

Reconhecimento de artefatos durante a análise de lâminas histológicas: uma revisão integrativa

Recognizing of artifacts during the analysis of histologic slides: a integrative review

Reconocimiento de artefactos durante el análisis de láminas histológicas: una revisión integradora

Recebido: 09/11/2021 | Revisado: 16/11/2021 | Aceito: 18/11/2021 | Publicado: 28/11/2021

Lidia Luz Correia

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8066-6341>

Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Brasil

E-mail: lidialuzcorreia@gmail.com

Diego Henrique Terra

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5929-1162>

Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Brasil

E-mail: diegohterra@gmail.com

Carolina Sturm Trindade

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3210-5360>

Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Brasil

E-mail: carolt@ufcspa.edu.br

Helena Terezinha Hubert Silva

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0797-1398>

Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Brasil

E-mail: hubert@ufcspa.edu.br

Resumo

O trabalho do patologista tem como objetivo a realização do diagnóstico de uma doença (patologia) através da análise de fragmentos de tecido ou órgão retirados por procedimentos de biópsia ou cirurgia. Trabalho este que é dificultado pela frequente aparição de artefatos durante a interpretação de lâminas histológicas, que muitas vezes podem levar ao erro de diagnóstico da doença investigada. Desta forma, foi realizada uma revisão integrativa, norteada pela pergunta “O que há na literatura referente a formação, interpretação e prevenção do surgimento de artefatos?”. A coleta de dados foi realizada em 12 de agosto de 2021, nos portais Biblioteca Virtual em Saúde (LILACS e Medline) e *National Center for Biotechnology Information* (Pubmed). Ao todo 26 artigos foram selecionados. Identificou-se que a origem de artefatos pode ocorrer nas mais diversas etapas durante o processo de confecção de lâminas. Desta forma, foram apresentados múltiplos cenários onde há a possibilidade de incorporação de artefatos nas lâminas, tais como: durante a colheita das amostras, fixação dos tecidos, preparação dos blocos, coloração dos tecidos, armazenamento das amostras assim como contaminação da lâmina durante o seu processo de montagem. Assim, facilitando o reconhecimento de artefatos durante a leitura de lâminas histológicas, evitando possíveis erros diagnósticos.

Palavras-chave: Artefatos; Histologia; Patologia; Lâminas.

Abstract

The pathologist's work aims to diagnose a disease (pathology) through the analysis of tissue or organ fragments removed by biopsy procedures or surgery. This work is hampered by the frequent appearance of artifacts during the interpretation of histological slides, which can often lead to misdiagnosis of the investigated disease. Thus, an integrative review was carried out, guided by the question “What is there in the literature regarding the formation, interpretation and prevention of the appearance of artifacts?”. Data collection was performed on August 12, 2021, at the Virtual Health Library (LILACS and Medline) and National Center for Biotechnology Information (Pubmed) portals. A total of 26 articles were selected, where it was identified that the origin of artifacts can occur in the most diverse stages during the process of making histological slides. Therefore, it was shown that several are the steps that can lead in incorporating artifacts in the slides, such as: during the collection of the previous ones, tissue correction, preparation of blocks, tissue coloring, storage of the before as well as contamination of the slide during its process of assembly. Thus, facilitating the recognition of artifacts when reading histological slides, avoiding possible diagnostic errors.

Keywords: Artifacts; Histology; Pathology; Slides.

Resumen

El trabajo del patólogo tiene como objetivo diagnosticar una enfermedad (patología) mediante el análisis de fragmentos de tejidos u órganos extraídos mediante procedimientos de biopsia o cirugía. Este trabajo se ve obstaculizado por la

aparición frecuente de artefactos durante la interpretación de los portaobjetos histológicos, que a menudo pueden conducir a un diagnóstico erróneo de la enfermedad investigada. Así, se realizó una revisión integradora, guiada por la pregunta “¿Qué hay en la literatura sobre la formación, interpretación y prevención de la aparición de artefactos?”. La recolección de datos se realizó el 12 de agosto de 2021 en los portales de la Biblioteca Virtual en Salud (LILACS y Medline) y del Centro Nacional de Información Biotecnológica (Pubmed). Se seleccionaron un total de 26 artículos, donde se identificó que el origen de los artefactos puede darse en las más diversas etapas durante el proceso de elaboración de los portaobjetos histológicos. Por lo tanto, se demostró que varios son los pasos que pueden conducir a la incorporación de artefactos en los portaobjetos, tales como: durante la recolección de los anteriores, corrección de tejidos, preparación de bloques, coloración de tejidos, almacenamiento del antes así como contaminación de la diapositiva durante su proceso de montaje. Así, facilitando el reconocimiento de artefactos al leer los portaobjetos histológicos, evitando posibles errores diagnósticos.

Palabras clave: Artefactos; Histología; Patología; Láminas.

1. Introdução

Nos diferentes cursos da área médica a patologia compreende a ciência voltada ao estudo e entendimento dos mecanismos que originam lesões e doenças, assim como ao reconhecimento macroscópico e microscópico das mesmas (Klatt e colab., 2010). Para isso, são utilizados inúmeros métodos, dentre os quais destaca-se a análise histopatológica, que consiste na análise sistemática de fragmentos de tecidos colhidos de seres vivos, por meio de procedimentos de biópsia, ou mortos, obtidos durante o exame necroscópico.

Durante a análise histopatológica o procedimento mais utilizado é a microscopia óptica (microscopia de luz), em que a imagem é originada a partir de raios luminosos de um feixe de luz que atravessa uma estrutura. Para a produção de lâminas a serem analisadas há quatro passos bem definidos: coleta (coleta-se amostra tecidual de algum organismo), fixação (a amostra é embebida em líquido fixador), inclusão (após fixada, a amostra é imersa em parafina, facilitando sua secção com micrótomo) e coloração (nessa etapa, a amostra é corada) (Correia, L.L, 2021).

Desta forma, o diagnóstico preciso de várias lesões ao microscópio requer a preparação de cortes de tecido, geralmente corados, que representam o mais próximo possível suas estruturas em vida. Assim como a preparação de seções de alta qualidade requer habilidade e experiência no campo da disciplina de laboratório. Porém, na maioria das vezes, os patologistas encontram lâminas que são fixadas ou manuseadas incorretamente durante o processamento do tecido, resultando em alterações nos detalhes do teste. Tais alterações encontradas no tecido durante a interpretação de lâminas histológicas são denominadas de “artefatos” e costumam ser uma das principais causas de erros de diagnóstico (Seoane, 2004).

Um artefato pode ser definido como uma estrutura artificial ou alteração de tecido em uma lâmina microscópica preparada como resultado de um fator estranho (Chatterjee, 2014). Em geral, os artefatos originados nas lâminas histológicas estão relacionados com imperfeições na execução da metodologia, equipamentos mal calibrados, ou ainda em relação aos reagentes utilizados durante o processamento (Ross, 2016).

