

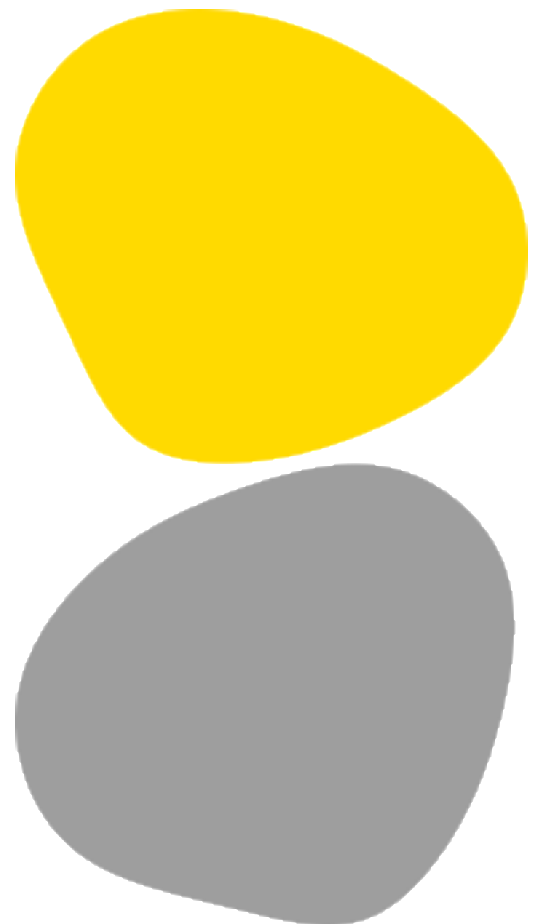


M MESTRADO
TÉCNICAS LABORATORIAIS EM BIOPATOLOGIA

Otimização de Técnicas para o Exame Macroscópico de Encéfalos Fetais e Perinatais Humanos

Mariana Duarte Ribeiro

09/2025



ESCOLA
SUPERIOR
DE SAÚDEUNIDADE LOCAL DE SAÚDE
SANTA MARIA

Otimização de Técnicas para Exame Macroscópico de Encéfalos Fetais e Perinatais Humanos

Autor

Mariana Duarte Ribeiro

Orientadores

Professora Doutora Regina Augusta Alves Pereira da Silva

Escola Superior de Saúde do Instituto Politécnico do Porto

Mestre Raquel Maria Pereira Ortins Pina

Serviço de Anatomia Patológica da Unidade Local de Saúde de Coimbra,

Hospital Universitário de Coimbra

Relatório de Estágio apresentado para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Técnicas Laboratoriais em Biopatologia – Ramo de Histopatologia pela Escola Superior de Saúde do Instituto Politécnico do Porto.



Agradecimentos

À minha orientadora, Professora Doutora Regina Silva, pela confiança depositada em mim e pela liberdade concedida para que seguisse o meu próprio caminho. Agradeço o privilégio que é poder contar com todo o seu vasto conhecimento.

À minha orientadora, Dr.^a Raquel Pina, pela sua disponibilidade, compreensão e generosidade na partilha de conhecimento. Agradeço-lhe por tudo o que me ensinou (e continua a ensinar) e, acima de tudo, pelo seu entusiasmo e dedicação, que me contagiaram e me fizeram apaixonar pela Patologia Fetoplacentar.

À professora Susana Silva pelas incríveis aulas de Macroscopia e pela partilha generosa de contributos que foram muito relevantes na concretização deste trabalho.

À professora Janete Borges pelo apoio e orientação na análise estatística dos dados.

À Dr.^a Joana Tavares, patologista responsável pela Patologia Fetoplacentar na Unidade Local de Saúde de Santa Maria, pelo incentivo, por acreditar em mim e me dar a oportunidade de experimentar técnicas novas. Sem ela, este trabalho não teria sido possível.

À Catarina Cerdeira, técnica de Anatomia Patológica responsável pela unidade de Embriofetopatologia da Unidade Local de Saúde de Coimbra, por ser amiga, mentora, uma referência na área e por me fazer ambicionar atingir, um dia, o mesmo nível de profissionalismo e proficiência.

Ao Dr. Tiago Oliveira, patologista na Unidade Local de Saúde de Santa Maria, agradeço por todos os ensinamentos, pela partilha de literatura científica (nomeadamente do artigo que me inspirou a executar este trabalho) e pelo espírito crítico que me trouxe foco e me ajudou a responder às perguntas certas.

À Dr.^a Mafalda Pinho, ao Dr. João Gama e ao Dr. Miguel Cristóvão, internos da especialidade em Anatomia Patológica, por toda a ajuda, constante disponibilidade, interesse e comprometimento.

À técnica Liliana (e à amiga Lili), por ser uma profissional de mão cheia. Os seus braços valem ouro, seja no trabalho ou a dar abraços. À Ana, Joana, Juliana e Teresa, por serem “As Meninas Novas” que vão revolucionar os Serviços de Anatomia Patológica. Agradeço-vos pelo “Chá”, pela alegria e o entusiasmo que partilharam comigo, mas também por acreditarem, celebrarem as minhas conquistas e ajudarem a desmistificar as minhas frustrações, sempre com carinho e compreensão.



À Bárbara, que está presente em todos os meus dias. Um Forte agradecimento.

Ao Joãozinho, pelo apoio incondicional, pela paciência e por dizer sempre que “Sim”, mesmo eu merecendo um “Não”. Não poderia pedir melhor camarada.

À Cristiana, a quem tenho muito a agradecer pelas longas conversas, áudios e preocupação, assim como por todo incentivo e empatia.

À Leonor, por me fazer acreditar que é possível ser (e fazer) mais.

Aos “Joões”, por serem os amigos de todas as horas, tanto nas boas quanto nas menos boas.

À minha querida Inês, por dar uso aos dons que Deus lhe deu para ajudar o próximo. A sua presença deixa purpurinas por onde passa, daquelas que ficam para sempre. Eu não fui exceção.

Às minhas colegas desta jornada, por cada desafio compartilhado e cada conquista.

À minha família, aos meus pais e irmã, pelo amor, esforço e apoio incondicionais, que me ajudaram a não desistir. Nenhuma palavra seria suficiente para agradecer a educação, os valores, a determinação, o sentido de responsabilidade e empenho que me transmitiram. Obrigada, por tudo, sempre.

Aos meus amigos e restante família, por toda a motivação, companheirismo e pela compreensão nos momentos de ausência.

A todas as instituições que, tão generosamente, me abriram as portas. Pelos exemplos de profissionalismo e conhecimento partilhado, agradeço aos Serviços de Anatomia Patológica das Unidade Local de Saúde de Santa Maria e de Coimbra, cujas salas de Autópsia se tornaram casa.

Por fim, a todos os que contribuíram para a minha formação como pessoa e como Técnica de Anatomia Patológica, Citológica e Tanatológica, seguramente muitos mais mereceriam ser mencionados.



Resumo

A preservação de encéfalos fetais e perinatais humanos, órgãos particularmente frágeis e suscetíveis à autólise e maceração, é essencial para o exame anatomopatológico, não existindo consenso quanto à melhor técnica.

Este estudo pretendeu avaliar três técnicas de preservação de encéfalos fetais/perinatais humanos e selecionar a mais adequada para implementar no diagnóstico.

Foram estudados 18 encéfalos (fetos/recém-nascidos com diferentes idades gestacionais/1 dia de vida) através das técnicas: fixação em formol-acético (6), fixação em formol neutro tamponado a 10% (6) e fixação em formol-acético e posterior inclusão em ágar (6). A avaliação foi efetuada nas etapas do exame macroscópico, microtomia e análise microscópica das preparações histológicas coradas pela hematoxilina-eosina, usando escalas para categorização dos parâmetros selecionados.

A técnica fixação em formol-acético e inclusão em ágar foi a que obteve as melhores pontuações em todas as etapas em estudo, destacando-se a do exame macroscópico por facilitar a realização de secções, manipulação das fatias e colheita de fragmentos.

A técnica fixação em formol-acético e inclusão em ágar foi implementada no Serviço de Anatomia Patológica da Unidade Local de Saúde Santa Maria, tendo sido usada, até à data, na preservação de 80 encéfalos fetais e perinatais humanos, mostrando reprodutibilidade e utilidade diagnóstica em neuropatologia.

Palavras-chave: ágar; autópsia; sistema nervoso central; malformações congénitas; feto



Abstract

The preservation of human fetal and perinatal brains, organs that are particularly fragile and prone to autolysis and maceration, is essential for anatomopathological examination. However, no consensus has been reached regarding the best technique.

This study aimed to evaluate three preservation techniques for human fetal/perinatal brains and to select the most appropriate one for diagnostic purposes.

Eighteen brains (fetuses/newborns with different gestational ages/1 day of life) were examined using the following techniques: acetic formalin fixation (6), 10% neutral buffered formalin fixation (6), and pre-embedding in agar following fixation in acetic formalin (6). The evaluation was performed during the stages of macroscopic examination, microtomy, and microscopic analysis of histological preparations stained with hematoxylin-eosin, using scoring scales to categorize the selected parameters.

Pre-embedding in agar following fixation in acetic formalin obtained the highest scores in all stages of the study, particularly in the macroscopic examination, as it facilitated the sectioning, slice manipulation and sampling.

Pre-embedding in agar following fixation in acetic formalin was subsequently implemented in the Pathology Department of the Unidade Local de Saúde Santa Maria and has been applied in the preservation of 80 human fetal and perinatal brains to date, demonstrating reproducibility and diagnostic utility in neuropathology.

Keywords: agar; autopsy; central nervous system; congenital malformations; fetus



Índice de Abreviaturas e Acrónimos

ADN Ácido Desoxirribonucleico

APCT Anatomia Patológica, Citológica e Tanatológica

ARN Ácido Ribonucleico

FA Formol-acético

FNT Formol Neutro Tamponado

HE Hematoxilina-Eosina

IG Idade Gestacional

IMG Interrupção Médica da gravidez

SNC Sistema Nervoso Central

TFA Fixação em formol-acético

TFAA Fixação em formol-acético e posterior inclusão em ágar

TFNT Secção a fresco, colheita de fragmentos e, posterior, fixação em formol neutro tamponado a 10%

TSDTs Técnicos Superiores de Diagnóstico e Terapêutica



Índice

1. Introdução.....	1
2. Objetivos	9
3. Material e métodos.....	10
3.1. Amostra.....	10
3.2. Remoção do encéfalo fetal/perinatal humano.....	11
3.3. Preservação do encéfalo para exame macroscópico.....	12
3.4. Exame macroscópico do encéfalo	12
3.5. Inclusão do encéfalo em ágar	13
3.6. Colheita de fragmentos do encéfalo.....	15
3.7. Obtenção de preparações histológicas	15
3.8. Avaliação das técnicas de preservação dos encéfalos fetais e perinatais humanos	16
3.9. Análise estatística.....	20
4. Resultados.....	21
4.1. Caracterização das amostras.....	21
4.2. Avaliação das técnicas de preservação dos encéfalos fetais e perinatais humanos..	24
4.2.1. Avaliação no exame macroscópico.....	24
4.2.2. Avaliação na microtomia.....	28
4.2.3. Avaliação na análise microscópica das preparações histológicas coradas pela hematoxilina-eosina	29
4.2.4. Avaliação global das técnicas de preservação em estudo.....	36
5. Discussão.....	38
5.1. Limitações do estudo e perspetivas futuras.....	44
6. Conclusão.....	46
Referências Bibliográficas.....	48



Índice de Tabelas

Tabela 1. Parâmetros utilizados para avaliação das técnicas de preservação dos encéfalos fetais/perinatais humanos na etapa do exame macroscópico.....	17
Tabela 2. Parâmetros utilizados para avaliação das técnicas de preservação dos encéfalos fetais/perinatais humanos na etapa da microtomia.....	18
Tabela 3. Parâmetros utilizados para avaliação das técnicas de preservação dos encéfalos fetais/perinatais humanos na etapa de avaliação microscópica das preparações histológicas coradas pela hematoxilina-eosina.....	18
Tabela 4. Número de amostras e idade gestacional dos casos utilizados no estudo de cada técnica de preservação dos encéfalos fetais/perinatais humanos.....	21
Tabela 5. Número de amostras e idade gestacional dos casos utilizados no presente estudo, segundo o desfecho obstétrico/perinatal.....	22
Tabela 6. Avaliação da etapa do exame macroscópico, segundo a técnica de preservação de encéfalos fetais/perinatais humanos em estudo.....	26
Tabela 7. Avaliação da etapa da microtomia, segundo a técnica de preservação de encéfalos fetais/perinatais em estudo.....	29
Tabela 8. Avaliação da etapa da análise microscópica das preparações histológicas coradas pela hematoxilina-eosina.....	35
Tabela 9. Avaliação global das técnicas de preservação de encéfalos fetais/perinatais humanos em estudo.....	37



Índice de Figuras

Figura 1. Técnica de remoção do encéfalo de um feto de 26 semanas de idade gestacional por interrupção médica da gestação.....	11
Figura 2. Remoção do tronco cerebral e cerebelo.....	12
Figura 3. Encéfalo de um feto de 21 semanas e 6 dias de idade gestacional por interrupção médica da gestação.....	13
Figura 4. Ilustração da técnica de inclusão em ágar após a fixação em formol-acético.....	14
Figura 5. Esquematização do protocolo de colheita de fragmentos em encéfalos fetais/perinatais humanos.....	15
Figura 6. Esquematização das fases para obtenção de preparações histológicas.....	16
Figura 7. Distribuição dos casos pelo desfecho obstétrico/perinatal, segundo as técnicas de preservação em estudo.....	22
Figura 8. Grau de maceração dos encéfalos preservados pelas técnicas em estudo.....	23
Figura 9. Grau de maceração dos encéfalos preservados pelas técnicas de preservação em estudo, segundo o desfecho obstétrico/perinatal.....	24
Figura 10. Comparação da facilidade de secção, identificação de estruturas cerebrais em superfície de secção e manipulação de fatias no exame macroscópico, segundo as técnicas de preservação em estudo.....	26
Figura 11. Preservação dos encéfalos de acordo com as técnicas de preservação em estudo.....	27
Figura 12. Comparação da facilidade e da qualidade de corte em microtomia entre as técnicas de preservação em estudo.....	28
Figura 13. Avaliação da qualidade do corte histológico em função da técnica de preservação, tendo em conta a frequência de artefactos da microtomia e do processamento.....	30
Figura 14. Avaliação da coloração geral em função da técnica de preservação.....	31
Figura 15. Avaliação da qualidade do corante hematoxilina em função da técnica de preservação em estudo.....	31
Figura 16. Avaliação da qualidade do corante eosina em função da técnica de preservação.....	32



Figura 17. Avaliação da preservação da morfologia do tecido em função da técnica de preservação em estudo.....	33
Figura 18. Avaliação da preservação da morfologia do tecido em função da qualidade do corte histológico, considerando a frequência de artefactos da microtomia e do processamento.....	33
Figura 19. Avaliação do grau de maceração das amostras em função da preservação da morfologia do tecido.....	34
Figura 20. Preparações histológicas de amostras ligeiramente maceradas coradas pela coloração de hematoxilina-eosina.....	35



1. Introdução

As anomalias congénitas do Sistema Nervoso Central (SNC) constituem o quarto grupo mais frequente de malformações congénitas. Na Europa, a sua prevalência total é de aproximadamente 27,5 casos por 10.000 nascimentos, incluindo nados vivos, nados mortos e interrupções médicas da gestação (IMG), dos quais 14,9 por 10.000 correspondem a IMG. (1) Em Portugal, um estudo revelou que a prevalência de anomalias congénitas do SNC, no biénio 2018–19, foi de 18,1 casos por 10.000 nascimentos, com IMG em 72,1% dos casos (correspondendo a 13,1 casos por 10.000 nascimentos). (2) Estas variações com os dados europeus refletem diferenças nas políticas de saúde, acesso ao rastreio pré-natal e práticas legais relativas à interrupção da gravidez. (3) As anomalias congénitas do SNC têm um impacto significativo tanto na mortalidade, como na morbilidade. (4,5)

Devido à implementação do rastreio pré-natal e ao avanço tecnológico dos exames imagiológicos, o diagnóstico destas anomalias tem melhorado significativamente, contudo a caracterização definitiva é efetuada pelo exame anatomopatológico do encéfalo fetal/perinatal humano. (6–8) O exame anatomopatológico auxilia na determinação da causa da morte e confirma, complementa ou refuta o diagnóstico clínico, sendo como um controlo de qualidade, que audita a acuidade do diagnóstico pré-natal. (9,10) Adicionalmente, o exame anatomopatológico caracteriza as patologias e descreve achados não suspeitos clinicamente, podendo adicionar informação não disponibilizada por outros exames e que poderá ser muito pertinente para o diagnóstico, investigação e melhoria dos serviços. (11–13) Em casos de patologias com base genética, este tipo de exame permite ainda estimar o risco de recorrência, de forma a otimizar o aconselhamento parental e os cuidados pré-concepcionais. (14,15) Para além do exposto, o exame anatomopatológico pode disponibilizar evidências para a sustentação de análises epidemiológicas, promoção da investigação e orientação para a elaboração de diretrizes específicas no âmbito da neuropatologia, o que pode conduzir a alterações na prática clínica em neurologia e neurocirurgia. (13,16)

O estudo de encéfalos fetais e perinatais humanos deve ser efetuado em tecidos muito bem preservados de forma a poder-se obter informações pertinentes para o diagnóstico e a investigação. O encéfalo a fresco permite a realização de estudos *post mortem* específicos, como análises microbiológicas, testes enzimáticos e toxicológicos. (17)



Contudo, devido a fenómenos naturais de degradação, como a maceração e a autólise, é necessário proceder à fixação dos encéfalos fetais e perinatais, a fim de preservar a morfologia, as características tintoriais e os marcadores moleculares dos tecidos, para possibilitar a realização de estudos histológicos e de técnicas complementares. (17-19)

A maceração é um processo que ocorre no útero e que causa a degeneração do feto, através da sua exposição ao líquido amniótico à temperatura do corpo materno, o que leva ao amolecimento progressivo e eventual liquefação dos tecidos moles. Em casos de maceração avançada, o encéfalo encontra-se liquefeito, sendo comprimido através do forâmen magno durante o parto, extravasando para outras cavidades anatómicas, o que compromete as análises macro e microscópicas subsequentes. (20)

A autólise causada pela atividade das enzimas lisossomais/celulares libertadas no processo da morte celular, em particular, pode ser retardada através da refrigeração do feto a 4°C e, principalmente, pela fixação imediata do encéfalo, de forma a evitar a isquemia a frio. (18) A maceração, por ser um processo que se iniciou e ocorreu no útero, provoca danos irreversíveis, não existindo formas de recuperação dos tecidos. (20)

O parênquima cerebral fetal e perinatal apresenta um elevado teor de água (cerca de 92% no feto de 22 semanas e 90% no recém-nascido, face aos 77% característicos do adulto), uma mielinização incompleta e ausência de uma rede de reticulina significativa, fatores que reduzem a sua resistência mecânica. (21-27) Estas características do parênquima cerebral, aliadas à maior susceptibilidade a fenómenos hipóxico-isquémicos, tornam o encéfalo fetal/perinatal estruturalmente frágil e de consistência diminuída, em relação ao encéfalo de adulto ou até a outros órgãos fetais/perinatais. (23,28,29)

Os encéfalos fetais/perinatais humanos possuem ainda uma elevada atividade enzimática, resultado dos diversos processos de divisão celular que ocorrem em simultâneo, o que facilita uma autólise rápida após a morte. (30,31)

Etapas, consideradas uma tarefa desafiante no registo macroscópico, são a remoção do encéfalo do crânio, o exame macroscópico e a secção do encéfalo. A dificuldade destas tarefas aumenta nos fetos com idade gestacional reduzida, devido a encéfalos de pequenas dimensões e/ou com anomalias congénitas do SNC que deformam a morfologia cerebral. (20,32,33) Em adição, a friabilidade intrínseca do encéfalo fetal/perinatal pode levar à aderência das meninges e consequente rutura do parênquima cerebral durante a remoção do encéfalo. (34)



Um passo considerado desafiante é a manipulação do encéfalo, uma vez que o parênquima pode colapsar causando a sua fragmentação, comprometendo a orientação anatómica e dificultando uma amostragem dirigida. Um fator que pode tornar a remoção do encéfalo ainda mais complexa é o intervalo que decorre entre a morte e a realização da autópsia (intervalo *post mortem*) prolongado, por comprometer a integridade estrutural do encéfalo. (34-36)

Apesar destas limitações macroscópicas, as alterações microscópicas podem permanecer identificáveis mesmo em casos em avançado estado de maceração, incluindo encéfalos liquefeitos ou fragmentados, uma vez que a degradação ao nível microscópico pode progredir mais lentamente do que a perda da integridade estrutural e, desta forma, o detalhe histológico encontra-se frequentemente mais bem preservado do que o expectável. (37) Este desfasamento deve-se ao facto da maceração e autólise não afetarem de forma homogénea todas as estruturas, permitindo a preservação parcial da arquitectura celular e/ou tecidular assim como de outros achados patológicos relevantes. (34) Contudo, a amostragem deve ser realizada sempre, independentemente do grau de maceração, dado que pode fornecer informação diagnóstica importante, devendo ser incluídas as áreas menos afetadas. (23)

A avaliação dos encéfalos fetais/perinatais humanos deve ser sempre contextualizada com a idade gestacional (IG), o grau de maceração e o desfecho obstétrico/perinatal, uma vez que estes parâmetros podem influenciar a morfologia do encéfalo e afetar de forma direta a qualidade das amostras. (38-42) Embora estes parâmetros não constituam, isoladamente, critérios diagnósticos ou de avaliação, condicionam a interpretação dos achados macro e microscópicos. Neste sentido, em cada caso, é recomendada a descrição objetiva do grau de maceração e a sua integração com a idade gestacional e o desfecho obstétrico, pois essa contextualização é fundamental para reconhecer limitações técnicas e conferir maior robustez às conclusões. (43)

