903-911. Recuperado em 2009, Dezembro 16, de <http://jcp.bmj.com/content/59/9/903.full>

# Agradecimentos



A todo o Serviço de Anatomia Patológica do Hospital Dr. Prof. Fernando Fonseca pelo apoio e colaboração

...Pela Liberdade de Participação...