



PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE MESTRADO EM GENÉTICA

Andreia Luiza Pereira Silva

Análise cienciométrica em estudos genéticos com o uso da imuno-histoquímica

GOIÂNIA, GO - BRASIL

2014

Andreia Luiza Pereira Silva

Análise cienciométrica em estudos genéticos com o uso da imuno-histoquímica

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado em Genética da Pontifícia Universidade Católica de Goiás, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Genética.

Orientadora: Dra. Flávia Melo Rodrigues

GOIÂNIA, GO – BRASIL

2014

Dados Internacionais de Catalogação da Publicação (CIP)
(Sistema de Bibliotecas PUC Goiás)

Silva, Andreia Luiza Pereira.

S586a Análise cienciométrica em estudos genéticos com o uso da imuno-histoquímica [manuscrito] / Andreia Luiza Pereira Silva. – 2014.

56 f. : il. ; graf. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado) – Pontifícia Universidade Católica de Goiás, Programa de Mestrado em Genética, 2014.

“Orientadora: Profª. Dra. Flávia Melo Rodrigues”.

1. Imunohistoquímica. 2. Ciencimetria. 3. Genética. 4. Biologia molecular. I. Título.

CDU 575(043)



**PUC
GOIÁS**

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS
PRÓ-REITORIA DE GRADUAÇÃO

Av. Universitária, 1069 • Setor Universitário
Caixa Postal 88 • CEP 74805-010
Goiânia • Goiás • Brasil
Fone: (62) 3946.1021 • Fax: (62) 3946.1397
www.pucgoias.edu.br • prograd@pucgoias.edu.br

ATA COMPLEMENTAR Nº 87/2014

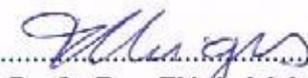
MESTRADO EM GENÉTICA DA PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS

DISCENTE: ANDREIA LUIZA PEREIRA SILVA

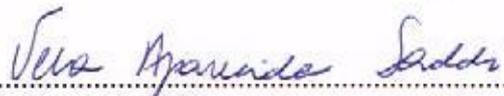
DEFENDIDA EM 07 DE MARÇO DE 2014 E APROVADA COM CONCEITO...A.....

O título foi alterado () não () sim _____

BANCA EXAMINADORA



Profª. Dra. Flávia Melo Rodrigues
(Presidente-orientador)



Profª. Dra. Vera Aparecida Saddi / PUC Goiás
(Membro interno)



Profª. Dra. Keila Correia de Alcântara / UFG
(Membro externo)

*Aos meus avós Manoel José e Maria Luiza (i. m.),
ofereço*

*À minha família:
Minha mãe, Narcisa
Meu filho Arthur
Meu esposo Josimar,
dedico*

Agradecimentos

Ao meu Deus, pela sua infinita graça e bondade.

À minha família pelo que sou, por todo carinho, ensinamentos, apoio, acolhimento em todos os instantes da minha vida e pela contribuição que tiveram no alcance desta conquista.

Aos professores, do Mestrado em Genética da PUC-GO, em especial: Vera Saddi, Rejane Barcelos, Peixoto, Kátia Verolle. A todos devo minha formação, admiração e respeito.

À professora Dra Flávia Melo Rodrigues pela preciosa orientação, instruções e ensinamentos. Pela sua contribuição em cada etapa deste mestrado: como professora, orientadora, coordenadora e, principalmente, como mestre. Muito obrigada!

À professora Dra Keila Correia de Alcântara por fazer parte da minha formação acadêmica e aceitar participar da minha banca de defesa.

Ao médico patologista Dênis Sugita pela valiosa colaboração neste trabalho e, principalmente, pelo convívio e amizade.

À Marilya Ítalo e Guyldo Layner pela contribuição na formatação deste trabalho e amizade em todos os momentos.

Ao professor Dr Maurício Barcelos, chefe do Departamento de Patologia do Hospital das Clínicas da UFG, Sr Wilson José Valadão, gerente, Maria Helena Tavares Vilela, patologista, aos residentes Gabriela Moura e Tiago Arantes, aos colegas Vítório, Carlos, Joyce e Jairo pela confiança, apoio e convivência.

Saber Viver

Não sei... Se a vida é curta
Ou longa demais pra nós,
Mas sei que nada do que vivemos
Tem sentido, se não tocamos o coração das pessoas.

Muitas vezes basta ser:
Colo que acolhe,
Braço que envolve,
Palavra que conforta,
Silêncio que respeita,
Alegria que contagia,
Lágrima que corre,
Olhar que acaricia,
Desejo que sacia,
Amor que promove.

E isso não é coisa de outro mundo,
É o que dá sentido à vida.
É o que faz com que ela
Não seja nem curta,
Nem longa demais,
Mas que seja intensa,
Verdadeira, pura... Enquanto durar.

Cora Coralina

Resumo

A imuno-histoquímica (IHQ) é um método diagnóstico que tem como objetivo detectar um antígeno tissular ou celular, sendo uma técnica cada vez mais utilizada tanto em pesquisa, quanto em diagnóstico. Seu uso cada vez mais amplamente difundido também está gerando, atualmente, um maior interesse na reprodutibilidade do método. Sendo assim, torna-se importante abordar, por meio de análise quantitativa, o desenvolvimento das aplicações e inovações desta técnica, bem como avaliar sua contribuição nas diversas áreas da genética. Para tanto, existem metodologias que permitem avaliar a produção científica em uma determinada área, como as análises cienciométricas. O objetivo deste estudo foi caracterizar a produção científica sobre a técnica de imuno-histoquímica, no período de 1986 a 2013, a fim de avaliar as tendências e perspectivas do desenvolvimento no campo da genética com o uso desta instrumentação, por meio da análise cienciométrica. Para isso foi realizado um levantamento bibliográfico no sítio *Scopus*, utilizando as palavras *immunohistochemistry** and *genetic** and *molecular* biology**. Foram realizadas diferentes abordagens de avaliação sobre os artigos: tipo de publicação (experimental ou revisão), número de artigos/ano, autores, áreas, revistas, fator de impacto das revistas que mais publicaram, dentre outros. Como resultado, constatou-se um aumento no número de publicações em genética com o uso da IHQ no decorrer dos anos seguido por uma estabilização, principalmente nos países desenvolvidos como os EUA. Observou-se relevante interesse no estudo com humanos. A maioria das pesquisas foi realizada com estudo de proteínas, seguidas por ácido ribonucleico (RNA). A principal patologia associada ao estudo imuno-histoquímico foi o câncer, confirmando seu uso com uma importante ferramenta no laboratório de patologia.

Palavras-chave: Imuno-histoquímica, cienciométrica, genética, biologia molecular

Abstract

Immunohistochemistry (IHC) is a diagnostic method used to detect tissue or cellular antigens. It has been increasingly used both in research and diagnosis. The technique is used worldwide and a greater interest in the reproducibility of the method is nowadays noticed. Thus, it becomes important to address the development of applications and innovations of this technique through quantitative analysis, and also to evaluate its contribution to the Genetic field. In order to do so, there are some methodologies for assessing scientific production in a certain field, such as Scientometric Analysis. The purpose of this study was to characterize the scientific literature on the immunohistochemistry technique in the period between 1986 and 2013. We assessed trends and prospects related to the development of the method in the field of Genetics through Scientometric Analysis. A literature survey was conducted on the site Scopus, using the words immunohistochemistry*, Genetic* and molecular biology*. We used different approaches to assess the articles: publication type (experimental or review), number of articles/year, authors, field, scientific magazines, and the impact factor of journals among other factors. As a result, there was an increase in the number of publications in genetics with the use of IHC over the years followed by a stabilization, especially in developed countries like the U.S.A. There was relevant interest for the human study. Most of the research was related to study of proteins, followed by ribonucleic acid (RNA). The main pathology associated with immunohistochemical studies was cancer, supporting its use as an important tool in the pathology laboratory.

Key words: Immunohistochemistry, Scientometric, Genetic, Molecular Biology

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	15
2.	OBJETIVOS	18
2.1	Objetivo geral	18
2.2	Objetivos específicos	18
3.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
3.1	Imuno-histoquímica	19
3.2	Cienciometria	34
4.	MATERIAIS E MÉTODOS	36
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
6.	CONCLUSÕES	51
	REFERÊNCIAS	52

LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS

Sigla	Significado
ABC	Complexo avidina –biotina (<i>Avidin Biotin Complex</i>)
AE1-AE3	Anticorpo anti- Pan citoceratinas humanas (1-8, 10, 14-16 e 19)
CD	<i>Clusters designations</i>
DNA	Ácido dextrorribonucleico (<i>Desoxirribonucleic Acid</i>)
D2-20	Marcador específico que reconhece a podoplanina expressa nas células endoteliais linfáticas
EMA	Antígeno de membrana epitelial (<i>Epithelial membrane antigen</i>)
Fab	Fragmento variável de ligação com o anticorpo
EGFR	Fator de crescimento epidermal (<i>Epidermal growth factor receptor</i>)
Fc	Região do anticorpo que interage com outros elementos do sistema immune
FI	Fator de impacto
HRP	Peroxidase de raiz forte (<i>Horseradish peroxidase</i>)
HE	Hematoxilina- Eosina
HHV-8	<i>Herpes Vírus Humano do tipo 8 (Human Herpesvirus tipo 8)</i>
HER-2	Receptor do fator de crescimento da epiderme 2 (<i>Human Epidermal growth factor Receptor 2</i>)
IBICT	Instituto Brasileiro de Informação em Ciência e Tecnologia
IHQ	Imuno-histoquímica
JCR	Do inglês <i>Journal Citation Reports</i>
Ki-67	Antígeno marcador de proliferação celular Ki-67
LSAB	Marcação com estreptoavidina ligado a biotina (<u><i>Labeled Streptavidin Binding</i></u>)
MFIP	Materiais fixados em formalina e incluídos em parafina
NK	Do ingles <i>Natural Killer</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde

PAP	Peroxidase anti-peroxidase
PAX-5	Do inglês <i>Paired box protein 5</i>
RE	Receptor de estrógeno
RP	Receptor de progesterona
RA	Recuperação antigênica
RNA	Ácido ribonucléico (<i>Ribonucleic acid</i>)
StreptABC	Complexo estreptoavidina biotina (<i>Strepto- Avidin Biotin Complex</i>)
S-100	Proteína específica do cérebro (<i>Protein Brain-Specific</i>)
TTF-1	Fator de transcrição tiroideano (<i>Thyroid transcription factor</i>)

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Sistema de detecção pelo método direto	22
Figura 2	Método indireto simples	23
Figura 3A	Representação esquemática da biotina	23
Figura 3B	Representação esquemática da avidina	23
Figura 4	Método StreptoABC	24
Figura 5	Método LSAB	25
Figura 6	Método PAP	25
Figura 7A	Polímero de esqueleto interno	27
Figura 7B	Micropolímero de enzimas	27
Figura 8A	Neoplasia de mama, HE médio aumento	28
Figura 8B	Neoplasia de mama, CD 31, menor aumento	28
Figura 9A	Paraganglioma carotídeo, HE, médio aumento	28
Figura 9B	Paraganglioma carotídeo, cromogranina A, médio aumento	28
Figura 10A	Sarcoma de Kaposi, HE, maior aumento	29
Figura 10B	Sarcoma de Kaposi, HHV-8, maior aumento	29
Figura 11A	Metástase linfonodal, HE, menor aumento	30
Figura 11B	Metástase linfonodal, HE, maior aumento	30
Figura 12A	Células neoplásicas, calretinina, maior aumento	30
Figura 12B	Células neoplásicas, citoceratina 5, maior aumento	30

Figura 12C	Células neoplásicas, EMA, maior aumento	30
Figura 13A	Sarcoma uterino, HE, menor aumento	31
Figura 13B	Sarcoma uterino, CD-10, maior aumento	31
Figura 14A	Linfonodo, HE, menor aumento	32
Figura 14B	Linfonodo, HE, maior aumento	32
Figura 14C	Linfonodo, CD-3, maior aumento	32
Figura 14D	Linfonodo, CD-20, maior aumento	32
Figura 14E	Linfonodo, PAX-5, maior aumento	32
Figura 15A	Neoplasia neuroendócrina, íleo, HE, maior aumento	33
Figura 15B	Neoplasia neuroendócrina, íleo, KI-67, maior aumento	33
Figura 16A	Neoplasia maligna de mama, HE, maior aumento	34
Figura 16B	Neoplasia maligna de mama, HER-2, médio aumento	34
Figura 16C	Neoplasia maligna de mama, RE, médio aumento	34
Figura 16D	Neoplasia maligna de mama, RP, médio aumento	34
Figura 17	Distribuição dos estudos sobre IHQ e biologia molecular na área da Genética de 1986 a 2012, segundo o tipo de publicação	38
Figura 18	Número de artigos publicados ao longo dos 26 anos, na área da Genética utilizando a IHQ e biologia molecular	39
Figura 19	Revistas com frequência de publicação maior ou igual a 15 artigos	40
Figura 20	Fator de Impacto (FI) e ano das revistas analisadas	41
Figura 21	Nomes de 16 autores principais que possuem a partir de cinco publicações no tema pesquisado	42
Figura 22	Principais áreas científicas de publicação dos estudos relacionados IHQ e biologia molecular na área da genética entre 1986 e 2013	43

Figura 23	Principais filiações institucionais dos autores que mais publicaram sobre IHQ e biologia molecular no campo da genética no período de 1986 a 2013	45
Figura 24	Descrição dos dez países que publicaram 60 ou mais artigos sobre IHQ e biologia molecular no campo da genética no período de 1986 a 2013	46
Figura 25	Tipo de estudo por artigos, por análise do conteúdo celular	48
Figura 26	Principais patologias estudadas nos artigos levantados	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	As dez principais palavras-chave utilizadas nas publicações referentes a IHQ e biologia molecular no campo da genética no período de 1986 a 2013.	44
Tabela 2	Idiomas mais utilizados nas publicações sobre IHQ e biologia molecular no campo da genética	46
Tabela 3	Tipos de organismos estudados de publicação dos estudos relacionados a IHQ, genética e biologia molecular entre 1986 e 2013.	47
Tabela 4	Tipos de câncer pesquisados nas publicações.	50

1 Introdução

Muitas são as técnicas “especiais” utilizadas ao longo dos anos para complementar, refinar ou confirmar os achados obtidos na tradicional avaliação morfológica de materiais fixados em formalina e incluídos em parafina (MFFIP), em patologia diagnóstica. Desde as primeiras reações histoquímicas que resultaram em colorações especiais, atualmente existe com um vasto arsenal, que inclui cultura celular, citometria de fluxo, microscopia eletrônica, estudos imuno-histoquímicos (IHQ) e métodos de biologia molecular. Muito se espera desse último grupo, entretanto, pode-se afirmar, certamente, que nenhuma outra técnica contribuiu tanto para prática de patologia diagnóstica atual, ao ponto de gerar uma grande revolução (principalmente no campo de patologia oncológica), quanto a imuno-histoquímica (DABBS, 2010).

A IHQ é um método diagnóstico que tem como objetivo detectar um antígeno tissular ou celular por meio de um anticorpo específico, sendo uma técnica cada vez mais utilizada tanto em pesquisa, quanto em diagnóstico. Sua contribuição no avanço do conhecimento em patologia é inquestionável e, em muitos casos, indispensável para um diagnóstico (DABBS, 2010). É um método de considerável sensibilidade e especificidade, além de alta reprodutibilidade, apesar de ainda ter custos relativamente altos, quando comparados a algumas outras técnicas. Quando utilizada em estudos celulares, é conhecida como imunocitoquímica (VON WASIELESWSKI et al, 1997).

A IHQ surgiu com as pesquisas em imunopatologia que começaram na década de 1940, mas somente a partir de 1975, quando foi possível demonstrar alguns antígenos tissulares pela técnica de imunoperoxidase em MFFIP, é que a IHQ foi aceita como um método simples e prático na rotina diagnóstica de patologia cirúrgica (CHAN, 2000). E é essa possibilidade de trabalhar com MFFIP, inclusive com materiais arquivados há tempos, um dos fatores que garantiu o sucesso dessa técnica (WERNER et al, 2005).

O segundo fator que contribuiu para a rápida aceitação da IHQ é o fato de se conseguir avaliar a marcação contra uma arquitetura tecidual já bastante familiar aos patologistas. Uma vez que, são utilizados cortes histológicos semelhantes aos já analisados em lâminas de hematoxilina e eosina como substrato para as reações imunológicas, é possível analisar as imunomarcações sobre um contexto morfológico prévio, aumentando a acurácia diagnóstica (DABBS, 2010).