O aspeto macroscópico e o tamanho do encéfalo varia com a idade gestacional: na ausência de anomalias congénitas e em IGs mais precoces (1 e 2º trimestres), o encéfalo é menos desenvolvido, apresenta menor complexidade de giros/sulcos e é mais friável, visto que o tecido é rico em matriz extracelular e água, estando a mielina ausente. (21,22,44,45) Contrariamente, a consistência do encéfalo em IGs avançadas (3º trimestre) é maior devido a uma progressiva neurogênese, migração neuronal e o início da mielinização, aumentando



a densidade da matriz extracelular e, conseqüentemente, a consistência do encéfalo. (22,27,44-46) Nos recém-nascidos (primeiros 28 dias de vida), o encéfalo evidencia sinais de maturação com giros e sulcos bem definidos, diferenciação entre a substância branca e cinzenta e maior densidade do parênquima, sendo este mais firme. (47-50) No entanto, a mielinização permanece incompleta e a percentagem de água na sua composição continua a ser superior à encontrada no adulto. (21,44)

No que concerne à maceração dos encéfalos, as alterações macroscópicas podem ser observadas 6 a 8 horas após o óbito fetal. (51,52) No geral a maceração é classificada como ligeira (6 a 48 horas de retenção), moderada (2 a 7 dias de retenção) e avançada (> 8 dias de retenção). (51,52) Macroscopicamente, a maceração manifesta-se por descamação, descoloração, compressão e cavalgamento das suturas cranianas e amolecimento, o que leva à fragilidade tecidual e fragmentação dos órgãos. (51) Os achados encontrados a nível microscópico são desagregação celular, perda de definição citoplasmática e nuclear, colapso da matriz extracelular e diminuição da reactividade a corantes e a marcadores imuno-histoquímicos. (53) O encéfalo é um órgão particularmente afetado pela maceração, com perda de consistência e liquefação cortical. (54) A presença de maceração condiciona a interpretação dos achados, ou seja, quanto maior o grau de maceração, menor a viabilidade diagnóstica e maior a dificuldade em distinguir lesões e alterações patológicas das alterações *post mortem*. (55,41)

Em relação ao desfecho obstétrico/perinatal, nas mortes fetais e IMG, a interrupção do aporte de oxigénio e nutrientes, ativa rapidamente as enzimas que degradam as estruturas neuronais. (56,57) Adicionalmente, o facto dos fetos *in utero* estarem sujeitos ao contacto directo com o líquido amniótico e a uma temperatura constante também favorece a autólise. (43) No caso particular das IMGs, a expulsão do feto é planeada e ocorre num período temporal após indução com misoprostol intravaginal, podendo esta ser precedida de feticídio. (17) Apesar do intervalo entre a administração do fármaco e a expulsão/parto ser variável, encéfalos resultantes de IMG estão associados comumente a menores graus de maceração (ligeira a moderada). Contrariamente, nas mortes fetais, desconhece-se frequentemente o exato momento da morte, o que faz com que o feto possa permanecer no útero durante dias até que ocorra a sua expulsão. Assim, estes casos estão comumente associados a graus de maceração muito variáveis: desde maceração ausente a graus de maceração superiores (classificados como moderados a avançados). (42) Quando a morte



é neonatal a circulação fetal e as trocas gasosas placentárias mantêm-se *in utero* até ao nascimento. (34,58) Após o parto, a homeostasia é assegurada através da respiração pulmonar, da circulação neonatal e do metabolismo ativo, não ocorrendo autólise. (59,60) Quando a respiração pulmonar e circulação cessam, inicia-se o processo de autólise, cujo ritmo e alterações dependem de múltiplos fatores como o intervalo *post mortem*, a temperatura, a humidade e as condições de conservação. (61-63)

A interação entre a IG, o grau de maceração, o desfecho obstétrico/perinatal e a fragilidade do parênquima cerebral fetal e perinatal é complexa e multifatorial, permanecendo objeto de investigação. (23,64) Deste modo, foram descritas várias abordagens para efetuar a remoção e o exame macroscópico dos encéfalos fetais/perinatais humanos, assim como diversas técnicas para preservação dos encéfalos como a fixação *in situ*, a perfusão e a imersão (a mais comum), utilizando diferentes fixadores. (65-70) A maioria dos protocolos para neuropatologia fetal/perinatal baseia-se em formol neutro tamponado (FNT) a 10%. A adição de reagentes como mercúrio, etanol, ácido acético glacial, zinco ou outros reagentes à solução fixadora, confere propriedades específicas às soluções, como por exemplo maior rigidez, melhor preservação morfológica ou antigénica. (70,71) Não obstante, apesar destas soluções fixadoras conferirem benefícios à fixação, nomeadamente, tornar o tecido mais firme, facilitando as etapas subsequentes como o exame macroscópico e a secção, algumas acarretam limitações como: a desidratação (agentes desnaturantes, como o etanol) que conduz à retração do tecido, tornando-o quebradiço e dificultando a microtomia; a degradação do ADN (por exemplo, os fixadores ácidos); e o aumento do volume do tecido. (72-74)

Na rotina histopatológica, o FNT a 10% é, atualmente, considerado o fixador de referência. (75) Este fixador consiste numa solução de formalina diluída em tampão fosfato, com pH final ajustado entre 7,0 e 7,4. (76) A sua ação fixadora baseia-se na formação de ligações metilénicas entre os grupos amino das cadeias laterais dos aminoácidos das proteínas, podendo ocorrer dentro da mesma proteína ou entre proteínas, formando uma rede que, macroscopicamente, se reflete sob a forma de gelificação, o que confere alguma consistência ao tecido. Este processo estabiliza e previne a difusão de proteínas solúveis intercelulares, ficando estas ligadas ao citoesqueleto da célula. Desta forma, a fixação com este fixador aditivo mantém as estruturas proteicas e os ácidos nucleicos, preservando a morfologia tridimensional dos tecidos. (72) Por esta razão, o formaldeído é caracterizado



como um fixador aditivo, conservando a arquitetura celular e tecidual próxima do estado nativo *in vivo*. (72) Todavia, apesar dos benefícios que a fixação convencional com FNT a 10% proporciona às amostras, devido às características inerentes a este tipo de tecido, à maceração e a determinadas anomalias do SNC e infeções congénitas, o encéfalo fetal/perinatal humano permanece, muitas vezes, com uma consistência friável. (23,77-79) De referir que a penetração do FNT a 10% no tecido cerebral fetal/perinatal é reduzida, facto que atrasa o processo de fixação no interior do órgão, o que dificulta o seu exame macroscópico e a realização de secções de espessura uniforme, sem que ocorra a sua fragmentação. (80)

Pelo exposto, na prática laboratorial em Embriofetopatologia, utiliza-se como fixador de encéfalos o formol-acético (FA), constituído por uma mistura de formol neutro tamponado a 10% e ácido acético glacial, geralmente numa proporção de 90:10 % volume/volume, respetivamente. (71) Esta solução fixadora tem um pH baixo, entre 3 e 5. (81) O FA alia a ação do FNT a 10% ao efeito coagulante/desnaturante do ácido acético glacial. (72) O efeito coagulante do ácido acético favorece a precipitação de proteínas e possui afinidade por componentes nucleares, estabilizando os ácidos nucleicos. (72,82) Nesta mistura, o ácido acético também facilita a difusão do formaldeído no tecido, o que permite melhor penetração do fixador e a sua ação nos tecidos. (72) No entanto, o facto do ácido acético aumentar a permeabilidade celular, aumentando a turgescência, pode, por vezes, distorcer a arquitetura do tecido. Paralelamente, o FA é um bom fixador dos lípidos do parênquima nervoso fetal e promove o endurecimento tecidual, facilitando a sua manipulação. (72) O equilíbrio entre os dois reagentes do FA é crucial, uma vez que soluções fixadoras com um pH muito ácido (<4), causam hidrólise e oxidação do formaldeído, a ácido fórmico, que não possui propriedades fixadoras, além de provocar degradação do tecido. (83,84)

O tempo de fixação é um parâmetro importante para a obtenção de uma boa fixação dos encéfalos. Uma fixação por períodos superiores a três semanas, tem demonstrado ser benéfica para a preservação morfológica, permitindo uma penetração mais homogénea do fixador e estabilização da estrutura tecidual, o que otimiza a qualidade dos exames macro e microscópico. (80)

Outro fator que pode afetar a avaliação dos encéfalos é o seu acondicionamento inadequado durante a fixação, como por exemplo a sua colocação num recipiente que não respeita o seu tamanho e anatomia, que poderá dificultar a sua avaliação, pela deformação.



Uma das estratégias descritas na literatura é a dissolução de cloreto de sódio na solução FNT a 10% até que o encéfalo flutue de forma a minimizar este efeito. (85) Como alternativa, para estabilizar o encéfalo durante a fixação, pode-se utilizar uma rede descartável, gaze ou fio de sisal para suporte físico. No entanto, estes materiais podem pressionar ou comprimir o encéfalo, causando artefactos típicos, como deformações, áreas de compactação ou até pequenas lacerações no parênquima cerebral. Assim, de forma complementar, todos os danos iatrogénicos devem ser documentados, de modo a permitir a distinção entre artefactos técnicos e eventuais alterações neuropatológicas. (20)

A rotina histológica dos encéfalos também apresenta desafios, especialmente na etapa de inclusão, dado que o tecido se pode fragmentar devido à pressão aplicada para o fragmento ficar no mesmo plano. Além disso, a etapa da microtomia requer perícia, devido à delicadeza do tecido cerebral. Por este motivo, o processo de extensão dos cortes histológicos deve ser efetuado em banho maria a 37°C, num período de tempo curto, para evitar a desintegração do corte ou alterações na morfologia do tecido. (86) A temperatura a que é efetuada a secagem dos cortes histológicos e o tempo de incubação devem ser controlados para evitar danos nos cortes histológicos. (72)

Uma das estratégias utilizadas para a preservação da morfologia do tecido desde o exame macroscópico até à sua inclusão, é a inclusão do encéfalo em ágar após a fixação. (87-89) O ágar é um hidrocoloide proveniente de algas marinhas que, misturado com água, forma um gel que solidifica entre os 32 e 37°C, sendo a sua temperatura de fusão aproximadamente 85°C. (90) O ágar é utilizado em várias áreas, como por exemplo na indústria alimentar, na área da saúde e/ou investigação, quer seja na microbiologia (como meio de cultura), na biologia molecular (nos géis de eletroforese), em campos de patologia experimental e na histopatologia (na execução de citoblocos e orientação de biópsias). (91-96) O facto da sua temperatura de fusão não exceder a temperatura de nenhuma das etapas do processamento histológico torna o ágar um excelente meio de inclusão. (20)

No Serviço de Anatomia Patológica da Unidade Local de Saúde de Santa Maria realizam-se, em média, cerca de 140 exames de encéfalos fetais/perinatais por ano, dos quais mais de 100 correspondem a amostras maceradas, autolisadas e de elevada friabilidade. Neste sentido reconhece-se a necessidade de avaliar e implementar, uma técnica que permita ultrapassar as limitações práticas associadas à realização do exame macroscópico e secção de encéfalos fetais/perinatais humanos.



Na rotina hospitalar, não existe um consenso sobre a melhor forma de preservar e avaliar macroscopicamente encéfalos fetais e perinatais humanos, um problema amplamente reconhecido, mas pouco explorado, apesar de sua extrema relevância. A literatura disponível sobre este tema é escassa e o tópico é geralmente abordado de forma superficial.

Para colmatar esta lacuna e responder às dificuldades inerentes à remoção, manipulação, exame macroscópico, secção e colheita de fragmentos, surge a necessidade de padronizar os procedimentos que integram o estudo de encéfalos fetais e perinatais humanos, sobretudo na presença de anomalias congénitas do SNC.



2. Objetivos

O presente trabalho visa o estudo e a seleção de uma técnica de preservação de encéfalos fetais/perinatais humanos que confira uma melhoria na qualidade dos serviços, principalmente que facilite e melhore o exame macroscópico, em particular a realização de secções, sem comprometer a acuidade diagnóstica e os tempos de resposta da autópsia e/ou exame neuropatológico.

Para o efeito foram avaliadas três técnicas de preservação de encéfalos fetais/perinatais humanos com o objetivo de determinar qual é a mais adequada para implementação no Serviço de Anatomia Patológica da Unidade Local de Saúde de Santa Maria.



3. Material e métodos

3.1. Amostra

No presente estudo, foram utilizados 18 encéfalos fetais/perinatais humanos resultantes de IMG e de mortes fetais entre as 17 semanas de idade gestacional e mortes neonatais precoces (recém-nascidos com um dia de vida) provenientes do Serviço de Obstetrícia da Unidade Local de Saúde de Santa Maria e rececionados no Serviço de Anatomia Patológica entre 1 de junho e 31 de julho de 2024. Os critérios de exclusão abrangeram casos de IMG por patologia do SNC e encéfalos fragmentados ou liquefeitos.

O presente estudo foi submetido à Comissão de Ética do Centro Académico de Medicina de Lisboa, não tendo sido obtida uma resposta até ao momento. Contudo, o estudo foi conduzido com base nas considerações éticas aplicáveis à investigação em Anatomia Patológica, nomeadamente não houve comprometimento do diagnóstico anatomopatológico das amostras em estudo e todos os dados obtidos em cada caso foram anonimizados de forma a manter a confidencialidade.

Todas as autópsias foram realizadas no dia de receção do feto ou até 24 horas após a mesma, de acordo com o protocolo aprovado pelo *Royal College of Pathologists*. (97–99) Para cada caso, foram registados dados essenciais para a análise e interpretação dos achados encontrados, nomeadamente: a idade gestacional, o grau de maceração e o desfecho obstétrico/perinatal.

O grau de maceração do feto foi classificado de acordo com uma adaptação da classificação de Bain *et al.* (1974) em: i) ausente, quando não apresenta alterações macroscópicas; ii) ligeiro, quando se observa descamação ligeira a extensa da pele, sem outras alterações; iii) moderado, quando o abdómen apresenta coloração castanha, se observa descamação generalizada, sem alterações compressivas significativas e com derrames sero-hemáticos; e iv) avançado, quando são observadas alterações compressivas, com cavalgamento das suturas cranianas, mumificação e liquefação dos órgãos internos. (100)

A execução da autópsia, nomeadamente do exame neuropatológico, foi efetuada por Anatomopatologistas, Internos de Formação Específica em Anatomia Patológica e de um Técnico Superior de Diagnóstico e Terapêutica (TSDT) de Anatomia Patológica, Citológica e Tanatológica (APCT) com formação específica em Patologia Fetoplacentar.

3.2. Remoção do encéfalo fetal/perinatal humano

Antes da remoção do encéfalo (Figura 1) efetuou-se uma inspeção do couro cabeludo e do formato do crânio, com o objetivo de identificar assimetrias, deformações ou alterações estruturais que possam refletir malformações congénitas, traumatismos obstétricos ou compressões associadas ao parto e/ou ao intervalo *post mortem* (Figura 1A). De seguida, realizou-se uma incisão bimastoide na pele (através do plano coronal), de modo a permitir o rebate cutâneo (Figura 1B). Com o fim de facilitar esta tarefa, separou-se manualmente o couro cabeludo da gálea aponevrótica (Figura 1C). Depois, cortou-se e dobrou-se e os ossos como as “pétalas de uma flor”, com o propósito de expor o encéfalo (Figura 1D e 1E). Posteriormente, realizou-se uma avaliação macroscópica da dura-máter. (18)

Removeu-se os encéfalos através de uma adaptação da técnica de imersão descrita por Prahlow *et al.* (67) Imergiu-se a cabeça e parte do corpo em água à temperatura ambiente, de modo a que o encéfalo permanecesse suspenso (Figura 1F). (20) Por conseguinte, inclinou-se o crânio para trás, identificaram-se os nervos cranianos e procedeu-se à sua secção, o mais próximo possível do osso, de anterior para posterior. Na fossa posterior, cortou-se o tentório ao longo da sua inserção no crânio e, em seguida, transseccionou-se a foice cerebral imediatamente acima deste (Figura 1E). De seguida, cortou-se, o mais distalmente possível, a medula espinhal cervical. Após a remoção do encéfalo examinou-se a superfície interna da calvária e a base do crânio. (18)

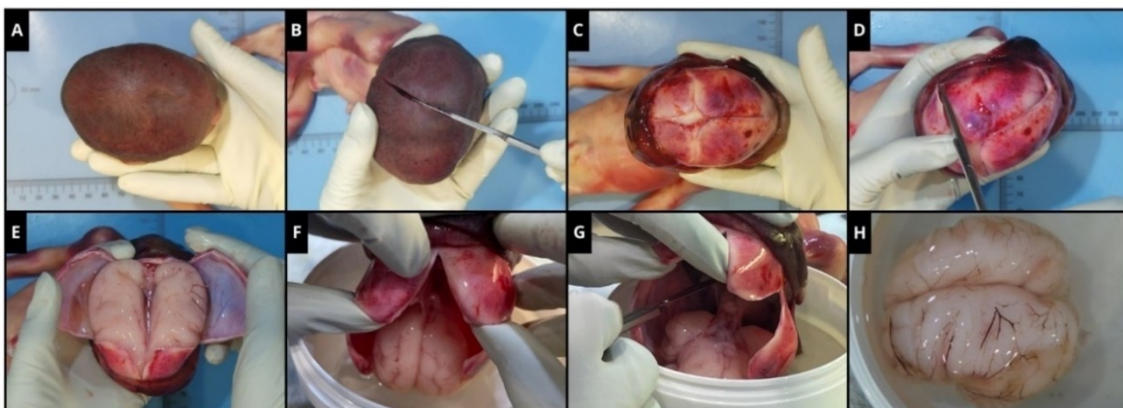


Figura 1. Técnica de remoção do encéfalo de um feto de 26 semanas de idade gestacional por interrupção médica da gestação. A. Inspeção do couro cabeludo. B. Realização de uma incisão bimastoide na pele (através do plano coronal). C. Rebate cutâneo. D. Corte das fontanelas e suturas com ajuda de uma tesoura e dobragem dos ossos do crânio como as “pétalas de uma flor”. E. Exposição do encéfalo. F. Imersão da cabeça dentro de água à temperatura ambiente para remoção do encéfalo. G. Inclinação da cabeça para trás, secção dos nervos cranianos, corte do tentório e da foice cerebral. Encéfalo descaído e secção da medula espinhal cervical o mais distal possível. H. Encéfalo imerso em água.



Removeu-se o tronco cerebral e cerebelo do encéfalo, com um bisturi, cortando o mesencéfalo perpendicularmente ao maior eixo do encéfalo (Figura 2). (18) O tronco cerebral e cerebelo também podem ser incluídos em ágar.

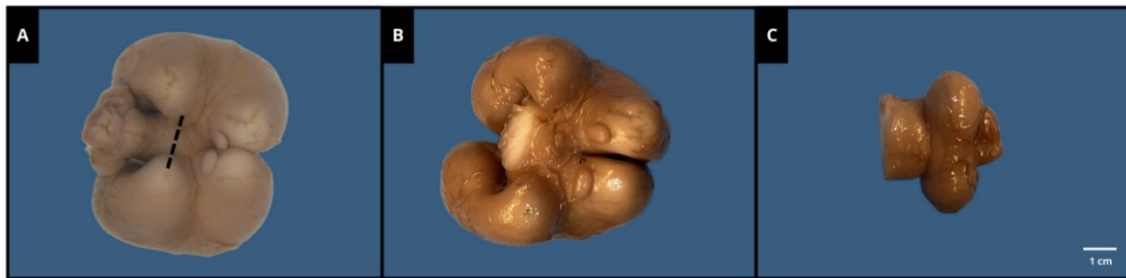


Figura 2. Remoção do tronco cerebral e cerebelo. A. Tronco cerebral e cerebelo removidos do encéfalo através da secção do mesencéfalo perpendicularmente ao maior eixo com recurso a um bisturi. B. Cérebro. C. Tronco cerebral e cerebelo.

3.3. Preservação do encéfalo para exame macroscópico

As técnicas utilizadas para a preservação dos encéfalos foram: i) Fixação dos encéfalos fetais/perinatais humanos em formol-acético (TFA); ii) Secção dos encéfalos fetais/perinatais humanos a fresco em fatias com 0,3–0,5 cm de espessura, colheita de fragmentos e sua fixação em formol neutro tamponado a 10% (TFNT); e iii) Fixação dos encéfalos fetais/perinatais humanos em formol-acético e posterior inclusão em ágar (TFAA). Dos 18 encéfalos incluídos na amostra, seis encéfalos foram submetidos à TFA, seis submetidos à TFNT e seis submetidos à TFAA.

A fixação dos encéfalos inteiros (TFA e TFAA) ocorreu através de imersão em formol-acético a 4% (uma solução composta por formol neutro tamponado a 10% e ácido acético glacial) durante um período de 20 dias num recipiente com volume de fixador cerca de dez vezes superior ao volume do encéfalo. Os fragmentos dos encéfalos seccionados a fresco foram fixados em FNT a 10% (TFNT) durante 24 horas.

