

Artefatos pré-analíticos nos processamentos anatomopatológicos: importância do uso adequado de fixadores.

Dra. Daniele Moraes Losada e Dr. José Vassallo

1. Conceitos gerais:

Os procedimentos anatomopatológicos podem ser divididos em três fases: pré-analítica, analítica e pós-analítica. A seguir listamos os principais procedimentos envolvidos em cada uma destas fases:

Fase do Exame Laboratorial	Procedimentos
Pré-analítica	<ul style="list-style-type: none">- Solicitação Médica;- Identificação das amostras;- Armazenamento das amostras para transporte;- Encaminhamento das amostras ao laboratório;- Cadastro dos dados do paciente e dos exames no sistema informatizado;- Preparo das amostras para análise.
Analítica	<ul style="list-style-type: none">- Análise dos espécimes pelo Patologista e formação de um parecer circunstanciado.
Pós-analítica	<ul style="list-style-type: none">- Interpretação dos resultados;- Digitação e liberação dos resultados;- Entrega dos laudos;- Discussão anatomoclínica.

Dentre os procedimentos pré-analíticos listados *o preparo das amostras para análise* é um dos mais importantes, pois é ele que garante, de maneira irreversível, a qualidade do material analisado permitindo sua correta interpretação. Neste cenário, ganha destaque a *fixação* de tecidos para análise.

2. Fixação:

Em linhas gerais, todo o tecido humano destinado à análise anatomopatológica sofre um processo de isquemia, ou seja: ausência de irrigação sanguínea. A falta de sangue cursa com a redução do aporte tecidual de oxigênio e nutrientes e se traduz em degeneração gradual e irreversível culminando com morte celular. As consequências adversas da isquemia dependem, não apenas das características do tecido, mas também do meio ambiente em que ocorrem.

A fixação dos tecidos é responsabilidade direta do profissional que colhe o material, geralmente o médico ou cirurgião, auxiliado pelos seus assessores, como enfermeiros e circulantes.

A fixação é um processo químico e/ou físico para proteger as células e os componentes teciduais dessas injúrias isquêmicas. Com esse processo, as células e demais estruturas teciduais ficam preservadas para posterior avaliação histológica pelo Patologista.

A falta de cuidado nessa etapa do manuseio dos tecidos (fixação) pode retardar ou impedir a análise, com enorme prejuízo para o paciente, principalmente em se tratando de lesões únicas!

Fatores que influenciam a qualidade da preservação tecidual		
<i>Parâmetros que precedem a fixação</i>	<i>Parâmetros relacionados à fixação</i>	<i>Parâmetros que sucedem a fixação</i>
I. Fatores constantes: a) natureza do anestésico b) duração da anestesia c) lesão anóxica <i>in situ</i> II. Fatores variáveis: a) tempo de prefixação	I. Propriedades dos fixadores: a) química e mecanismo de ação b) Penetração de tecidos II. Condição de fixação: a) temperatura b) duração c) pH d) osmolaridade e) concentração f) tamanho do espécime g) volume do fixador	I. Parâmetros de armazenamento: a) duração b) temperatura c) condição (com ou sem vácuo) II. Natureza do fator biológico a ser analisado a) proteínas b) enzimas c) lípidos d) ácidos nucleicos e) mucopolissacarídeos f) aminas biogênicas g) glicogênio

Adaptado de: Srinivasan M, Sedmak D, Jewell S. Effect of fixatives and tissue processing on the content and integrity of nucleic acids. *Am J Pathol.* 2002;161(6):1961-71.

2.1 Métodos físicos de fixação:

2.1.1 Calor (acelera outras formas de fixação). Exemplo: forno de micro-ondas.

2.1.2 Criopreservação: útil no estudo de materiais solúveis e pequenas moléculas. Exemplo: nitrogênio líquido a -40°C.

2.2 Métodos químicos de fixação:

2.2.1 Coagulantes: atuam através da coagulação de proteínas tornando-as insolúveis, processo este referido como “denaturação proteica”, ou seja, quebra de sua estrutura terciária o que gera alteração de suas propriedades físicas, insolubilidade e perda funcional. Vantagem: mantém a arquitetura celular. Desvantagem: promove a floculação do citoplasma e não preservam mitocôndrias e grânulos secretórios, o que os torna inadequados para análise ultraestrutural.

Podem ser classificados em:

- a) agentes coagulantes desidratantes (ex: álcoois),
- b) ácidos (ex: ácido prícrico e ácido tricloroacético).