Neste contexto, o presente artigo tem como objetivo realizar um levantamento científico referente a obras que apontam para identificação de artefatos durante o procedimento de leitura e interpretação de lâminas histológicas.

2. Metodologia

Trata-se de uma revisão integrativa da literatura, contemplando 6 etapas: (1) formulação de uma questão de pesquisa, (2) estabelecimento de critérios para inclusão e exclusão de estudos/ amostragem ou busca na literatura; (3) definição das informações a serem extraídas dos estudos selecionados/ categorização dos estudos; (4) avaliação dos estudos incluídos na revisão integrativa, (5) interpretação dos resultados; (6) apresentação da revisão.

A questão norteadora do estudo foi: “O que há na literatura referente a formação, interpretação e prevenção do surgimento de artefatos?”. Os critérios de inclusão considerados foram: estudos primários ou de revisão, publicados entre janeiro de 2015 e agosto de 2021, nos idiomas inglês e português, gratuitos e com texto completo, que contemplem a pergunta da norteadora da pesquisa. Foram excluídos artigos duplicados, cartas, resumos, livros e dossiês.

A busca na literatura ocorreu no período de março de 2021 a agosto de 2021. Foram utilizados o Portal de Periódicos da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), fazendo busca por assunto e acesso remoto Acesso remoto via café (acessos institucional); a Biblioteca Virtual em Saúde do Brasil (BVS) e a National Center for Biotechnology Information Search database (NCBI), selecionando-se as seguintes bases de dados: Scientific Electronic Library Online (SciELO), Literatura Latino-Americana e do Caribe em Ciências da Saúde (LILACS) e a Medical Literature Analysis and Retrieval System Online (Medline). As estratégias de busca utilizadas consideram os descritores do DeCS (Descritores em Ciências da Saúde) e do MeSH (Medical Subject Headings) – “Artefatos/Artifacts”, “Histopatológico/ Histopathology”, “Citologia/ Cell Biology”, “Histologia” / Histology, “Patologia/ Pathology”, “Troubleshooting” e “Lâminas/ Lamins”, estando ilustrados no Quadro 1.

Quadro 1 - Expressões de busca utilizadas nas bases de dados online.

Portal	Base de dados	Expressão de Busca	Resultado
Biblioteca Virtual em Saúde do Ministério da Saúde	LILACS	(artefato) AND (histologia) OR (citologia) OR (patologia) AND (year_cluster:[2015 TO 2021])	37
	MEDLINE	Primeira expressão/busca: (artefato) AND (histologia) OR (citologia) OR (patologia) AND (year_cluster:[2015 TO 2021]) Segunda expressão/busca: (artifacts) AND (troubleshooting) AND (mh:(histopathology)) OR (mh:(histology)) AND (db:"MEDLINE") AND (year_cluster:[2015 TO 2021])	2 22
National Center for Biotechnology Information (NCBI)	PubMed	Primeira expressão/busca: “(artifact OR artifacts OR artefact OR artefacts) AND (histolog* OR cytolog* OR patolog*) AND (slides OR lamins)”, Segunda expressão/busca “((((("artifact"[Title/Abstract] OR "artifacts"[Title/Abstract] OR "artefact"[Title/Abstract] OR "artefacts"[Title/Abstract]) AND "review"[Title/Abstract] AND "histopathology"[Title/Abstract]) OR "cytological"[Title/Abstract] OR "histology"[Title/Abstract] OR "histological"[Title/Abstract]) AND (stain)) AND (slide)) AND (preparation))”.	74 153

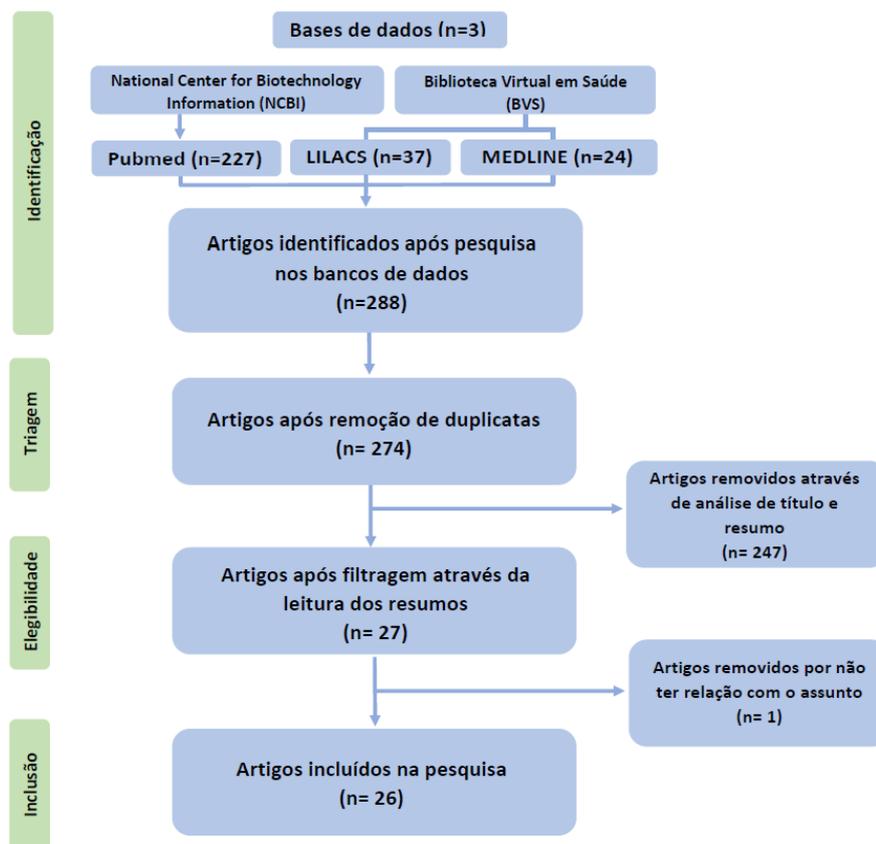
Fonte: Autores.

A primeira seleção dos estudos foi feita com base na leitura de títulos e resumos, para a identificação de trabalhos com potencial de atender aos critérios de inclusão. Nessa etapa, dois revisores eliminaram os artigos que não atendiam aos critérios de inclusão. A leitura dos textos na íntegra foi necessária quando o título e o resumo não foram capazes de elucidar a pertinência do estudo para a questão norteadora. Num segundo momento, os revisores leram na íntegra os artigos pré-selecionados, aplicando novamente os critérios de inclusão e exclusão. No caso de não ocorrer acordo entre os dois revisores, um terceiro revisor era acionado.

Com relação a categorização dos estudos, foram definidos os seguintes dados a serem extraídos dos estudos selecionados: identificação do artigo (autores, periódico, ano título); objetivos do estudo; tipo do estudo/ nível de evidência do estudo; procedimentos metodológicos; técnica de análise dos dados, resultados/conclusões. A representação deste processo está ilustrada na Figura 1.