3.4. Exame macroscópico do encéfalo

Os passos do exame macroscópico do encéfalo fetal/perinatal humano compreendem: exame da dura-máter e das leptomeninges (registar a existência de hemorragias, a sua localização e extensão); descrição do tamanho e da forma do encéfalo; inspeção dos hemisférios e do seu padrão de giros e sulcos (correlacionar com a idade gestacional na tentativa de avaliar o desenvolvimento); avaliação do corpo caloso (presente/sem ou com alterações/ausente); referência a malformações (ex. holoprosencefalia, lisencefalia, etc);



exame do polígono de Willis, do quiasma ótico e de outros nervos cranianos; descrição de lesões superficiais macroscópicas, incluindo áreas palpáveis de redução ou aumento da consistência do tecido cerebral e documentação de herniações. (17,18) Após a secção do encéfalo realizou-se a descrição do parênquima. No presente estudo, o exame macroscópico do encéfalo foi efetuado em encéfalos fixados na TFA e TFAA e em encéfalos a fresco na TFNT. Fotografaram-se todos os encéfalos em diferentes orientações, conforme ilustrado na Figura 3, com o objetivo de registar de forma sistemática todas as superfícies e estruturas relevantes, bem como documentar eventuais alterações morfológicas.

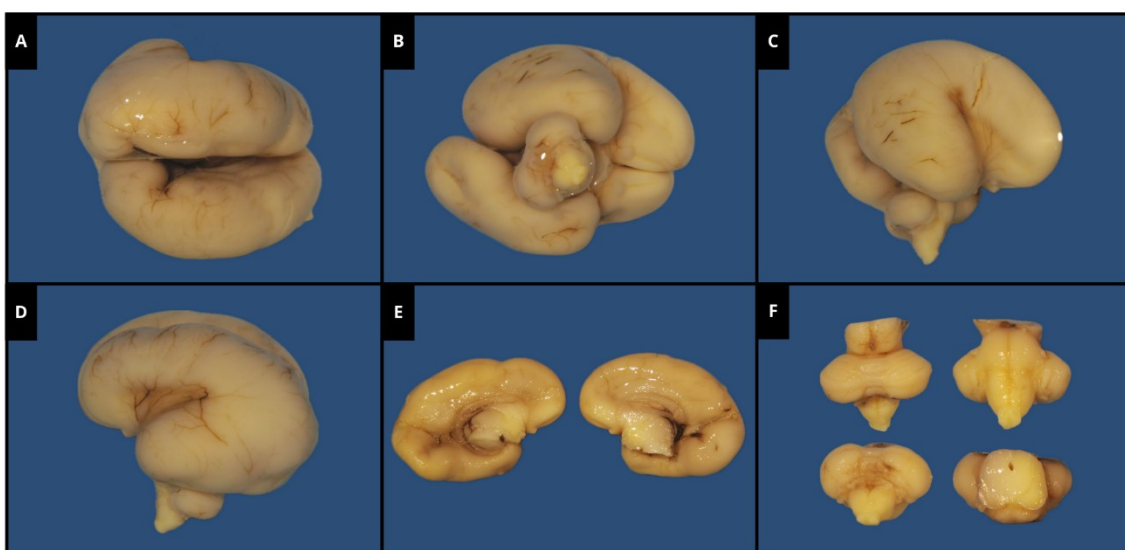


Figura 3. Encéfalo de um feto de 21 semanas e 6 dias de idade gestacional por interrupção médica da gestação. A. Vista superior. B. Vista inferior. C. Vista lateral esquerda. D. Vista lateral direita. E. Vista sagital medial. F. Tronco cerebral e cerebelo. Estas fotos permitem registar de forma sistemática todas as superfícies e estruturas relevantes (por exemplo, o corpo caloso), bem como eventuais alterações morfológicas ou patológicas.

3.5. Inclusão do encéfalo em ágar

Depois do exame macroscópico, realizou-se uma inclusão em ágar dos encéfalos fixados em formol-acético (TFAA), procedimento adaptado da técnica criada por van Dijk *et al.* (20)

Neste estudo, utilizou-se uma solução aquosa extemporânea de ágar a 2% (*Próvida®*, *Sintra, Portugal*) (Figura 4A). Para dissolução do ágar, aqueceu-se a solução no microondas (a 800 W), homogeneizando-se o conteúdo em intervalos de 30 segundos, durante 3 a 4 minutos. De seguida, num recipiente apropriado ao tamanho do encéfalo (cerca de 5-15 cm de diâmetro), verteu-se ágar até formar uma camada com aproximadamente 1 cm de altura. Colocou-se o recipiente a 4°C durante 10 minutos de forma ao ágar solidificar (Figura



4B). Removeu-se o ágar restante do microondas, deixou-se a arrefecer até atingir os 40–50°C e verteu-se sobre a camada de ágar previamente solidificada. Imergiu-se o encéfalo no ágar e colocou-se a 4°C, durante 1 a 2 horas, para que solidificasse (Figura 4C). Após solidificação, com auxílio de uma faca, removeu-se o bloco, que foi aparado de forma a deixar uma margem de 1 cm de ágar a cobrir o encéfalo de todos lados (Figura 4D e 4E). Antes de seccionar, verificou-se se este mantinha a orientação pretendida. Depois, efetuaram-se secções coronais com espessura compreendida entre 0,3 a 0,5 cm (Figura 4F). O número de fatias dependeu do tamanho do encéfalo, assim como da espessura das fatias, que deve ser uniforme e reproduzível em cada amostra (Figura 4G). A Figura 4 ilustra, de forma esquematizada, as etapas da técnica de inclusão em ágar após a fixação em FA.

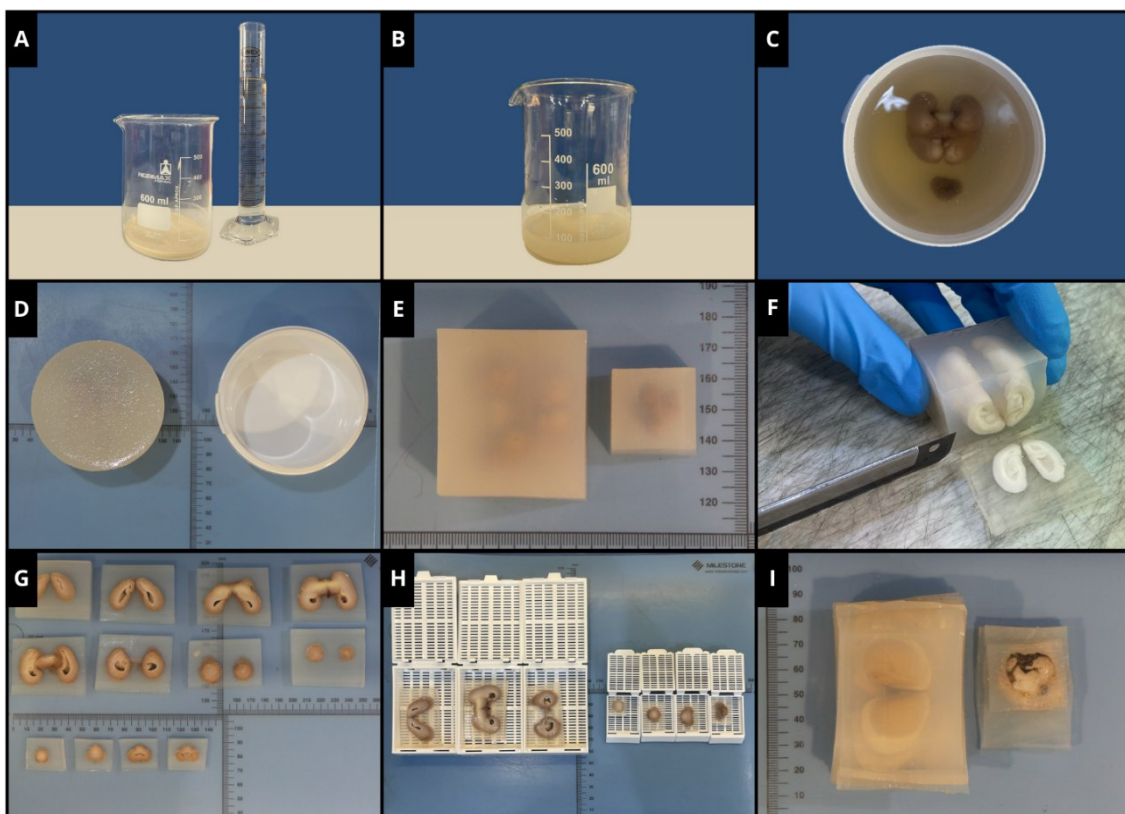


Figura 4. Ilustração da técnica de inclusão em ágar após a fixação em formol-acético. A. Preparação da solução de ágar a 2%. B. Solidificação da camada basal de ágar (1 cm de espessura) durante 10 minutos a 4°C. C. Restante ágar a 40°C vertido sobre a camada basal e imersão do encéfalo. D. Solidificação do ágar durante 2 horas a 4°C e remoção do ágar em bloco do recipiente. E. Remoção do excesso de ágar do bloco deixando uma margem de 1 cm a cobrir todos os lados do encéfalo. F. Execução de secções coronais (de frontal para occipital). G. Encéfalo seccionado em fatias com 0,5 cm de espessura. H. Realização da colheita de fragmentos. I. Colocação das fatias preservando a sua disposição original, num recipiente contendo fixador, de modo a manter a orientação, caso seja necessário colher fragmentos adicionais.

3.6. Colheita de fragmentos do encéfalo

A colheita de fragmentos dos encéfalos fetais/perinatais humanos (Figura 5), para posterior avaliação histológica, incidiu sobre o tronco cerebral (mesencéfalo, ponte e bulbo), cerebelo (vérmis e núcleo dentado), medula espinhal, hipocampo, corpo caloso, córtex e substância branca, núcleos da base, plexos coróides e meninges. Após a colheita, transferiram-se os fragmentos para megacassetes e/ou cassetes histológicas padrão. Realizou-se a colheita de fragmentos de acordo com os protocolos descritos na literatura. (17,18) Na técnica que envolveu inclusão em ágar, as fatias do encéfalo foram acondicionadas no recipiente com o respetivo fixador, preservando a anatomia original.

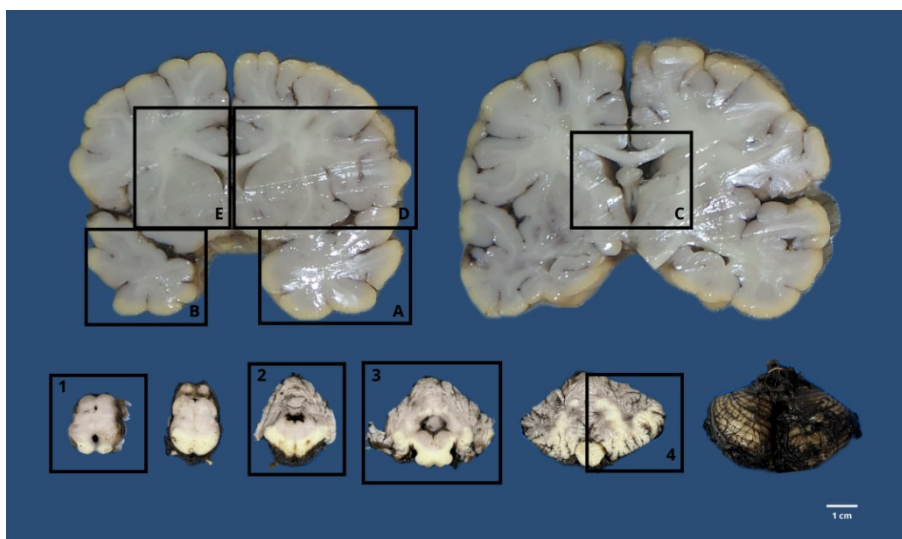


Figura 5. Esquematização do protocolo de colheita de fragmentos em encéfalos fetais/perinatais humanos: hipocampo esquerdo (A) e direito (B); corpo caloso (C); córtex e substância branca (D); núcleos da base (E), plexos coróides, meninges, mesencéfalo (1), cerebelo [medula, ponte (2), vérmis (3) e núcleo dentado (4)] e medula espinhal.

3.7. Obtenção de preparações histológicas

Para obtenção das preparações histológicas as cassetes foram colocados no processador *HistoCore PELORIS 3 Premium Tissue Processing System* (Leica Biosystems, Illinois, Estados Unidos da América) para serem desidratadas, diafanizadas e impregnadas em parafina, tendo sido os fragmentos posteriormente incluídos em parafina (*HistoStar™ Embedding Workstation*; ThermoFisher, Massachusetts, Estados Unidos da América). De seguida foi efetuado o desbaste dos blocos, no *HistoCore AUTOCUT* (Leica Biosystems, Illinois, Estados Unidos da América), tendo sido os blocos cortados a uma espessura de 6 μm . Com o auxílio de um banho de água à temperatura ambiente e outro com água à temperatura de 37°C, estenderam-se os cortes em lâminas de vidro, tendo sido estas

colocadas em suportes apropriados, para posterior secagem e coloração pela hematoxilina-eosina (HE). De referir que não houve necessidade de remoção do ágar antes das etapas do processamento, da inclusão, do corte ou da coloração.

Depois de efetuada a coloração de HE, procedeu-se à montagem automática das lâminas no *Leica CV5030 Coverslipper* (*Leica Biosystems, Illinois, Estados Unidos da América*) ou manual, no caso das lâminas obtidas a partir dos fragmentos processados em megacassetes, tendo sido efetuado posteriormente o controlo de qualidade (Figura 6).

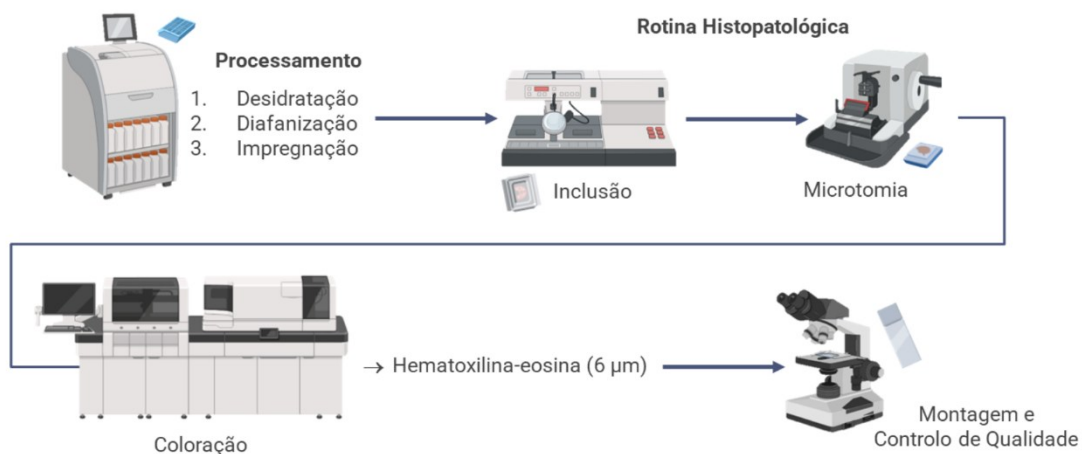


Figura 6. Esquematisação das fases para obtenção de preparações histológicas: fixação, processamento dos tecidos, inclusão, microtomia, coloração (hematoxilina-eosina), controlo de qualidade e entrega das lâminas, para posterior avaliação.

As preparações histológicas foram submetidas a uma avaliação microscópica, consoante os parâmetros referidos em 3.8.

3.8. Avaliação das técnicas de preservação dos encéfalos fetais e perinatais humanos

A avaliação das diferentes técnicas de preservação dos encéfalos fetais e perinatais humanos foi efetuada nas etapas do exame macroscópico, da microtomia e da análise microscópica das preparações histológicas coradas pela HE.

A avaliação do exame macroscópico, secção e colheita de fragmentos dos encéfalos foi efetuada pela pessoa que realizou o exame neuropatológico (Patologistas/Internos de AP/TSDT APCT) e a microtomia foi avaliada por um TSDT APCT. A análise microscópica das preparações histológicas coradas pela HE foi efetuada por três avaliadores independentes: Patologistas especialistas em Patologia Fetoplacentar.

De forma a garantir uma avaliação sistemática de todas as etapas, cada parâmetro foi avaliado através de uma escala de pontuação, tendo sido efetuado o somatório de todas as



pontuações atribuídas em cada parâmetro de uma dada etapa, para cada caso. Essa pontuação, designada por pontuação parcial, obtida para cada etapa avaliada (exame macroscópico, microtomia e análise microscópica das preparações histológicas coradas pela HE) foi utilizada para o cálculo da pontuação final de cada caso. Deste modo, a pontuação final reflete a qualidade da técnica, podendo esse valor ser tratado para efetuar comparações entre as diferentes técnicas em estudo. A escolha deste método baseou-se no facto de ser um método simples e rápido, ser objetivo, reproduzível e flexível.

Os parâmetros avaliados no exame macroscópico dos encéfalos submetidos às diferentes técnicas de preservação dos encéfalos fetais/perinatais foram a facilidade de: i) secção dos encéfalos para obtenção de fatias; ii) identificação das diferentes estruturas cerebrais em superfície de secção; e iii) manipulação das fatias de encéfalo. Para a avaliação destes parâmetros foram usadas escalas categorizadas pontuadas. A avaliação geral do exame macroscópico para um dado encéfalo corresponde ao somatório da pontuação atribuída a cada parâmetro de avaliação, podendo a pontuação parcial variar entre 3 a 11 pontos (Tabela 1).

Tabela 1. Parâmetros utilizados para avaliação das técnicas de preservação dos encéfalos fetais/perinatais humanos na etapa do exame macroscópico.

Parâmetros	Escala de avaliação
Facilidade de secção	1 - Mau/2 - Fraco/3 - Razoável/ 4 - Bom/5 - Muito bom
Facilidade de identificação das estruturas cerebrais em superfície de secção	1 - Difícil/2 - Fácil
Facilidade de manipulação das fatias	1 - Difícil/2 - Moderadamente fácil/ 3 - Fácil/4 - Muito fácil
Avaliação geral (somatório da pontuação atribuída em cada parâmetro)	3 a 11 pontos

Na etapa de microtomia a avaliação foi efetuada segundo os seguintes critérios: i) facilidade de obtenção de um corte histológico e ii) qualidade do corte histológico. Para a avaliação destes dois parâmetros foram usadas escalas categorizadas pontuadas (Tabela 2). A avaliação da facilidade do corte teve em consideração a resistência do bloco/tecido à faca ao efetuar o corte e a formação de uma fita de cortes. A avaliação da qualidade do corte histológico teve em consideração a espessura com que foi possível efetuar um bom corte histológico, adesão do corte à lâmina e a ausência de pregas/sulcos/estrias. A avaliação



geral efetuada na etapa de microtomia corresponde ao somatório da pontuação atribuída a cada parâmetro de avaliação, podendo a pontuação parcial variar entre 2 a 10 pontos.

Tabela 2. Parâmetros utilizados para avaliação das técnicas de preservação dos encéfalos fetais/perinatais humanos na etapa de microtomia.

Parâmetros	Escala de avaliação
Facilidade de corte	1 – Mau/2 – Fraco/3 – Razoável/ 4 – Bom/5 – Muito bom
Qualidade do corte	1 – Mau/2 – Fraco/3 – Razoável/ 4 – Bom/5 – Muito bom
Avaliação geral (somatório da pontuação atribuída em cada parâmetro)	2 a 10 pontos

Por último, a avaliação microscópica das preparações histológicas coradas pela HE foi efetuada atendendo à: i) qualidade do corte histológico - artefactos da microtomia e processamento; ii) coloração do tecido pela HE (1 – Heterogénea ou 2 – Homogénea); iii) coloração pela hematoxilina; iv) coloração pela eosina; e v) morfologia do tecido. Para a avaliação destes parâmetros foram usadas escalas categorizadas pontuadas (Tabela 3).

Tabela 3. Parâmetros utilizados para avaliação das técnicas de preservação dos encéfalos fetais/perinatais humanos na etapa de avaliação microscópica das preparações histológicas coradas pela hematoxilina-eosina.

Parâmetros	Escala de avaliação
Qualidade do corte histológico – Artefactos da microtomia e processamento	1 – Muito frequentes/2 – Pouco frequentes/3 – Ausentes
Coloração Geral	1 – Heterogénea/2 – Homogénea
Coloração pela hematoxilina (núcleos)	1 – Insatisfatória/2 – Razoável/3 – Boa/4 – Muito boa
Coloração pela eosina (citoplasma)	1 – Insatisfatória/2 – Razoável/3 – Boa/4 – Muito boa
Morfologia do tecido	1 – Mal preservada/2 – Razoavelmente preservada/3 – Bem preservada/4 – Muito bem preservada
Avaliação geral (somatório da pontuação atribuída em cada parâmetro)	5 a 17 pontos

A avaliação da qualidade do corte histológico teve em consideração a presença de artefactos causados pela microtomia e processamento, onde a categoria pouco frequente corresponde a raros artefactos que não comprometem a análise e a categoria muito



frequente quando os artefactos são comuns, podendo ter impacto na análise microscópica e, conseqüentemente, no diagnóstico.

A avaliação da coloração pela Hematoxilina teve em consideração a coloração nuclear. Assim, a categoria insatisfatória corresponde a núcleos com cromatina pouco definida e turva; a categoria razoável, quando a definição da cromatina é moderada com algumas áreas sobrecoradas; a categoria satisfatória, quando os núcleos estão bem contrastados com uma cromatina perceptível; e a categoria excelente, quando se observam núcleos nítidos, cromatina muito bem definida e homogénea.

A avaliação da coloração pela Eosina foi categorizada como: insatisfatória quando o citoplasma se encontrava pálido e irregular ou ausente, com algumas zonas pouco diferenciadas/sem contraste; razoável, quando o citoplasma apresentava uma coloração moderada e algumas áreas com pouca definição ou sobrecoradas; boa, quando o citoplasma apresentava uma boa intensidade, fibras extracelulares visíveis e bom contraste geral entre substância branca e cinzenta; e muito boa, quando o citoplasma era homogéneo com uma coloração intensa, uniforme e apresentava um ótimo contraste.