Nos últimos anos, a IHQ experimentou progressiva evolução, com a introdução de métodos de amplificação de sinal mais sensíveis e, sobretudo, com sistemas de “recuperação de antígenos” (RA), que tornaram possível a definição de grande variedade de antígenos em amostras fixadas em formol. Hoje são utilizados diferentes métodos de RA baseados em calor, com destaque para vapor úmido (panela de pressão, panela a vapor, autoclaves, banho-maria), calor irradiado (micro-ondas), combinação de calor úmido e irradiado (panela de pressão em micro-ondas) ou digestão enzimática com calor úmido ou irradiado (RAMOS-VARA 2005).

Nesse período, foram também introduzidos novos anticorpos monoclonais, bem como sistemas de amplificação mais sensíveis, como o complexo biotínil-tiramida, polímeros de dextrana e novas opções aos já tradicionais complexos avidina-biotina-HRP (ABC) e estreptavidinabiotina- HRP (StreptABC) (SHERESTA et al, 2009).

A técnica deve seguir um protocolo estabelecido e total atenção deve ser dada em qualquer um dos passos, pois em todos os momentos há armadilhas que podem levar a uma má interpretação da reação e a um diagnóstico equivocado; tais como fixação inadequada do espécime, processamento inadequado (corte, desidratação, parafinização, desparafinização, incubação), reagentes com problemas (validade, concentração). Seu uso cada vez mais amplamente difundido também está gerando, atualmente, um maior interesse na reprodutibilidade do método, com ênfase em uma padronização, através da comparação de resultados qualitativos e semi-quantitativos de diversos laboratórios (DABBS, 2010).

As aplicações da IHQ são amplas. As mais importantes são: 1) elucidação do tecido de origem de uma neoplasia indiferenciada; 2) determinação do órgão de origem de uma neoplasia diferenciada; 3) subclassificação de linfomas; 4) pesquisa de fatores prognósticos, terapêuticos e índices proliferativos de algumas neoplasias; 5) identificação de estruturas, organismos e materiais secretados pelas células; 6) detecção de células neoplásicas metastáticas (DABBS, 2010).

A fim de quantificar e qualificar as publicações geradas maciçamente, como publicações na área de genética que usam a IHQ, é cada vez maior o número de pesquisadores que buscam trabalhar com cienciométrica (CARNEIRO et al, 2008; QUIXABEIRA et al, 2010). O termo surgiu na antiga União Soviética e tornou-se conhecido no final da década de 1970, com a publicação na revista “*Sciencometrics*”, na Hungria. De acordo com Nonato (2003), a cienciométrica foi definida por Prince em 1969 como “a pesquisa quantitativa de todas as coisas que dizem respeito à ciência, às quais podem ser atribuídos números”. Ou ainda a cienciométrica pode ser definida como uma avaliação quantitativa das atividades científicas e tecnológicas tendo como principal objetivo focalizar o número de metodologias,

ou mesmo a estrutura de vários centros de pesquisa (VANTI, 2011). Sua importância se deve ao fato de sua capacidade de analisar os aspectos quantitativos referentes à geração, propagação e utilização de informações científicas de um país, de uma comunidade científica, ou de uma instituição (GROESSER, 2012; GUPTA, 2012)

A contribuição da IHQ no avanço do conhecimento em patologia é inquestionável e, em muitos casos, indispensável para um diagnóstico. Sua popularização trouxe grande auxílio para a patologia cirúrgica. Assim, faz-se necessário uma análise cienciométrica para avaliar a contribuição desta técnica não somente em patologia, bem como em outras áreas. Além disso, verificar o crescimento e as tendências de estudos em conjunto com a biologia molecular, bem como indicar o número de artigos em determinado período, países, tipos de periódicos, autores e ainda inferir novos campos e organismos biológicos a serem explorados, com o uso desta técnica.

2 Objetivos

2.1 Objetivo

O objetivo deste estudo foi caracterizar a produção científica sobre a técnica de imuno-histoquímica, no período de 1986 a 2013, a fim de avaliar as tendências e perspectivas do desenvolvimento no campo da genética com o uso desta instrumentação.

2.2 Objetivos específicos

- Quantificar os trabalhos, na área da genética, que utilizaram a técnica de IHQ aliada à biologia molecular;
- Quantificar os tipos de publicações (artigos experimentais, revisões, *papers*);
- Verificar quais os autores que mais publicaram e áreas envolvidas no tema estudado;
- Verificar as revistas que mais publicaram sobre o assunto e o fator de impacto (FI) destes periódicos;
- Quantificar as principais palavras-chaves utilizadas nos artigos e as principais filiações institucionais que mais publicaram sobre o assunto;
- Verificar quais os principais países e idiomas usados nos artigos publicados;
- Levantar quais os principais organismos e componentes celulares estudados e;
- Descrever as principais patologias e os tipos de câncer estudados nos artigos publicados.

3 Revisão Bibliográfica

3.1 Imuno-histoquímica

Imuno-histoquímica (IHQ), ou imunocitoquímica, é um método para localização de antígenos em tecidos ou células baseado no reconhecimento antígeno- anticorpo, que procura explorar a especificidade fornecida pela ligação de um anticorpo com seu antígeno ao nível da microscopia óptica. A técnica é amplamente utilizada no diagnóstico de células anormais tais como aquelas encontradas em tumores, bem como na pesquisa básica para entender a distribuição e localização de biomarcadores e expressão de proteínas em diferentes partes do tecido (DABBS, 2010).

A IHQ surgiu com pesquisas em imunopatologia que começaram na década de 1940. Só a partir de 1974, quando foi possível demonstrar alguns antígenos tissulares pela técnica da imunoperoxidase em tecidos fixados em formalina e incluídos em parafina, é que a IHQ foi aceita como um método simples e prático na rotina diagnóstica de patologia cirúrgica (CHAN, 2000). A IHQ envolve uma complexa sequência de procedimentos mecânicos e químicos que serão descritos a seguir.

3.1.1 Recuperação antigênica

A fixação nas técnicas histológicas rotineiras utiliza formalina, que pode mascarar alguns epítomos antigênicos, fazer ligação cruzada ou destruí-los. Por esse motivo, torna-se necessário realizar a recuperação antigênica, que promove o desmascaramento, facilitando o acesso do anticorpo ao epítipo alvo. Os dois métodos mais comuns de RA são a enzimática e a recuperação baseada no calor. Este último, desenvolvido por Shi e seus colaboradores (1991) revolucionou a técnica de IHQ e é um método simples que envolve o aquecimento das lâminas confeccionadas a partir dos tecidos embebidos em parafina. A partir daí, várias modificações da técnica foram desenvolvidas (TAYLOR, 2006; SHERESTA et al, 2009).

3.1.2 Anticorpos

Os anticorpos são globulinas sintetizadas por linfócitos B e principalmente por plasmócitos, após o estímulo de um imunógeno, que possui a propriedade de interagir com este de maneira específica.

A avaliação de um anticorpo para o uso em IHQ é baseada em dois pontos: a sensibilidade e a especificidade da interação antígeno-anticorpo. Atualmente, emprega-se na reação de IHQ anticorpos monoclonais ou policlonais.

Os anticorpos policlonais são produzidos por vários plasmócitos, reagindo assim com diversos epítomos de um antígeno. O animal mais utilizado para a produção de um anticorpo policlonal é o coelho, mas podem ser utilizados cabra, porco ou ovelha entre outros. A sequência habitual de produção inicia-se na escolha do antígeno e sua injeção no animal-alvo de forma a obter-se uma resposta imunitária, e termina na obtenção de um soro purificado com vários anticorpos diferentes dirigidos para os vários epítomos do antígeno. Tem alta afinidade, porém baixa especificidade quando comparado aos monoclonais. Apresenta a vantagem de identificar múltiplos epítomos na proteína alvo, entretanto a desvantagem está em permitir reações cruzadas e até mesmo falso-positivas.

Anticorpo monoclonal é o produto de um único clone de plasmócitos imortalizados e que, como tal, é uniforme em estrutura, especificidade e afinidade. Os anticorpos de um determinado clone são imunoquimicamente idênticos e reagem com um determinado epítomo de um antígeno, contra o qual foram produzidos. A técnica mais utilizada para a produção de soros monoclonais consiste, resumidamente, nos seguintes passos:

- A. Imunização de um animal de modo a serem produzidos anticorpos para um determinado antígeno que é introduzido por injeções repetidas.
- B. Colheita de plasmócitos no baço desse animal.
- C. Fusão desses plasmócitos (curto tempo de vida) com células de mieloma (longo tempo de vida).
- D. Colocação individual das células resultantes da fusão em cultura de modo para recolher os anticorpos por elas produzidos.
- E. Testes para os anticorpos em causa, no sentido de se saber quais as suas características.
- F. Manutenção das culturas (clones) que demonstrem características úteis e destruição das restantes.

G. Escolha sistemática dos anticorpos produzidos pelo clone que passam a constituir o soro monoclonal e que podem ser utilizados em IHQ.

Os anticorpos monoclonais são produzidos principalmente a partir de camundongos. A vantagem deste anticorpo é alta especificidade quando comparado ao anticorpo policlonal. A especificidade reduz a possibilidade de reações cruzadas com outros antígenos. Anticorpos monoclonais produzidos a partir de coelhos também são comercializados. A vantagem em relação àqueles produzidos por camundongos é a alta afinidade, e aumento da especificidade em alguns casos (RAMOS-VARA, 2005).

3.1.3 Sistemas de detecção

As moléculas de anticorpo não podem ser vistas ao microscópio óptico ou mesmo eletrônico, a menos que eles sejam marcados ou sinalizados por um método que permita sua visualização, constituindo os sistemas de detecção. Essencialmente, os sistemas de detecção marcam os anticorpos primários ou secundários, a fim de que a interação antígeno/anticorpo seja visualizada nos cortes histológicos. Uma variedade de marcadores é usada, incluindo compostos fluorescentes e enzimas ativas. As enzimas quando na presença de um substrato específico e um cromógeno produzem uma coloração no local onde ocorre a reação antígeno/anticorpo. A seleção do sistema de detecção é muito importante, considerando que a sensibilidade de uma reação imune dependerá principalmente do sistema usado. Os sistemas de detecção são classificados em métodos diretos e indiretos (RAMOS-VARA, 2005).

3.1.3.1 Sistema de detecção pelo método direto

Método direto é um método simples e rápido, porém, raramente usado devido à amplificação pobre do sinal. Envolve a incubação com apenas um anticorpo marcado reagindo diretamente com o antígeno presente nos cortes histológicos (Figura 1) (RAMOS-VARA, 2005).

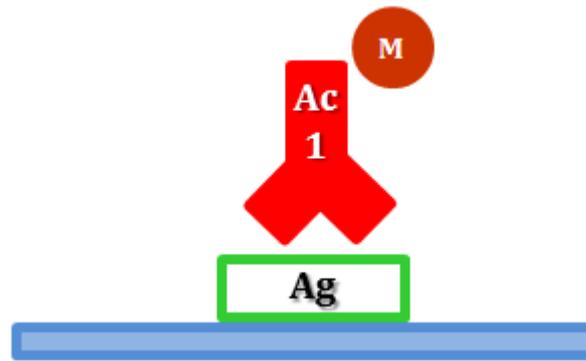


Figura 1. Sistema de detecção pelo método direto. Fonte: Ferro, 2013

3.1.3.2 Sistema de detecção pelo método indireto

A necessidade de sistemas de detecção de antígenos mais sensíveis levou ao desenvolvimento dos métodos indiretos. A sensibilidade desses métodos é maior quando comparada ao método direto porque o anticorpo primário não é marcado preservando sua atividade e resultando na amplificação do sinal e é grande o número de ligações por moléculas de anticorpo primário, aumentando a intensidade da reação. O resultado é a capacidade de detectar pequenas quantidades de antígeno ou aumentar a diluição do anticorpo primário. Vários sistemas de detecção pelo método indireto foram desenvolvidos tais como: método simples, método da avidina-biotina, método da peroxidase – antiperoxidase, sistema de detecção por polímero (SHI et al., 2007).

Simple

Neste método são utilizados dois tipos de reagentes:

- A. Primário - anticorpo dirigido contra o antígeno que se quer detectar;
- B. Secundário - anticorpo dirigido contra as imunoglobulinas da espécie animal em que foi produzido o anticorpo primário. Está marcado com a substância que permite a visualização do complexo (Figura 2).

Podem ser utilizados como anticorpos secundários, entre outros, os *Rabbit anti-mouse Igs* (RAM) no caso do anticorpo primário ser produzido em ratinho ou os *Swine anti rabbit Igs* (SAR) no caso do anticorpo primário ser produzido em coelho.

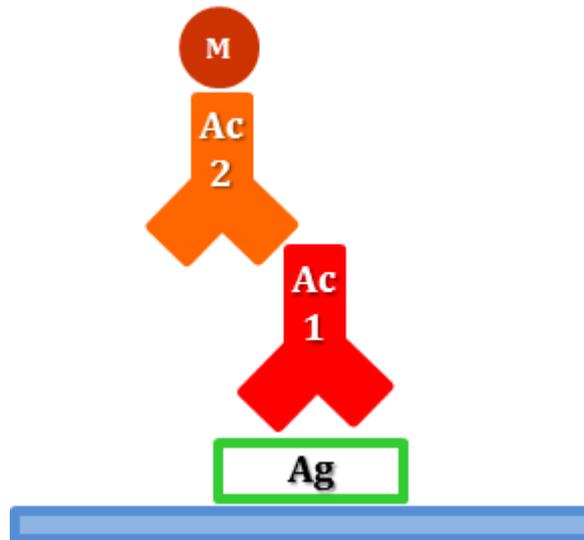


Figura 2. Método indireto simples. Fonte: Ferro, 2013

Metodo da Avidina-biotina

A avidina é uma glicoproteína grande extraída do ovo e tem quatro sítios de ligação por molécula (figura 3A) além de uma alta afinidade pela biotina, uma vitamina de baixo peso molecular (figura 3B). A biotina tem um sítio de ligação para a avidina e pode ser ligada através de outros sítios ao anticorpo ou a outra macromolécula, como enzima, fluorocromo. O aumento da sensibilidade deste método resulta em um grande número de moléculas de biotina que podem ligar-se ao anticorpo secundário.

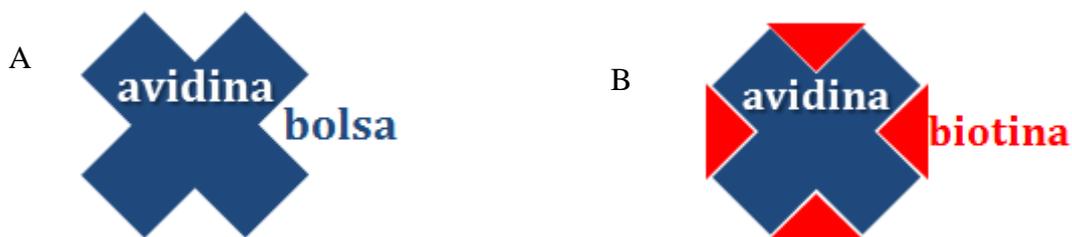


Figura 3. A. Representação esquemática da Biotina
Fonte: Ferro, 2013

B. Representação esquemática da Avidina

Um dos métodos mais comuns é o Complexo Avidina Biotina (ABC). No sistema ABC, é ligado a um marcador apropriado. Outro método amplamente utilizado é o conjugado esteptoavidina – biotina (LSAB), aqui usa-se um anticorpo secundário biotinalado e um terceiro reagente de peroxidase ligado à avidina. A sensibilidade deste método é maior quando comparada ao ABC. Uma das principais desvantagens do método avidina - biotina é a formação de coloração de fundo (inespecífica) (GUESTON et al., 1979).

Técnica streptABC

Nesta metodologia são utilizados três passos (Figura 4):

- A. Aplicação do anticorpo primário dirigido contra o antígeno pretendido;
- B. Aplicação do anticorpo secundário biotilado dirigido contra o anticorpo primário;
- C. Aplicação do complexo streptavidina-biotina (marcado com substância propiciadora da visualização - normalmente HRP).