Referente aos artigos que atenderam os critérios de inclusão, foi feita análise e posterior síntese utilizando um formulário com os seguintes tópicos: identificação do artigo; autor(es); objetivos do estudo; procedimentos metodológicos; técnica de análise dos dados, resultados e conclusões.

Figura 1 - Fluxograma da seleção dos estudos primários incluídos na revisão integrativa de acordo com os sítios eletrônicos.



Fonte: Autores, com base no Prisma (Selçuk, 2019).

3. Resultados e Discussão

Ao todo foram selecionados 26 artigos, que estão organizados no Quadro 2. Destes, 1 (3,8%) é estudo de nível de evidência 2B, 9 (34,61%) são estudos de nível de evidência 3A, 1 (3,8%) é estudo de nível de evidência 4 e 15 (57,69%) são estudos de nível de 5.

Quadro 2 - Dados dos artigos incluídos na revisão integrativa.

Artigos	Objetivo(s)	Tipo de estudo	Nível de Evidência	Técnica de análise de dados	Resultados e Conclusões
1.Marsch, A F et al. Dermatopathologist's Guide to Troubleshooting Immunohistochemistry Part 1: Methods and Pitfalls. <i>The American Journal of Dermatology</i> . (2015)	Guia prático sobre as metodologias disponíveis para imunohistoquímica, os problemas mais comuns de cada técnica, assim como suas soluções.	Revisão sistemática	3A	N/A	Anticorpos demonstram ter 3 padrões principais de recuperação do epítipo induzida por calor influenciada pelo pH

2. Pantanowitz, L et al. A Digital Pathology Solution to Resolve the Tissue Floater Conundrum. <i>Arch Pathol Lab Med</i> (2021).	Demonstrar a viabilidade de usar uma ferramenta de busca de imagens para resolver artefatos gerados através da contaminação cruzada de tecidos.	Experimental	5	Ferramenta de busca de imagens	Houve uma probabilidade muito alta de encontrar uma correspondência correta do tumor para o tecido consultado ao pesquisar o banco de dados digital
3. Petrak, L J & Waters, J C. A Practical guide to microscope care and maintenance. <i>Methods in Cell Biology</i> (2014).	Construção de um guia prático sobre cuidados acerca do microscópio com ênfase na prevenção, identificação e solução de problemas comuns.	Revisão sistemática	3A	N/A	Há uma série de etapas simples que um gerente de microscópio pode realizar para aprimorar o desempenho e aumentar a longevidade de seu microscópio.
4. Jali, PK et al. A rapid manual processing technique for resource-limited small laboratories. <i>Journal of Oral and Maxillofacial Pathology</i> . (2015)	Avaliar a eficácia de uma nova programação de processamento rápido, comparando-a com duas programações de processamento rápido existentes.	Estudo experimental	5	Cronograma de processamento sugerido pelos autores com pré-processamento noturno em 60% de álcool isopropílico seguido por 8h programação de processamento	Nenhuma diferença estatística foi encontrada entre as metodologias comparadas.
5. Taqi, S A et al. A review of artifacts in histopathology. <i>Journal of Maxillofacial Pathology</i> . (2018)	realizar uma revisão sobre os artefatos comumente encontrados durante a interpretação de uma lâmina e auxiliar na diferenciação de um artefato e um componente do tecido.	Revisão sistemática	3A	N/A	Artefatos de tecido podem ser introduzidos na amostra de tecido durante qualquer uma das muitas etapas através das quais uma amostra é processada.
6. Zheng, Y et al. Adaptive color deconvolution for histological WSI normalization. <i>Comput Methods Programs Biomed</i> . (2019)	Desenvolver métodos eficazes de normalização de cores para imagens histológicas digitais.	Estudo experimental	5	Novo algoritmo de deconvolução adaptativa de cores para separação de manchas e normalização de cor de imagens de lâminas coradas com hematoxilina-eosina	O modelo proposto pode ser utilizado de forma eficiente e é eficaz para melhorar o desempenho do reconhecimento de imagens de câncer.
7. Satturwar, S et al. An update on touch preparations of small biopsies. <i>Journal of the American Society of Citopathology</i> . (2020)	Revisar todos os aspectos das preparações de toque, incluindo sua utilidade clínica, técnicas adequadas de preparação de lâminas, características citomorfológicas distintas, limitações e artefatos em potencial.	Revisão sistemática	3A	N/A	Além de seu valor com interpretações diagnósticas imediatas e estudos auxiliares, as preparações através do toque também são valiosas em estudos de pesquisa, testes clínicos e biobancos.
8. Johnson, K A & Hagen, G M. Artifact-free whole-slide imaging with structured illumination microscopy and Bayesian image reconstruction. <i>Gigascience</i> . (2020)	Demonstrar como a microscopia de iluminação estruturada produz imagens sem artefatos.	Estudo experimental	5	Microscopia de iluminação estruturada	Imagens de microscopia de iluminação estruturada produzem resultados que podem ser úteis para histologia intraoperatória
9. Yagi, Y et al. Development of a database system and image viewer to assist in the correlation of histopathologic features and digital image analysis with clinical and molecular genetic information. <i>Pathology</i>	Relatar uma experiência com a produção de bancos de dados que podem permitir uma navegação mais eficiente.	Relato de experiência	5	Desenvolvimento de um sistema de banco de dados e visualizador de imagens	Este sistema de protótipo demonstrou ser uma grande promessa para a integração de estudos em patologia digital e patologia molecular.