A morfologia foi classificada em quatro categorias: i) mal preservada, quando havia perda da arquitetura, falta da definição das camadas corticais, extensa autólise e retrações teciduais; ii) parcialmente preservada, quando a arquitetura geral era visível, mas com retrações focais ou difusas, perda parcial da definição das camadas corticais e artefactos; iii) bem preservada, quando a arquitetura geral estava preservada com camadas corticais reconhecíveis e poucos artefactos; e iv) ótima preservação, quando se verificava a arquitetura geral e morfologia/células íntegras e preservadas, com zonas bem diferenciadas e uma distinção ótima entre substância cinzenta e branca. (101)(102)

A avaliação efetuada na etapa da análise microscópica das preparações histológicas coradas pela HE baseou-se no somatório das pontuações atribuídas a cada parâmetro, podendo a pontuação de cada caso variar entre 5 a 17 pontos. Uma vez que, foram avaliados 18 casos e cada um foi analisado por três avaliadores independentes, no total foram efetuadas 54 observações. Assim, para a interpretação dos resultados da análise microscópica, considerou-se a soma das pontuações dos três avaliadores em cada caso, uma vez que o objetivo do estudo foi avaliar as técnicas de preservação e não a concordância interobservador. Desta forma, a avaliação geral da análise microscópica de cada caso apresenta uma pontuação parcial que pode variar entre 15 e 54 pontos.



3.9. Análise estatística

Neste trabalho, a análise estatística incluiu duas abordagens complementares: descritiva e inferencial. Na análise descritiva, para as variáveis quantitativas, calcularam-se a média, o desvio-padrão (DP) e os valores mínimo e máximo. Por outro lado, as variáveis qualitativas foram expressas através de frequências absolutas (n) e frequências relativas (%), representadas sob a forma de gráficos de barras.

A avaliação geral das técnicas de preservação de encéfalos fetais e perinatais humanos correspondeu ao somatório das pontuações atribuídas nos parâmetros avaliados em cada etapa em estudo: exame macroscópico, microtomia e análise microscópica. A avaliação global resultou do somatório das pontuações obtidas nas avaliações gerais destas três etapas, permitindo calcular para cada técnica em estudo (TFA, TFNT e TFAA), o valor médio e o respetivo DP.

Na análise inferencial, a normalidade da distribuição das variáveis quantitativas foi verificada através do teste de Shapiro-Wilk. Como algumas variáveis não apresentaram distribuição normal, optou-se pela aplicação de testes não paramétricos. Deste modo, recorreu-se ao teste de Kruskal-Wallis, adequado para amostras pequenas, independentes e que não cumprem o pressuposto de normalidade. Consideraram-se diferenças entre grupos estatisticamente significativas quando se obteve um valor de $p \leq 0,05$.

O tratamento de dados e a análise estatística dos resultados obtidos foram realizados com recurso ao programa *International Business Machines® - Statistical Package for the Social Sciences®* (SPSS Inc., Chicago, Illinois, EUA), versão 29 para a análise estatística.



4. Resultados

4.1. Caracterização das amostras

A caracterização inicial da amostra é fundamental para contextualizar os resultados, dado que a idade gestacional, o grau de maceração e o desfecho obstétrico/perinatal são fatores que podem influenciar diretamente a avaliação das técnicas de preservação dos encéfalos.

No presente estudo, foi efetuada uma distribuição equitativa dos casos entre as três técnicas em avaliação, tendo sido efetuada cada técnica em 6 casos, perfazendo um total de 18 encéfalos. Relativamente à IG por técnica em estudo (Tabela 4), esta apresenta amplitude de 17,29 a 41,14 semanas, com uma IG média de $30,92 \pm 6,98$ semanas. O DP, de cerca de 7 semanas, sugere uma dispersão moderada, indicando estimativa precisa da média. A análise dos resultados evidencia que as técnicas foram aplicadas em grupos de encéfalos com IG distintas: observa-se que os encéfalos onde foi aplicada a TFA possuíam IG mais avançada, enquanto os encéfalos onde foi aplicada a TFNT possuíam maior variação da IG, incluindo IG intermédias e tardias. Os encéfalos onde foi aplicada a TFAA possuíam as IG mais precoces.

Tabela 4. Número de amostras e idade gestacional dos casos utilizados no estudo de cada técnica de preservação dos encéfalos fetais/perinatais humanos. Valores de idade gestacional mínimo e máximo ([mínimo, máximo]) e médio com respetivo desvio-padrão (Média \pm DP), expressos em semanas.

Técnica	Número de amostras (n)	Idade Gestacional	
		Média \pm DP (S)	Mínimo e máximo (S)
TFA	6	$35,60 \pm 4,98$	[26,29; 41,00]
TFNT	6	$32,45 \pm 5,71$	[24,29; 41,14]
TFAA	6	$24,72 \pm 5,74$	[17,29; 32,00]
Total	18	$30,92 \pm 6,98$	[17,29; 41,14]

Legenda: n – Número de amostras; TFA – Fixação em formol-acético; TFNT – Secção a fresco, colheita de fragmentos e, posterior, fixação em formol neutro tamponado a 10%; TFAA – Fixação em formol-acético e posterior inclusão em ágar; DP – desvio-padrão; S – Semanas.

Em relação à IG dos encéfalos, segundo o desfecho obstétrico/perinatal, a Tabela 5 evidencia que a morte fetal foi o desfecho mais frequente (61,1%; n = 11), seguida da morte neonatal (22,2%; n = 4) e da IMG (16,7%; n = 3). Globalmente, as IMG apresentaram IG precoces, correspondentes ao período pré-viabilidade, enquanto as mortes fetais refletem maioritariamente perdas em fases tardias da gestação, próximas do termo. Contrariamente, as mortes neonatais, apresentaram maior dispersão da IG, refletindo



desde situações de grande prematuridade até recém-nascidos de termo, o que demonstra maior variabilidade e, conseqüente, desvio-padrão mais elevado neste grupo.

Tabela 5. Número de amostras e idade gestacional dos casos utilizados no presente estudo, segundo o desfecho obstétrico/perinatal. Valores de idade gestacional mínimo e máximo ([mínimo, máximo]) e médio com respetivo desvio-padrão (Média \pm DP), expressos em semanas.

Desfecho obstétrico/perinatal	Número de amostras (n)	Idade Gestacional	
		Média \pm DP (S)	Mínimo e máximo (S)
Morte fetal	11	33,44 \pm 4,60	[24,29; 41,00]
IMG	3	20,76 \pm 3,36	[17,29; 24,00]
Morte neonatal	4	31,61 \pm 8,42	[23,00; 41,14]
Total	18	30,92 \pm 6,98	[17,29; 41,14]

Legenda: n – Número de amostras; IMG – Interrupção Médica da Gestação; DP – desvio-padrão; S – Semanas.

A análise do desfecho obstétrico/perinatal em relação às diferentes técnicas de preservação revelou que, na TFA, a maioria dos encéfalos provinha de casos de morte fetal (n = 4), não incluindo casos de IMG. Os encéfalos onde se aplicou a TFNT foram predominantemente procedentes de casos de morte fetal (83%), sendo um caso proveniente de morte neonatal. Por sua vez, a TFAA foi aplicada a encéfalos provenientes de casos com vários desfechos, sendo o mais frequente a IMG (50%), seguida da morte fetal (33%) e morte neonatal (17%) (Figura 7).

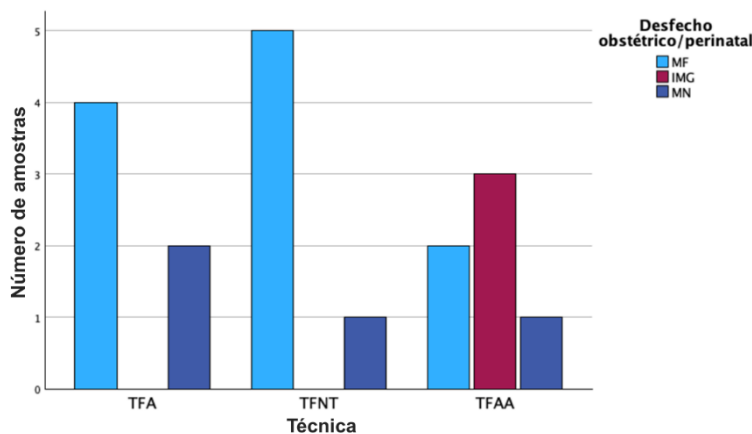


Figura 7. Distribuição dos casos pelo desfecho obstétrico/perinatal, segundo as técnicas de preservação em estudo. (MF – Morte fetal; IMG – Interrupção Médica da gestação; MN – Morte neonatal; TFA – Fixação em formol-acético; TFNT – Secção a fresco, colheita de fragmentos e, posterior, fixação em formol neutro tamponado a 10%; TFAA – Fixação em formol-acético e posterior inclusão em ágar)

Relativamente à maceração, a maioria das amostras apresentou graus de maceração ligeiros (33%) e moderados (33%). Uma análise atenta da Figura 8 revela que o grau de maceração das amostras não apresenta uma distribuição semelhante em todas as técnicas de preservação estudadas. Assim, a TFAA revelou maior frequência de amostras com



maceração moderada (67%). A TFA foi efetuada apenas em amostras com maceração ausente (50%) ou ligeira (50%), contudo a TFNT revelou maior variabilidade de amostras consoante o grau de maceração, apresentando amostras com todos os graus de maceração.

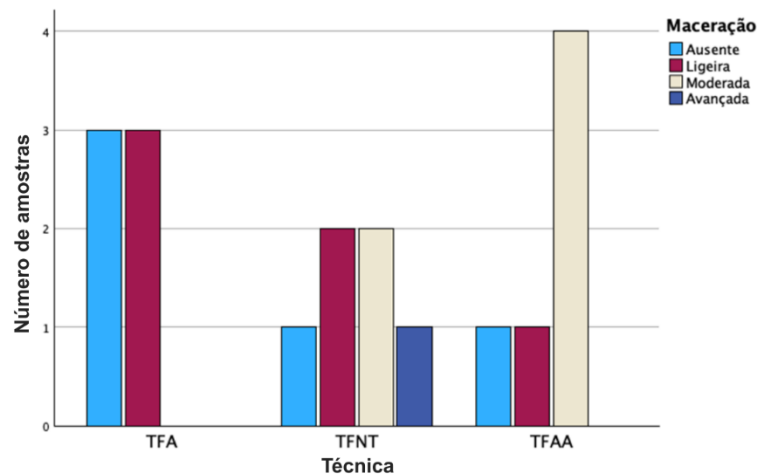


Figura 8. Grau de maceração dos encéfalos preservados pelas técnicas em estudo. (TFA – Fixação em formol-acético; TFNT – Secção a fresco, colheita de fragmentos e, posterior, fixação em formol neutro tamponado a 10%; TFAA – Fixação em formol-acético e posterior inclusão em ágar)

A influência do desfecho obstétrico/perinatal foi avaliada com o intuito de determinar se este influenciou o grau de maceração, procurando compreender se as circunstâncias da morte afetaram a qualidade da amostra e, conseqüentemente, a avaliação das técnicas de preservação. Uma análise da Figura 9, revela que as 11 amostras provenientes de mortes fetais apresentaram graus de maceração variados, desde maceração ausente até avançada, tendo cerca de 45% das amostras maceração moderada e 36% maceração ligeira. Em contraste, as amostras provenientes de IMG mostraram graus mais homogéneos, predominantemente moderados (67%). Nas mortes neonatais, não se observaram sinais de maceração.

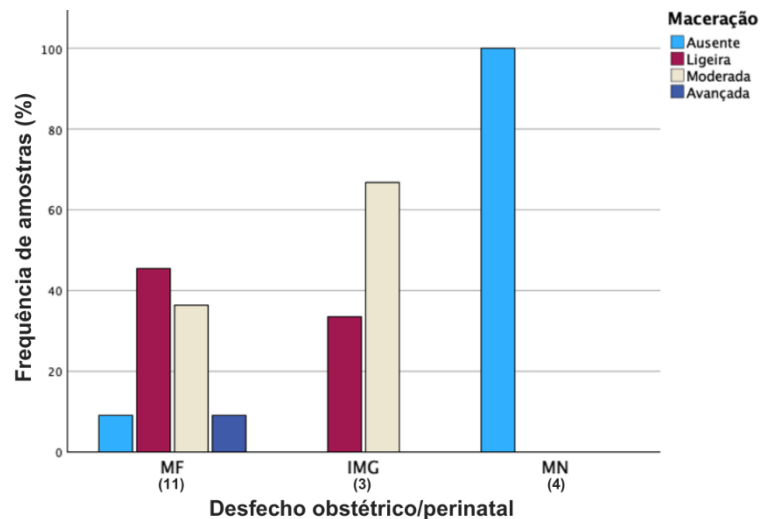


Figura 9. Grau de maceração dos encéfalos preservados pelas técnicas em estudo, segundo o desfecho obstétrico/perinatal. (MF – Morte fetal; IMG – Interrupção Médica da gestação; MN – Morte neonatal)

4.2. Avaliação das técnicas de preservação dos encéfalos fetais e perinatais humanos

A preservação de encéfalos fetais e perinatais humanos constitui um desafio devido à sua fragilidade, suscetibilidade à maceração e à autólise, o que compromete os exames macro e microscópicos. Para contornar estas limitações, foram avaliadas três técnicas de preservação: i) fixação em FA (TFA); ii) secção a fresco, colheita de fragmentos e sua fixação em FNT a 10% (TFNT) e iii) fixação em FA e posterior inclusão em ágar (TFAA).

A avaliação das técnicas de preservação dos encéfalos fetais e perinatais foi realizada em três etapas: no exame macroscópico, na microtomia e na análise microscópica. No exame macroscópico, os parâmetros avaliados foram a facilidade de secção, a identificação das estruturas cerebrais e a manipulação das fatias obtidas. Na microtomia, os parâmetros avaliados foram a facilidade de obtenção dos cortes histológicos e a qualidade dos mesmos. Por fim, na avaliação microscópica das preparações histológicas coradas pela HE, foram considerados parâmetros relacionados com a qualidade do corte histológico, uniformidade e intensidade da coloração, bem como a preservação da morfologia dos tecidos.

4.2.1. Avaliação no exame macroscópico

A avaliação macroscópica constitui a primeira etapa do exame neuropatológico e é determinante na obtenção de secções representativas dos encéfalos. Nesta etapa, a avaliação foi efetuada, aplicando a escala atribuída a cada parâmetro (ver Material e métodos).



Quanto ao parâmetro facilidade de secção, a TFAA mostrou melhores resultados, tendo sido a maioria das amostras classificada como muito boa (83%), enquanto a TFA mostrou resultados intermédios, com a maioria das amostras classificadas como razoáveis (67%). A TFNT foi a técnica que obteve piores resultados, tendo sido a maioria das amostras classificada como fraca (83%) ou más (17%) (Figura 10). Estes dados mostram que a inclusão em ágar facilita significativamente a secção dos encéfalos.

Sobre a facilidade de identificação das estruturas cerebrais em superfície de secção, as técnicas TFA e TFAA permitiram identificar facilmente as estruturas cerebrais em todas as amostras (100%) (Figura 10). Em contraste, na maioria das amostras submetidas à TFNT, a identificação das estruturas cerebrais foi difícil (83%), evidenciando que a secção a fresco (TFNT) compromete a identificação das estruturas em superfície de secção, devido à maior friabilidade e deformação/colapso do tecido não fixado.

Relativamente à facilidade de manipulação das fatias, a TFAA foi a que proporcionou maior facilidade de manipulação, tendo sido a maioria das amostras (83%) classificadas como muito fáceis de manipular. A TFA apresentou resultados moderados, tendo sido a maior parte dos casos classificados como moderadamente fácil (50%), enquanto a TFNT levou a que a manipulação fosse difícil em todas as amostras (100%) (Figura 10). Estes achados demonstram que a TFAA fornece maior consistência às amostras, o que se reflete numa maior facilidade de manipulação das fatias.

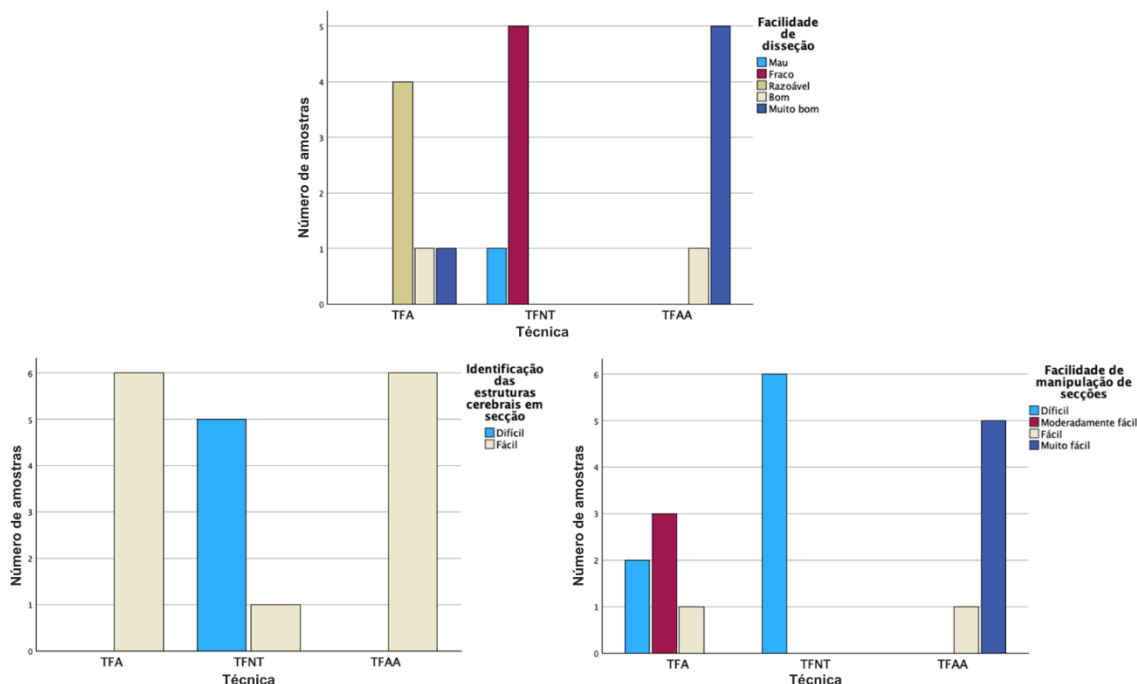


Figura 10. Comparação da facilidade de secção, identificação de estruturas cerebrais em superfície de secção e manipulação de fatias no exame macroscópico, segundo as técnicas de preservação em estudo. (TFA – Fixação em formol-acético; TFNT – Secção a fresco, colheita de fragmentos e, posterior, fixação em formol neutro tamponado a 10%; TFAA – Fixação em formol-acético e posterior inclusão em ágar)

No que diz respeito à avaliação geral no exame macroscópico, a TFAA obteve a maior pontuação média ($10,67 \pm 0,82$ pontos), enquanto a TFNT foi a que apresentou menor ($4,00 \pm 0,63$ pontos), numa escala máxima de 11 pontos. A TFA situou-se num valor intermédio ($7,33 \pm 1,51$ pontos). As diferenças na pontuação geral para cada uma das técnicas revelam uma grande discrepância entre as técnicas em estudo. Ao aplicar-se o teste de Kruskal-Wallis, verificou-se que as diferenças entre as técnicas de preservação em estudo são estatisticamente significativas ($p = 0,0005$) (Tabela 6).

Tabela 6. Avaliação da etapa do exame macroscópico, segundo a técnica de preservação de encéfalos fetais/perinatais humanos em estudo. Pontuações mínima e máxima ([mínimo, máximo]) e pontuação média com respetivo desvio-padrão (Média \pm DP), expressas em pontos, e o nível de significância pelo teste de Kruskal-Wallis.

Técnica	Número de amostras (n)	Média \pm DP (P)	Mínimo e máximo (P)	Valor de p
TFA	6	$7,33 \pm 1,51$	[6,00; 10,00]	0,0005
TFNT	6	$4,00 \pm 0,63$	[3,00; 5,00]	
TFAA	6	$10,67 \pm 0,82$	[9,00; 11,00]	
Total	18	$7,33 \pm 2,97$	[3,00; 11,00]	

Legenda: n – Número de amostras; TFA – Fixação em formol-acético; TFNT – Secção a fresco, colheita de fragmentos e, posterior, fixação em formol neutro tamponado a 10%; TFAA – Fixação em formol-acético e posterior inclusão em ágar; DP – desvio-padrão; P – pontos. O nível de significância do teste de Kruskal-Wallis é para $p \leq 0,05$; $H = 15,25$; $df = 2$.

A Figura 11 fornece uma visão geral do exame macroscópico das amostras efetuadas pelas três técnicas de preservação. As imagens evidenciam diferenças significativas na



integridade do tecido, na definição das estruturas cerebrais, na espessura das secções e na facilidade de manipulação das fatias, refletindo o impacto da técnica na qualidade da avaliação macroscópica do encéfalo fetal/perinatal humano.