2.2.2 Reações cruzadas (“não-coagulantes”). Estes reagentes promovem ligações covalentes cruzadas dentro de moléculas proteicas e entre moléculas proteicas e ácidos nucleicos. Ex: *formaldeído* (fixador mais comumente utilizado em exames anatomopatológicos), glutaraldeído.

2.3 Fixadores fora de uso:

2.3.1 Cloreto de Mercúrio: tóxico a organismos vivos e nocivo ao meio-ambiente, sendo de difícil descarte.

Análise comparativa entre fixadores					
	<i>Agentes químicos coagulantes desidratantes</i>	<i>Agentes químicos por reação cruzada</i>	<i>Combinado (Cloreto de Mercúrio e formaldeído ou ácido acético)</i>	<i>Tetróxido de Ósmio</i>	<i>Ácido Pícrico com formalina e ácido acético</i>
<i>Exemplos</i>	Etanol Metanol Acetona	Formaldeído* Glutaraldeído	Zenker's B5	Pós-fixação por glutaraldeído	Bouin's
<i>Toxicidade</i>	Baixa	Intensa*	Moderada	Intensa	Baixa
<i>Tempo de Fixação</i>	Lento	Lento K*** = 0,78 (equivalente a 25h para fixar fragmento com 10mm de espessura)*	Moderado	Lento	Rápido
<i>Proteínas</i>	Formação de precipitado sem adição química	Reage*	Reage	Reage	Reage
<i>Ácidos Nucléicos</i>	Reação leve	Promove mudança estrutural (reage com grupos aminos livres)*	Coagulação	Remoção leve	Não reage
<i>Lípidios</i>	Extensa remoção**	Reage com lípidios insaturados na presença de íons cálcio*	Não reage	Reage	Não reage
<i>Carboidratos</i>	Não reage	Não reage*	Não reage	Oxidação leve	Não reage
<i>Efeito ultraestrutural (organelas)</i>	Destrói proteínas e mitocôndrias	Boa preservação se utilizada Formalina Neutra Tamponada Excelente se utilizado glutaraldeído	Preservação pobre	Usado para visualização de membranas	Pobre – destruição de membranas
<i>Qualidade de coloração por Hematoxilina e Eosina</i>	Satisfatória	Boa	Boa	Pobre	Boa

Adaptado de: Bancroft JD, Gambre M. Theory and Practice of Histological Techniques. 6th ed. 2008. Legenda:

** Explicação: a água estabiliza o contato de substâncias hidrofóbicas (no caso a gordura) por mecanismos de repulsão. Sua remoção enfraquece as ligações de moléculas hidrofóbicas.

*** K (coeficiente de difusão) = distância em “mm” que o fixador difunde em 1h.

3. Formalina

A formalina é o fixador mais utilizado na prática de procedimentos anatomopatológicos devido à sua propriedade de preservar indefinidamente as características morfológicas de grande variedade de tecidos e de componentes teciduais, além de ser prático para utilizar e relativamente barata.

Formalina não tamponada: se oxida a ácido fórmico que, ao reagir com hemoglobina, produz um pigmento artefactual.

Formalina tamponada (ou seja, solução com pH neutro): considerada ideal, pois o formaldeído atua de forma mais eficaz em pH neutro.

Formalina neutra tamponada a 10%: O tempo de exposição ideal para análise das características nucleares é de 24h. Estudos recentes em mama³ preconizam um tempo de exposição ideal à solução fixadora entre 8h e 48h, sem prejuízo para a expressão imunoistoquímica ou estudo molecular através da técnica de *Hibridação in situ por Fluorescência (FISH)*. Este período, bem como a especificação do “tempo total de fixação” nos laudos é preconizado pela Sociedade Americana de Oncologia Clínica / Colégio Americano de Patologistas.

Como proceder

- ✓ Após a retirada do tecido a ser analisado, este deve ser armazenado o mais rapidamente possível em formalina tamponada a 10%. A sensibilidade de cada célula às injúrias isquêmicas é variável (exemplo de período máximo de viabilidade celular por tecido específico: neurônio: de 3 a 5 min; miocárdio e hepatócitos: de 10 min a 120 min; fibras musculares e fibroblastos: horas).
- ✓ Proporção volumétrica ideal: de 10 a 20:1 (10 a 20 volumes de formalina para 1 volume de tecido)
- ✓ Estocagem apropriada: recipientes muito pequenos fazem com que a peça se dobre, resultando num aumento de espessura e conseqüente má penetração pelo fixador. Além disso, como a peça endurece durante a fixação, o tecido pode adquirir o formato do recipiente, dificultando seu processamento.
- ✓ A solução de formalina é fotossível, portanto, os reservatórios de solução para uso ou os frascos com os tecidos retirados devem, sempre que possível, permanecer protegidos de estímulos luminosos.