<i>International</i> . (2016)					
10. Zaorsky, N G et al. Differentiating Lymphovascular Invasion from Retraction Artifact on Histological Specimen of Breast Carcinoma and Their Implications on Prognosis. <i>Journal of Breast Cancer</i> . (2012)	Relatar uma revisão sobre artefatos que mimetizam a invasão linfovascular.	Artigo de revisão	5	N/A	Colorações múltiplas devem ser recomendadas para o diagnóstico de invasão linfovascular.
11. Shashikala, P et al. Familiar trespassers in histopathology: An obstacle in diagnosis? A single-blind study. <i>Indian Journal of Pathology & Microbiology</i> . (2017)	observar a aparência microscópica de diferentes estruturas anormais com seus prováveis diagnósticos histológicos errados.	Estudo experimental	5	Processamento padrão de coloração com hematoxilina e eosina	As aparências vívidas de estruturas contaminantes levam a diagnósticos histológicos errados.
12. Erickson, Q L et al. Flash Freezing of Mohs Micrographic Surgery Tissue Can Minimize Freeze Artifact and Speed Slide Preparation. <i>Dermatology Surgery</i> . (2011)	Provar que o uso de um isopentano histobath para congelamento rápido de seções de MMS encurta o tempo necessário para preparar amostras para criotomia.	Estudo piloto para melhoria de qualidade	5	Comparação entre o congelamento instantâneo com banho de isopentano e método tradicional de congelamento no criostato.	O congelamento instantâneo em um banho de isopentano produziu uma amostra mais rapidamente opacificada, com menos artefatos e maior qualidade.
13. Izadyyazdanabadi, M et al. Fluorescence Image Histology Pattern Transformation Using Image Style Transfer. <i>Front Oncology</i> . (2019)	Mostrar que a qualidade diagnóstica das imagens estilizadas é superior às imagens originais.	Estudo experimental	5	<i>image style transfer</i>	As imagens transformadas tinham menos artefatos e estruturas críticas mais perceptíveis em comparação à sua forma original de endomicroscopia a laser confocal
14. Chatzopoulos, K et al. Formalin pigment artifact deposition in autopsy tissue: predisposing factors, patterns of distribution and methods for removal. <i>Forensic Science, Medicine and Pathology</i> . (2020)	Identificar tipos de mortes e tipos de tecido que são mais prováveis de serem afetados pela deposição de pigmento de formalina.	Estudo de casos	4	Revisão de lâminas de H&E de autópsias	A deposição de pigmento de formalina se correlaciona com a duração do intervalo pós-morte, assim como sua deposição também ocorre em falecidos que estavam gravemente enfermos no momento da morte.
15. Rech, R R et al. Gross and histopathological pitfalls found in the examination of 3,338 cattle brains submitted to the BSE surveillance program in Brazil. <i>Forensic Science, Medicine and Pathology</i> . (2018)	Abordar os principais artefatos que possam aparecer durante a manipulação de cérebros bovinos.	Revisão sistemática	3A	N/A	Alterações autolíticas pós-mortais ou de putrefação incluíram vacuolizações na bainha de mielina, halos claros em torno dos neurônios e oligodendrócitos, aglomerados de bacilos de putrefação dentro dos vasos ou dispersos em todo o tecido cerebral.
16. Olivas, A D. Histologic changes caused by injection of a novel submucosal lifting agent for endoscopic resection in GI specimens. <i>Gastrointestinal Endoscopy</i> . (2021)	Apresentar casos de artefatos histológicos produzidos pelo gel ORISE.	Coorte retrospectiva	2B	Revisão de banco de lâminas	A injeção de ORISE Gel durante a ressecção endoscópica de lesões gastrointestinais resulta na deposição de material amorfo cinza-azulado visto em cortes histológicos, enquanto as amostras de ressecção cirúrgica de intervalo demonstram material eosinofílico denso com uma reação de células gigantes associada.
17. Abuhaimed, AK et al. <i>Saudi Journal of Medicine and Medical Sciences</i> . Histologic Reliability of Tissues from Embalmed Cadavers: Can They be Useful in Medical Education? <i>Saudi Journal of Medicine</i>	Avaliar a confiabilidade histológica de tecidos retirados de cadáveres embalsamados em um laboratório de anatomia.	Estudo experimental	5	Coloração padrão de hematoxilina e eosina	A maioria dos tecidos adquiridos dos cadáveres embalsamados eram de qualidade boa ou satisfatória, indicando o uso benéfico de tecido histológico de cadáveres para fins educacionais.

<i>and Medical Sciences.</i> (2020)					
18. Franchini, M et al. Hysteroscopic polypectomy in an office setting: specimen quality assessment for histopathological evaluation. <i>European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology.</i> (2015)	Registrar artefatos histopatológicos qualitativos e quantitativos e para avaliar as diferenças entre os artefatos encontrados em espécimes obtidos por diferentes técnicas cirúrgicas de polipectomia	Estudo experimental	5	Revisão de banco de lâminas e as técnicas utilizadas para biópsia	Não houve diferença entre as três técnicas para adequação do exame histológico, apesar do efeitos da lesão térmica ou fragmentação do tecido.
19. Sy, J & Ang, L C. Microtomy: Cutting Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded Sections. <i>Methods in Molecular Biology.</i> (2019)	Descrever o processo de corte de seções embebidas em parafina usando um micrótomo rotativo. Destacando as possíveis armadilhas que podem surgir, discutindo como evitá-las.	Descrição de metodologia	5	Lâminas processadas com tecido fixados em formalina e embebidos em parafina	N/A
20. Reggiani, B L et al. Optimal processing of ESD specimens to avoid pathological artifacts. <i>Tech Coloproctology.</i> (2018)	Avaliação histológica de espécimes de dissecação submucosa endoscópica em bloco.	Estudo experimental	5	Coloração de H&E	Suporte de celulose e blocos de amostragem adequados podem ser úteis para realizar uma avaliação histológica precisa de espécimes de dissecação endoscópica da submucosa
21. Redmayne, N & Chavez, S L. Optimizing Tissue Preservation for High-Resolution Confocal Imaging of Single-Molecule RNA-FISH. <i>Current Protocols in Molecular Biology.</i> (2019)	Apresentar uma alternativa para a produção de imagens de alta resolução que preservem as moléculas de RNA.	Descrição de metodologia	5	descrever as propriedades de fixação em formalina, embebido em parafina que impactam negativamente a integridade do RNA	N/A
22. Ramos-Vara, J A. Principles and Methods of Immunohistochemistry. <i>Methods in Cell Biology.</i> (2011)	Aborda os principais métodos de imunohistoquímica utilizados na caracterização do tecido normal e patológico.	Descrição de metodologia	3A	Técnica de imunohistoquímica	N/A
23. Paknezhad, M et al. Regional registration of whole slide image stacks containing major histological artifacts. <i>BMC Bioinformatics.</i> (2020)	Propor um algoritmo de registro regional para imagens de slides inteiros.	Estudo experimental	5	Algoritmo de registro regional para imagens de slides inteiros	A metodologia levou a uma solução mais robusta e precisa para o problema de registro regional de imagens inteiras de slides corrompidos em algumas partes por artefatos histológicos importantes no tecido imageado.
24. Ward, J M & Reh, J E. Rodent Immunohistochemistry: Pitfalls and Troubleshooting. <i>Veterinary Pathology.</i> (2014)	Aborda os padrões histológicos de coloração específica e inespecífica após o uso de técnicas de imunohistoquímica, bem como a solução de problemas e identificação de artefatos em camundongos.	Revisão sistemática	3A	N/A	A avaliação cuidadosa de todos os componentes envolvidos em cada etapa da técnica de imunohistoquímica e a correção das deficiências provavelmente resultarão em uma coloração ideal.
25. Wick, M R. The hematoxylin and eosin stain in anatomic pathology—An often-neglected focus of quality assurance in the laboratory. <i>Seminars in Diagnostic Pathology.</i> (2019)	Revisar os diferentes aspectos dos artefatos produzidos nas lâminas histológicas.	Revisão sistemática	3A	N/A	A precisão no diagnóstico morfológico é a questão chave da patologia anatômica.
26. Chapman, C M. Troubleshooting in the histology laboratory. <i>Journal of Histotechnology.</i> (2019)	Revisar os artefatos comumente encontrados durante a análise de lâminas juntamente com as medidas corretivas que podem ser realizadas para diferenciar um artefato de um constituinte de tecido.	Revisão sistemática	3A	N/A	histologistas devem compreender os princípios básicos de fixação, processamento e coloração em a fim de solucionar problemas de lâminas de microscópio abaixo do ideal

Fonte: Autores baseado em Whitmore (2005).