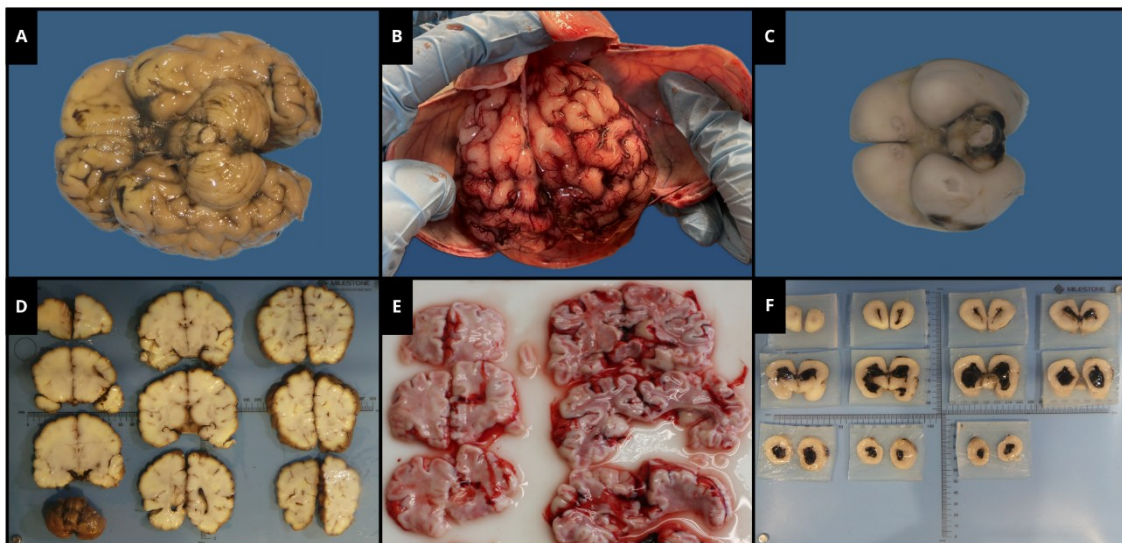


Figura 11. Preservação dos encéfalos de acordo com as técnicas em estudo. A e D. Encéfalo de um feto com 41 semanas de idade gestacional por morte fetal. As secções de encéfalo pós-fixação em formol-acético permitem a visualização das estruturas cerebrais, mas apresentam espessura irregular e fragilidade do parênquima, dificultando a manipulação e colheita. B e E. Encéfalo de feto com 41 semanas de idade gestacional por morte fetal. Nos fragmentos colhidos a fresco e fixados em formol neutro tamponado a 10%, verifica-se perda da integridade do parênquima e muita dificuldade na identificação das estruturas. C e F. Encéfalo de recém-nascido com 1 dia de vida e 23 semanas de idade gestacional por morte neonatal. As secções uniformes de encéfalo moderadamente macerado, incluídas em ágar pós-fixação em formol-acético, revelam excelente preservação das relações entre estruturas cerebrais, facilidade na avaliação macroscópica e na manipulação das secções.

Os resultados obtidos mostram que a TFAA foi a técnica que obteve melhores resultados em todos os parâmetros avaliados no exame macroscópico, assegurando maior facilidade de secção, estabilidade na manipulação e identificação mais fácil de estruturas cerebrais em superfície de secção, fatores críticos para a avaliação macroscópica. A TFA proporcionou um desempenho aceitável, embora inferior à TFAA, enquanto a TFNT evidenciou limitações significativas, nomeadamente maior fragilidade na secção dos encéfalos e maior dificuldade na identificação das estruturas e na manipulação das fatias, comprometendo a análise. No conjunto, estes achados sugerem que a TFAA oferece vantagens práticas significativas no exame macroscópico, principalmente na secção e na manipulação de fatias de encéfalos fetais e perinatais humanos.



4.2.2. Avaliação na microtomia

A avaliação na etapa da microtomia pretendeu averiguar o impacto das técnicas de preservação na obtenção de cortes histológicos, considerando a facilidade e qualidade de corte.

No que se refere ao parâmetro facilidade de corte, observou-se que a TFAA permitiu a obtenção de cortes histológicos muito facilmente (50% das amostras) ou facilmente (50% das amostras), enquanto que nas amostras submetidas à TFA a obtenção de cortes foi fácil (50% das amostras) ou de facilidade razoável (50% das amostras). Pela TFNT a facilidade de corte foi razoável para a maioria das amostras (67%) (Figura 12).

Quanto à qualidade de corte, a TFAA destacou-se novamente, sendo a única técnica que proporcionou cortes histológicos com muito boa qualidade (33% das amostras), sendo os cortes das restantes amostras de boa qualidade (67%). A TFA apresentou desempenho globalmente bom (67%), mas inferior ao obtido com a TFAA, uma vez que se obtiveram cortes de qualidade razoável em 33% das amostras. A TFNT apresentou performance intermédia, com o mesmo número de amostras classificadas como boas (50%) e razoáveis (50%). Os dados indicam variações significativas no desempenho das diferentes técnicas de preservação que se refletem na qualidade da microtomia, mostrando que a TFAA é a técnica que permite a obtenção de cortes histológicos com maior facilidade e de melhor qualidade (Figura 12).

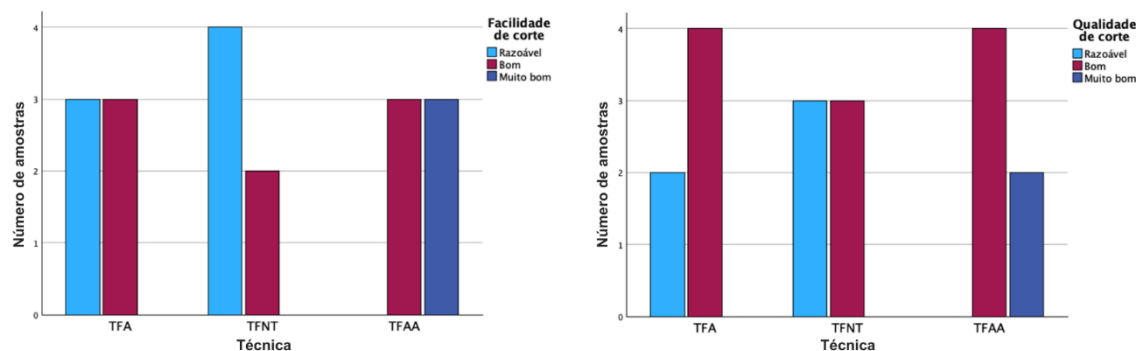


Figura 12. Comparação da facilidade e da qualidade de corte em microtomia entre as técnicas de preservação em estudo. (TFA – Fixação em formol-acético; TFNT – Secção a fresco, colheita de fragmentos e, posterior, fixação em formol neutro tamponado a 10%; TFAA – Fixação em formol-acético e posterior inclusão em ágar)

Na avaliação global da microtomia, verifica-se que a TFAA foi a técnica que obteve a pontuação mais elevada ($8,83 \pm 0,98$ pontos), contrastando com a TFA ($7,17 \pm 0,98$ pontos) e a TFNT ($6,83 \pm 0,98$ pontos), numa escala máxima de 10 pontos (Tabela 7). A pontuação



máxima obtida pela TFA e TFNT correspondem à pontuação mínima obtida pela TFAA, o que reforça a sua vantagem na obtenção de cortes histológicos.

Para avaliar diferenças entre as avaliações gerais da microtomia das três técnicas em estudo, aplicou-se o teste de Kruskal-Wallis que revelou diferenças estatisticamente significativas entre as técnicas de preservação em estudo ($p = 0,016$) (Tabela 7). Estes resultados indicam que a TFAA proporcionou melhor desempenho na avaliação da microtomia, enquanto TFNT registou os valores mais baixos.

Tabela 7. Avaliação da etapa da microtomia, segundo a técnica de preservação de encéfalos fetais/perinatais em estudo. Pontuações mínima e máxima ([mínimo, máximo]) e pontuação média com respetivo desvio-padrão (Média \pm DP), expressas em pontos, e o nível de significância pelo teste de Kruskal-Wallis.

Técnica	Número de amostras (n)	Média \pm DP (P)	Mínimo e máximo (P)	Valor de p
TFA	6	7,17 \pm 0,98	[6,00; 8,00]	0,016
TFNT	6	6,83 \pm 0,98	[6,00; 8,00]	
TFAA	6	8,83 \pm 0,98	[8,00; 10,00]	
Total	18	7,61 \pm 1,29	[6,00; 10,00]	

Legenda: n – Número de amostras; TFA – Fixação dos encéfalos fetais/perinatais humanos em formol-acético; TFNT – Secção dos encéfalos fetais/perinatais humanos a fresco, colheita de fragmentos e, posterior, fixação em formol neutro tamponado a 10%; TFAA – Fixação dos encéfalos fetais/perinatais humanos em formol-acético e posterior inclusão em ágar; DP – desvio-padrão; P – pontos. O nível de significância do teste de Kruskal-Wallis é $\leq 0,05$; H = 8,24; df = 2.

Os resultados evidenciam que as técnicas baseadas em fixação com FA, sobretudo quando combinada com a inclusão em ágar, favoreceram a realização do corte histológico e apresentaram melhor qualidade, otimizando a microtomia. Contrariamente, a TFNT revelou limitações significativas, dificultando a obtenção de cortes e resultando em preparações histológicas de qualidade inferior.

4.2.3. Avaliação na análise microscópica das preparações histológicas coradas pela hematoxilina-eosina

A avaliação das técnicas de preservação em estudo na análise microscópica das preparações histológicas coradas pela coloração HE foi efetuada tendo em consideração os parâmetros qualidade do corte histológico, coloração geral, coloração pela hematoxilina, coloração pela eosina e a morfologia do tecido. Os parâmetros microscópicos foram avaliados por observadores independentes e, por isso, os resultados apresentados resultam do somatório das frequências absolutas das avaliações dos três avaliadores.

Em relação à qualidade dos cortes histológicos obtidos das amostras efetuadas por dada técnica de preservação (Figura 13), com base nos artefactos da microtomia e do



processamento, observam-se diferenças entre as técnicas de preservação. A TFAA apresentou os melhores resultados, com predominância de amostras sem artefactos (67%) e um número considerável de cortes histológicos com artefactos pouco frequentes (33%), não tendo sido registada nenhuma amostra com artefactos moderados ou muito frequentes. A TFA apresentou distribuição equilibrada entre cortes com artefactos moderados (22% das amostras) e pouco frequentes (22% das amostras), apresentando um número significativo de amostras em que se obtiveram cortes sem artefactos (56%), indicando boa qualidade geral. A TFNT revelou maior variabilidade, incluindo cortes com artefactos ausentes, pouco frequentes, moderados e muito frequentes (33%), sendo a técnica em que se observou mais casos com a pior classificação, refletindo um desempenho menos consistente. Estes dados sugerem que a TFAA é a técnica de preservação de amostras mais eficaz para obtenção de cortes histológicos de elevada qualidade, seguida da TFA, enquanto a TFNT apresenta desempenho inferior, com maior suscetibilidade à ocorrência de artefactos.

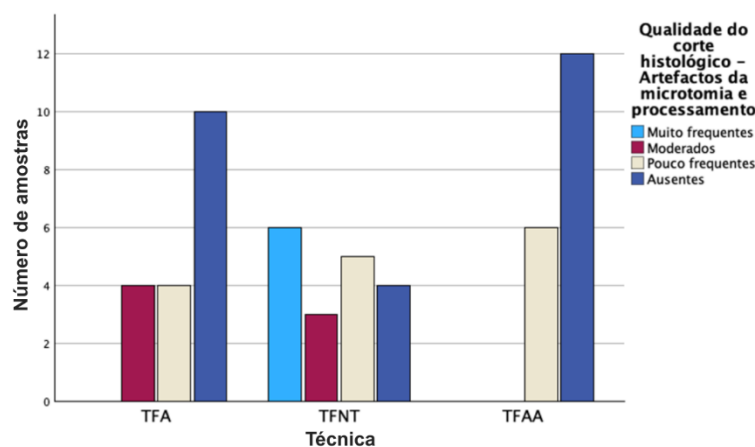


Figura 13. Avaliação da qualidade do corte histológico em função da técnica de preservação, tendo em conta a frequência de artefactos da microtomia e do processamento. (TFA – Fixação em formol-acético; TFNT – Secção a fresco, colheita de fragmentos e, posterior, fixação em formol neutro tamponado a 10%; TFAA – Fixação em formol-acético e posterior inclusão em ágar)

De acordo com a coloração geral em função da técnica de preservação (Figura 14), a TFAA foi a que permitiu a obtenção de uma coloração homogénea em quase todas as amostras (94%; n = 17). De forma semelhante, a TFA também apresentou bons resultados, com maior parte das amostras com coloração homogénea (89%) e apenas algumas com coloração heterogénea (11%). Já a TFNT, embora mantenha a maioria das amostras com coloração homogénea (67%), evidenciou maior variabilidade, com um número relativamente superior de amostras com coloração heterogénea (33%). Assim, conclui-se

que TFA e, sobretudo, TFAA se destacam na qualidade da coloração geral, enquanto a TFNT apresenta maior diversidade nos resultados.

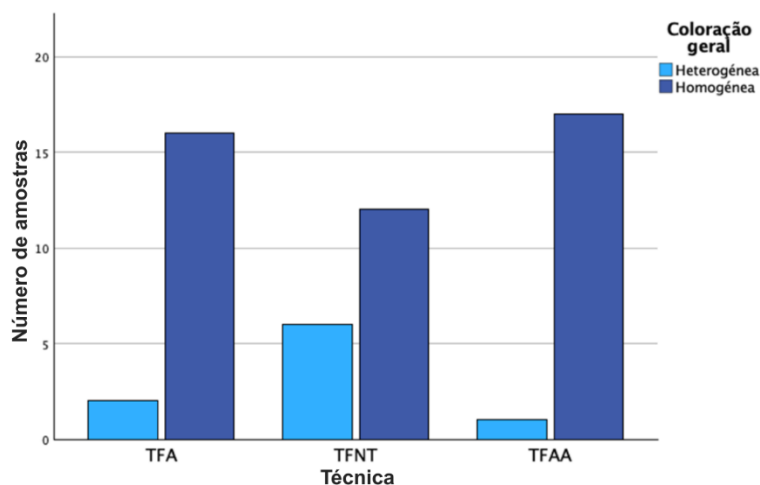


Figura 14. Avaliação da coloração geral em função da técnica de preservação em estudo. (TFA – Fixação em formol-acético; TFNT – Secção a fresco, colheita de fragmentos e, posterior, fixação em formol neutro tamponado a 10%; TFAA – Fixação em formol-acético e posterior inclusão em ágar)

Relativamente à coloração pela hematoxilina em função da técnica de preservação (Figura 15), observaram-se diferenças entre as três técnicas. A TFAA destacou-se pela consistência, apresentando coloração nuclear excelente em todas as amostras (100%). Já a TFA e a TFNT apresentaram resultados ligeiramente inferiores, uma vez que algumas amostras submetidas a estas técnicas de preservação apresentaram coloração nuclear satisfatória, tendo a TFA apresentado mais amostras com esta classificação (22%).

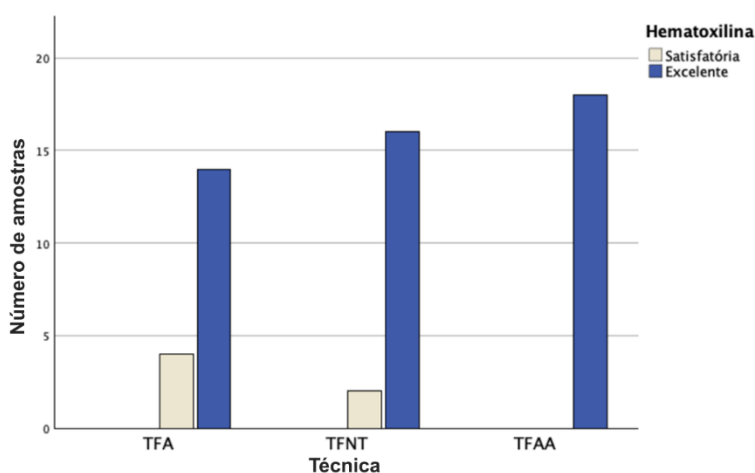


Figura 15. Avaliação da qualidade do corante hematoxilina em função da técnica de preservação em estudo. (TFA – Fixação em formol-acético; TFNT – Secção a fresco, colheita de fragmentos e, posterior, fixação em formol neutro tamponado a 10%; TFAA – Fixação em formol-acético e posterior inclusão em ágar)

No que se refere à coloração pela eosina (Figura 16), a TFAA destacou-se como a mais consistente e reprodutível, apresentando o maior número de amostras com classificação



excelente (94%), sendo a técnica mais indicada entre as avaliadas. A TFA também revelou resultados fiáveis, com amostras com coloração citoplasmática excelente (89%), mas um número maior de amostras com coloração satisfatória (11%). Em contraste, a TFNT revelou maior variabilidade, incluindo classificações excelentes (72%), satisfatórias (17%) e razoável (5%). Em suma, todas as técnicas mostraram viabilidade, mas a TFAA e TFA demonstraram maior robustez e reprodutibilidade, enquanto a TFNT evidenciou limitações que requerem maior cuidado na sua execução.

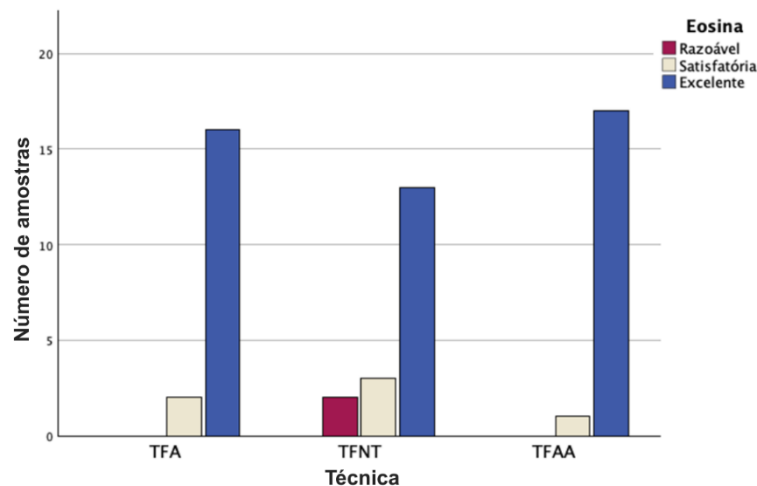


Figura 16. Avaliação da qualidade do corante eosina em função da técnica de preservação. (TFA – Fixação em formol-acético; TFNT – Secção a fresco, colheita de fragmentos e, posterior, fixação em formol neutro tamponado a 10%; TFAA – Fixação em formol-acético e posterior inclusão em ágar)

A Figura 17 apresenta diferenças na morfologia do tecido em função da técnica de preservação. A TFAA demonstrou o melhor desempenho, com maior parte das amostras com morfologia bem preservada (61%; n = 11), mantendo a integridade dos tecidos de forma consistente. A TFA apresentou um desempenho intermédio, com predominância de amostras com histologia parcialmente preservada (50%; n = 9), indicando preservação razoável, mas com algumas alterações morfológicas. No entanto, a TFA foi a técnica com mais amostras com ótima preservação da morfologia (33%, n = 6). Em contraste, a TFNT revelou menor eficácia, com amostras com morfologia severamente alterada (44%; n = 8), associando-se a maior incidência de alterações graves e comprometimento da preservação morfológica. De forma geral, os resultados sugerem que a TFAA é a técnica mais eficiente na preservação da morfologia, seguida da TFA, enquanto a TFNT apresenta pior desempenho (Figura 17).

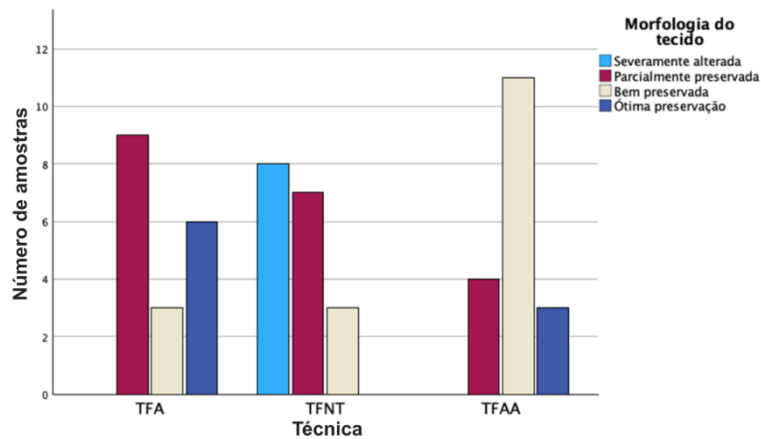


Figura 17. Avaliação da preservação da morfologia tecidular em função da técnica de preservação em estudo. (TFA – Fixação em formol-acético; TFNT – Secção a fresco, colheita de fragmentos e, posterior, fixação em formol neutro tamponado a 10%; TFAA – Fixação em formol-acético e posterior inclusão em ágar)

Adicionalmente, foi analisada a associação entre a preservação da morfologia do tecido e a qualidade do corte histológico, tendo em consideração a frequência de artefactos da microtomia e processamento (Figura 18). Os resultados demonstram que a qualidade histológica dos cortes depende diretamente da preservação da morfologia: amostras com melhor preservação apresentam menor frequência (11% das amostras) ou ausência (89% das amostras) de artefactos, confirmando a relação entre boa preservação da morfologia e a qualidade do corte histológico. Por outro lado, amostras com morfologia parcial ou severamente alterada associam-se a maior frequência de artefactos, com artefactos muito frequentes em 75% das amostras, podendo comprometer o diagnóstico.

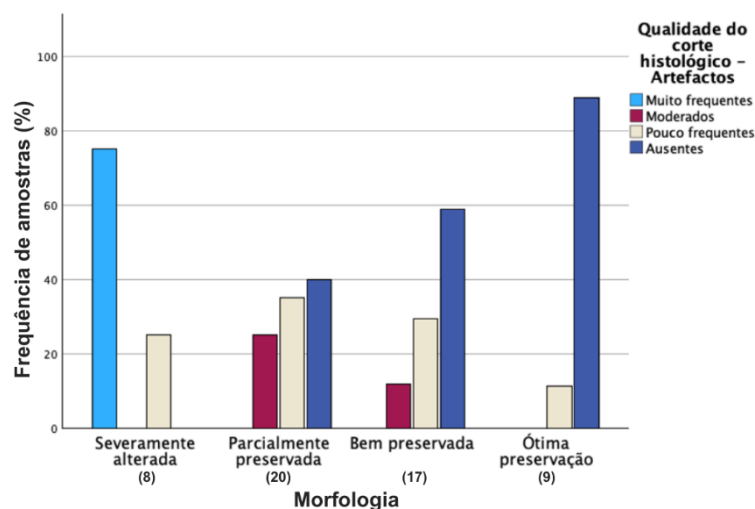


Figura 18. Avaliação da preservação da morfologia do tecido em função da qualidade do corte histológico, considerando a frequência de artefactos da microtomia e do processamento.