Desvantagens: - O excesso de exposição à formalina faz com que esta se ligue tão intensamente às estruturas celulares a ponto de impedir a ligação de proteínas celulares (epítomos) a outras moléculas proteicas necessárias, por exemplo, para o estudo imunoistoquímico. Além disso, a formalina em excesso sofre oxidação resultando na formação de ácido fórmico o qual, por sua vez, se precipita como pigmento tecidual prejudicando a interpretação do material em análise.

Limitações do método: estudos realizados nas últimas seis décadas² demonstram preservação dos aspectos morfológicos e da expressão de imunomarcadores com

expressão citoplasmática. Por outro lado, documentam a perda de imunexpressão nuclear e de membrana citoplasmática ao longo do tempo (com prejuízo mais pronunciado em marcadores como Ki-67 e CD31).

Efeitos do Formaldeído na integridade de ácidos nucleicos	
DNA	RNA
Prejudica a análise molecular usando a técnica de PCR (do inglês, <i>polymerase chain reaction</i>)	Prejudica a preservação e extração do RNA
<i>Mecanismos de reação:</i>	
1) Adição (incorporação da molécula de formaldeído à estrutura do DNA/RNA)	
2) Instabilidades estrutural da cadeia de DNA/RNA (através do enfraquecimento da ligação entre dois grupos aminos; quebra de ligações entre bases púricas e pirimidínicas e hidrólise lenta de ligações fosfodiéster).	
Estudos demonstram que a reatividade do formol com as bases púricas e pirimidínicas do RNA ocorre na seguinte ordem A/ C > G > U, sugerindo que o grupo terciário amino é o principal alvo para o ataque da formalina.	

Legenda: DNA: ácido desoxirribonucleico; RNA: ácido ribonucleico; Bases púricas: adenina (A) e guanina (G); Bases pirimidínicas: citosina (C) e uracila (U).

Curiosidades:

- *o paraformaldeído é um polímero de formaldeído utilizado no preparo de solução de formaldeído de alta pureza e geralmente destinado à análises em Microscopia Eletrônica.*
- *Existem técnicas para recuperação antigênica, ou seja, técnicas que otimizam a reação imunoistoquímica, facilitando a interação entre o anticorpo e os epítomos celulares em material previamente fixado em formalina. Estas técnicas utilizam-se de métodos físicos (exemplo: calor) e químicos (exemplo: anidrido de ácido citacronico).¹⁸*

Descarte
<p>O formaldeído é considerado efluente de alta toxicidade e baixa biodegradabilidade. Deve ser descartado separadamente do lixo comum e encaminhado para incineração.</p> <p>Tempo de meia-vida no ar: menos de 24h; na água de superfície: de 24h a 168h; em águas subterrâneas: 48h a 336h.</p> <p>Segundo as normas da CETESB (Companhia Ambiental do Estado de São Paulo) o formaldeído desprezado deve ser dissolvido ou misturado em um solvente combustível e queimado em um incinerador químico equipado com pós-queimador e lavador de gases.</p>

4. Cuidados no manuseio da formalina: efeitos no organismo

MEDIDAS DE SEGURANÇA	
<ul style="list-style-type: none"> • Responsabilidades do laboratório de Patologia: prover um ambiente de trabalho com ventilação adequada; instalação de exaustores; fornecer equipamentos de proteção individual aos funcionários. • Responsabilidade do funcionário: utilizar equipamentos de proteção individual (ex.: luvas, máscara e óculos próprios para procedimentos) e vestimenta adequada (ex.: sapatos fechados). • Em caso de contaminação por contato: lavar o local com água corrente. • Em caso de intoxicação aguda (ingestão ou inalação): procurar atendimento médico. 	

Efeitos nocivos ao organismo humano

Sistema orgânico ou órgão	Concentração em PPM	Efeitos
Sistema Respiratório	Acima de 0,1 ppm	Exposições leves: tosse, irritação do trato respiratório, dispnéia e espasmos da laringe.
	Acima de 20 ppm	Exposições graves podem causar bronquite asmática, edema pulmonar e pneumonia.
	Acima de 50 ppm	Casos severos ocasionam apatia, perda de peso e de consciência, coma e óbito.
Olhos	0,1 a 2,0 ppm	Irritação da conjuntiva ocular, lacrimejamento, dor imediata e inflamação. "Borramento" da visão. Risco de reação alérgica e conjuntivite.
	Acima de 2,0 ppm	Casos severos: danos à córnea, íris e pálpebras com perda de visão. Agressão à retina e ao nervo óptico.
Pele e anexos	Acima de 0,1 ppm	Irritação e ressecamento da pele, aparecimento de fissuras, vermelhidão, alteração na tonalidade das unhas, dermatite por contato e necrose da epiderme podendo piorar com o calor e suor.
Sistema Imunológico	Acima de 0,1 ppm	Hipersensibilidade, dermatites alérgicas e bronquite asmática.
Todos os sistemas orgânicos	Convivência ocupacional	Potencial agente carcinogênico, tumorigênico e teratogênico.