Como visto na literatura revisada, há diversos tipos de artefatos, com suas diferentes origens e interpretações. Para fins didáticos, pode ser feita uma organização dos tipos de artefatos que podem surgir e como eles podem ser interpretados. Essa organização será discutida a seguir.

Artefatos e Microscópio

Os artefatos podem ser produzidos durante diversas etapas do processamento de uma lâmina histológica, desde o processo de retirada do tecido, seu armazenamento, até a montagem da lâmina conforme a metodologia empregada para fixação, montagem do bloco e confecção da lâmina (Rech, 2018).

O microscópio é um equipamento obrigatório para realização da interpretação de lâminas dentro do laboratório, porém, se não utilizado de forma correta, pode transformar-se em potencial produtor de artefatos. Com o avanço da tecnologia empregada na construção de microscópios cada vez mais avançada, quanto mais componentes um sistema possui, maior é a necessidade de compreensão sobre resolução de problemas e reparos que vão além do fornecido por manuais de fabricantes (Pettrak, 2014; Sy, 2019). Assim, torna-se necessária a realização de verificações rotineiras do microscópio, pois os mesmos podem revelar problemas que, de outra forma, não seriam detectados e afetariam a qualidade dos dados adquiridos com o instrumento (Pettrak, 2014). Em nossa revisão, foi observado que o manuseio de um microscópio funciona melhor quando este se encontra devidamente higienizado, mas a limpeza de rotina é frequentemente ignorada, muitas vezes devido ao medo de danificar o equipamento. Em um artigo publicado por Hoerenz, vemos a necessidade da realização da manutenção dos microscópios, sendo indicado frequente inspeção das lentes objetivas, da estrutura do microscópio, o cuidado com os equipamentos no tocante à iluminação do microscópio assim como a limpeza periódica do equipamento, assim como após o manuseio do mesmo (Hoerenz, 1981).

Artefatos durante obtenção da amostra

Os procedimentos realizados para retirada de uma amostra para posterior análise microscópica pode originar uma variedade de alterações nos tecidos, muitas vezes interpretadas de forma incorreta por se tratar de um artefato. Segundo nossas buscas, em um estudo publicado por Rech, o procedimento de retirada da amostra pode causar uma hemorragia local do tecido, tornando difícil diferenciar uma hemorragia local de uma realizada devido ao dano tecidual causado durante o procedimento. Outro exemplo de origem de artefatos durante a obtenção de uma amostra refere-se a fragmentos de osso que podem ser encontrados dentro do tecido cerebral, mimetizando mineralização intraparenquimatosa, artefato este, frequentemente atribuído à utilização de equipamentos com serras durante o manuseio da amostra (Rech, 2018; Franchini, 2015).

A utilização de lâminas pouco afiadas durante o procedimento de colheita da amostra, assim como os equipamentos utilizados para o manuseio do tecido (fórceps), regularmente reflete na criação de artefatos como o efeito veneziana, a compressão dos tecidos e o efeito de mordedura em traça (Taqi, 2018; Reggiani, 2018). Estes tipos de artefatos muitas vezes podem levar a um erro de diagnóstico, como por exemplo, segundo estudo publicado por Zaorsky, em uma amostra patológica de células de câncer de mama, o artefato de retração durante o processamento histológico pode simular a invasão linfovascular verdadeira (Zaorsky, 2012). Durante a ressecção de tecidos do trato gastrointestinal na endoscopia é usado um material para levantar a porção submucosa e facilitar a obtenção da amostra. Nesse processo, usa-se diversos materiais. Um deles é o “ORISE Gel”, que pode gerar artefatos histopatológicos com características amorfas, basofílicas e granulares. Sendo um fator de confusão para alguns diagnósticos, como por exemplo: adenocarcinoma (Olivas, 2020). Outro erro comum de interpretação de lâminas encontrados com frequência é a incorporação de bolhas nos tecidos durante sua retirada no tecido, o que pode muitas vezes ser mal interpretado como embolia gasosa tecidual (Rech, 2018).

Outro achado comum em nossa revisão, revela que a injeção intralesional de solução anestésica pode causar sangramento com extravasamento e separação das bandas de tecido conjuntivo, com vacuolização dos tecidos, tal prática deve ser evitada, ou quando necessária, realizada a coleta tecidual na área que não foi lesionada (Taqi, 2020). Segundo uma revisão publicada por Kumaraswamy, para o procedimento cirúrgico de biópsia, a anestesia local deve ser administrada longe da lesão para evitar artefatos na amostra. O surgimento destes tipos de artefatos, resultantes da injeção intralesional de solução anestésica são descritos também em uma revisão escrita por Mota-Ramírez em 2007. Além disso, os artefatos de fulguração ocorrem durante o corte eletrocirúrgico ou a laser do tecido, resultando em uma zona de necrose térmica e distorção do tecido (Taqi, 2018). O epitélio e o tecido conjuntivo apresentam aspecto amorfo devido à coagulação de proteínas. As células epiteliais aparecem destacadas do tecido conjuntivo e os núcleos assumem uma configuração fusiforme em paliçada. Ainda em nossa busca, foi observado a possibilidade de ocorrerem artefatos relacionados aos equipamentos de proteção utilizados pelos manipuladores do tecido. Um exemplo é o amido proveniente de luvas cirúrgicas que contaminam a amostras durante a manipulação, podendo ser interpretado erroneamente como células epiteliais (Taqi, 2020; Shashikala, 2017). Segundo um relato de caso publicado em 2010 por Jadhav, a lâmina quando contaminada com algodão, origina um artefato que pode imitar uma substância semelhante a amiloide, assim como a presença de amido de luva leva a artefatos de amido que podem aparecer como células epiteliais atípicas em cortes histopatológicos. Além disso, artefatos de preparações de toque podem distorcer ou obscurecer a citomorfologia e, assim, levar a uma errônea interpretação da lâmina. Artefatos típicos que podem ser vistos com preparações de toque incluem listras, células esmagadas e aglomerados espessos que tornam difícil visualizar células individuais (Satturwar, 2020).