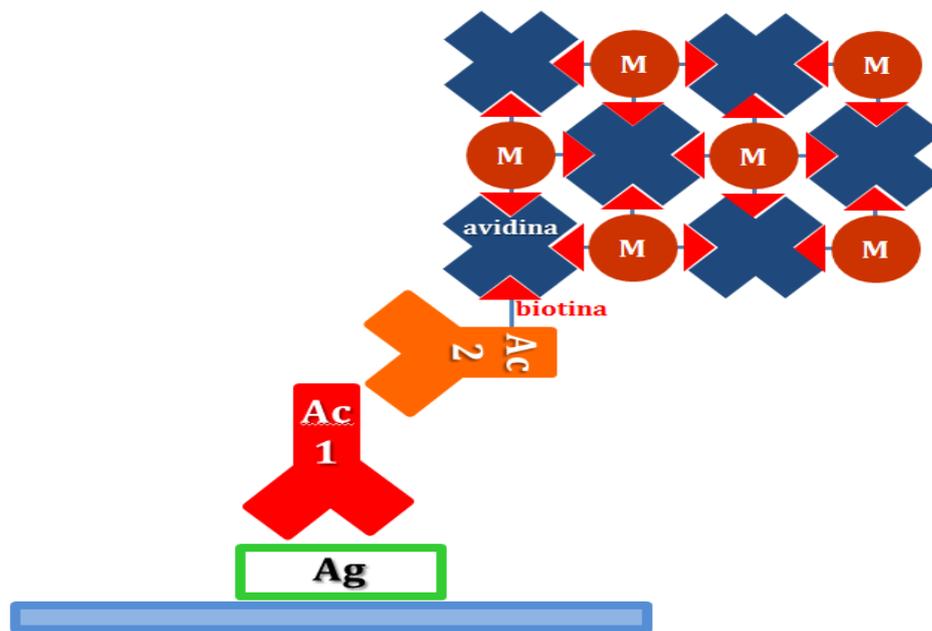


Figura 4. Método StreptoABC. Fonte: Ferro, 2013

Técnica LSAB

Nesta metodologia são utilizados três passos (Figura 5):

- A. Aplicação do anticorpo primário contra o antígeno pretendido;
- B. Aplicação do anticorpo secundário biotilado dirigido contra o anticorpo primário;
- C. Aplicação da streptavidina marcada com substância propiciadora da visualização (normalmente HRP).

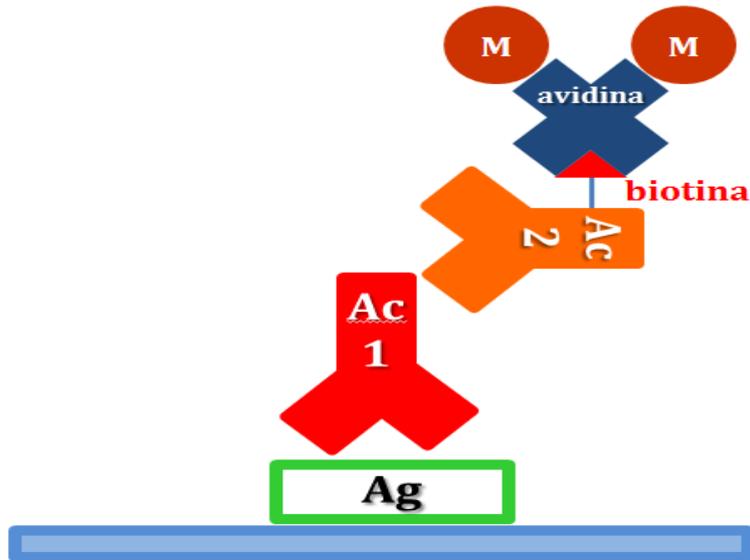


Figura 5. Método LSAB. Fonte: Ferro, 2013

Método da Peroxidase- antiperoxidase (PAP)

O método PAP (Figura 6), mais frequentemente utilizado, consiste na reação em cadeia de três anticorpos. O anticorpo primário, produzido no animal da espécie A, reage com o antígeno-alvo. O anticorpo terciário antiperoxidase é também produzido pelo animal da espécie A. O anticorpo secundário é originado em espécie animal diferente e reconhece especificamente a porção Fc das imunoglobulinas produzidas pelos animais da espécie A. Um braço da porção Fab do anticorpo secundário se liga à Fc do anticorpo primário e o outro à Fc do anticorpo terciário, formando com eles uma ponte. Como, nesse caso, maior número de moléculas da peroxidase fica disponível para agir, esse método apresenta maior sensibilidade (RAMOS-VARA, 2005).

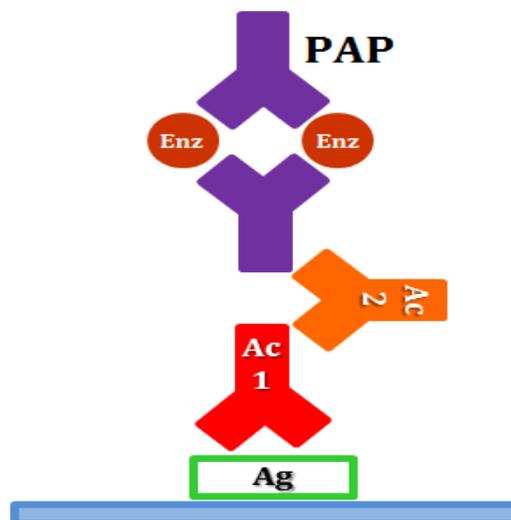


Figura 6. Método PAP. Fonte: Ferro, 2013

Sistema de detecção por polímero

Os sistemas de amplificação de polímero permitem novas abordagens dos conceitos anteriormente utilizados. Os métodos que maior sucesso obtiveram foram os métodos de polímero, que podem ser de esqueleto interno (Figura 7A) ou de micropolímeros de enzimas (Figura 7B)(DABBS, 2010).

Levando em conta que, através da utilização dos polímeros, existe a possibilidade de conjugar grandes quantidades de marcador a anticorpos, emerge uma capacidade superior de amplificação, pois conseguem concentrar bastantes moléculas propiciadoras de visualização, normalmente enzimas, por molécula de antígeno. Como está presente um grande número de enzimas no polímero, maior quantidade de cromógeno será precipitada, o que resulta numa marcação mais intensa e brilhante, aumentando assim a sensibilidade do método, permitindo detectar até as quantidades mais ínfimas de antígeno. Além disso, estes métodos permitem diminuir os custos com anticorpos primários pois facultam um aumento das suas diluições de trabalho sem comprometer a intensidade das marcações. Com maiores diluições de trabalho dos anticorpos primários surgem também outras vantagens, como a forte diminuição das marcações inespecíficas provocadas pelas marcações cruzadas (RAMOS-VARA, 2005). O fato destes sistemas não possuírem (strept)avidina nem biotina torna desnecessária a utilização de reagentes bloqueadores. Paralelamente permitem, ainda, a utilização de recuperação antigénica mais vigorosa sem o receio de evidenciar biotina endógena. Os sistemas de polímero possibilitam todas estas vantagens enquanto se beneficia da simplicidade e rapidez de um ensaio de poucas etapas. Na generalidade, os métodos são simples e de rápida execução, tornando menos provável a variabilidade intralaboratorial, aumentando a reprodutibilidade e a facilidade de padronização, e diminuindo fatores de erro, equívocos e repetições. Para reforçar esta tendência os reagentes são normalmente fornecidos pelo fabricante em formato líquido, pronto a aplicar, com proteína estabilizadora e conservante. Estas características aumentam a qualidade e garantem a diminuição dos custos do trabalho e do tempo técnico e, quando associadas à possibilidade de aumentar diluições dos anticorpos primários, permitem compensar largamente os custos destes reagentes (RAMOS-VARA, 2005).

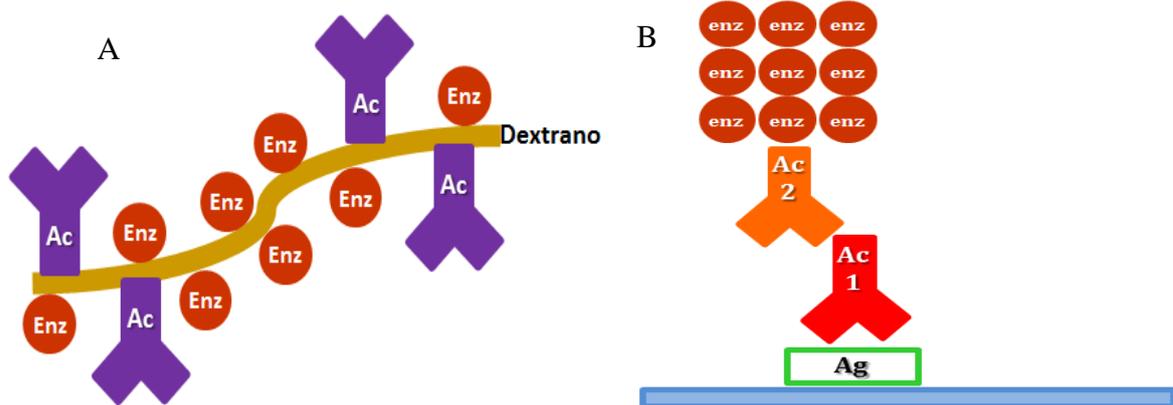


Figura 7. A. Polímero de esqueleto interno. B. Micropolímero de enzimas. Fonte: Ferro, 2013

3.1.4 Aplicações da Imuno-histoquímica

As aplicações da IHQ são amplas e cabe ressaltar, novamente, que seus achados são complementares, objetivando confirmar ou refinar uma avaliação morfológica prévia. Segundo Juan Rosai (2012), “Não há nada mais perigoso (ou caro) que pessoas inexperientes em patologia realizando diagnóstico com base em perfil imuno-histoquímico em desacordo com a citoarquitetura das lesões”.

3.1.4.1 Auxílio na avaliação morfológica

Por vezes, a avaliação morfológica é limitada, pois algumas características celulares e/ou arquiteturais são comuns a diagnósticos distintos, senão díspares. Células de citoplasma amplo em seios subcapsulares de linfonodos seriam apenas macrófagos ou já seriam células metastáticas? Um ninho de células neoplásicas delimitado por um espaço opticamente vazio e uma camada única de células aplainadas: êmbolo tumoral vascular ou reação do estroma com artefatos de processamento histológico? Trata-se de um caso de câncer de mama apenas com componente *in situ*, ou há focos de invasão? (WERNER et al., 2005).

Portanto, a IHQ refina a avaliação morfológica prévia, pois, no primeiro caso, se fossem macrófagos, as células seriam positivas para CD 68 (marcador de histiócitos), por exemplo; no segundo caso, as células aplainadas seriam positivas para um marcador vascular (CD 31 – endotélio vascular; D2-40 – endotélio linfático positividade em imunomarcações para células mioepiteliais (ausentes em casos de invasão) (LUKANDE et al., 2008) (Figura 8).

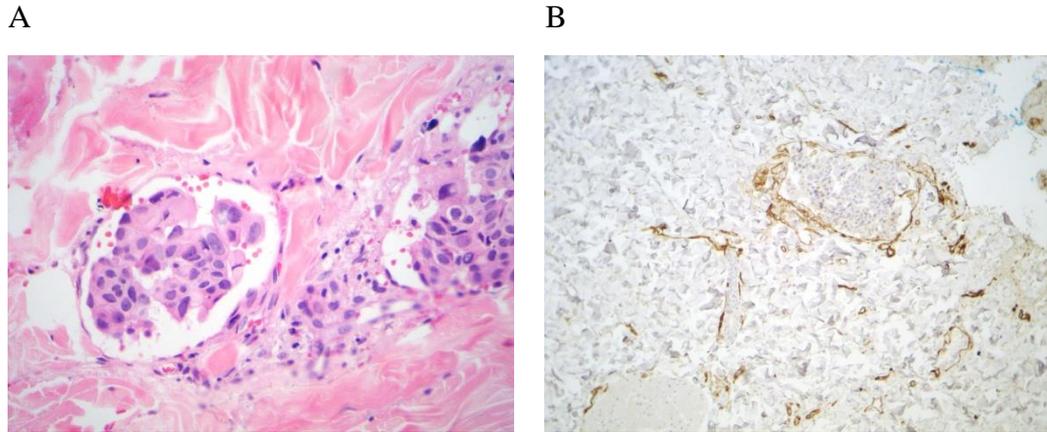


Figura 8. **A.** HE, médio aumento. Caso de neoplasia de mama em pele da mama. Notam-se blocos de células neoplásicas em meio a um espaço opticamente vazio, com raras hemácias, revestido internamente por uma camada de células aplainadas, sugerindo tanto um êmbolo tumoral no interior de um vaso sanguíneo (células aplainadas seriam células endoteliais), quanto uma reação do estroma adjacente, com fibrose (células aplainadas seriam fibroblastos) e uma retração artefactual do estroma. **B.** CD 31, menor aumento. Positividade em células endoteliais de vasos, inclusive um contendo o bloco de células neoplásicas, comprovando se tratar de um êmbolo tumoral vascular. Fonte: HC-UFG/Patologia – 2013.

3.1.4.2 Identificação de estruturas ou de produtos metabólicos celulares

Os diversos antígenos possuem distribuições diversas na célula e o padrão de imunomarcagem identifica essa localização, como ilustrado na figura 9. Além disso, há anticorpos específicos para certas estruturas celulares, como marcadores de grânulos de secreção neuroendócrina (por exemplo, cromogranina A e sinaptofisina) (DIAS-PEREZ e CURRAS, 2013).

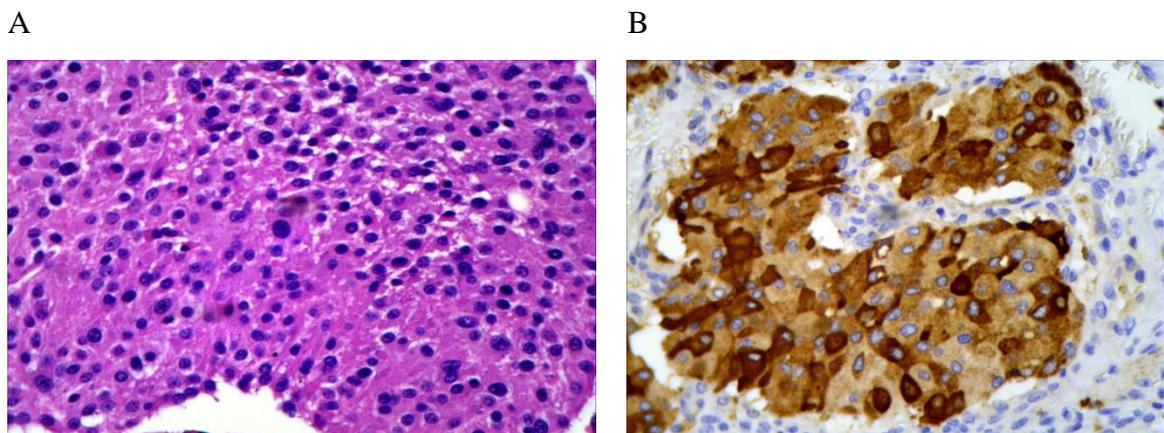


Figura 9. **A.** HE, médio aumento. Caso de paraganglioma carotídeo. Neoplasia composta por ninhos de células poliédricas; de citoplasma amplo, granular e eosinofílico; sugestiva de neoplasia neuroendócrina. **B.** Cromogranina A, médio aumento. Positividade para cromogranina A em grânulos de secreção neuroendócrina, no citoplasma celular. Fonte: HC-UFG/Patologia – 2013.

3.1.4.3 Identificação de patógenos

A figura 10 exemplifica o uso da IHQ em patologia infecto-parasitária que apresenta inúmeros benefícios, tais como:

- resultados rápidos e sensíveis, com menor exposição a material biológico contaminante (pois utiliza MFFIP) (SHI et al., 2007);
- avaliação retrospectiva sobre MPPIF arquivado;
- diagnóstico quando não há material fresco para culturas;
- detecção de micro-organismos em situações adversas (baixa carga do agente, agentes de cultura lenta ou impossível, agentes de detecção difícil por outras técnicas);
- identificação de novos patógenos;
- correlação microbiológica-morfológica, permitindo maior compreensão da patogenia da infecção.

Atualmente, está disponível de grande variedade de anticorpos mono e policlonais para detecção de vírus, bactérias, micobactérias, espiroquetas, protozoários, fungos e, inclusive, príons (BEUKES e THIART, 2012).