Fonte: VERONEZ et al., 2006.

5. Fixadores especiais

A escolha do fixador ideal depende da análise de interesse em estudo. A seguir, alguns exemplos.

Fixador	Análise de interesse em estudo
Formol-cálcio	Preservação de lípides (fosfolípides)
Zenker	Boa preservação nuclear; Lise de células vermelhas (recomendado para espécimes com congestão vascular). <i>* uso descontinuado, pois contém mercúrio em sua composição.</i>
Helly	Excelente para medula óssea, hematopoiese extramedular, células renais justaglomerulares e discos intercalares de músculo cardíaco.
B-5	Tecido hematopoiético e linfóide; Produz excelentes detalhes nucleares, fornece bons resultados com colorações especiais e é recomendado para estudo imunoistoquímico. <i>* uso descontinuado, pois contém mercúrio em sua composição.</i>
Bouin	Ideal para tecidos corados com Tricrômico de Masson. (exemplo: biópsias renais); Muito bom para biópsias de testículo; Preserva glicogênio e lisa eritrócitos; Útil para análise de cristais de urato.
Hollande	Recomendado para espécimes gastrointestinais e fixação de tecidos endócrinos; Tem propriedades descalcificantes.
Solução de Gendre	Ideal para análise de carboidratos.
Solução de Clarke	Utilizado em material congelado e esfregaços. Preserva os ácidos nucleicos.
Solução de Carnoy	Preservação nuclear e retenção do glicogênio; Lisa eritrócitos e dissolve lípidos; Pode produzir excesso de endurecimento e encolhimento (ideal para análises por Microscopia Eletrônica).
Formalina Alcoólica	Ideal para fixação ou pós-fixação de grandes espécimes gordurosos (particularmente mama).

Fonte: <https://www.leicabiosystems.com/pathologyleaders/fixation-and-fixatives-4-popular-fixative-solutions/>

6. Contraindicações do uso de fixadores

Em algumas situações o material deve ser encaminhado a fresco para análise. A seguir listamos alguns exemplos:

- Exame de congelação intraoperatório;
- Histoquímica enzimática de tecidos musculares;
- Análise por imunofluorescência (comum na investigação de doenças autoimunes em amostras renais e cutâneas);
- Microdissecção a *laser* (permite análise em material parafinado, a fresco, com marcação fluorescente e de células em culturas);
- Reação de cadeia polimerase por transcriptase reversa (qRT-PCR). Exemplo: pesquisa de HPV (do inglês *human papiloma vírus*) através da pesquisa molecular para os oncogenes E6 e E7 em tumores da cavidade oral.

7. Em resumo:

- ❖ Os processamentos anatomopatológicos podem ser divididos em três fases: pré-analítica, analítica e pós-analítica. Na fase **pré-analítica** ganha destaque a etapa de **fixação**, pois ela garante a qualidade do material analisado permitindo sua correta interpretação morfológica.
- ❖ **Não existe fixador ideal:** todos apresentam vantagens e desvantagens do ponto de vista morfológico, sendo mais ou menos favoráveis a análises específicas.
- ❖ A **formalina** é o **fixador mais utilizado na prática** de procedimentos anatomopatológicos devido à sua propriedade de preservar indefinidamente as características morfológicas de grande variedade de tecidos e de componentes teciduais. É considerada efluente de **alta toxicidade** e **baixa biodegradabilidade**.

A completa compreensão por parte de todos os envolvidos (do paciente à equipe multiprofissional empenhada no melhor resultado do exame) das limitações e potencialidades do uso adequado de fixadores em materiais biológicos maximiza a qualidade final do resultado, garantindo maior acurácia diagnóstica.