Artefatos de fixação

A patologia cirúrgica é baseada no exame microscópico de seções de tecido fixadas em formalina e embebidas em parafina (Jali, 2015). Para uma fixação ideal para exame histopatológico, a amostra deve ser imersa em um volume de fixador que seja pelo menos dez vezes maior que o volume de tecido a ser fixado. Além disso, o tempo de fixação varia de acordo com o tamanho e o tipo da amostra (Rech, 2018). Sua má execução em relação ao volume utilizado, assim como tempo de incorporação e concentrações empregadas no tecido podem levar a produção de uma lâmina em que o tecido não possua suas verdadeiras características, resultando em uma interpretação errônea durante sua análise. Em um estudo publicado em 2020 relacionado a análise da confiabilidade histológica de tecidos retirados de cadáveres embalsamados demonstrou que a qualidade da preservação dos tecidos varia entre os órgãos, onde os coágulos formados dentro do sistema vascular do corpo durante o processo de morte podem limitar a qualidade da fixação, assim, o atraso desde o momento da morte até o início do processo de embalsamamento pode alterar a estrutura dos tecidos (Abuhamed, 2020).

Embora as amostras fixadas em formalina e embebidas em parafina sejam geralmente adequadas para imunohistoquímica e outras avaliações baseadas em proteínas, existem várias desvantagens de usar essa abordagem na avaliação da expressão e localização do RNA (Redmayne, 2019). O pigmento de formalina é um subproduto do formaldeído. Assim, a deposição desse pigmento nas lâminas é um artefato histológico comum resultante da fixação de tecidos em soluções ácidas, que ocorre mais em espécimes de autópsia. O uso de formalina tamponada neutra pode reduzir a quantidade desse artefato. Tal pigmento pode se sobrepor a outros pigmentos que podem ter significância clínica, como bile, melanina ou hemossiderina. (Chatzopoulos, 2020). Porém, a formalina neutra tamponada, quando mal preparada, tamponada erroneamente e com um pH fora da faixa fisiológica, pode causar precipitados indesejados de “pigmento de hematina de ácido preto” em seções de tecido (Wick, 2019).

Artefatos processamento do tecido

Os artefatos de processamento de tecidos mais visíveis são os rugas e rasgos nas lâminas, que ocorrem por desidratação e infiltração de parafina incompleta (Clifford, 2019). Outro tipo de artefato que pode ser originado durante o processamento dá-se pelo uso de almofadas de poliéster e esponjas, que podem gerar artefatos de compressão em espécimes de tecido muito pequenos (menor que 0,1 cm) durante seu processamento (Clifford, 2019).

Além disso, pode ser observado frequentemente artefatos de vibração, que são mais sujeitos a originar-se em qualquer tecido pequeno. Este pode ser causado pelo tipo de fixador usado, o tempo total no fixador e o tempo no tecido processado. Fixadores à base de álcool podem ajudar a evitar esse artefato, usando um tempo de processamento de 6 a 8 horas. Finalmente, a velocidade de corte durante a microtomia pode ser uma causa direta desse problema. Usar uma velocidade de corte moderada é a melhor opção (Clifford, 2019).

Diversos são os artefatos que podem ser gerados durante o processamento do tecido para montagem de uma lâmina. Entre eles encontram-se desidratação realizada de maneira imprópria. Um exemplo é o tratamento com álcool prolongado, que pode resultar no encolhimento do tecido, assim como, se utilizado em baixas concentrações, podem criar-se vacúolos nos tecidos (Taqi, 2020). No caso do xileno, seu uso, quando insuficiente, leva a uma precária incorporação da parafina no tecido nas etapas posteriores, resultando em uma distorção do tecido durante os cortes no micrótomo (Taqi, 2020).

O micrótomo deve ser frequentemente revisado, pois sua conservação é fundamental para obtenção de boas lâminas histológicas. Sua lâmina, quando mal ajustada ao equipamento, pode gerar pequenas vibrações durante o corte, resultado no artefato chamado de efeito veneziana. Na obtenção de uma lâmina pouco afiada, os cortes podem ainda gerar compressões no tecido, levando a alterações significativas durante a análise histológica, ou ainda caso o equipamento seja mal higienizado, detritos de outros blocos anteriormente utilizados podem ser incorporados no tecido sendo processado (Taqi, 2020).

Artefatos coloração

A utilização do ácido acético tem como intenção o aumento da ionização de grupamentos aminos do tecido. Isto leva a um aumento na coloração da amostra principalmente com a utilização da eosina. Assim, deve-se atentar para o uso em excesso do ácido acético para evitar uma coloração em excesso de eosina que causará a visualização de uma massa completamente homogênea e plana e corada em rosa profundo (Taqi, 2020).

Assim como a eosina, durante a coloração utilizando a hematoxilina também deve se ter um grande cuidado. O sulfato de potássio e alumínio é usado como mordente na composição da hematoxilina, se a solução de hematoxilina não for misturada adequadamente durante a coloração, pode ocorrer a conversão do sulfato de alumínio em potássio para sua forma cristalina, resultando na deterioração da solução, originando um pigmento escuro no tecido a ser analisado (Taqi, 2020).

Outros tipos de artefatos

Observou-se que uma limitação da seção de tecidos congelados é a presença de determinados artefatos. A nucleação, por exemplo, é a primeira etapa no processo de congelamento e ocorre abaixo do ponto de congelamento de uma solução. Quando o fluido tem viscosidade suficiente, a cristalização cessa na etapa final da formação de gelo. O resfriamento rápido pode limitar a formação ou tamanho de cristais de gelo. No cenário de histologia de tecidos congelados, a diminuição gradual da temperatura de uma amostra prolonga o tempo de exposição à zona de temperatura de cristalização, aumentando o tamanho do cristal de gelo e consequentemente aumentando a distorção celular, conhecida como artefato de congelamento. Logo, congelar de forma mais rápida o material previne tal tipo de artefato (Clifford, 2019; Erickson, 2011).

Com o desenvolvimento da patologia digital, as lâminas histológicas podem ser digitalizadas rapidamente usando “micro-scanners” avançados e armazenadas como imagens digitais inteiras de slides. Esse processo pode mudar

consideravelmente a cor das lâminas histológicas. Além disso, a normalização sequencial das imagens gera artefatos estruturais (Zheng, 2019; Izadyyazdanabadi, 2019; Yagi, 2016). Uma análise 3D, no entanto, requer uma reconstrução precisa do volume do tecido da pilha de imagens 2D, porém segundo Paknezhad, deve-se considerar a forte presença de deformações de tecido nas fatias virtuais adquiridas e o grande tamanho dessas imagens, assim, os métodos baseados em pontos de referência podem ser mal orientados por regiões altamente deformadas no tecido (Paknezhad, 2020).

Outro tipo de artefato que pode ser originado durante o processo de montagem da lâmina se dá pela má orientação do tecido ao ser processado, exemplo de biópsias de pele, que necessitam de atenção quanto a orientação exata para realização da lâmina. As primeiras seções geradas pela equipe de microtomia devem ser recolhidas em uma lâmina de microscópio e observadas, sem coloração, sob o microscópio para garantir a orientação dermo-epidérmica correta (Chapman, 2019). Além disso, é comum que patologistas venham a encontrar pedaços estranhos de tecido em lâminas de vidro por causa da contaminação cruzada da amostra durante a realização do banho-maria (Pantanowitz, 2020).