No que se refere à avaliação dos diferentes graus de preservação morfológica em função do grau de maceração, a Figura 19 evidencia a associação entre ambas as variáveis. Observa-se que tecidos com preservação ótima ocorrem exclusivamente em amostras sem maceração (100%). Além disso, tecidos bem ou parcialmente preservados apresentaram, predominantemente, maceração moderada (57%) ou ligeira (15%), sugerindo que níveis intermédios de maceração ainda permitem manutenção parcial da morfologia. Por outro lado, amostras com morfologia severamente alterada estiveram maioritariamente associadas à maceração ligeira (75%), com alguns casos de maceração moderada (25%). Estes resultados sugerem que a progressão da maceração compromete a preservação da morfologia, sendo um fator determinante da integridade histológica, embora outros fatores também possam influenciar este processo.

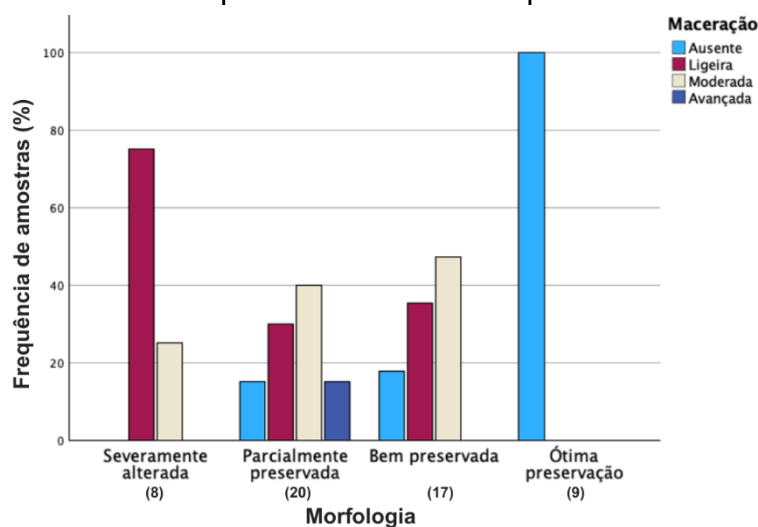


Figura 19. Avaliação do grau de maceração das amostras em função da preservação da morfologia do tecido.

Em relação à avaliação geral da análise microscópica de preparações histológicas coradas pela coloração de HE (Tabela 8), numa escala máxima de 54 pontos, observou-se que a TFAA apresentou a pontuação média mais elevada ($49,50 \pm 3,27$ pontos), associada a uma menor dispersão e a um intervalo restrito de variação [44,00–54,00]. A TFA registou igualmente pontuação média elevada ($47,50 \pm 5,09$ pontos), embora com maior variabilidade, ainda que ligeira. Em contrapartida, a TFNT evidenciou a pontuação média mais baixa ($39,28 \pm 6,18$ pontos) e a maior amplitude de valores [30,00–46,00], refletindo maior heterogeneidade entre as amostras e indicando pior desempenho, enquanto as técnicas TFAA e TFA, apresentaram resultados superiores.

Para comparar a avaliação geral da análise microscópica das três técnicas, aplicou-se o teste de Kruskal-Wallis, que revelou diferenças estatisticamente significativas entre as três técnicas de preservação em estudo ($p = 0,017$) (Tabela 8).



Tabela 8. Avaliação da etapa da análise microscópica das preparações histológicas coradas pela hematoxilina-eosina. Pontuações mínima e máxima ([mínimo, máximo]) e pontuação média com respetivo desvio-padrão (Média \pm DP), expressas em pontos, e o nível de significância pelo teste de Kruskal-Wallis.

Técnica	Número de amostras (n)	Média \pm DP (P)	Mínimo e máximo (P)	Valor de p
TFA	6	47,50 \pm 5,09	[39,00; 54,00]	0,017
TFNT	6	39,83 \pm 6,18	[30,00; 46,00]	
TFAA	6	49,50 \pm 3,27	[44,00; 54,00]	
Total	18	45,61 \pm 6,36	[30,00; 54]	

Legenda: n – Número de amostras; TFA – Fixação em formol-acético; TFNT – Secção a fresco em fatias com 0,3-0,5 cm de espessura, colheita de fragmentos e, posterior, fixação em formol neutro tamponado a 10%; TFAA – Fixação em formol-acético e posterior inclusão em ágar; DP – desvio-padrão; P – pontos. O nível de significância do teste de Kruskal-Wallis é $p \leq 0,05$; H = 8,12; df = 2.

Uma análise das preparações histológicas das amostras submetidas às diferentes técnicas de preservação evidencia as principais diferenças entre as técnicas, permitindo a avaliação dos seus respetivos desempenhos. A Figura 20 ilustra de forma sintética essa comparação, apresentando uma visão geral das amostras submetidas a cada técnica.

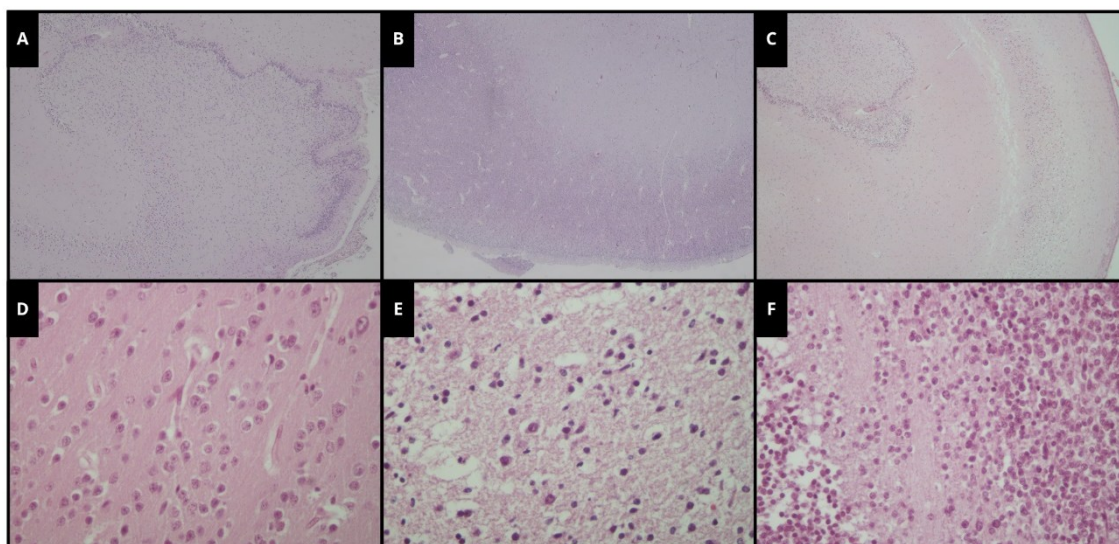


Figura 20. Preparações histológicas de amostras ligeiramente maceradas coradas pela coloração de hematoxilina-eosina. A e D. Encéfalo de feto com 41 semanas de IG fixado com formol-acético. Em pequena ampliação, observa-se a interface entre as substâncias cinzenta e a branca, com boa definição da arquitetura e da estrutura celular (Ampliação 20X). Em maior ampliação, observam-se neurónios com núcleos arredondados a ovalados assim como células da glia dispostas no neurópilo e pequenos vasos capilares com discreto artefacto de retração (Ampliação 400X). A morfologia encontra-se bem preservada, sendo possível observar o detalhe nuclear, com uma boa definição da cromatina e dos nucléolos. B e E. Encéfalo de feto com 35 semanas de IG fixado com formol neutro tamponado a 10%. Observa-se córtex cerebral e substância branca com limites bem definidos e a arquitetura encontra-se bem preservada, apesar das áreas de retração dispersas pela substância cinzenta (Ampliação 20X). Em maior ampliação, observam-se neurónios no neurópilo, com ligeiros artefactos. Apesar disto a morfologia encontra-se globalmente bem preservada, sendo possível observar o detalhe nuclear, com uma boa definição da cromatina e dos nucléolos (Ampliação 400X). C e F. Encéfalo de feto de 22 semanas incluído em ágar pós-fixação em formol-acético. As diferentes camadas do córtex e da substância branca estão bem definidas e a arquitetura encontra-se bem preservada (Ampliação 20X). Em maior ampliação, observam-se neurónios em maturação dispostos no neurópilo. Observa-se alguma descoesão, mas a morfologia encontra-se globalmente bem preservada, sendo possível observar o detalhe nuclear, com uma boa definição da cromatina e dos nucléolos (Ampliação 400X).



Os resultados da análise microscópica confirmaram que as técnicas baseadas em fixação com FA apresentaram melhor desempenho, embora a técnica baseada em fixação em FNT a 10% produza preparações viáveis para diagnóstico. A inclusão em ágar destacou-se por permitir maior uniformidade nos cortes histológicos e reduzir a ocorrência de artefactos. Neste contexto, a TFAA apresentou o melhor equilíbrio entre preservação estrutural, qualidade de coloração e menor frequência de artefactos, possibilitando clara diferenciação entre substância cinzenta e branca, preservação da arquitetura e definição nuclear adequada. A TFA evidenciou bons resultados, mas inferiores aos da TFAA. Já a TFNT revelou limitações significativas, associadas a maior frequência de artefactos e pior preservação morfológica. Assim, a TFAA demonstrou ser a técnica mais adequada para a análise microscópica de preparações histológicas coradas pela coloração de HE.

4.2.4. Avaliação global das técnicas de preservação em estudo

A avaliação global dos 18 casos foi realizada pelo somatório das três etapas em estudo: o exame macroscópico, a microtomia e a análise microscópica das preparações histológicas coradas pela HE. A Tabela 9 evidencia diferenças no desempenho das técnicas de preservação de encéfalos fetais e perinatais, expressas em pontos. A TFAA apresentou a maior pontuação média ($69,00 \pm 4,52$ pontos), refletindo melhor desempenho e menor variabilidade. A TFA registou valores intermédios ($62,00 \pm 6,07$ pontos). Por outro lado, a TFNT obteve a menor média ($50,67 \pm 6,44$ pontos), indicando pior performance. No conjunto das 18 amostras, a média foi de $60,56 \pm 9,46$ pontos. Estes resultados evidenciam diferenças entre as técnicas, com a TFAA consistentemente próxima dos valores máximos e a TFNT concentrada em valores mais baixos.

Para avaliar a distribuição dos dados da avaliação global de cada técnica, aplicou-se o teste de Kruskal-Wallis, que revelou diferenças estatisticamente significativas ($p = 0,00004$) (Tabela 9).



Tabela 9. Avaliação global das técnicas de preservação de encéfalos fetais/perinatais humanos em estudo. Pontuação máxima e mínima ([mínimo, máximo]), pontuação média com respetivo desvio-padrão (Média \pm DP), expressos em pontos, e o nível de significância pelo teste de Kruskal-Wallis.

Técnica	Número de amostras (n)	Média \pm DP (P)	Mínimo e máximo (P)	Valor de p
TFA	6	62,00 \pm 6,07	[53,00; 69,00]	0,00004
TFNT	6	50,67 \pm 6,44	[40,00; 57,00]	
TFAA	6	69,00 \pm 4,52	[61,00; 75,00]	
Total	18	60,56 \pm 9,46	[40,00; 75,00]	

Legenda: n – Número de amostras; TFA – Fixação dos encéfalos fetais/perinatais humanos em formol-acético; TFNT – Secção dos encéfalos fetais/perinatais humanos a fresco em fatias com 0,3–0,5 cm de espessura, colheita de fragmentos e, posterior, fixação em formol neutro tamponado a 10%; TFAA – Fixação dos encéfalos fetais/perinatais humanos em formol-acético e posterior inclusão em ágar; DP – desvio-padrão; P – pontos. O nível de significância do teste de Kruskal-Wallis é $p \leq 0,05$; $H = 20,74$; $df = 2$.

Em síntese, a análise integrada dos resultados gerais indica que as técnicas baseadas na fixação em FA são as melhores, particularmente quando associada à inclusão em ágar, que revelou o melhor desempenho nas três etapas avaliadas – exame macroscópico, microtomia e análise microscópica de preparações histológicas coradas pela HE. Estes dados sustentam a seleção da técnica mais viável para implementação na rotina laboratorial, a TFAA.



5. Discussão

No presente estudo compararam-se três técnicas de preservação de encéfalos fetais/perinatais humanos, com o objetivo de avaliar o seu desempenho em três etapas da rotina histológica, nomeadamente no exame macroscópico, na microtomia e na análise microscópica das preparações histológicas coradas pela HE.

Este estudo visou averiguar qual das três técnicas seria a mais adequada para o diagnóstico neuropatológico fetal e perinatal com o intuito de implementar a mais eficaz na rotina do Serviço de Anatomia Patológica da Unidade Local de Saúde de Santa Maria e, assim, melhorar a qualidade dos serviços prestados na área da neuropatologia fetal.

As técnicas de preservação alvo de avaliação foram: a fixação em formol-acético (TFA); secção dos encéfalos fetais/perinatais humanos a fresco, colheita de fragmentos e sua fixação em formol neutro tamponado a 10% (TFNT); e fixação em formol-acético seguida de inclusão em ágar (TFAA). Estas três abordagens foram escolhidas porque combinam fixadores com ampla validação na literatura científica e reconhecida aplicabilidade na prática laboratorial (o FNT a 10% e o FA) com uma estratégia adicional (a inclusão em ágar após a fixação).

A consulta de bibliografia na área revelou que embora existam investigações que exploram métodos de preservação e técnicas de exame macroscópico em neuropatologia, são escassos os estudos dedicados a encéfalos fetais/perinatais humanos. (23,103) Os poucos trabalhos publicados sobre esta temática apresentam, em geral, carácter histórico, descrevendo protocolos dispendiosos ou tecnicamente muito complexos, frequentemente baseados em fixadores hoje considerados obsoletos ou descontinuados devido à sua toxicidade e riscos associados, como é o caso de soluções à base de mercúrio ou a solução de Zamboni utilizadas por Nicholls (1988) e Bass *et al.* (1993), respetivamente. (66,68) Em adição, estes artigos omitem ou descrevem de forma muito limitada o exame macroscópico e a secção subsequente dos encéfalos, impossibilitando a definição de protocolos aplicáveis à prática contemporânea.

Nesta conjuntura, destaca-se a originalidade e relevância do artigo de van Dijk *et al.* (2021), que constitui uma das poucas referências atuais verdadeiramente direcionadas à neuropatologia fetal/perinatal humana. (20) Embora não se trate de uma revisão sistemática, este apresenta uma revisão crítica das técnicas disponíveis, acompanhada de



descrição detalhada, o que representa um contributo fundamental para a atualização e uniformização metodológica nesta área.

Relativamente aos resultados do presente estudo, a análise das características das amostras (idade gestacional, grau de maceração e desfechos obstétrico/perinatais) sugere uma associação entre estas e o desempenho nas fases subsequentes.

No que concerne a idade gestacional, verificou-se que a IG mais elevada e os valores com maior dispersão se associaram sobretudo às mortes fetais, enquanto as IMG ocorreram em idades mais precoces, o que é compatível com a literatura. Tal distribuição está de acordo com o enquadramento legal português, uma vez que, de acordo com a Lei n.º 16/2007, a IMG é permitida até às 24 semanas em casos de malformação congénita grave ou doença fetal incurável, sendo permitida em qualquer idade gestacional quando existe risco vital para a mãe ou inviabilidade fetal. (104) Estes limites justificam que a maioria das IMG se concentre em idades gestacionais mais baixas, ao passo que as mortes fetais ocorrem frequentemente em idades mais avançadas.

Relativamente à maceração, esta mostrou-se moderada nas IMG, o que é coerente com o facto de nestas situações o intervalo entre a morte do feto e a expulsão ser geralmente mais curto, dado o contexto clínico programado. Contrariamente, nos casos de morte fetal, o grau de maceração é variável, o que é compatível com o descrito por Gold *et al.* (2014), que também destaca o facto desta variável depender de múltiplos fatores. (42) Em contraste, a maceração foi ausente nas mortes neonatais, como esperado, dado que o óbito ocorreu fora do ambiente intrauterino, não havendo exposição ao líquido amniótico e às condições que desencadeiam a maceração. (38)

A diversidade observada entre as amostras confirma a heterogeneidade das amostras e evidencia a influência das circunstâncias do óbito na integridade do encéfalo, refletindo a variabilidade dos casos analisados. Este enquadramento reforça a necessidade de técnicas de preservação robustas e versáteis, capazes de preservar a qualidade em contextos muito distintos e de serem adaptáveis a diferentes condições, dado que na prática laboratorial se analisam rotineiramente amostras de diferentes IG, com graus de maceração muito distintos e provenientes de diversos desfechos obstétricos/perinatais. De igual forma, os dados refletem que a eficácia das técnicas de preservação deve ser interpretada, tendo em conta a condição inicial do tecido, destacando a importância de considerar a natureza da amostra na escolha e otimização dos protocolos laboratoriais.



Relativamente ao exame macroscópico e tendo em conta os resultados obtidos, verificou-se uma tendência para considerar que as técnicas baseadas em fixação com FA, designadamente TFA e TFAA, apresentaram desempenho superior. Em contraste, na TFNT, técnica cujo exame macroscópico foi realizado a fresco, as amostras apresentaram resultados insatisfatórios, com dificuldade na secção, na identificação das estruturas cerebrais e na manipulação das fatias devido à friabilidade. Estes achados estão em consonância com Nardi *et al.* (2023) que enfatiza a necessidade de fixação adequada para garantir uma avaliação macroscópica fiável. (80)

Por outro lado, a utilização do ácido acético conferiu maior consistência aos encéfalos, facilitando a sua manipulação, a secção e a colheita de fragmentos. (72,105) Para além disso, o FA apresenta, em comparação com o FNT a 10%, menor osmolaridade e pH mais ácido, o que favorece a precipitação de proteínas em tecidos com elevado conteúdo hídrico, característica típica dos encéfalos fetais e perinatais humanos. (106) Estas propriedades também promovem a penetração do fixador, resultando numa preservação mais rápida, eficaz e uniforme, sem provocar desidratação excessiva das amostras. (72,107,108)

Tal como previamente descrito por Herbert *et al.* (1961), primeiro autor a reportar a utilização de ágar como meio de inclusão pós-fixação para orientação de biópsias, o presente estudo confirma que o ágar preserva a integridade das amostras. Neste trabalho, optou-se pela utilização de uma solução de ágar a 2%, uma vez que se considerou que a esta concentração apresenta a melhor relação entre a consistência e a transparência, dado que a opacidade do ágar dificulta a visualização da amostra e, por conseguinte, a precisão das secções. Realça-se ainda que pode ser utilizado qualquer tipo de ágar, ainda que a transparência do mesmo varie.

De referir que, devido ao ágar ser inerte, não é necessária a sua remoção antes do processamento, inclusão, microtomia ou coloração, pois este não compromete nenhuma das etapas. (20) De forma semelhante ao descrito por van Dijk *et al.* (2021), verificou-se que o ágar é anfófilo, o que significa que cora com corantes ácidos e básicos, não condicionado a coloração de HE. (20)

Além destes achados, este estudo revelou que a técnica de inclusão em ágar após a fixação em FA é inovadora e vantajosa para o exame macroscópico. Ao fornecer suporte estrutural durante a secção, reduz significativamente o tempo de dissecção e favorece a uniformização da espessura das fatias (entre 0,3 a 0,5 cm), possibilitando uma avaliação



macroscópica detalhada, dado que aumenta a superfície de corte. Da mesma forma, preserva as relações espaciais e minimiza a fragmentação durante o exame macroscópico, a manipulação das fatias, a colheita de fragmentos e posterior transferência dos mesmos para as cassetes histológicas.

Estudos recentes confirmam que a maceração reduz significativamente o rendimento diagnóstico da autópsia fetal/perinatal, sobretudo no exame neuropatológico, e recomendam o recurso a técnicas complementares como a ressonância magnética *post mortem* em fetos com maceração avançada, dado que os exames imagiológicos conseguem identificar alterações anatómicas que se perdem na avaliação macroscópica deste tipo de encéfalos. (40,41) Estes dados corroboram, em parte, os resultados obtidos, que mostram que as amostras com graus mais avançados de maceração se associaram a pontuação mais baixas no exame macroscópico. Todavia, verificou-se que, apesar da TFAA ter sido aplicada em mais amostras com grau de maceração moderado, esta apresentou um desempenho notável em todos os parâmetros avaliados, inclusive na manutenção da integridade dos encéfalos com consistência reduzida. A inclusão em ágar conferiu suporte físico ao tecido, facilitando a obtenção de secções representativas em encéfalos friáveis e macerados. Este achado é particularmente relevante, pois demonstra que, embora a condição inicial do tecido seja um fator limitante, a escolha da técnica de preservação robusta pode atenuar de forma significativa esses constrangimentos, garantindo resultados diagnósticos fiáveis em situações adversas. Posto isto, estes resultados reforçam que a inclusão em ágar após a fixação em FA revelou ser a abordagem mais eficaz para o exame macroscópico e secção de encéfalos fetais e perinatais humanos o que vai ao encontro do descrito por Van Dijk *et al.* (20)

No presente estudo constatou-se que a TFAA facilita, ainda, a inclusão em parafina, pois a amostra pode ser transferida para o molde de inclusão segurando no ágar e pode ser exercida mais pressão na inclusão, dado que o fragmento se encontra num suporte (a pressão é feita de forma uniforme e distribuída), o que faz com que a superfície de corte do fragmento fique toda no mesmo plano e, desta forma, exija um menor desbaste na etapa de microtomia.