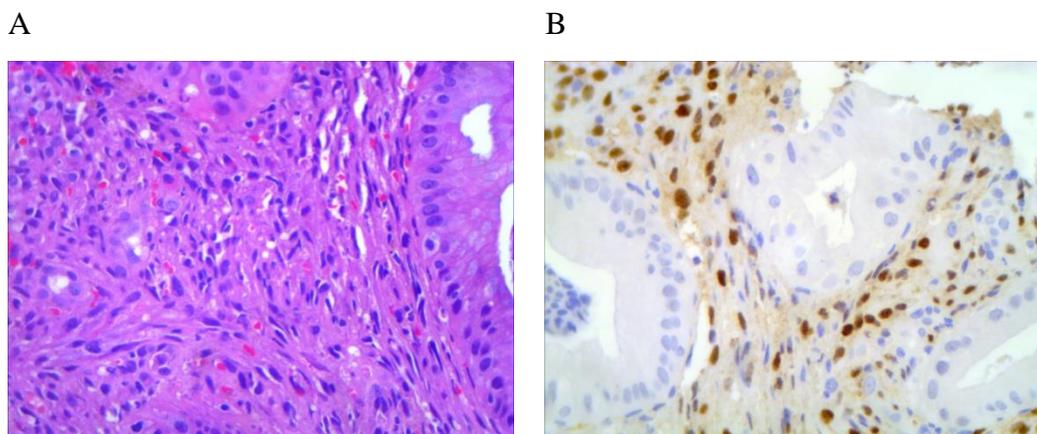


Figura 10. A. HE, maior aumento. Caso de sarcoma de Kaposi em intestino. Intestino sede de neoplasia vascular, formando vasos de calibre diminuto, por vezes preenchidos por hemácia única, sugestiva de sarcoma de Kaposi.

B. HHV-8, maior aumento. Positividade para HHV-8, demonstrando infecção pelo herpesvírus tipo 8, compatível com sarcoma de Kaposi. Fonte: HC-UFG/Patologia – 2013.

3.1.4.4 Definição do sítio primário de neoplasias metastáticas

Esta talvez seja a aplicação na qual a IHQ tem maior impacto na patologia diagnóstica; elucidação de neoplasias metastáticas de sítio primário indeterminado. Infelizmente, mesmo os marcadores mais específicos para determinados sítios anatómicos não são exclusivos desses órgãos, podendo tanto ser expressos por outros tecidos, quanto

apresentar expressão aberrante em neoplasias mais indiferenciadas (CAMBRUZZI et al., 2011) (Figura 11).

Nesse momento, são utilizados painéis de marcadores na tentativa de separar a lesão em uma das grandes categorias (carcinoma, linfoma, melanoma, tumor de células germinativas e sarcoma) e, se possível, tentar especificar o sítio de origem (Figura 12). Além disso, serve como triagem, de maneira a estreitar as possibilidades diagnósticas a serem pesquisadas por métodos de biologia molecular (ZHANG, 2013).

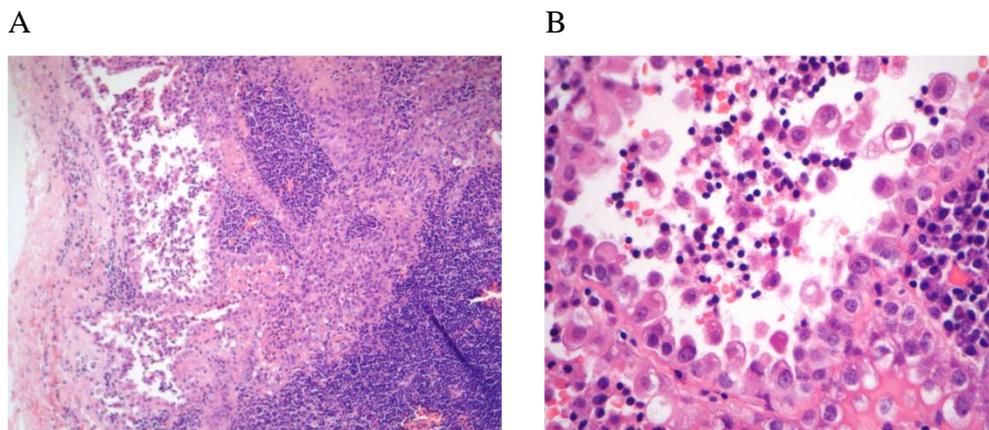


Figura 11. A. HE, menor aumento. Caso de metástase linfonodal com sítio primário a esclarecer (suspeita de metástase de neoplasia de pulmão). Linfonodo infiltrado por neoplasia com esboço de lúmens. B. HE, maior aumento. Notam-se células neoplásicas intermediárias a grandes, redondas, com citoplasma eosinofílico por vezes vacuolado, e núcleo com nucléolo evidente (não exclui metástase de neoplasia de pulmão). Fonte: HC-UFG/Patologia – 2013

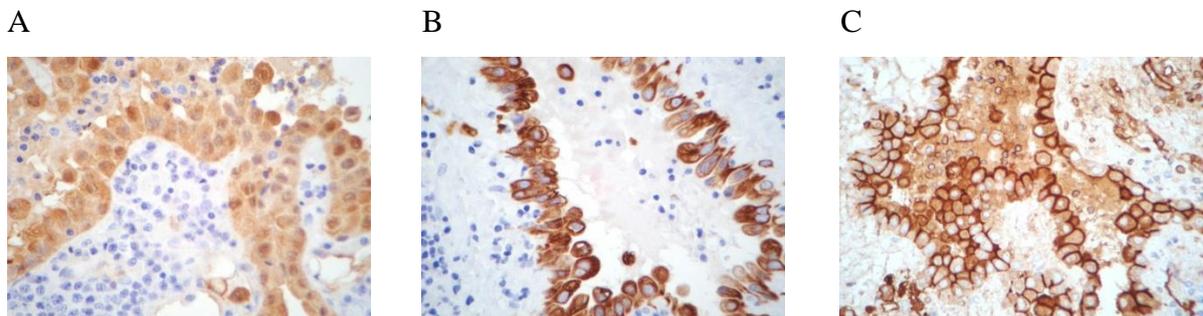


Figura 12. A Calretinina,, B. Citoceratina 5 e C. EMA, maior aumento. Células neoplásicas positivas para marcadores de células mesoteliais e negativas para marcadores de células pulmonares (TTF-1), sugerindo metástase de mesotelioma e não de neoplasia de pulmão. Fonte: HC-UFG/Patologia – 2013

3.1.4.5 Definição de histogênese de neoplasias pouco diferenciadas

Procede-se de maneira semelhante ao relatado no item anterior, principalmente no intuito de identificar se a lesão é primária do órgão em avaliação, ou metastática, quando possível, conforme ilustrado na figura 13.

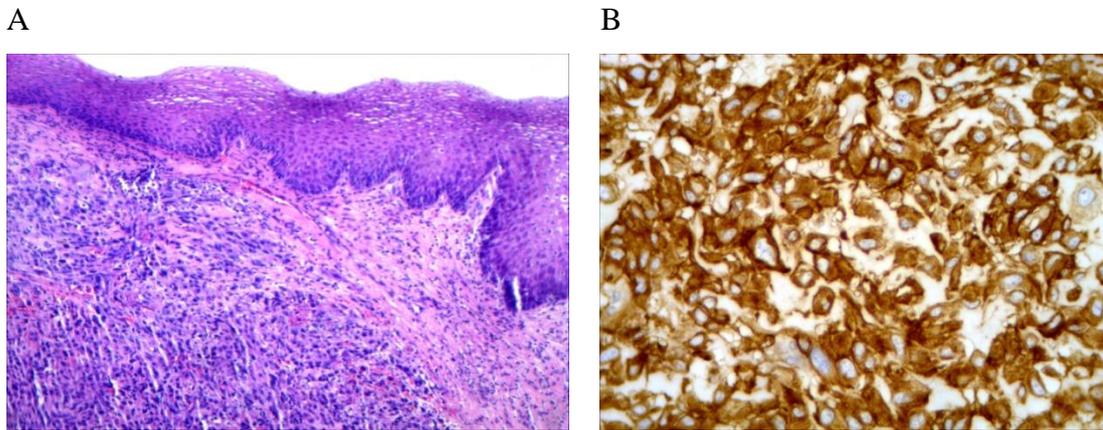


Figura 13. A. HE, menor aumento. Caso de sarcoma uterino pouco diferenciado. Sarcoma de alto grau invadindo colo uterino e todo corpo uterino até a metade externa do miométrio. B. CD 10, maior aumento. Positividade para CD 10 e negatividade para marcadores musculares (actina de músculo liso e desmina), epiteliais (AE1 / AE3) e neurais (S-100), sendo o quadro compatível com sarcoma de estroma endometrial, excluindo-se outros sarcomas (por exemplo, leiomiossarcoma) e carcinomas. Fonte: HC-UFG/Patologia – 2013.

3.1.4.6 Imunofenotipagem de linfomas

A IHQ desempenha papel fundamental na imunofenotipagem de linfomas Hodgkin e não-Hodgkin, especialmente destes últimos (Figura 14). A mais recente classificação das neoplasias hematopoiéticas publicada pela Organização Mundial de Saúde (OMS), em 2008, leva em consideração, no esquema de classificação, apresentação clínica, genética, morfologia, citometria de fluxo e imuno-histoquímica (LUKANDE et al., 2008).

Nessas situações, não há um marcador único para cada entidade. Utilizam-se painéis na tentativa de caracterizar o imunofenótipo da célula neoplásica. Podem-se utilizar marcadores de linfócitos B, linfócitos T e linfócitos NK, além de uma série de marcadores que tanto espelham o momento maturativo / local de maturação em que a célula se encontra, quanto complementam os marcadores prévios (TONG et al., 2013).

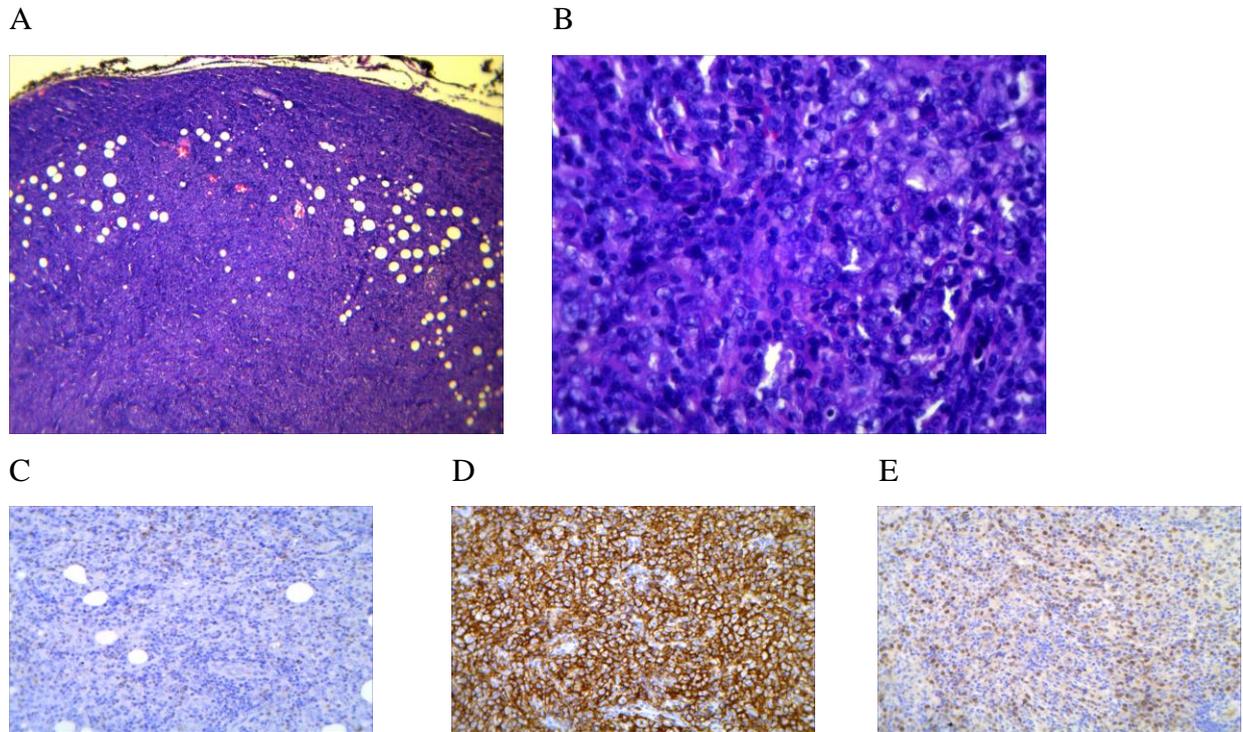


Figura 14. A e B. HE, menor e maior aumento, respectivamente. Linfonodo com histo-arquitetura obliterada por neoplasia maligna composta por grandes células, com núcleos redondos e ovais, com cromatina vesiculosa e nucléolos visíveis, sugestiva de linfoma. C. CD 3, D. CD 20 e E. PAX-5. Em médio aumento, as células neoplásicas são positivas para marcadores de linfócitos B (CD 20 e PAX-5) e negativas para marcadores de células T (CD 3), indicando um linfoma difuso de grandes células B. Fonte: HC-UFG/Patologia – 2013.

3.1.4.7 Classificação de neoplasias

Alguns marcadores na IHQ são avaliados de maneira semi-quantitativa e esse valor é utilizado na criação de graus para classificação de tumores. Por exemplo, a mais recente classificação de tumores neuroendócrinos do trato gastrointestinal, publicada pela OMS em 2010, utiliza como critério de distinção entre tumores grau 1, 2 e 3 o índice de proliferação celular, avaliado através da porcentagem de células positivas (< 3%, de 3% a 20% e > 20%, respectivamente) em imunomarcção pelo Ki-67 (Figura 15) (KLIMSTRAI et al., 2010).

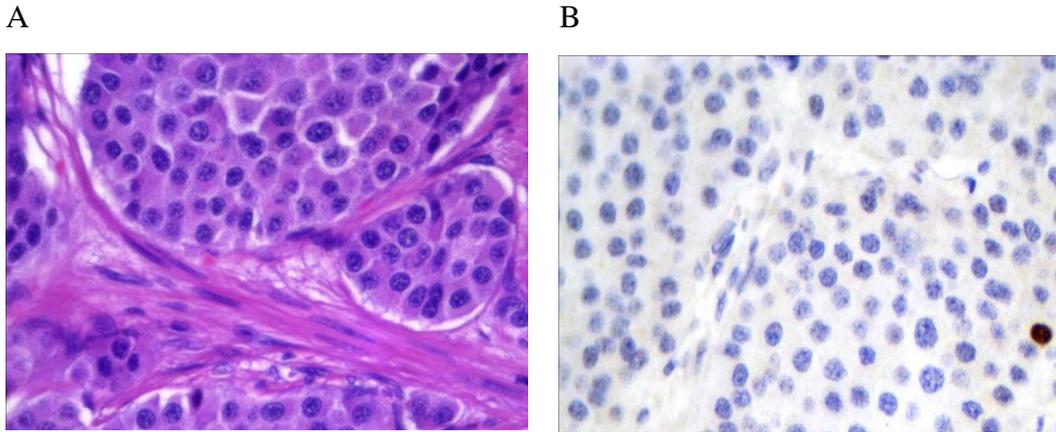


Figura 15. A. HE, maior aumento. Caso de neoplasia neuroendócrina de íleo. Neoplasia composta por ninhos de células poliédricas; de citoplasma amplo, granular e eosinofílico; com núcleos redondos de cromatina salpicada; sugestiva de neoplasia neuroendócrina. **B.** Ki-67, maior aumento. Neoplasia neuroendócrina grau 1, pois o índice de proliferação ao Ki-67 foi positivo em menos de 3% das células neoplásicas. Fonte: HC-UFG/Patologia – 2013

3.1.4.8 Pesquisa de fatores prognósticos e terapêuticos

Há, ainda, a possibilidade de pesquisa de moléculas-alvo para quimioterapias com anticorpos monoclonais e de moléculas que indicam neoplasias com um comportamento biológico mais agressivo. O exemplo mais clássico dessa aplicação encontra-se nos painéis utilizados em casos de neoplasias de mama. Tradicionalmente faz-se pesquisa de receptores hormonais (estrógeno e progesterona) e da proteína HER2 (Figura 16) (tratamento com trastuzumab), de maneira a direcionar tratamento das pacientes e melhorar seu prognóstico. Outras moléculas de interesse terapêutico seriam: CD 20 em linfomas (tratamento com rituximab), CD 117 em tumores estromais gastrointestinais (tratamento com imatinibe) e EGFR em neoplasia de pulmão (tratamento com cetuximab) (GOBBI et al., 2008).