Artefatos não-relacionados a lesões

É frequente a inclusão de aspectos morfológicos equivocados durante a interpretação de lâminas, principalmente quando o leitor não está familiarizado com o tecido analisado. Desta forma, lesões sem significado clínico, como aspectos que não contribuem para o estado alterado do tecido, acabam sendo incluídos durante a necropsia ou exame histológico (Rech, 2018). Segundo Rech, em um estudo sobre os principais erros de análise de tecidos nos cérebros bovinos, é comum a interpretação errônea de tecidos com alta atividade dos melanócitos serem interpretadas como necrose dos tecidos corticais (Rech, 2018). A lipofuscina é um pigmento granular marrom-amarelado que se acumula no citoplasma dos neurônios em animais idosos e aparentemente não altera a função do neurônio. Geralmente se deposita em um polo do pericário, mas também pode ser observado no citoplasma das células gliais ou livre no neurópilo. A ocorrência extracelular da lipofuscina pode ser explicada pelo processo de exocitose ou pela ruptura das células gliais que contenham o pigmento (Rech, 2018).

Outro caso frequente de artefato não relacionado a lesão dá-se pela mineralização dos vasos sanguíneos no cérebro de bovinos, que afeta predominantemente os vasos do núcleo denteado, globo pálido, cápsula interna e núcleo caudal, sem qualquer associação com doença vascular generalizada, sendo apenas um artefato sem correspondência clínica (Rech, 2018).

Artefatos imunohistoquímica

A imunohistoquímica é a detecção de antígenos em cortes de tecido por meio de anticorpos específicos, tendo a capacidade de correlacionar a presença de um antígeno com sua localização em um tecido ou célula (Ramos, 2011). Em geral, foi observado em nossa busca que sistemas de detecção mais complexos resultam em maior sensibilidade, mas apresenta mais oportunidades para erros técnicos e artefatos. Segundo Masch, durante a realização de imunohistoquímica, a proteína avidina tende a se ligar de forma não específica a componentes de tecido semelhantes à lectina e outros carregados negativamente em pH fisiológico, prestando-se a potenciais interpretações falso-positivas e falso-negativas. Além disso, os métodos de recuperação de antígeno podem ter um efeito deletério na morfologia do tecido (Marsch, 2015).

Não obstante, o grau de reticulação de proteína induzida por formalina é proporcional ao tempo de fixação, deste modo, tempos de fixação mais longos resultam em maior perda de antigenicidade. Assim como o processamento e incorporação de tecidos também pode interferir com a antigenicidade, causando coagulação e precipitação de proteínas fixas (Marsch, 2015). Segundo Ward e Rehg, alguns anticorpos e antígenos podem ser sensíveis à temperatura, levando a uma diminuição ou até perda da imunoreatividade em temperaturas mais altas (Ward et al., 2014). Outro caso comum durante a imunohistoquímica são as marcações inespecíficas, nestes casos, a coloração inespecífica muitas vezes pode ser evitada com a utilização de um "bom" anticorpo. Segundo estudo publicado por Mohan e colaboradores em 2008, o congelamento rápido é o método mais amplamente

utilizado para o manuseio de amostras de biópsia para estudos de imunofluorescência. Isso pode ser realizado imergindo a amostra da biópsia imediatamente após a biópsia em nitrogênio líquido ou dióxido de carbono sólido frio ou em banho de hexano. A biópsia de congelamento rápido é então montada em um composto de incorporação de tecido e seccionada em um criostato.

4. Conclusão

Esta revisão integrativa analisou os materiais disponíveis em bancos de dados online buscando artigos referentes às causas, produções e soluções para a não formação dos mais diversos artefatos durante a produção e interpretação de lâminas histológicas.

Identificou-se que os cenários de origem destes artefatos abrangem diversas etapas durante o processo de confecção de lâminas. Assim, foram apresentados múltiplos cenários onde há a possibilidade de incorporação de artefatos nas lâminas como durante a colheita das amostras, durante a fixação dos tecidos, preparação e processamento dos blocos, coloração dos tecidos, armazenamento das amostras assim como contaminação da lâmina durante o seu processo de montagem. Viabilizando a utilização do presente estudo como ferramenta didática tanto na área acadêmica quanto profissional, podendo ser incorporado, por exemplo, em aulas práticas de histologia assim como para estudos de identificação de artefatos durante as aulas de patologia geral.

Reconhece-se, aqui, os limites da pesquisa quanto à própria amostragem, levando a conclusão sobre a necessidade de novas investigações sobre a produção, interpretação e solução de artefatos durante a análise de lâminas histológicas, com a finalidade de esclarecer e proporcionar maior entendimento tanto para profissionais quanto pesquisadores, visando facilitar a expansão e disseminação destes conhecimentos nas mais diversas áreas da histopatologia.

Referências

- Abuhaimed, A., Almulhim, A., Alarfaj, F., Almustafa, S., Alkhater, K., Yousef, M. & Menezes, R. (2020). Histologic Reliability of Tissues from Embalmed Cadavers: Can They be Useful in Medical Education? *Saudi J. Med. Med. Sci.*, 8(3), 208-212. 10.4103/SJMMS.SJMMS_383_19
- Chapman, C. (2019). Troubleshooting in the histology laboratory. *Journal of histotechnology*, 42(3), 137-149. 10.1080/01478885.2019.1640923
- Chatzopoulos, K., Treeck, B., Venable, E., Serla, V., Wirth, T., Amirahmadi, F. & Lin, P. (2020). Formalin pigment artifact deposition in autopsy tissue: predisposing factors, patterns of distribution and methods for removal. *Forensic Sci. Med. Pathol.*, 16(3), 435-441. 10.1007/S12024-020-00240-5
- Correia, L. & Hubert, H. (2021). *Manual Eletrônico Sobre Artefatos Durante a Preparação de Lâminas Histológicas*, Porto Alegre, Brasil: Appris.
- Erickson, Q., Clark, T., Larson, K., & Minsue, T. (2011). Flash freezing of Mohs micrographic surgery tissue can minimize freeze artifact and speed slide preparation. *Dermatol Surg.*, 37(4), 503-509. 10.1111/J.1524-4725.2011.01926.X
- Franchini, M., Zolfanelli, F., Gallorini, M., Giarrè, G., Fimiani, R., & Florio, P. (2015). Hysteroscopic polypectomy in an office setting: specimen quality assessment for histopathological evaluation. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.*, 189, 64-67. 10.1016/J.EJOGRB.2015.03.011
- Hoerenz, P. (1981). The operating microscope. V. Maintenance and cleaning. *Microsurgery*, 2(3), 179-182. 10.1002/MICR.1920020304
- Izadyazdanabadi, M., Belykh, E., Zhao, X., Moreira, L. B., Gandhi, S., Cavallo, C., Eschbacher, J., Nakaji, P., Preul, M. C., & Yang, Y. (2019). Fluorescence Image Histology Pattern Transformation Using Image Style Transfer. *Frontiers in oncology*, 9, 519. 10.3389/fonc.2019.00519
- Jadhav, K. B., Gupta, N., & Ahmed, M. B. (2010). Maltese cross: Starch artifact in oral cytology, divulged through polarized microscopy. *Journal of cytology*, 27(1), 40-41. 10.4103/0970-9371.66698
- Jali, P. K., Donoghue, M., & Gadiwan, M. (2015). A rapid manual processing technique for resource-limited small laboratories. *Journal of oral and maxillofacial pathology*, 19(3), 306-314. 10.4103/0973-029X.174616
- Johnson, K., & Hagen, G. (2020). Artifact-free whole-slide imaging with structured illumination microscopy and Bayesian image reconstruction. *GigaScience*, 9(4), 1-14. 10.1093/GIGASCIENCE/GIAA035
- Klatt, E., Kumar, V., & Violin, K. (2010). *Robbins & Contran: Perguntas e Respostas Em Patologia*. Elsevier.