No que concerne à microtomia, etapa particularmente exigente neste tipo de amostras, os resultados evidenciam que as amostras fixadas em FA apresentam desempenho superior às fixadas em FNT a 10%, corroborando os dados obtidos no exame macroscópico.



A análise sugere que a TFAA, em particular, facilita a microtomia, na medida que permite com facilidade a formação de fitas de corte. Para além disso, apresenta uma facilidade de extensão no banho histológico e permite a obtenção de cortes histológicos uniformes e de elevada qualidade. Assim, a TFAA destacou-se, tanto no exame macroscópico, quanto na microtomia.

Relativamente à análise microscópica de preparações histológicas coradas pela HE, importa salientar que a avaliação foi realizada “às cegas”, de forma a reduzir a subjetividade dos observadores, utilizando tabelas numéricas com os diferentes critérios a avaliar. Em relação à coloração de HE, as técnicas que envolviam a fixação em FA, demonstraram, de forma consistente, melhores resultados refletindo maior uniformidade na coloração e preservação da morfologia. Por outro lado, observou-se que a inclusão em ágar pós-fixação em FA é eficaz na preservação das características histológicas, apresentando melhores resultados na coloração geral, bem como na eosina, na hematoxilina e na avaliação geral da coloração, apesar de apresentar alguns artefactos da microtomia e do processamento, que refletem a sensibilidade deste tipo de amostras. Contrariamente, a TFNT, revelou maior variabilidade, com amostras em ambos os extremos dos diferentes parâmetros avaliados. Esta técnica esteve associada a maior frequência de artefactos e a preservação morfológica comprometida, alinhando-se com Bancroft *et al.* (2012), que destaca a dificuldade em obter cortes histológicos consistentes em tecidos subfixados, devido à friabilidade e alterações *post mortem*. (72) Adicionalmente, evidenciaram-se achados compatíveis com o descrito em revisões da literatura, como por exemplo a penetração limitada do FNT a 10% neste tipo de tecido, resultando numa fixação incompleta, autólise e conseqüente perda da integridade com fragmentação dos encéfalos. (80,109) Além disso, o FNT a 10% provoca retração, o que resultou na deformação e colapso do parênquima cerebral, observação confirmada no presente estudo. (110)

Tal como descrito por Shelmerdine *et al.* (2020), também no presente estudo, níveis mais elevados de maceração estão associados a um aumento da frequência de artefactos e alterações na preservação da morfologia. (111) No entanto, algumas amostras com graus de maceração avançados estavam mais bem preservadas do que o expectável, podendo fornecer informações diagnósticas úteis. Estes achados refletem a complexidade do processo de maceração, o que coincide com o descrito por Gold *et al.* (2014). (42)



Apesar de não terem sido realizadas técnicas complementares no nosso estudo, Yan *et al.* (2007) e Ridolfi *et al.* (2019) descreveram que o ágar tem como vantagem a preservação das propriedades cito e histoquímicas e da imunorreatividade. (89,112) Posto isto, o principal desafio poderá residir no fixador utilizado.

A nível da compatibilidade dos fixadores com a realização de imuno-histoquímica, a maioria dos protocolos está otimizado para o FNT a 10%, sendo apenas necessário fazer uma recuperação antigénica, uma vez que, o *crosslinking* mascara os epítomos. (71,113) No que concerne a técnicas de biologia molecular, apesar do FNT a 10% possibilitar estudos desta índole, cria ligações irreversíveis por formação de reações cruzadas levando à fragmentação dos nucleótidos. (72,105) Portanto, extrair ADN/ARN de amostras fixadas em FNT a 10% é um desafio, visto que trabalhamos com fragmentos menores, necessitando de kits com características particulares. Quanto maior for o período de fixação (superior a 48-72 horas), piores os resultados obtidos. (83,114) Já o FA pode desnaturar os antigénios através do excesso de coagulação, tornando a recuperação antigénica menos eficaz, exigindo tempos de fixação mais curtos (máximo 24 horas). (82) Para além do mais, degrada ainda mais o ADN/ARN do que o FNT a 10%, pois fá-lo através das reações cruzadas e da coagulação, dificultando estudos de biologia molecular, visto que condiciona a integridade dos ácidos nucleicos. (71) Também o pH ácido pode causar degradação dos ácidos nucleicos. (84)

A nível de técnicas histoquímicas, o impacto dos fixadores FNT a 10% e FA é variável, dependendo da coloração em causa. Tendo em conta que o protocolo que seguimos implica 20 dias de fixação em FA, a realização de técnicas complementares como a imuno-histoquímica e biologia molecular, neste tipo de amostra, fica amplamente comprometida. No entanto, na prática diária raramente é necessária a realização de técnicas complementares em encéfalos fetais e perinatais humanos.

Para contornar estas limitações, sugere-se o estudo de fixadores alternativos, como a formalina-zinco ou o glioxal, conforme recomendam artigos recentes. (115,116) Embora ainda não existam trabalhos publicados sobre o uso de formalina-zinco na neuropatologia, nem evidências sobre a aplicação do glioxal em encéfalos fetais/perinatais, estas abordagens surgem como opções promissoras.

A nível de limitações metodológicas identificadas na TFAA, devem considerar-se os custos adicionais (ainda que reduzidos), o acréscimo de etapas nos protocolos e a



necessidade de formação técnica. Estas limitações não anulam a utilidade prática da sua realização, mas sublinham a importância da otimização para maior eficiência dos fluxos de trabalho e tempos de resposta mais rápidos e a necessidade de formação contínua.

Assim, apesar de todas as técnicas permitirem a obtenção de preparações histológicas viáveis, a nossa análise qualitativa e quantitativa evidencia que a inclusão em ágar pós-fixação em FA poderá mudar o paradigma na área pois facilita significativamente o exame macroscópico, a microtomia e a análise microscópica de preparações histológicas coradas pela HE. Esta apresenta vantagens como a facilidade de execução e a reprodutibilidade interoperador. Além disso, acarreta custos monetários reduzidos, não exige muitos recursos humanos e materiais, permite a padronização do procedimento e, principalmente, a manutenção da integridade dos fragmentos durante as diversas etapas. Adicionalmente, a TFAA é a única metodologia que permite manter a orientação das fatias de encéfalo, preservando a sua disposição original, o que é crucial caso seja necessário colher fragmentos adicionais. Ademais, apesar da inclusão em ágar exigir um tempo extra de 15 minutos de preparação, com cerca de 2 horas de espera, este investimento é compatível com as exigências da rotina laboratorial e os tempos de resposta para diagnóstico em Anatomia Patológica. Posto isto, propõe-se a implementação da técnica de inclusão em ágar após a fixação em formol-acético para o exame macroscópico de encéfalos fetais e perinatais humanos.

5.1. Limitações do estudo e perspetivas futuras

Neste estudo, identificaram-se diversos efeitos confundidores que deverão ser eliminados em investigações futuras. Em primeiro lugar, o tamanho reduzido da amostra e a impossibilidade de submeter o mesmo encéfalo às três técnicas em estudo restringiram a generalização dos resultados, reforçando a necessidade de aumentar substancialmente o tamanho da amostra.

Para além disto, a variação das idades gestacionais, dos graus de maceração e do desfecho obstétrico/perinatal dos encéfalos avaliados pode ter influenciado a interpretação dos resultados, motivo pelo qual se propõe, em estudos futuros, a seleção rigorosa de encéfalos com idades gestacionais e graus de maceração uniformes, possibilitando a formação de grupos equiparáveis.



Destaca-se também o facto da colheita de fragmentos ter sido efetuada para cassetes histológicas padrão e/ou megacassetes. Os fragmentos colhidos para megacassetes exigem um tempo de processamento superior, sendo necessários mais estudos para verificar se existem alterações associadas a este fator, contudo os resultados obtidos foram promissores.

Pretende-se ainda continuar o estudo com a realização da técnica de inclusão em ágar pós-fixação em FA em encéfalos com patologia do SNC, a realização de perfusão interventricular com ágar em casos de ventriculomegalias e/ou quistos, bem como a investigação da aplicabilidade de técnicas de histoquímica, imuno-histoquímica e biologia molecular em encéfalos preservados com recurso a esta técnica.

Pelo exposto, propõe-se a elaboração de um protocolo a partir do presente estudo e a realização de um estudo inter-hospitalar com esse protocolo, de forma a este ser avaliado em diferentes contextos, considerando níveis de recursos e número de amostras distintos. Desta forma, com o *feedback* das outras instituições poderá ser possível efetuar um protocolo padronizado. A adoção de protocolos padronizados beneficia não só a formação de profissionais, como a qualidade do diagnóstico, para além de permitir a criação de redes colaborativas e promover o desenvolvimento de iniciativas multicêntricas.



6. Conclusão

A preservação dos encéfalos fetais e perinatais humanos é crucial para estudos *post mortem*, sobretudo no âmbito do diagnóstico anatomopatológico, visto que o exame neuropatológico continua a ser uma ferramenta indispensável no controlo de qualidade e na avaliação da acuidade do diagnóstico pré-natal. Tendo em conta que os processos naturais de maceração e autólise podem comprometer significativamente a integridade dos tecidos, a fixação torna-se uma etapa indispensável.

Adicionalmente, o desenvolvimento do SNC é marcado pela fragilidade, que reflete um elevado conteúdo hídrico, quantidade reduzida de mielina e suscetibilidade a eventos hipóxico-iscémicos. Posto isto, são necessários métodos de preservação robustos, especialmente em contextos desafiadores como a presença de maceração, intervalos prolongados entre a morte e a realização da autópsia/exame neuropatológico e encéfalos de tamanho reduzido/idades gestacionais precoces e/ou afetados por anomalias congénitas.

Embora todas as técnicas permitam a obtenção de preparações histológicas viáveis, o presente estudo mostra que a inclusão em ágar após a fixação em FA constitui a melhor abordagem para o exame macroscópico de encéfalos fetais e perinatais humanos, pois facilita esta etapa, permitindo a realização de secções representativas e de qualidade.

A TFAA facilita a preservação do encéfalo durante o exame macroscópico, secção e colheita de fragmentos, mas também facilita toda a rotina histológica subsequente, exigindo um tempo adicional de 15 minutos de preparação e um intervalo de espera de aproximadamente 2 horas. Entre as suas vantagens destacam-se a facilidade de execução e reprodutibilidade interoperador, custos monetários reduzidos, não exigir muitos recursos humanos e materiais e permitir a padronização do procedimento. Além disso, verifica-se que a inclusão em ágar é a única técnica que permite manter a orientação das fatias dos encéfalos fetais/perinatais humanos, preservando a sua disposição original, facilitando a colheita de fragmentos adicionais, se necessário.

Dado os resultados promissores, e ainda que sejam necessários estudos adicionais, esta técnica já foi implementada no Serviço de Anatomia Patológica da Unidade Local de Saúde de Santa Maria, tendo sido aplicada, até à data, a cerca de 80 encéfalos fetais e perinatais humanos. Considerando que nesta instituição se realizam, em média, cerca de 140 exames



deste tipo por ano, a adoção desta técnica revelou-se particularmente vantajosa, por ser uma solução tempo-efetiva, económica e reprodutível, sem comprometer os exames macro e microscópico.

O presente estudo é um ponto de partida robusto para a implementação desta técnica por outras instituições, visando a elaboração de um protocolo que padronize os procedimentos laboratoriais no âmbito da neuropatologia fetal.



Referências Bibliográficas

1. European Surveillance of Congenital Anomalies (EUROCAT). EUROCAT Website Database [Internet]. Belfast: University of Ulster. 2025 [cited 2025 Aug 18]. Available from: <https://www.eurocat-network.eu/>
2. Braz P, Machado A, Roquette R, Dias CM, Jorge DR. Registo Nacional de Anomalias Congénitas - Relatório 2018-2019 [Internet]. Lisboa; 2021. Available from: <https://www.insa.min-saude.pt/renac-relatorio-2018-2019/>
3. Boyd P, DeVigan C, Khoshnood B, Loane M, Garne E, Dolk H. Survey of prenatal screening policies in Europe for structural malformations and chromosome anomalies, and their impact on detection and termination rates for neural tube defects and Down's syndrome. *BJOG An Int J Obstet Gynaecol* [Internet]. 2008 May 9;115(6):689-96. Available from: <https://obgyn.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1471-0528.2008.01700.x>
4. Aydın E, Tanacan A, Büyükeren M, Uçkan H, Yurdakök M, Beksaç MS. Congenital central nervous system anomalies: Ten-year single center experience on a challenging issue in perinatal medicine. *J Turkish-German Gynecol Assoc* [Internet]. 2019 Sep 1;20(3):170-7. Available from: http://cms.galenos.com.tr/Uploads/Article_19457/JTGGA-20-170-En.pdf
5. Adama van Scheltema PN, Nagel HTC, Brouwer OF, Vandenbussche FPHA. Outcome of children with prenatally diagnosed central nervous system malformations. *Ultrasound Obstet Gynecol* [Internet]. 2003 Jan 11;21(1):41-7. Available from: <https://obgyn.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/uog.6>
6. Ramm E, Perdriolle-Galet E, Bach-Segura P, Bassnagel P, Morel O, Dap M. Additional value of fetal magnetic resonance imaging for prenatal diagnosis: A retrospective study. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* [Internet]. 2025 Apr;307:1-6. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0301211525000351>
7. Rossi AC, Prefumo F. Correlation between fetal autopsy and prenatal diagnosis by ultrasound: A systematic review. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* [Internet]. 2017 Mar;210:201-6. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0301211516310867>
8. Ozdemir O, Aksoy F, Sen C. Comparison of prenatal central nervous system abnormalities with postmortem findings in fetuses following termination of



- pregnancy and clinical utility of postmortem examination. *J Perinat Med* [Internet]. 2022 Jul 26;50(6):769–76. Available from: <https://www.degruyter.com/document/doi/10.1515/jpm-2021-0501/html>
9. Struksnæs C, Blaas H-GK, Vogt C. Autopsy Findings of Central Nervous System Anomalies in Intact Fetuses Following Termination of Pregnancy After Prenatal Ultrasound Diagnosis. *Pediatr Dev Pathol* [Internet]. 2019 Dec 29;22(6):546–57. Available from: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/1093526619860385>
 10. Ramos F, Maia S, Branco M, Raposo J, Sá J, Sousa S, et al. Accuracy of Prenatal Diagnosis in Elective Termination of Pregnancy: 385 Cases from 2000 to 2007. *ISRN Obstet Gynecol* [Internet]. 2011 Nov 8;2011:1–5. Available from: <https://www.hindawi.com/journals/isrn/2011/458120/>
 11. ONKAR D. Evaluation of Fetal Central Nervous System Anomalies by Ultrasound and Its Anatomical Co-relation. *J Clin DIAGNOSTIC Res* [Internet]. 2014;8(6):7–9. Available from: http://jcdr.net/article_fulltext.asp?issn=0973-709x&year=2014&volume=8&issue=6&page=AC05&issn=0973-709x&id=4437
 12. Suhren J-T, Hussein K, Kreipe H, Schaumann N. Comparison of Prenatal and Postmortem Diagnoses from 251 Fetal Autopsies: High Rate of Placenta Pathologies, Low Rate of Discrepancies. *Fetal Pediatr Pathol* [Internet]. 2023 Jul 4;42(4):630–41. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/15513815.2023.2201623>
 13. Venkataswamy C, Gurusamy U, Lakshmi SV. Second-trimester fetal autopsy: A morphological study with prenatal USG correlations and clinical implications. *J Lab Physicians* [Internet]. 2018 Jul 19;10(03):338–45. Available from: <https://jlabphy.org/second-trimester-fetal-autopsy-a-morphological-study-with-prenatal-usg-correlations-and-clinical-implications/>
 14. Vinutha SP, Narayanappa D, Manjunath G V., Sujatha MS, Sapna Patel MC, Bhat D. The Spectrum of Congenital Central Nervous System Anomalies Among Stillborn: An Autopsy Based Study. *Ann Neurosci* [Internet]. 2020 Jul 1;27(3–4):224–31. Available from: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/0972753121990169>
 15. Byrne AB, Arts P, Ha TT, Kassahn KS, Pais LS, O'Donnell-Luria A, et al. Genomic autopsy to identify underlying causes of pregnancy loss and perinatal death. *Nat Med* [Internet]. 2023 Jan 19;29(1):180–9. Available from:



- <https://www.nature.com/articles/s41591-022-02142-1>
16. Das RN, Mandal B, Das M, Sil K, Mukherjee S, Chatterjee U. Perinatal and Fetal Autopsies in Neuropathology: How I do it. *Indian J Pathol Microbiol* [Internet]. 2022 May;65(Supplement):S207–17. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/35562151>
 17. Lechpammer M, Del Bigio M, Folkerth R. Perinatal Neuropathology [Internet]. Cambridge, editor. Vol. 24, Continuum (Minneapolis, Minn.). Cambridge University Press; 2021. 72–95 p. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29432238>
 18. Khong TY, Malcomson RDG, editors. Keeling's Fetal and Neonatal Pathology [Internet]. 6th ed. Cham: Springer International Publishing; 2022. 947 p. Available from: <https://link.springer.com/10.1007/978-3-030-84168-3>
 19. Thomson C. The pathology of foetal maceration. *Obstetr Gynaecol Brit Empire*. 1927. 40–71 p.
 20. van Dijk MCRF, Kornegoor R, Mol S, Rodriguez M. Fetal and Perinatal Brain Autopsy: Useful Macroscopic Techniques Including Agar In-situ and Pre-Embedding Methods. *Pediatr Dev Pathol* [Internet]. 2021 Aug 18;24(4):299–308. Available from: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/10935266211000036>
 21. Widdowson EM, Dickerson JWT. The effect of growth and function on the chemical composition of soft tissues. *Biochem J* [Internet]. 1960 Oct 1;77(1):30–43. Available from: <https://portlandpress.com/biochemj/article/77/1/30/52284/The-effect-of-growth-and-function-on-the-chemical>
 22. Vasung L, Lepage C, Radoš M, Pletikos M, Goldman JS, Richiardi J, et al. Quantitative and Qualitative Analysis of Transient Fetal Compartments during Prenatal Human Brain Development. *Front Neuroanat* [Internet]. 2016 Feb 24;10(FEB). Available from: <http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fnana.2016.00011/abstract>
 23. Pinar H, Koch M, Hawkins H, Heim-Hall J, Shehata B, Thorsten V, et al. The Stillbirth Collaborative Research Network Neuropathologic Examination Protocol. *Am J Perinatol* [Internet]. 2011 Dec 21;28(10):793–802. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3624763/pdf/nihms412728.pdf>
 24. Gilles FH, Dooling E, Fulchiero A. Sequence of myelination in the human fetus. *Trans*



- Am Neurol Assoc [Internet]. 1976;101:244–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1028249>
25. Gilles FH. Myelination in the neonatal brain. [Internet]. Vol. 7, Human pathology. 1976. 244–8 p. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/57917>
26. BRODY BA, KINNEY HC, KLOMAN AS, GILLES FH. Sequence of Central Nervous System Myelination in Human Infancy. I. An Autopsy Study of Myelination. *J Neuropathol Exp Neurol* [Internet]. 1987 May;46(3):283–301. Available from: <https://academic.oup.com/jnen/article-lookup/doi/10.1097/00005072-198705000-00005>
27. Song L, Mishra V, Ouyang M, Peng Q, Slinger M, Liu S, et al. Human Fetal Brain Connectome: Structural Network Development from Middle Fetal Stage to Birth. *Front Neurosci* [Internet]. 2017 Oct 13;11. Available from: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fnins.2017.00561/full>
28. Stiles J, Jernigan TL. The Basics of Brain Development. *Neuropsychol Rev* [Internet]. 2010 Dec 3;20(4):327–48. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s11065-010-9148-4>
29. Wälchli T, Bisschop J, Carmeliet P, Zadeh G, Monnier PP, De Bock K, et al. Shaping the brain vasculature in development and disease in the single-cell era. *Nat Rev Neurosci* [Internet]. 2023 May 20;24(5):271–98. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41583-023-00684-y>
30. Kostović I, Sedmak G, Judaš M. Neural histology and neurogenesis of the human fetal and infant brain. *Neuroimage* [Internet]. 2019 Mar;188(December 2018):743–73. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1053811918321876>
31. Quartu M, Serra MP, Manca A, Mascia F, Follesa P, Del Fiacco M. Neurturin, persephin, and artemin in the human pre- and full-term newborn and adult hippocampus and fascia dentata. *Brain Res* [Internet]. 2005 Apr 18;1041(2):157–66. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006899305002325>
32. Loo CKC, Freeman B, Quinton A, Yong J, Killingsworth M. The significance of cerebral mantle thickness in fetal ventriculomegaly at autopsy. *Pathology* [Internet]. 2004 Jun;36(3):247–53. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0031302516341964>
33. Gaitanis J, Tarui T. Nervous System Malformations. *Contin Lifelong Learn Neurol*