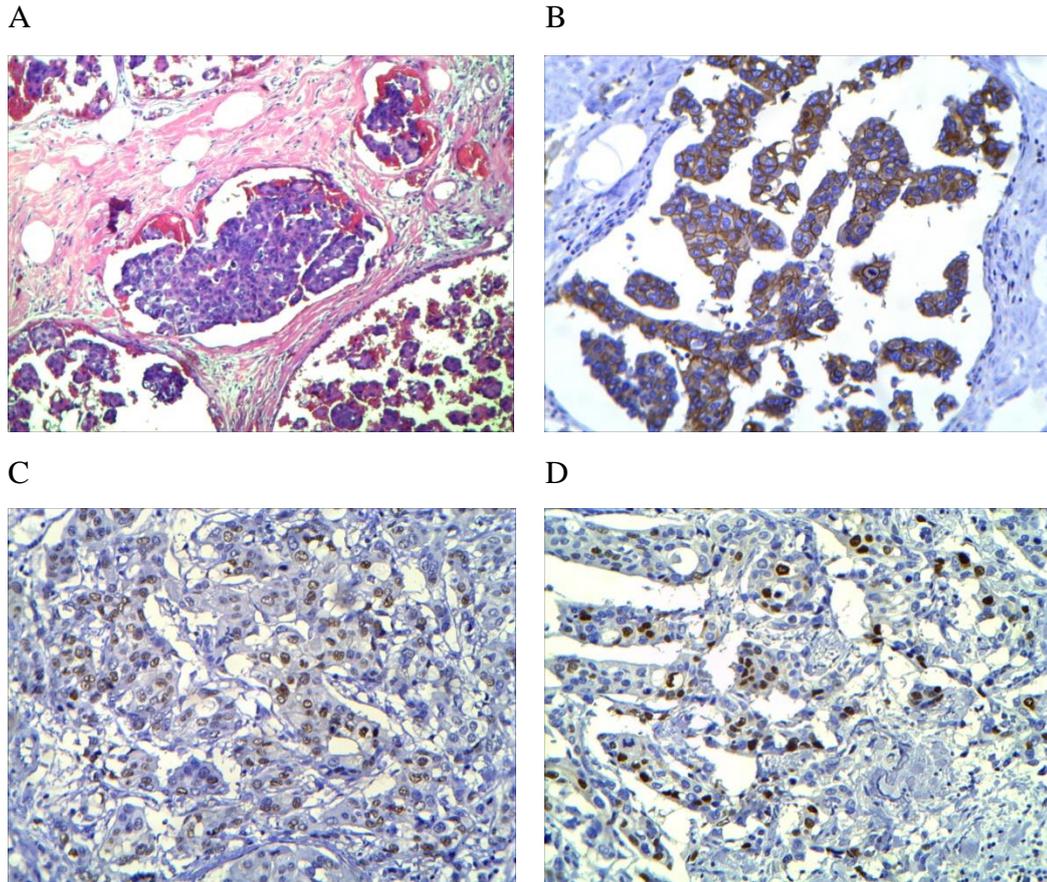


Figura 16. A. HE, menor aumento. Caso de neoplasia maligna de mama. Neoplasia composta por blocos de células com um padrão micropapilar. B. HER2, médio aumento. Marcação duvidosa, sendo necessária complementação com hibridização *in situ* para beneficiar a paciente com tratamento com quimioterápico alvo. C. RE D. RP, médio aumento. Mesmo caso, exibindo positividade para receptores hormonais, estrógeno e progesterona, respectivamente. Fonte: HC-UFG/Patologia – 2013.

3.2 Cienciometria

A cienciometria ou cientometria é conhecida como a pesquisa quantitativa da produção científica que permite entender melhor a amplitude e a natureza das atividades de pesquisa desenvolvidas nas diferentes áreas do conhecimento, de diversos países, instituições e pesquisadores (NONATO, 2003).

O termo surgiu na antiga União Soviética, URSS, e Europa Oriental e alcançou notoriedade com o início da publicação, em 1977, da revista *Scientometrics*, editada originalmente na Hungria e atualmente Holanda. Também na URSS, em Kiev, no ano de 1996, surgiu a obra de Dobrov intitulada “A ciência sobre a ciência” (*Science about Science*). Nesta obra, o autor oferece uma conceitualização da nova disciplina, onde trata a ciência como um processo de previsão, planejamento e gestão das atividades de pesquisa (GRANOVSKY, 2010). No Brasil, os estudos cienciométricos começaram na década de 70, quando professores do curso de Pós-Graduação em Ciências da Informação, atualmente

Instituto Brasileiro de Informação em Ciência e Tecnologia (IBICT), convidaram cientistas internacionais para ministrarem, aos alunos do mestrado, disciplinas que abordavam o tema cienciometria. Durante as décadas de 80 e 90, pesquisadores de diferentes áreas começaram a colaborar com a IBICT em estudos cienciométricos, visto que é cada vez maior o número de estudos no campo da cienciometria (PINHEIRO e SILVA, 2008).

A cienciometria é, portanto, um dispositivo, de medida, baseado em técnicas estatísticas, que tem por objetivo identificar e tratar as informações contidas nas publicações científicas e técnicas, disponíveis nos sistemas de informação, essencialmente, referências bibliográficas de artigos, de livros e de patentes; razão pela qual torna-se importante analisar o papel destas diferentes publicações nas atividades dos pesquisadores. Alguns índices como frequência de artigos e citação destes em bases de dados indexadas, além do fator de impacto dos periódicos onde estão publicados, são as ferramentas da cienciometria (NONATO, 2003).

Segundo Vanti (2002), as possibilidades de aplicação da cienciometria são amplas:

- identificar as tendências e o crescimento do conhecimento em uma área;
- identificar as revistas do núcleo de uma disciplina;
- mensurar a cobertura das revistas secundárias;
- identificar os usuários de uma disciplina;
- prever as tendências de publicação;
- estudar a dispersão e a obsolescência da literatura científica;
- prever a produtividade de autores individuais, organizações e países;
- medir o grau e padrões de colaboração entre autores;
- analisar processos de citação e co-citação;
- determinar o desempenho dos sistemas de recuperação da informação;
- avaliar os aspectos estatísticos da linguagem, das palavras e das frases;
- avaliar a circulação e uso de documentos em um centro de documentação;
- medir o crescimento de determinadas áreas e o surgimento de novos temas.

Sendo assim, as técnicas cienciométricas são importantes para, entre outras atividades, identificar as tendências e o desenvolvimento do conhecimento. Enfim, a análise cienciométrica permite avaliar a produção científica em uma área da ciência e extrair diversas informações a fim de conhecer o desenvolvimento científico e as tendências dentro do tema pesquisado.

4 Materiais e Métodos

Para a análise quantitativa da importância da IHQ nos estudos genéticos, foi utilizada a produção bibliográfica como indicador dos resultados obtidos nos últimos 26 anos. O levantamento dos estudos foi realizado por meio do banco de dados publicado no sítio do *Scopus*, utilizando as palavras-chaves “immunohistochemistry* AND genetic* AND molecular* biology*”, o uso do asterisco indica que qualquer terminação da palavra pode ser aceita, garantindo a busca de palavras no singular e no plural. Utilizou-se somente a forma composta porque separadamente os termos podem indicar uma variedade enorme de trabalhos não relacionados aos assuntos interligados, portanto não se enquadrarem aos objetivos deste estudo. O período da pesquisa foi entre 1986 a maio de 2013, pois neste sítio contém artigos somente a partir de 1986. Foi utilizado o *Scopus* devido a sua abrangência quanto ao número de publicações e qualidade das revistas indexadas.

O *Scopus* é a maior base de dados de resumos e citações de literatura científica revisada por pares nas áreas de ciência, tecnologia, medicina, ciências sociais, artes e humanidade. Oferece uma visão abrangente da produção científica mundial. É atualizado diariamente e inclui 21.000 títulos de mais de 5.000 editoras internacionais. 20.000 revistas e jornais, incluindo 2.600 revistas de acesso aberto. Conta, ainda, com 390 publicações comerciais, 370 séries de livros, 5,5 milhões de documentos de conferências e “*Articles-in-Press*” de 3.850 periódicos e editoras como a *Cambridge University Press*, *Elsevier*, *Springer*, *Wiley-Blackwell*, *Nature*, *Publish Group* e *IEEL*. São 29 milhões de registros, incluindo referências, desde 1995 (84% inclui abstrats) e 21 milhões de registros anteriores à 1996 até 1.823 (SCOPUS, 2013).

A partir das publicações selecionadas foram levantadas as seguintes informações:

- (i) ano de publicação do artigo;
- (ii) periódico em que o artigo foi publicado;
- (iii) tipo de documento publicado (experimental, revisão);
- (iv) nome dos autores do trabalho;
- (v) área do conhecimento em que se enquadra;
- (vi) palavras-chave;
- (vii) instituição à qual estão filiados os autores;
- (viii) países onde foram realizados os estudos;
- (ix) tipo de organismo estudado nos seguintes grupos (mamíferos, humanos, fungos, algas, plantas, protistas, vírus e bactérias, insetos e outros);

- (x) conteúdo celular estudado;
- (xi) patologia associada ao estudo e;
- (xii) tipo de câncer estudado.

O fator de impacto (FI) dos artigos utilizados nas análises foi obtido a partir do *Journal Citation Reports* (JCR) para o ano de 2011 em maio de 2013 (<http://www.bioxbio.com/if/>). O FI é um indicador utilizado para calcular o número médio de citações recebidas por uma revista científica e é obtido por meio da relação entre o número de vezes que a revista foi citada e o número de artigos que ela publicou num determinado período de tempo, normalmente dois anos. A finalidade da utilização deste indicador é descobrir o impacto dos periódicos na comunidade científica (GROSSER, 2012).

Informações como tipo de organismo estudado, componente celular, tipos de patologias e tipos de câncer foram obtidas através da leitura dos resumos (*abstracts*). Alguns artigos não disponibilizam os resumos por isso foram excluídos, ou ainda, são *papers* e não apresentam tais informações.

Em seguida, os dados dos trabalhos foram tabulados e organizados em uma planilha de Excel de acordo com cada variável da pesquisa, conforme já mencionado. A partir de então, foram montadas as tabelas separadamente com a estatística descritiva do estudo.

Após a tabulação dos dados, os mesmos foram analisados por meio de estatística descritiva e correlação de Pearson para avaliar a associação entre o número de publicações por ano e o FI por ano. Adotou-se um nível de significância de 0,05 para todas as análises. Todas as análises foram realizadas no programa Bioestat 5.0 (AYRES et al. 2007).

5 Resultados e Discussão

De acordo com o levantamento realizado, foram encontrados 1958 trabalhos publicados no período de 1986 a abril de 2013 utilizando as palavras “immunohistochemistry* and genetic* and molecular* biology*”.

Em um total de 1958 artigos, 382 foram revisões e 1445 foram artigos originais, perfazendo um total de 74% (Figura 17), demonstrando que houve interesse em utilizar a IHQ aliada a biologia molecular em estudos genéticos. Trabalhos em diferentes áreas demonstram que estudos teóricos tem menor frequência que estudos experimentais ou descritivos (QUIXABEIRA et al., 2010; CARNEIRO et al., 2008). Entretanto, apesar da baixa frequência de artigos teóricos esses são frequentemente os artigos com maior número de citações (LEIMU e KORICHEVA, 2005).

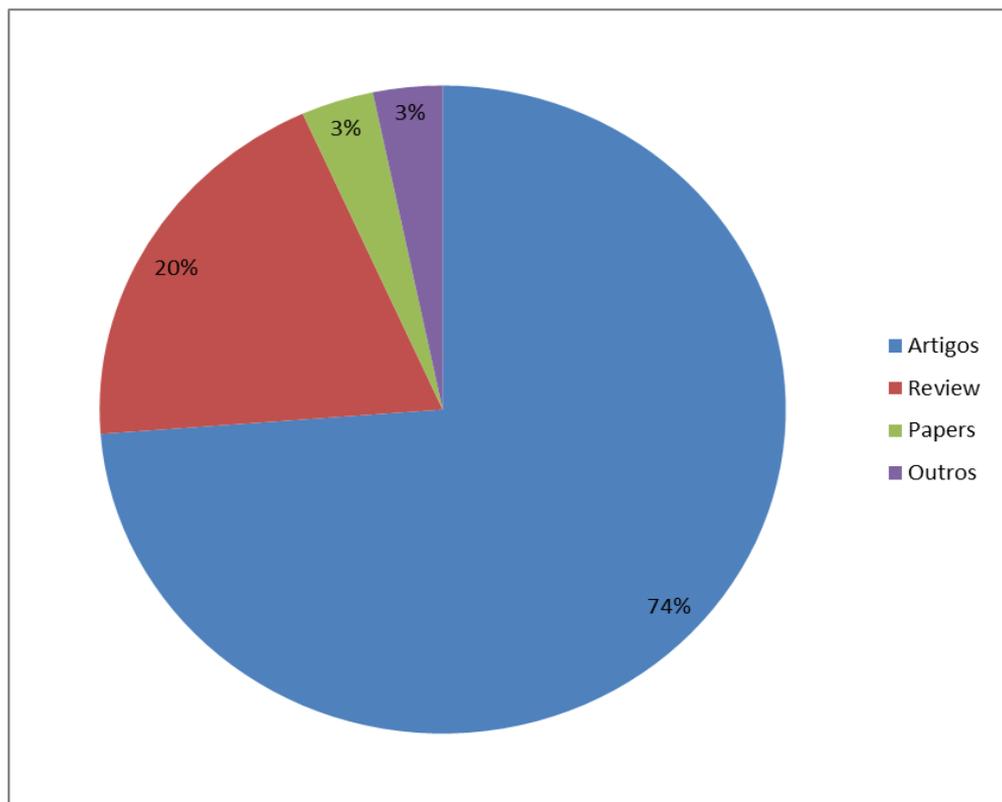


Figura 17. Distribuição dos estudos sobre IHQ e biologia molecular na área da Genética de 1986 a 2012, segundo o tipo de publicação. *Papers* incluem conferências, anais de congresso, notas e editoriais.

De acordo com a figura 18, o número de publicações cresceu de forma acentuada a partir do ano 2000, com um pico no ano de 2005 (254 artigos), seguido por um decréscimo nos anos seguintes, o que pode indicar uma estabilização ou a diminuição do impacto dessa ferramenta na literatura. Segundo Jardim (2013), desde a sua introdução, na década de 70, as

publicações científicas com aplicações da IHQ aumentaram significativamente. Esse fato reflete a posição que esta ferramenta ocupa como complementar e indispensável no diagnóstico diferencial. Além disso, o aumento do número de publicações evidencia o aumento de pesquisadores interessados nesse ramo da biologia. Levando em conta que o número de publicações é uma importante medida para quantificar o progresso da ciência, esse aumento de publicações se deve, em parte, ao contínuo esforço em aperfeiçoar a técnica de IHQ. Outro aspecto importante é que vários estudos têm sido realizados com o objetivo de tornar a IHQ uma ferramenta confiável a fim de aumentar a qualidade e a sua contribuição diagnóstica (NONOGAKI et al., 2007).

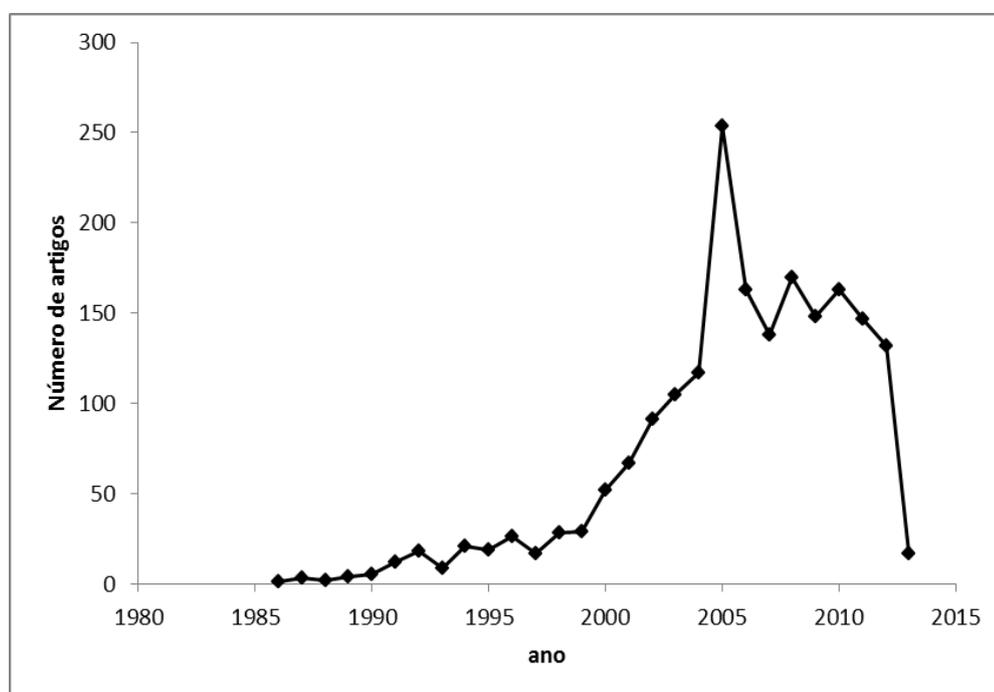


Figura 18. Numero de artigos publicados em porcentagem, ao longo dos 26 anos, na área da Genética utilizando a IHQ e biologia molecular, indexados no *Scopus*.