- Kumaraswamy, K. L., Vidhya, M., Rao, P. K., & Mukunda, A. (2012). Oral biopsy: oral pathologist's perspective. *J. Cancer. Res. Ther.*, 8(2), 192–198. 10.4103/0973-1482.98969
- Marsch, A. F., Truong, J. N., McPherson, M. M., Junkins-Hopkins, J. M., & Elston, D. M. (2015). A Dermatopathologist's Guide to Troubleshooting Immunohistochemistry Part 1: Methods and Pitfalls. *The American Journal of dermatopathology*, 37(8), 593–603. 10.1097/DAD.0000000000000335
- Mohan, K., Pai, S., Rao, R., Sripathi, H., & Prabhu, S. (2008). Techniques of immunofluorescence and their significance. *Indian journal of dermatology, venereology and leprology*, 74(4), 415–419. 10.4103/0378-6323.42898
- Mota-Ramírez, A., Silvestre, F. J., & Simó, J. M. (2007). Oral biopsy in dental practice. *Medicina oral, patologia oral y cirugia bucal*, 12(7), E504–E510.
- Olivas, A. D., Setia, N., Weber, C. R., Xiao, S. Y., Villa, E., Chapman, C. G., Siddiqui, U. D., Waxman, I., Hart, J., & Alpert, L. (2021). Histologic changes caused by injection of a novel submucosal lifting agent for endoscopic resection in GI lesions. *Gastrointestinal endoscopy*, 93(2), 470–476. 10.1016/j.gie.2020.06.056
- Paknezhad, M., Loh, S.Y.M., Choudhury, Y. et al. (2020). Regional registration of whole slide image stacks containing major histological artifacts. *BMC Bioinformatics*, 21(1), 1–20. 10.1186/S12859-020-03907-6
- Pantanowitz, L., Michelow, P., Hazelhurst, S., Kalra, S., Choi, C., Shah, S., Babaie, M., & Tizhoosh, H. R. (2021). A Digital Pathology Solution to Resolve the Tissue Floater Conundrum. *Archives of pathology & laboratory medicine*, 145(3), 359–364. 10.5858/arpa.2020-0034-OA
- Petrak, L., & Waters, J. (2014). A practical guide to microscope care and maintenance. *Methods in cell biology*, 123, 55–76. 10.1016/B978-0-12-420138-5.00004-5
- Ramos-Vara J. A. (2011). Principles and methods of immunohistochemistry. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 691, 83–96. 10.1007/978-1-60761-849-2_5
- Rech, R. R., Giaretta, P. R., Brown, C., & Barros, C. S. L. (2018). Gross and histopathological pitfalls found in the examination of 3,338 cattle brains submitted to the BSE surveillance program in Brazil. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 38(11), 2099–2108. 10.1590/1678-5150-PVB-6079
- Redmayne, N., & Chavez, S. L. (2019). Optimizing Tissue Preservation for High-Resolution Confocal Imaging of Single-Molecule RNA-FISH. *Current protocols in molecular biology*, 129(1), E107. 10.1002/cpmb.107
- Reggiani, L., Manta, R., Manno, M., Conigliaro, R., Missale, G., Bassotti, G., & Villanacci, V. (2018). Optimal processing of ESD specimens to avoid pathological artifacts. *Techniques in coloproctology*, 22(11), 857–866. 10.1007/S10151-018-1887-X
- Satturwar, S., Rekhtman, N., Lin, O., & Pantanowitz, L. (2020). An update on touch preparations of small biopsies. *Journal of the American Society of Cytopathology*, 9(5), 322–331. 10.1016/J.JASC.2020.04.004
- Shashikala, P., Sreevidyalatha, G., Nandyal, S., & Umapathy, G. (2017). Familiar trespassers in histopathology: An obstacle in diagnosis? A single-blind study. *Indian journal of pathology & microbiology*, 60(4), 524–527. 10.4103/IJPM.IJPM_241_17
- Sy, J., & Ang, L. (2019). Microtomy: Cutting Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded Sections. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 1897, 269–278. 10.1007/978-1-4939-8935-5_23
- Taqi, S., Sami, S., Sami, L., & Zaki, S. (2018). A review of artifacts in histopathology. *Journal of Oral and Maxillofacial Pathology*, 22(2), 279. 10.4103/jomfp.JOMFP_125_15
- Ward, J., & Rehag, J. (2014). Rodent immunohistochemistry: pitfalls and troubleshooting. *Veterinary pathology*, 51(1), 88–101. 10.1177/0300985813503571
- Wick, M. (2019). The hematoxylin and eosin stain in anatomic pathology-An often-neglected focus of quality assurance in the laboratory. *Seminars in diagnostic pathology*, 36(5), 303–311. 10.1053/J.SEMDP.2019.06.003
- Whittemore R, & Knafl K. (2005). The integrative review: updated methodology. *J Adv Nurs.*, 52(5), 546-53. 10.1111/j.1365-2648.2005.03621.x
- Yagi, Y., Riedlinger, G., Xu, X., Nakamura, A., Levy, B., Iafrate, A. J., Mino-Kenudson, M., & Klepeis, V. E. (2016). Development of a database system and image viewer to assist in the correlation of histopathologic features and digital image analysis with clinical and molecular genetic information. *Pathology international*, 66(2), 63–74. 10.1111/pin.12382
- Zaorsky, N., Patil, N., Freedman, G., & Tuluc, M. (2012). Differentiating Lymphovascular Invasion from Retraction Artifact on Histological Specimen of Breast Carcinoma and Their Implications on Prognosis. *Journal of Breast Cancer*, 15(4), 478. 10.4048/JBC.2012.15.4.478
- Zheng, Y., Jiang, Z., Zhang, H., Xie, F., Shi, J., & Xue, C. (2019). Adaptive color deconvolution for histological WSI normalization. *Computer Methods and Programs in Biomedicine*, 170, 107–120. 10.1016/J.CMPB.2019.01.008