- [Internet]. 2018 Feb;24(1):72–95. Available from: <https://journals.lww.com/00132979-201802000-00007>
34. Krassner MM, Kauffman J, Sowa A, Cialowicz K, Walsh S, Farrell K, et al. Postmortem changes in brain cell structure: a review. *Free Neuropathol.* 2023;4:1–53.
35. Thayyil S, Sebire NJ, Chitty LS, Wade A, Olsen O, Gunny RS, et al. Post mortem magnetic resonance imaging in the fetus, infant and child: a comparative study with conventional autopsy (MaRIAS Protocol). *BMC Pediatr* [Internet]. 2011 Dec 22;11(1):120. Available from: <https://bmcpediatr.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2431-11-120>
36. Griffiths PD, Variend D, Evans M, Jones A, Wilkinson ID, Paley MNJ, et al. Postmortem MR imaging of the fetal and stillborn central nervous system. *AJNR Am J Neuroradiol* [Internet]. 2003 Jan;24(1):22–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12533322>
37. Strachan GI. The Pathology Of Foetal Maceration: A Study of 24 cases. *Br Med J* [Internet]. 1922;2(3211):80–82. Available from: <http://www.jstor.org/stable/20420547>
38. Cohen MC, Scheimberg I. Forensic Aspects of Perinatal Deaths. *Acad Forensic Pathol* [Internet]. 2018 Sep;8(3):452–91. Available from: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/1925362118797725>
39. Cohen M, Roessmann U. In utero Brain Damage: Relationship of Gestational Age to Pathological Consequences. *Dev Med Child Neurol* [Internet]. 1994 Mar 12;36(3):263–8. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1469-8749.1994.tb11839.x>
40. Montaldo P, Addison S, Oliveira V, Lally PJ, Taylor AM, Sebire NJ, et al. Quantification of maceration changes using post mortem MRI in fetuses. *BMC Med Imaging* [Internet]. 2016 Apr 27;16(1):34. Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/s12880-016-0137-9>
41. Hustings N, Thonissen Y, Cockmartin L, Vanderseyen K, Baldewijns M, De Catte L, et al. Fetal brain maceration score on postmortem magnetic resonance imaging vs. conventional autopsy. *Pediatr Radiol* [Internet]. 2023 May 29;53(5):929–41. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00247-022-05559-5>
42. Gold KJ, Abdul-Mumin AS, Boggs ME, Opare-Addo HS, Lieberman RW. Assessment



- of “fresh” versus “macerated” as accurate markers of time since intrauterine fetal demise in low-income countries. *Int J Gynecol Obstet* [Internet]. 2014 Jun 4;125(3):223–7. Available from: <https://obgyn.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1016/j.ijgo.2013.12.006>
43. Sebire NJ. Detection of fetal growth restriction at autopsy in non-anomalous stillborn infants. *Ultrasound Obstet Gynecol* [Internet]. 2014 Mar 4;43(3):241–4. Available from: <https://obgyn.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/uog.13295>
 44. Jakovcevski I. Oligodendrocyte development and the onset of myelination in the human fetal brain. *Front Neuroanat* [Internet]. 2009;3(JUN):1–15. Available from: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/neuro.05.005.2009/abstract>
 45. Hasegawa M, Houdou S, Mito T, Takashima S, Asanuma K, Ohno T. Development of myelination in the human fetal and infant cerebrum: A myelin basic protein immunohistochemical study. *Brain Dev* [Internet]. 1992 Jan;14(1):1–6. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0387760412802713>
 46. Leibovitz Z, Lerman-Sagie T, Haddad L. Fetal Brain Development: Regulating Processes and Related Malformations. *Life* [Internet]. 2022 May 29;12(6):809. Available from: <https://www.mdpi.com/2075-1729/12/6/809>
 47. Ruoss K, Lövblad K, Schroth G, Moessinger AC, Fusch C. Brain Development (Sulci and Gyri) as Assessed by Early Postnatal MR Imaging in Preterm and Term Newborn Infants. *Neuropediatrics* [Internet]. 2001 Apr;32(2):69–74. Available from: <http://www.thieme-connect.de/DOI/DOI?10.1055/s-2001-13871>
 48. McArdle CB, Richardson CJ, Nicholas DA, Mirfakhraee M, Hayden CK, Amparo EG. Developmental features of the neonatal brain: MR imaging. Part I. Gray-white matter differentiation and myelination. *Radiology* [Internet]. 1987 Jan;162(1):223–9. Available from: <http://pubs.rsna.org/doi/10.1148/radiology.162.1.3786767>
 49. Albayrak E, Kasap T. Evaluation of Neonatal Brain Parenchyma Using 2-Dimensional Shear Wave Elastography. *J Ultrasound Med* [Internet]. 2018 Apr 29;37(4):959–67. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jum.14366>
 50. White T, Su S, Schmidt M, Kao C-Y, Sapiro G. The development of gyrification in childhood and adolescence. *Brain Cogn* [Internet]. 2010 Feb;72(1):36–45. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0278262609002012>
 51. Genest DR, Singer DB. Estimating the time of death in stillborn fetuses: III. External



- fetal examination; a study of 86 stillborns. *Obstet Gynecol* [Internet]. 1992 Oct;80(4):593–600. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1407878>
52. Langley FA. The perinatal postmortem examination. *J Clin Pathol* [Internet]. 1971 Mar;24(2):159–69. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5551383>
53. Genest DR, Williams MA, Greene MF. Estimating the time of death in stillborn fetuses: I. Histologic evaluation of fetal organs; an autopsy study of 150 stillborns. *Obstet Gynecol* [Internet]. 1992 Oct;80(4):575–84. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1383898>
54. Genest DR. Fetal death: maceration, autolysis and retention. Reed GB, Claireaux AE CF, editor. *Diseases of the fetus and newborn*. London: Chapman & Hall; 1995.
55. Man J, Hutchinson JC, Ashworth M, Jeffrey I, Heazell AE, Sebire NJ. Organ weights and ratios for postmortem identification of fetal growth restriction: utility and confounding factors. *Ultrasound Obstet Gynecol* [Internet]. 2016 Nov 25;48(5):585–90. Available from: <https://obgyn.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/uog.16017>
56. Zissler A, Stoiber W, Steinbacher P, Geissenberger J, Monticelli FC, Pittner S. Postmortem Protein Degradation as a Tool to Estimate the PMI: A Systematic Review. *Diagnostics* [Internet]. 2020 Nov 26;10(12):1014. Available from: <https://www.mdpi.com/2075-4418/10/12/1014>
57. Northington FJ, Chavez-Valdez R, Martin LJ. Neuronal cell death in neonatal hypoxia-ischemia. *Ann Neurol* [Internet]. 2011 May 22;69(5):743–58. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ana.22419>
58. Friedman AH, Fahey JT. The transition from fetal to neonatal circulation: normal responses and implications for infants with heart disease. *Semin Perinatol* [Internet]. 1993 Apr;17(2):106–21. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8327901>
59. Bowker RM, Yan X, Managlia E, Liu SXL, Marek C, Tan X, et al. Dimethyloxalylglycine preserves the intestinal microvasculature and protects against intestinal injury in a neonatal mouse NEC model: role of VEGF signaling. *Pediatr Res* [Internet]. 2018 Feb 25;83(2):545–53. Available from: <https://www.nature.com/articles/pr2017219>
60. Kimura RE, Warshaw JB. Metabolic Adaptations of the Fetus and Newborn. *J Pediatr*



- Gastroenterol Nutr [Internet]. 1983;2:12–5. Available from: <http://journals.lww.com/00005176-198300201-00003>
61. Viaene AN. A role for immunohistochemical stains in perinatal brain autopsies. *J Neuropathol Exp Neurol* [Internet]. 2024 Apr 19;83(5):345–56. Available from: <https://academic.oup.com/jnen/article/83/5/345/7618855>
 62. Megyesi MS, Nawrocki SP, Haskell NH. Using accumulated degree–days to estimate the postmortem interval from decomposed human remains. *J Forensic Sci* [Internet]. 2005 May;50(3):618–26. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15932096>
 63. Parisi F, Degl’Innocenti S, Aytas Ç, Pirone A, Cantile C. Morphological and Immunohistochemical Changes in Progressive Postmortem Autolysis of the Murine Brain. *Animals* [Internet]. 2024 Dec 20;14(24):3676. Available from: <https://www.mdpi.com/2076-2615/14/24/3676>
 64. Peyvandi S, Rollins C. Fetal Brain Development in Congenital Heart Disease. *Can J Cardiol* [Internet]. 2023 Feb;39(2):115–22. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0828282X22008935>
 65. Vlasyuk VV. Features of Opening the Skull and Extracting the Brain from the Skull. In: *Birth Trauma and Perinatal Brain Damage* [Internet]. Cham: Springer International Publishing; 2019. p. 137–45. Available from: http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-93441-9_13
 66. Bass T, Bergevin MA, Werner AL, Liuzzi FJ, Scott DE. In Situ Fixation of the Neonatal Brain and Spinal Cord [Internet]. Vol. 13, *Pediatric Pathology*. 1993. 699–705 p. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/15513819309048255>
 67. Prahlow JA, Ross KF, Salzberger L, Lott EG, Guileyardo JM, Barnard JJ. Immersion technique for brain removal in perinatal autopsies. *J Forensic Sci* [Internet]. 1998 Sep 1;43(5):1056–60. Available from: <http://www.astm.org/doiLink.cgi?JFS14357J>
 68. Nicholls JM. Rapid method for fetal brain fixation. *J Clin Pathol* [Internet]. 1988 Sep 1;41(9):1019–20. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2404306>
 69. Barrett C, Brett F, Grehan D, McDermott MB. Heat–Accelerated Fixation and Rapid Dissection of the Pediatric Brain at Autopsy: A Pragmatic Approach to the Difficulties of Organ Retention. *Pediatr Dev Pathol* [Internet]. 2004 Nov 11;7(6):595–600.



- Available from: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1007/s10024-004-0041-0>
70. Cimmino A, Parisi G, Mastropasqua MG, Ricco R. A new technique for foetal brain fixation and extraction. *Pathologica* [Internet]. 2002 Dec 1;94(6):320–4. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s102420200058>
 71. Paradiso B, Simonato M, Thiene G, Lavezzi A. From fix to fit into the autoptic human brains. *Eur J Histochem* [Internet]. 2018 Aug 27;62(3):257–65. Available from: <https://www.ejh.it/index.php/ejh/article/view/2944>
 72. Kim Suvarna Kim Suvarna Christopher Layton John Bancroft. *Bancroft's - Theory and Practice of Histological Techniques*. 7th Ed. United Kingdom: Churchill Livingstone: Elsevier; 2012. 654 p.
 73. Howat WJ, Wilson BA. Tissue fixation and the effect of molecular fixatives on downstream staining procedures. *Methods* [Internet]. 2014 Nov;70(1):12–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ymeth.2014.01.022>
 74. Baker JR. *Principles of biological microtechnique; a study of fixation and dyeing* [Internet]. London: Methuen; 1958. Available from: <https://www.biodiversitylibrary.org/bibliography/5905>
 75. Grizzle WE. Special symposium: fixation and tissue processing models. *Biotech Histochem* [Internet]. 2009 Oct 3;84(5):185–93. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/10520290903039052>
 76. Perry C, Chung J-Y, Ylaya K, Choi CH, Simpson A, Matsumoto KT, et al. A Buffered Alcohol-Based Fixative for Histomorphologic and Molecular Applications. *J Histochem Cytochem* [Internet]. 2016 Jul 24;64(7):425–40. Available from: <https://journals.sagepub.com/doi/10.1369/0022155416649579>
 77. Miller GM, Stears JC, Guggenheim MA, Wilkening GN. Schizencephaly. *Neurology* [Internet]. 1984 Aug;34(8):997–997. Available from: <https://www.neurology.org/doi/10.1212/WNL.34.8.997>
 78. MacKenzie JM. Examining the Decomposed Brain. *Am J Forensic Med Pathol* [Internet]. 2014 Dec;35(4):265–70. Available from: <https://journals.lww.com/00000433-201412000-00012>
 79. Nahmias A, Keyserling H KG. *Diseases of the fetus and newborn infant*. Philadelphia:WB Saunders. 1983. 636–78 p.
 80. Nardi L, Schmeisser MJ, Schumann S. Fixation and staining methods for



- macroscopical investigation of the brain. *Front Neuroanat* [Internet]. 2023 Jun 22;17(1):122–31. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10668998>
81. Harrison PT. An ethanol-acetic acid-formol saline fixative for routine use with special application to the fixation of non-perfused rat lung. *Lab Anim* [Internet]. 1984 Oct 1;18(4):325–31. Available from: <https://journals.sagepub.com/doi/10.1258/002367784780865324>
82. Machaalani R, Radford JL, Waters KA. Tissue fixation effects on immunohistochemical staining of caspase-3 in brain tissue. *Appl Immunohistochem Mol Morphol AIMM* [Internet]. 2007 Dec;15(4):463–70. Available from: <https://journals.lww.com/00129039-200712000-00017>
83. Srinivasan M, Sedmak D, Jewell S. Effect of fixatives and tissue processing on the content and integrity of nucleic acids. *Am J Pathol* [Internet]. 2002 Dec;161(6):1961–71. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0002944010644720>
84. Koji T. Reflections on the Principles of Fixation in Histochemistry and Cytochemistry: With a Special Focus on Immunohistochemistry and *In Situ* Hybridization. *ACTA Histochem Cytochem* [Internet]. 2025 Apr 26;58(2):25–00006. Available from: https://www.jstage.jst.go.jp/article/ahc/58/2/58_25-00006/_article
85. de Wit OA, den Dunnen WFA, Sollie KM, Muñoz RI, Meiners LC, Brouwer OF, et al. Pathogenesis of cerebral malformations in human fetuses with meningocele. *Cerebrospinal Fluid Res* [Internet]. 2008 Dec 1;5(1):4. Available from: <https://fluidsbarrierscns.biomedcentral.com/articles/10.1186/1743-8454-5-4>
86. Smart A, Tisca C, Huszar IN, Kor D, Ansorge O, Tachrount M, et al. Protocol for tissue processing and paraffin embedding of mouse brains following ex vivo MRI. *STAR Protoc* [Internet]. 2023 Dec 15;4(4):102681. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.xpro.2023.102681>
87. SHACKELFORD, R. I., AND JONES JL. An embedding medium for permanent sections of exudative material and fragments of tissue removed for biopsy. *Am J Clin Path.* 1959;(32):397–8.
88. Klekamp J, Riedel A, Herrmann A, Kretschmann HJ. A new embedding and sectioning technique (macrovibratome) for macroscopic and morphometric examinations especially of the human brain. *J Hirnforsch* [Internet]. 1985;26(1):33–40. Available



- from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3886780>
89. Ridolfi M, Paudice M, Salvi S, Valle L, Gualco M, Perasole A, et al. Agar pre-embedding of small skin biopsies: real-life benefits and challenges in high throughput pathology laboratories. *J Clin Pathol* [Internet]. 2019 Jun;72(6):448–51. Available from: <https://jcp.bmj.com/lookup/doi/10.1136/jclinpath-2018-205680>
 90. Das N, Tripathi N, Basu S, Bose C, Maitra S, Khurana S. Progress in the development of gelling agents for improved culturability of microorganisms. *Front Microbiol* [Internet]. 2015 Jul 23;6(JUN):1–7. Available from: <http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fmicb.2015.00698/abstract>
 91. Liao Y-C, Chang C-C, Nagarajan D, Chen C-Y, Chang J-S. Algae-derived hydrocolloids in foods: applications and health-related issues. *Bioengineered* [Internet]. 2021 Dec 19;12(1):3787–801. Available from: <https://doi.org/10.1080/21655979.2021.1946359>
 92. Tuberkulose DÄ Der. Die Atiologie der Tuberculose. Facsimile of the original contribution by Robert Koch in “Berliner Klinische Wochenschrift.” *Fortschr Med* [Internet]. 1982 Mar 25;100(12):539. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6804345>
 93. Xiao J, Wang S-R. A new slicing method for the lower vertebrate brain: Brain mould and adjustable stage. *J Neurosci Methods* [Internet]. 1998 Mar;80(1):13–7. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0165027097001799>
 94. Kerstens HMJ, Robben JCM, Poddighe PJ, Melchers WJG, Boonstra H, De Wilde PCM, et al. Agarcyto: A novel cell-processing method for multiple molecular diagnostic analyses of the uterine cervix. *J Histochem Cytochem*. 2000;48(5):709–18.
 95. Olson NJ, Gogel HK, Williams WL, Mettler FA. Processing of aspiration cytology samples. An alternative method. *Acta Cytol* [Internet]. 1986;30(4):409–12. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3526781>
 96. Ventura L, Bologna M, Ventura T, Colimberti P, Leocata P. Agar specimen orientation technique revisited: A simple and effective method in histopathology. *Ann Diagn Pathol* [Internet]. 2001 Apr 13;5(2):107–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9606045>
 97. Osborn M, Lowe J, Cox P, Hargitai B, Marton T. The Royal College of Pathologists. Guidelines on autopsy practice: Fetal autopsy (2nd trimester fetal loss and



- termination of pregnancy for congenital anomaly). *Pathol Sci* behind cure. 2017;1–17.
98. Lowe, Jim; Osborn, Michael; Cox, Phillip; Hargitai, Beata; Marton T. Guidelines on autopsy practice Third trimester antepartum and intrapartum stillbirth. *R Coll Pathol*. 2017;(June):1–17.
99. Royal College of Pathologists. Guidelines on autopsy practice: Neonatal death. Osborn, Michael Cox, Phillip Hargitai, Beata Marton, Tamas. 2019;1–19.
100. AD B. The perinatal autopsy. In: *Neonatal medicine*. Oxford: Blackwell Scientific; 1974. p. 820–34.
101. Ernst LM, Ruchelli ED, Huff DS, editors. *Color Atlas of Fetal and Neonatal Histology* [Internet]. New York, NY: Springer New York; 2011. 414 p. Available from: <https://link.springer.com/10.1007/978-1-4614-0019-6>
102. Garman RH. Histology of the Central Nervous System. *Toxicol Pathol* [Internet]. 2011 Jan 30;39(1):22–35. Available from: <https://journals.sagepub.com/doi/10.1177/0192623310389621>
103. Isaacson G. Postmortem examination of infant brains. Techniques for removal, fixation, and sectioning. *Arch Pathol Lab Med* [Internet]. 1984 Jan;108(1):80–1. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6546346>
104. República A da. Lei n.º 16/2007, de 17 de abril [Internet]. *Diário da República*, 1.a série — N.º 75 p. 2417–8. Available from: <https://diariodarepublica.pt/dr/detalhe/lei/16-2007-519464>
105. Masuda N, Ohnishi T, Kawamoto S, Monden M, Okubo K. Analysis of chemical modification of RNA from formalin-fixed samples and optimization of molecular biology applications for such samples. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 1999 Nov 1;27(22):4436–43. Available from: <https://academic.oup.com/nar/article-lookup/doi/10.1093/nar/27.22.4436>
106. Hopwood D. Fixatives and fixation: a review. *Histochem J* [Internet]. 1969 May;1(4):323–60. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/BF01003278>
107. Start RD, Layton CM, Cross SS, Smith JHF. Reassessment of the rate of fixative diffusion. *J Clin Pathol* [Internet]. 1992 Dec;45(12):1120–1. Available from: <https://jcp.bmj.com/lookup/doi/10.1136/jcp.45.12.1120>
108. DEMPSTER WT. Rates of penetration of fixing fluids. *Am J Anat* [Internet]. 1960 Jul 3;107(1):59–72. Available from:



- <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/aja.1001070105>
109. Dannhorn A, Swales JG, Hamm G, Strittmatter N, Kudo H, Maglennon G, et al. Evaluation of Formalin-Fixed and FFPE Tissues for Spatially Resolved Metabolomics and Drug Distribution Studies. *Pharmaceuticals* [Internet]. 2022 Oct 23;15(11):1307. Available from: <https://www.mdpi.com/1424-8247/15/11/1307>
 110. Mouritzen Dam A. Shrinkage of the brain during histological procedures with fixation in formaldehyde solutions of different concentrations. *J Hirnforsch* [Internet]. 1979;20(2):115–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/556570>
 111. Shelmerdine SC, Langan D, Mandalia U, Sebire NJ, Arthurs OJ. Maceration determines diagnostic yield of fetal and neonatal whole body post-mortem ultrasound. *Prenat Diagn* [Internet]. 2020 Jan 29;40(2):232–43. Available from: <https://obgyn.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/pd.5615>
 112. Yan P, Seelentag W, Bachmann A, Bosman FT. An Agarose Matrix Facilitates Sectioning of Tissue Microarray Blocks. *J Histochem Cytochem* [Internet]. 2007 Jan 1;55(1):21–4. Available from: <https://journals.sagepub.com/doi/10.1369/jhc.6A6987.2006>
 113. Paavilainen L, Edvinsson Å, Asplund A, Hober S, Kampf C, Pontén F, et al. The Impact of Tissue Fixatives on Morphology and Antibody-based Protein Profiling in Tissues and Cells. *J Histochem Cytochem* [Internet]. 2010 Mar 9;58(3):237–46. Available from: <https://journals.sagepub.com/doi/10.1369/jhc.2009.954321>
 114. Colburn ME, Delaney MA, Anchor GC, Terio KA. Effect of formalin-fixation and paraffin-embedded tissue storage times on RNAscope in situ hybridization signal amplification. *J Vet Diagnostic Investig* [Internet]. 2024 Jul 22;36(4):498–505. Available from: <https://journals.sagepub.com/doi/10.1177/10406387241245777>
 115. 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. *Lab Invest* [Internet]. 2003 Jun;83(6):889–99. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S002368372203522X>
 116. Konno K, Yamasaki M, Miyazaki T, Watanabe M. Glyoxal fixation: An approach to solve immunohistochemical problem in neuroscience research. *Sci Adv* [Internet]. 2023 Jul 14;9(28). Available from: <https://www.science.org/doi/10.1126/sciadv.adf7084>

P.PORTO

ESCOLA
SUPERIOR
DE SAÚDE



M

MESTRADO

TÉCNICAS LABORATORIAIS EM BIOPATOLOGIA