Na avaliação do número de revistas e o total de artigos, observou-se que 160 diferentes revistas publicaram sobre o assunto estudado. Porém, somente nove revistas obtiveram um número de publicações igual ou superior a 15 trabalhos, perfazendo um total de 519 artigos, que corresponde a 26,5% das publicações (Figura 19).

Em estudos genéticos correlacionados a IHQ, as revistas com alta taxa de publicações como mostra a figura 12, observa-se que a revista *Journal of Biological Chemistry* publicou 375 artigos, o que corresponde a um total de 19,1% das publicações. A *Journal of Biological Chemistry* publica artigos baseados em pesquisas originais que contribuem para a compreensão das bases moleculares e celulares dos processos biológicos e,

assim como as nove revistas ranqueadas, apresenta um enfoque multidisciplinar, o que confirma a importância da IHQ em diferentes áreas do conhecimento mesmo na era biomolecular (ROCCO, 2012).

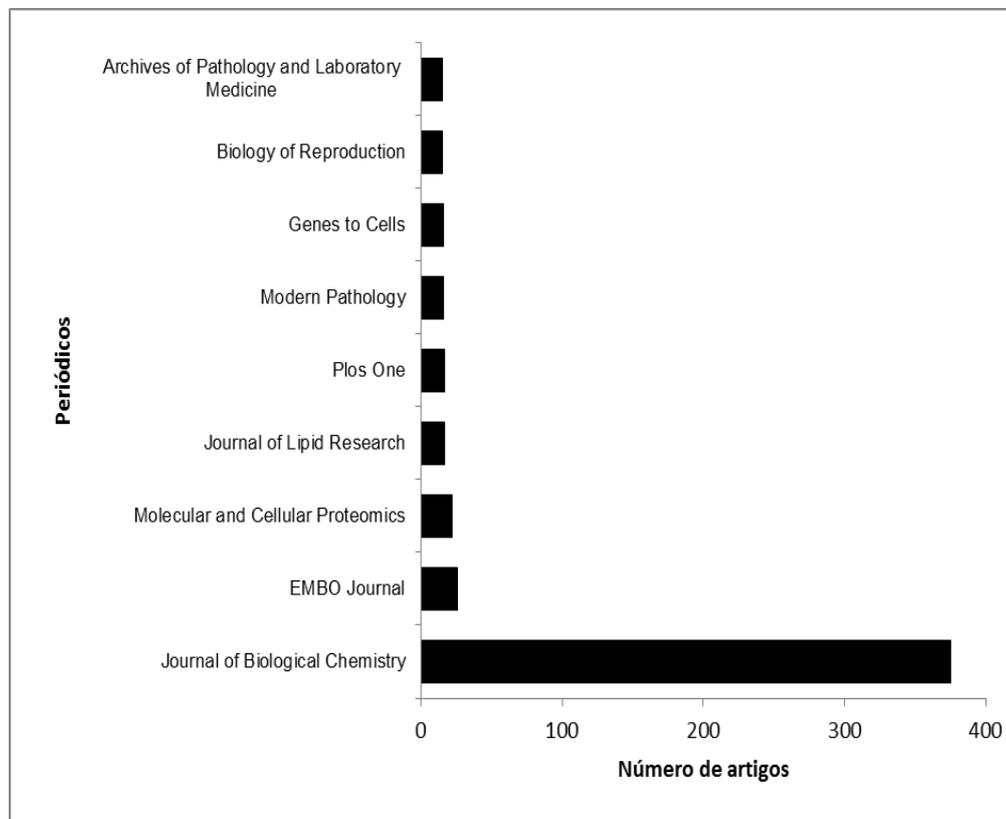


Figura 19. Revistas com frequência de publicação maior ou igual a 15 artigos.

Quanto ao FI dos periódicos utilizados nas análises verificou-se um valor médio de 4,7 ($\pm 4,0$), variando de 0,1 a 51,7. O periódico com o maior número de publicações, a *Journal of Biological Chemistry*, apresenta um FI de 4,65, o que é muito próximo do FI médio. Além disso, os nove periódicos que mais publicaram tem um alto FI, apenas dois apresentam FI menor do que três (Figura 20). Os resultados evidenciam um considerável impacto do assunto pesquisado na comunidade científica. Podemos verificar uma fraca correlação negativa entre o FI e o ano ($r = -0,07$; $p = 0,0356$).

A cienciometria visa o avanço do conhecimento e busca relacionar este com questões sociais e políticas públicas. Tem, portanto, um caráter multidisciplinar. Sua meta é gerar informações e discussões que contribuam para superação dos desafios característicos da ciência moderna (SHTOVBA e SHTOVBA, 2013). E, acima de qualquer definição ou conceito, sabe-se que a cienciometria tem um grande potencial de aplicação, despertando o interesse de governos e de instituições de pesquisa. Ademais, índices como os de citação e fator de impacto (FI) de revistas vêm se tornando uma importante fonte de informação para

historiadores, sociólogos e outros pesquisadores interessados na revolução da ciência (SILVA et al., 2001). Além disso, esses índices são importantes uma vez que fazem parte dos critérios principais para escolher as revistas que compõem o banco de dados *Scopus* que leva em consideração, ainda, a periodicidade e acessibilidade de uma revista.

O conceito por trás da indexação de citações é muito simples: ao reconhecer que o valor da informação é determinado por aqueles que a usam, a melhor maneira de medir a visibilidade de um trabalho é calculando o impacto que ele tem sobre a comunidade científica. Ao utilizar ou citar determinada fonte, o pesquisador determina a influência da ideia daquele autor sobre um corpo de conhecimento (VANTI, 2011). Portanto, embora para alguns autores a quantidade de publicações, citações e suas combinações nem sempre são indicadores da qualidade de um trabalho científico e proponha cada vez mais o uso de novos índices, o FI continua sendo um importante índice cienciométrico (GROESSER, 2012; TIRGAR et al., 2013).

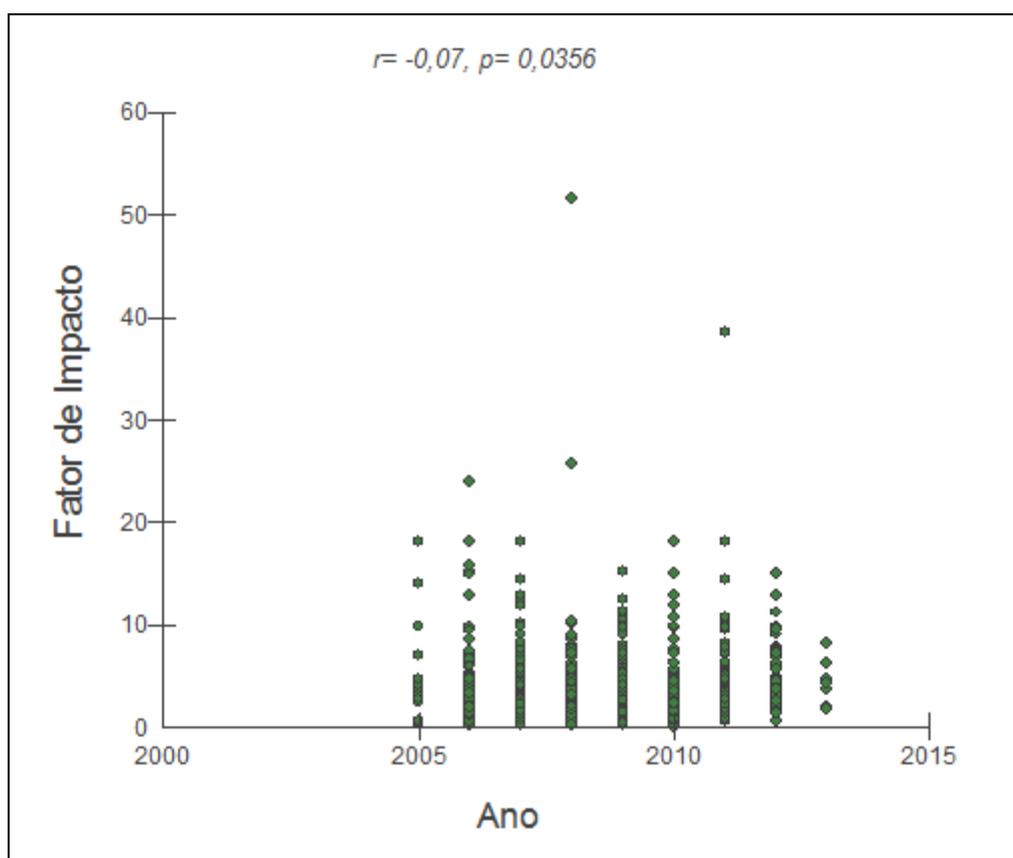


Figura 20. Fator de Impacto (FI) e ano das revistas analisadas.

Dos 160 diferentes autores que publicaram os artigos analisados no presente levantamento, 16 publicaram cinco ou mais artigos sobre IHQ e biologia molecular na área da

Genética entre 1986 e 2013. Estes 16, juntos perfizeram um total de 4,3% de todas as publicações, sendo que Michal, M. publicou sete artigos enquanto Benhattar, J. e Miettinen, M. publicaram seis artigos cada um (Figura 21). Portanto, não se observa nenhum autor que se destacasse quanto ao número de publicações.

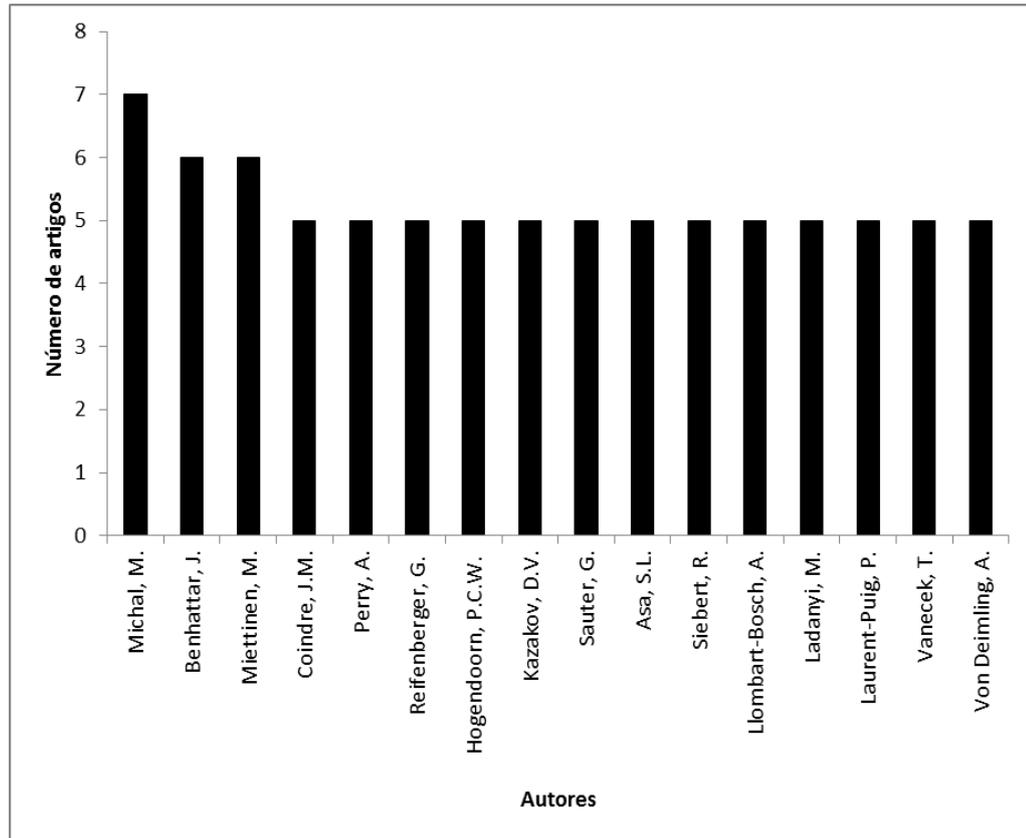


Figura 21. Nomes de 16 autores principais que possuem a partir de cinco publicações no tema pesquisado.

Os artigos foram publicados em oito áreas científicas diferentes segundo a classificação do SCOPUS, sendo que as que mais publicaram artigos relacionados à IHQ aliada à biologia molecular na área da genética, no período analisado (1986 a 2013), foram Genética e Biologia Molecular (44%), seguida por Medicina (38%), Neurociência (5%), Ciências Agrárias e Biológicas (3%), Imunologia e Microbiologia (3%), Farmacologia, Toxicologia e Farmacêutica (1%) e outros (6%) (Figura 22). Isso sugere que, apesar do interesse multidisciplinar, a IHQ teve impacto, principalmente, no campo da Genética e Biologia Molecular e Medicina que, juntas, representam 82% das publicações. Confirmando seu uso como técnica complementar no diagnóstico e pesquisas (ROCCO, 2012). Os recentes avanços ocorridos na área da biologia molecular apresentam-se hoje como uma importante fonte de estudos, baseados em especial na associação da análise de resultados clínicos com a observação de exames laboratoriais capazes de detectar alterações moleculares em tecidos

obtidos através de procedimentos cirúrgicos. Neste sentido, destaca-se a IHQ como uma ferramenta de grande relevância por permitir a obtenção destas informações por meio de procedimentos relativamente de baixo custo e disponíveis na maior parte dos laboratórios de anatomia patológica (PINHO, 2005; TAYLOR, 2006).

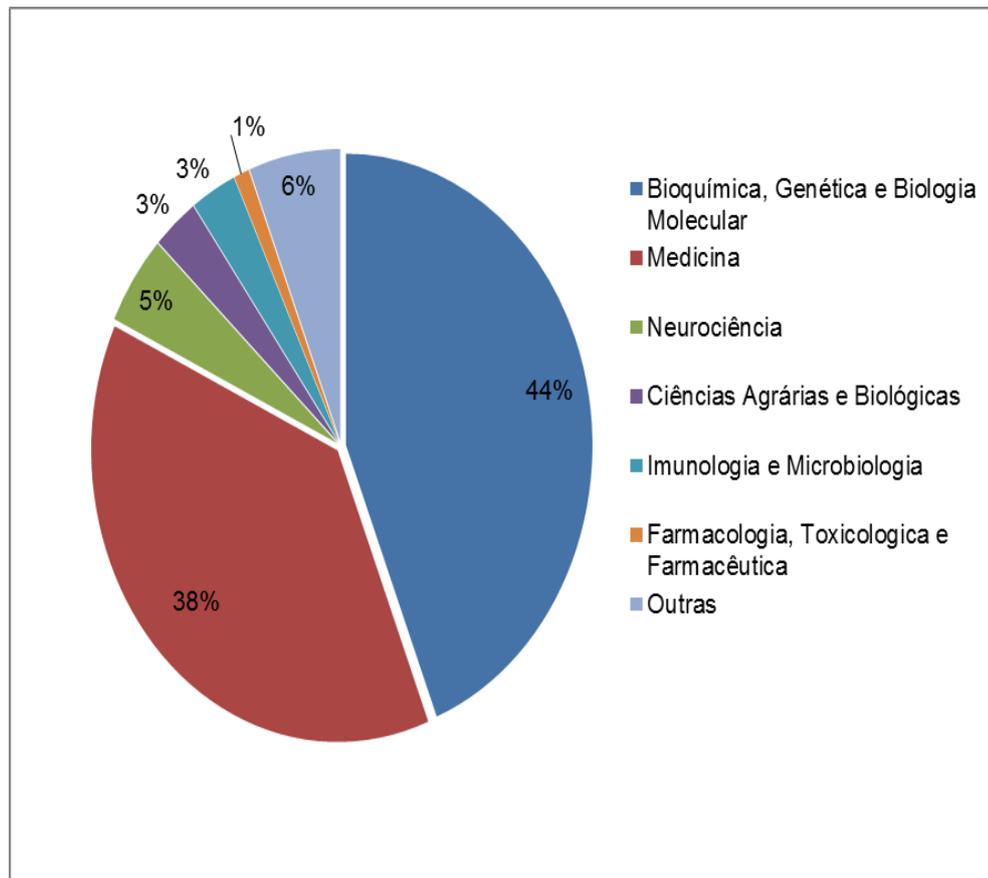


Figura 22. Principais áreas científicas de publicação dos estudos relacionados IHQ e biologia molecular na área da Genética entre 1986 e 2013.

Dentre as palavras-chave, pode-se observar que *Immunohistochemistry* foi a mais utilizada (17%), seguida por biologia molecular (13%). As 10 primeiras palavras equivalem a aproximadamente 40% de um total de 160 palavras relacionadas ao tema (Tabela 1).

Tabela 1: As dez principais palavras-chave utilizadas nas publicações referentes a IHQ e biologia molecular no campo da genética no período de 1986 a 2013.

Palavras-chave	n	%
Immunohistochemistry	1887	17
Article	1436	13
Priority jornal	1341	12
Human	1312	12
Humans	1234	11
Animals	935	8
Controlled study	911	8
Nonhuman	905	8
Molecular biology	699	6
Protein expression	612	5
Total	11272	100

Quanto à filiação institucional dos autores verifica-se uma grande diversidade com um total de 160 instituições diferentes. Entretanto, observou-se que nove instituições publicaram 20 ou mais artigos e equivalem a apenas 15 % do total de publicações. Embora a instituição com maior número de artigos publicados, *Inserm* com 39 (3 %) seja francesa, os EUA contam com seis instituições, entre as nove, que mais publicaram, o que perfaz um total de 143 publicações justificando o maior volume de publicações nos periódicos deste país (Figura 23), bem como o predomínio da língua inglesa na redação dos mesmos. Pinto e Andrade (1999) afirmam que a situação financeira das instituições de pesquisa em outras partes do mundo é mais crítica do que a americana. Daí a dificuldade de instituições filiadas a países em desenvolvimento em promover atividades científicas. Outro aspecto importante é a migração dos cientistas para países desenvolvidos, devido a melhores vantagens financeiras aliada a melhor infraestrutura em relação ao seu país de origem (CURRÁS e BARREIRO, 2008).

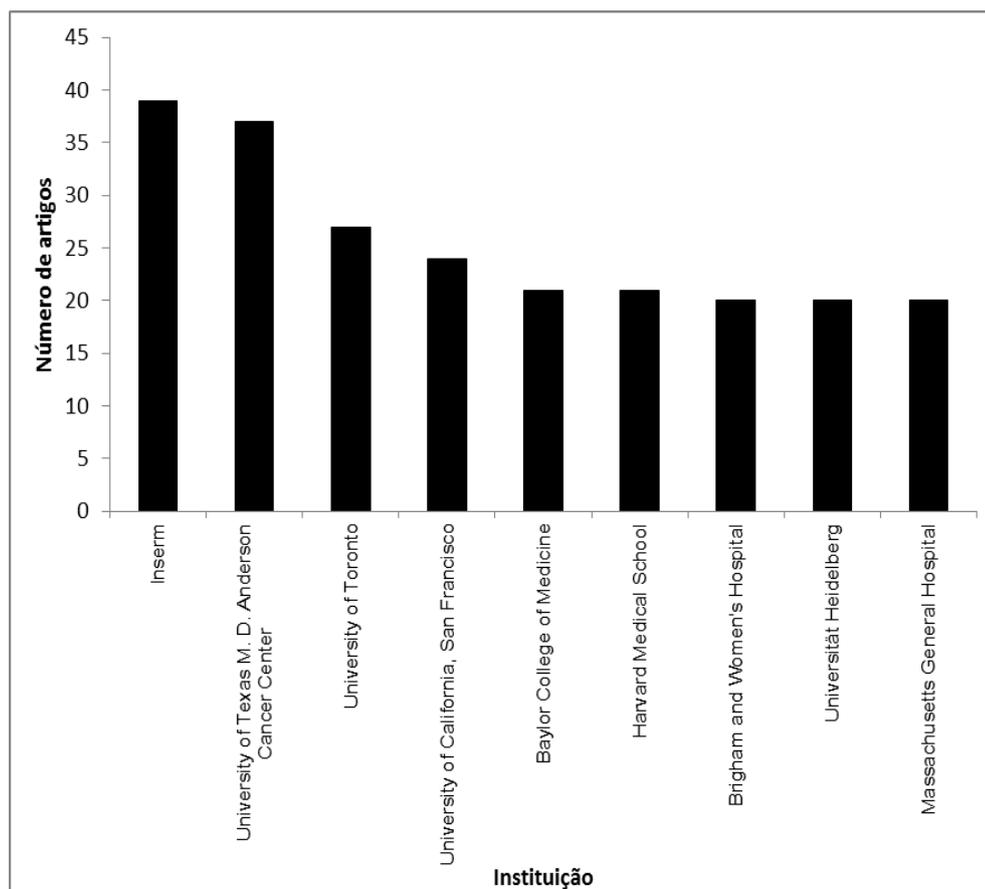


Figura 23. Principais filiações institucionais dos autores que mais publicaram sobre IHQ e biologia molecular no campo da genética no período de 1986 a 2013.

Observou-se que os dez países que mais publicaram artigos envolvendo IHQ no campo da genética entre 1986 a 2013 (Figura 24) equivalem a aproximadamente 78% do total de publicações. Verifica-se que os EUA aparecem com 823 artigos, o que equivale a 41% das publicações seguido, em ordem decrescente por Japão, Alemanha, Reino Unido, França, Itália, Canadá, China, Espanha e Suíça, com 215, 202, 153, 144, 116, 112, 106, 68 e 60 artigos respectivamente. O Brasil, com apenas 20 publicações (0,9%), aparece em vigésimo lugar. De acordo com Carneiro e colaboradores (2008), o grande número de publicações por países de primeiro mundo é o reflexo da infraestrutura e investimento desses países em pesquisa. Nossos resultados são semelhantes àqueles encontrados por Quixabeira e colaboradores (2010), quando demonstrou que o número de publicações com a citometria de fluxo (CMF) foi maior em países desenvolvidos. A IHQ, a exemplo da CMF é considerada uma técnica de custo elevado, mesmo apresentando uma relação custo/benefício positiva (JARDIM et al., 2013). Diante disso, fica claro que países em desenvolvimento, como o Brasil, continuam enfrentando dificuldades para realizar pesquisas em áreas que necessitam de alta tecnologia tal como a genética e biologia molecular.

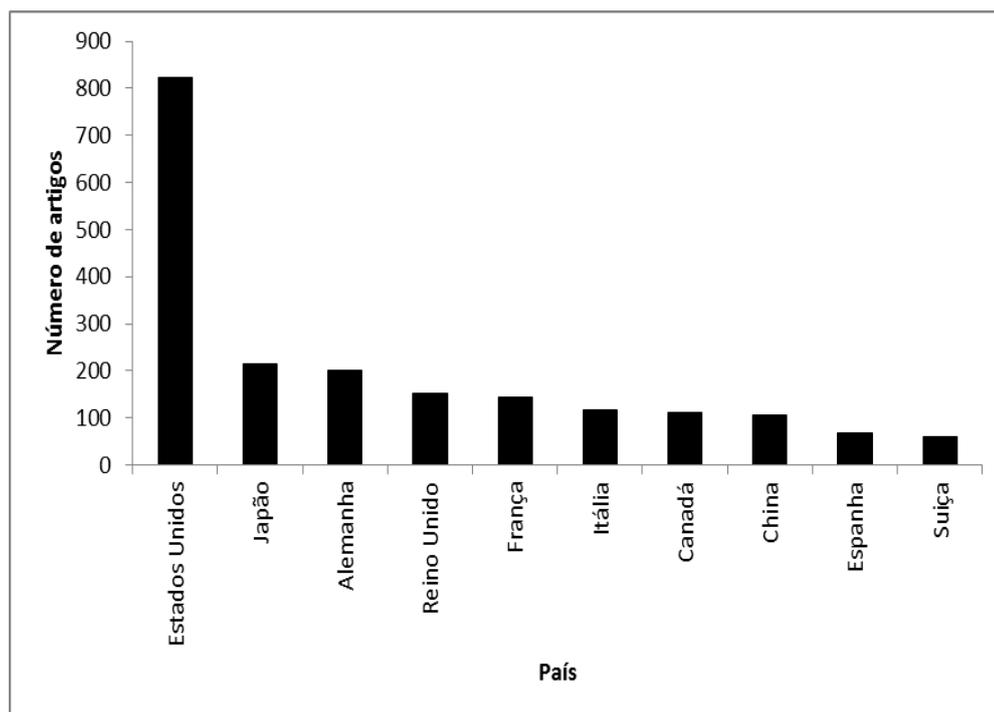


Figura 24. Descrição dos dez países que publicaram 60 ou mais artigos sobre IHQ e biologia molecular no campo da genética no período de 1986 a 2013.

Em relação ao idioma utilizado na redação dos artigos científicos observou-se que o inglês predominou com 1848 artigos publicados, perfazendo aproximadamente 94% de todas as publicações, conforme a tabela 2. O grande número de publicações por parte dos EUA, uma vez que as revistas que mais publicaram são americanas, bem como as principais filiações institucionais, justificam o predomínio da língua inglesa nas publicações analisadas.

Tabela 2. Idiomas mais utilizados nas publicações sobre IHQ e biologia molecular no campo da genética.

Idioma	n	%
Inglês	1845	94.24
Francês	32	1.63
Alemão	25	1.27
Chinês	11	0.56
Espanhol	11	0.56
Japonês	8	0.41
Outros	26	1.33
Total	1958	100.00

De acordo com a tabela 3, análise dos tipos de organismos estudados geneticamente com o uso da IHQ associada a técnicas de biologia molecular revelou que a maior parte dos estudos foi desenvolvida com humanos, representando 1.235 artigos (65%), seguido por outros mamíferos com 424 artigos (22,6%), outros animais com 80 artigos (4,3%), insetos

(4,1%), plantas e algas com 27 artigos (1,4%) bactérias e vírus com 17 artigos (0,9%), protozoários com 8 artigos (0,4%) e fungos com 5 artigos (0,3%).

Apesar de existirem diferentes organismos sendo estudados com o uso da IHQ, fica evidente que a maior parte dos artigos foi desenvolvida em trabalhos com a espécie humana, usando a técnica principalmente para a detecção de patologias. Os resultados aqui demonstrados são similares àqueles encontrados por Quixabeira e colaboradores (2010), quando avaliou o uso da citometria de fluxo, uma importante ferramenta para o diagnóstico e pesquisas, em estudos genéticos, demonstrando a superioridade de estudos humanos. De acordo com RAMOS-VARA (2005), a IHQ é uma ferramenta importante em laboratórios de pesquisa e diagnóstico humano quanto naqueles que tem como objetivo diagnóstico e pesquisa veterinária.

Tabela 3. Tipos de organismos estudados de publicação dos estudos relacionados IHQ, Genética e Biologia Molecular entre 1986 e 2013.

Organismos estudados	n	%
Humanos	1235	65,9
Outros mamíferos	424	22,6
Outros animais	80	4,3
Insetos	77	4,1
Plantas e algas	27	1,4
Bactérias e vírus	17	0,9
Protozoários	8	0,4
Fungos	5	0,3
Total	1873	100,0

Com relação ao tipo de material genético estudado, 545 artigos (40%) foram realizados com proteínas, 512 artigos (38%) com RNA e 291 artigos (22%) com DNA (Figura 25).

Segundo Quixabeira e seus colaboradores (2010), a escolha do material para estudo acontece de acordo com o organismo estudado, sendo que em humanos predomina a escolha pela pesquisa do fenótipo (proteína), uma vez que são abordados vários temas para pesquisa como, por exemplo, diagnóstico e prognóstico de doenças através da marcação das proteínas evidenciando o fenótipo celular. Contudo em qualquer grupo de organismo pode se estudar qualquer tipo de material (DNA, RNA e proteína) (NOLAN e MANDY, 2006).

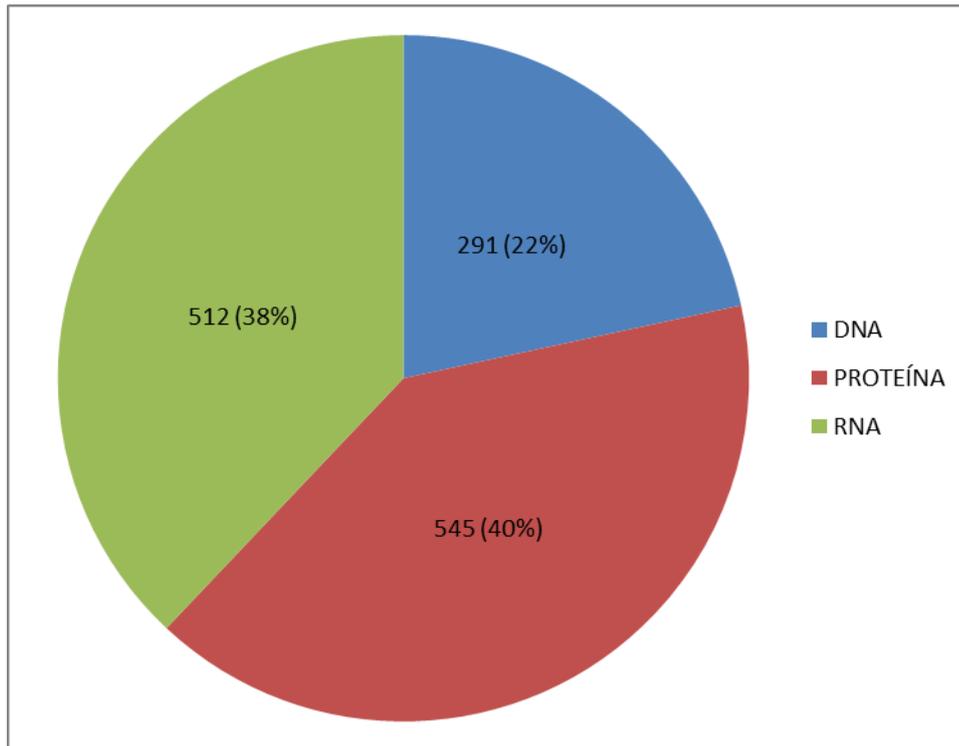


Figura 25. Tipo de estudo por artigos, por análise do conteúdo celular.

Quanto ao tipo de patologia investigada através da IHQ aliada a técnicas de biologia molecular na área da genética, dos 1958 artigos analisados 1154 (59%) estão relacionados a algum tipo de patologia (Figura 26). É evidente o maior enfoque na área oncológica com 701 (63%) artigos publicados. Esse fato reflete a posição que a IHQ ocupa, desde sua introdução na patologia na década de 70 até os dias de hoje, como uma técnica complementar e importante no diagnóstico diferencial (JARDIM et al., 2013). Leong e Wright (1987), patologistas australianos, escreveram o primeiro artigo que avalia a contribuição da IHQ na área de diagnóstico de tumores. Segundo os autores, a IHQ foi particularmente de grande auxílio nos diagnósticos diferenciais entre linfoma anaplásico e carcinoma, e na identificação de melanoma amelanótico. Werner e colaboradores (2005) afirmam que em 95% dos casos em que o patologista está diante de um diagnóstico difícil, a IHQ pode ajudá-lo a firmar se não o diagnóstico conclusivo pelo menos um diagnóstico apropriado.

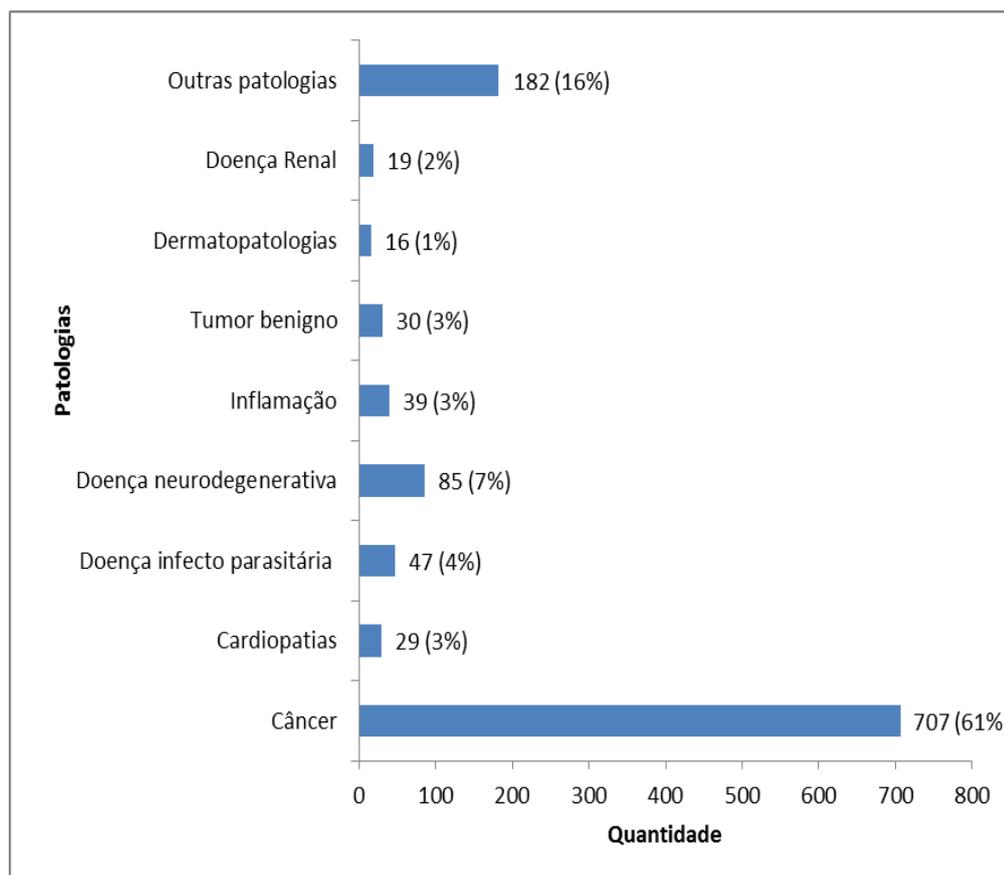


Figura 26. Principais patologias estudadas nos artigos levantados.

Na tabela 4 estão listados os tipos de câncer pesquisados nos estudos selecionados. Observa-se, na área oncológica, um número elevado de pesquisas em leucemias e linfomas com 91 artigos publicados (12,93%), seguido por sistema nervoso, mama, colorretal, pulmão e renal e bexiga, que juntos somam 372 (52,85%) artigos publicados. Em relação às doenças linfoproliferativas, muitos estudos são conduzidos no sentido de estabelecer sua confiabilidade no diagnóstico e conduta clínica. A classificação para tais neoplasias é baseada em critérios laboratoriais e clínicos. Nesse sentido, deve-se incluir sempre que possível, o exame de IHQ como ferramenta complementar, cuja indicação, seleção de anticorpos, e interpretação exigem conhecimento do contexto clínico, assim como informações de exames laboratoriais, citogenética, moleculares além da imunofenotipagem por citometria de fluxo (ZERBINI, 2013).

Embora o câncer de sistema nervoso (gliomas, astrocitomas, meningioblastoma entre outros) seja o segundo em número de artigos publicados (73 artigos), a utilidade da IHQ no prognóstico desses pacientes permanece incerta, entretanto, a técnica pode contribuir com outros achados como, por exemplo, índice mitótico, papel pró-apoptótico. Além de ser muito

importante na elucidação de metástases cerebrais e tumores do sistema nervoso central (RIBEIRO et al., 2004).

O estudo imuno-histoquímico tem sido utilizado em diferentes situações da patologia mamária, sendo as mais importantes: avaliação de fatores preditivos e prognósticos do câncer de mama, pesquisa de células epiteliais metastáticas em linfonodo sentinela, diagnóstico diferencial de lesões mamárias e determinação de possível origem de células metastáticas (GOBBI et al, 2008; HELAI, et al., 2013). A importância clínica do uso da IHQ foi reconhecida e incorporada pelo sistema único de saúde e por convênios médicos a partir da década de 1990, quando foi implantada no Laboratório de Patologia Mamária da Faculdade de Medicina de Minas Gerais (UFMG). A IHQ passou a ser realizada rotineiramente na avaliação de fatores preditivos em todos os casos de câncer de mama diagnosticados no Hospital das Clínicas da UFMG a partir de 2000 (SALLES, 2009).

Tabela 4. Tipos de câncer pesquisados nas publicações.

Tipo de Câncer	n	%
Leucemia e Linfomas	91	12.93
Sistema nervoso	73	10.37
Mama	66	9.38
Colorretal	59	8.38
Pulmão	43	6.11
Renal e Bexiga	40	5.68
Fígado e Pâncreas	36	5.11
Útero e Ovário	35	4.97
GIST e esôfago	33	4.69
Próstata	26	3.69
Gástrico	23	3.27
Melanoma	21	2.98
Cabeça e pescoço e Tireoide	17	2.41
Osso	13	1.85
Outros	128	18.18
Total	704	100.00

6 Conclusões

Observou-se que houve a tendência de aumento no número de publicações ao longo dos anos, com um pico de publicações no ano de 2005 sendo que os trabalhos foram, na maioria, artigos originais.

Verificou-se que os autores que mais publicaram são de países desenvolvidos, assim como as revistas e as instituições, justificando o predomínio da língua inglesa na redação dos mesmos. O fator de impacto médio das revistas analisadas foi de 4,7. Países em desenvolvimento, entre eles o Brasil, apresentam pouca contribuição em estudos de genética usando IHQ e biologia molecular. O que confirma a necessidade de estudos cienciométricos para despertar o interesse de governos e instituições que fomentam pesquisa nesses países, a fim de que haja maior investimento de pesquisa em áreas como a genética molecular.

Diferentes organismos foram estudados, com um maior número de trabalhos publicados com humanos. Nos vários tipos de estudos realizados há o predomínio no uso de proteína (fenótipo) e a maior parte dos estudos envolve patologias. Dentre as doenças investigadas, o câncer obteve maior número de trabalhos publicados, sendo que as leucemias e linfomas foram os tipos de câncer com o maior número de estudos.

Portanto, conclui-se há que um interesse multidisciplinar em relação ao uso da IHQ, uma vez que a mesma é uma ferramenta complementar indispensável para a pesquisa, diagnóstico diferencial e fatores prognósticos mesmo na era da biologia molecular.

Referências

- AYRES, M.; AYRES JÚNIOR, M.; AYRES D.L.; SANTOS, A.A.S. BioEstat: Aplicações estatísticas na área de ciências biomédicas. 4 ed. Belém, 2007.
- BEUKES, C.A.; THIART, J. The incidence of human herpes vírus -8 expression lymphonode biopsies from human immunodeficiency vírus positive patients. **Histopathology**, v. 61, p. 942-944, 2012.
- CAMBRUZZI, E.; PÊGAS, C.L.; FERRARI, M.B. Avaliação imuno-histoquímica de 100 casos de metástases encefálicas e correlação com o sítio primário do tumor. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 47, n. 1, p. 57-64, 2011.
- CARNEIRO, F.M.; NABOUT, J.C.; BINI, L.M. Trends in the scientific literature on phytoplankton. **Limnology**, v. 9, p. 153-158, 2008.
- CHAN, J.K. Advances in immunohistochemistry: impacto on surgical pathology practice. **Seminary Diagnostic Pathology**, v.17, n. 3, pp. 170-177, 2000.
- CURRÁS, E.; BARREIRO, E.W. Integration in Europe of human genetics results obtained by Spaniards in the USA: A historical perspective, **Scientometrics**, v. 75, p. 473-493, 2008.
- DABBS, D. Diagnostic Immunohistochemistry – Theranostic and Genomic Applications. Filadélfia: Elsevier, 2010.
- DIAZ-PÉREZ, J.I.; CURRAS, F.M. Cromogranina A y tumores neuroendócrinos. **Endocrinología y Nutrición**, v. 60, n 7, p. 386-395, 2013.
- FERRO, A. M. Imunohistoquímica [Internet] [acesso em 1º de dezembro de 2013]. Disponível em <http://amadeuferro.webs.com/documentos/texto%20total%20v2.4a.pdf>.
- GOBBI, H.; ROCHA, R.M.; NUNES, C.B. Predictive factors of breast cancer evaluated by immunohistochemistry. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 44, n. 2, p.131-140, 2008.
- GRANOVSKI, Y.V. Is it possible to measure Science? V. V. Nalimov's research in scientometrics. **Scientometrics**, v. 52, n. 2, p. 127-150, 2010.
- GROESSER, S. Dynamics of journal impact factors. **Systems Research and Behavioral Science**, v. 29, p. 624-644, 2012.
- GUESDON, J.; TERNYNCK, T.; AVRAMEAS, S. The use avidin-biotin interaction in immunoenzymatic techniques. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v. 27, n. 8, p. 1131-1139, 1979.
- GUPTA, B.M. Heredity Blood Disorders (HBD): A Scientometric Analyses of Publications Output from India during 2002-2011. **Journal of Blood Disorders and Transfusion**, v.3, n.4, p. 126-132, 2012.

HELAI, T.E.A.; IBRAHIM, E.A.A.; ALLOUB, A.L.A. Immunohistochemical analyses of tumor – infiltrating lymphocytes in breast carcinoma: relation to prognostic variables. **Indian Journal of Pathology and Microbiology**, v. 56, n 2, p. 89-93, 2013.

JARDIM, E.C.G; MANRIQUE, G.R.; MENDONÇA, J.C.G; HANSSSESIAN, A.; BARROS, R.M. Technical Analyses Histological and Immunohistochemical in dentistry. **Arch Health Invest**, v. 2, n.1 p. 40-49, 2013.

KLIMSTRA, D.S.; MODLIN, I.R.; COPPOLA, D.; LLOYD, R.; SUSTER, S. The Pathologic Classification of Neuroendocrine Tumors – A Review of Nomenclature, Grading and Staging Systems. **Pancreas**, v. 39, n. 6, p. 707-12, 2010.

LEIMU, R., KORICHEVA, J. Does Scientific Collaboration Increase the Impact of Ecological Articles. **BioScience** v.5, p. 438-443, 2005.

LEONG, A.S.Y., WRIGHT, J. The contribution of immunohistochemical staining in tumor diagnosis. **Histopathology**, v. 11, n. 12, p. 1295-1305, 1987.

LUKANDE, R.; WABINGA, H.R.; TUMWINE, L.K. Burkitt's lymphoma in Uganda: The role of immunohistochemistry in diagnosis. **East African Medical Journal**, v. 85, n.5, p. 207-212, 2008.

NOLAN, J.P.; MANDY, F. Multiplexed and microparticle –based analyses: quantitative tools for the large –scale analyses of biological systems. **Cytometry Part A**, v. 60A p.318-325, 2006.

NONOGAKI, S. et al. Análise de indicadores internos externos relevantes à resolutividade diagnóstica em laboratório de referência em imuno-histoquímica. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 43, n. 4, p. 297-304, 2007.

NONATO, R.M.S. Produção científica: por que medir? O que medir? **Revista Digital de Biblioteconomia e Ciência da Informação**, v.1, n.1, p. 22-38. 2003.

PEREZ, E.A.; CORTÉS, J.; GONZALES-ÂNGULO, A.M.; BARTLETT, J. M.S. HER-2 Testing: current status and future directions. **Cancer Treatment Reviews**, v 40, n. 2, p. 276-284, 2014.

PINHEIRO, L.R.U., SILVA, G.S. Cartografia histórica e conceitual da bibliometria / cientometria no Brasil. In: Conferência Ibero-Americana de publicações eletrônicas no contexto da publicação científica, Rio de Janeiro, 2008.

PINHO, M.S.L. Imunohistoquímica: o estudo da biologia molecular ao alcance de todos. **Revista brasileira coloproctologia**, v.25, p.188-191, 2005.

PINTO, A.C., ANDRADE, J.B., Fator de impacto de revistas científicas: Qual o significado deste parâmetro? **Química Nova**, v. 22, p. 448-453, 1999.

QUIXABEIRA, V.B.; NABOUT, J.C.; RODRIGUES, F.M. Trends in genetic literature with the use of flow cytometry. **Cytometry Part A**, v. 77A, p. 207-210, 2010.

- RAMOS-VARA, J.A. Technical aspects of immunohistochemistry. **Veterinary Pathology**, v. 42, n. 4, pp.405-426, 2005.
- ROSAI, J. Prefácio. In: DABBS, D. Diagnostic Immunohistochemistry – Theranostic and Genomic Applications. Filadélfia: Elsevier, 2010.
- RIBEIRO, M.C.; COUTINHO, L.M.B.; HILBIG, A. The role of apoptosis, cell proloferations index, Bcl-2, and p53 in glioblastoma prognosis. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v. 62, n. 2A, p. 262-270, 2004.
- ROCCO, G. The surgeon's role in molecular biology. **The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery**, v. 114, n.3, p. S18-22, 2012.
- SALLES, M.A. et al. Contribuição da imuno-histoquímica na avaliação de fatores prognósticos e preditivos do câncer de mama e no diagnóstico de lesões mamárias. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v.45, n.3, p. 213-222, 2009.
- SCOPUS [Internet]. Elsevier; 2012. [acesso em 1º de maio de 2013]. Disponível em <http://www.scopus.com> .
- SHERESTA, P.; SHERESTA, I.; KARISU, K. Immunohistochemistry: a review of practical procedure. **Nepal Journal of Practical Procedure**, v.6, p. 38-41, 2009.
- SHI, S.R.; KEY, M.E.; KALRA, K.L. Antigen retrieval in formalina-fixed, paraffin-embedded tissue. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, n. 39, p. 741, 1991.
- SHI, S.R.; LIU, C.; TAYLOR, C.R. Standardization of immunohistochemistry for formalina-fixed, parafin-embedded tissue sections based on antigen-retrieval technique: from experiments to hypothesis. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**. v.55, n. 2, p. 105-109, 2007.
- SHTOVBA, S.D., SHTOVBA, S.D. A citation index with allowance for the implicit diffusion of scientific knowledge. **Scientific and Technical Information Processing**, v. 40, n. 3, p.142-145, 2013.
- SCI Journal Impact Factor [internet]. BioxBio.com. 2012. [acesso em 1º julho de 2013]. Disponível em <http://www.bioxbio.com/if/> .
- SILVA, J.A.; BIANCHI, M.L.P. Cientometria: a métrica da ciência. **Revista Paideia**, v. 11, n. 20, p.5-10, 2001.
- TAYLOR, C.R. Standardization in immunohistochemistry: the role of antigen retrieval in molecular morfology.. **Biotechnic and Histochemistry**, v. 81, n. 1 p. 3-12, 2006.
- TIRGAR, A.; YAMINFIROOZ, M.; AHANGAR, H. The subject sameness: a new scientometric indicator. **Europe Science Editing**. v.39, n.1, p. 3-4. 2013.
- TONG, L.C. et al. Subclassification of lymphoproliferative dosorders in serous effusion. **Cancer Cytopathology**, v. 121, n. 5, p. 261-270, 2013.

VANTI, N.A. A cienciometria revisitada à luz da expansão da ciência, da tecnologia e da inovação. **Ponto de Acesso**, v.5, n. 3, p. 05-31, 2011.

VANTI, N.A. Da bibliometria à webometria: uma exploração conceitual dos mecanismos utilizados para medir o registro da informação e a difusão do conhecimento. **Ciências da Informação**, v.31, n.2, p.152-162, 2002.

VON WASIELEWSKI, R. et al. Tyramine amplification technique in routine immunohistochemistry. **The Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v. 45, n. 11, p. 1455-1459, 1997

WERNER, B., CAMPOS, A.C., NADJI, M. TORRES, L.F.T. Uso prático da imunohistoquímica em patologia cirúrgica. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 41, n. 5, p. 353-354, 2005.

WHO [Internet]. [acesso em 1º de maio de 2013]. Disponível em <http://www.who.int/en/>

ZERBINI, M.C.N. Exame imuno-histoquímico na biópsia de medula óssea: uma importante ferramenta complementar à morfologia. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 47, n. 6, p. 635-642, 2011.

ZHANG, Y. An immunohistochemical panel to distinguish ovarian from uterine serous papillary carcinomas. **International Journal of Gynecological Pathology**, v. 32, n. 5, p. 476-481, 2013.