FIXADORES E ACONDICIONAMENTO DE MATERIAL ANATOMOPATOLÓGICO LABORATÓRIO MULTIPAT



1 - Frascos com solução de formalina tamponada 10% pronta para uso são disponibilizados para clínicas e hospitais. Esta solução deve ser utilizada para fixação de peças cirúrgicas maiores, na proporção aproximada de 10-20x o volume da peça. Devem-se utilizar frascos grandes, com abertura larga, ou sacos plásticos especiais para esse fim, firmemente vedados após colocação da peça. Importante e **dupla identificação** (nome e data de nascimento do paciente) em todos os recipientes.



2 – Frascos para biopsias de médio tamanho, com abertura ampla, servem para acondicionar peças como linfonodos e retalhos maiores de pele. O volume deve ser completado com formalina tamponada 10%.



3 – Biopsias menores podem ser acondicionadas em frascos pequenos, fornecidos pelo Laboratório. Servem para biopsias endoscópicas e pequenas lesões de pele, por exemplo.



4 – A identificação adequada com etiqueta fortemente adesiva, preenchida a lápis, é fundamental para evitar troca ou perda de amostras. A **dupla identificação** (nome e data de nascimento do paciente) impede a confusão com homônimos. O uso de lápis (e não de caneta) impede que o escrito se dissolva em caso de vazamento da formalina.



5 – Após colocar o fragmento nos frascos, é importante colocá-los em sacos plásticos bem vedados e novamente rotulá-los com **dupla identificação do lado de fora do saco plástico**. Se houver mais de uma amostra do mesmo paciente, como mostra a foto, ambas devem conter clara informação sobre seu conteúdo. Por exemplo: mama direita, mama esquerda; ou: fragmentos de estômago, fragmentos de duodeno etc.

Referências

- 1) Singhal P, Singh NN, Sreedhar G, Banerjee S, Batra M, Garg A. Evaluation of Histomorphometric Changes in Tissue Architecture in Relation to Alteration in Fixation Protocol - An Invitro Study. J Clin Diagn Res. 2016;10(8):ZC28-32.
- 2) Grillo F, Bruzzone M, Pigozzi S, Prosapio S, Migliora P, Fiocca R, Mastracci L. Immunohistochemistry on old archival paraffin blocks: is there an expiry date?. J Clin Pathol. 2017;70(11):988-993.
- 3) Kao KR, Hasan T, Baptista A, Truong T, Gai L, Smith AC, Li S, Gonzales P, Voisey K, Eriwvo P, Power J, Denic N. Effect of fixation time on breast biomarker expression: a controlled study using cell line-derived xenografted (CDX) tumours. J Clin Pathol. 2017;70(10):832-837.
- 4) Sato M, Kojima M, Nagatsuma AK, Nakamura Y, Saito N, Ochiai A. Optimal fixation for total preanalytic phase evaluation in pathology laboratories: a

- comprehensive study including immunohistochemistry, DNA, and mRNA assays. *Pathol Int.* 2014;64(5):209-16.
- 5) Apple S, Pucci R, Lowe AC, Shintaku I, Shapourifar-Tehrani S, Moatamed N. The effect of delay in fixation, different fixatives, and duration of fixation in estrogen and progesterone receptor results in breast carcinoma. *Am J Clin Pathol.* 2011;135(4):592-8.
 - 6) Conceitos e métodos para a formação de profissionais em laboratórios de saúde: volume 2 / Organização de Etelcia Moraes Molinaro, Luzia Fátima Gonçalves Caputo e Maria Regina Reis Amendoeira. - Rio de Janeiro: EPSJV; IOC, 2010.
 - 7) 290 p. ISBN: 978-85-98768-41-0.
 - 8) Nunes CS, Cinsa LA. Princípios do processamento histológico de rotina (monografia). *Revista Interdisciplinar de Estudos Experimentais.* 2016; 8:31-40.
 - 9) Bancroft JD, Gambre M. *Theory and Practice of Histological Techniques.* 6th ed. Churchill Livingstone Elsevier. 2008. ISBN: 978-0-443-10279-0.
 - 10) Thrasher JD, Kilburn KH. Embryo toxicity and teratogenicity of formaldehyde. *Arch Environ Health.* 2001;56(4):300-11.
 - 11) Veronez DAL, Farias ELP, Fraga R, Freitas RS, Petersen ML, Silveira JRP, et al. Potencial de risco para a saúde ocupacional de docentes, pesquisadores e técnicos de anatomia expostos ao formaldeído. SENAC, São Paulo, 2006.
 - 12) Engel KB, Moore HM. Effects of preanalytical variables on the detection of proteins by immunohistochemistry in formalin-fixed, paraffin-embedded tissue. *Arch Patholm Lab Med.* 2011;135(5):537-43.
 - 13) Werner M, Chott A, Fabiano A, Battifora H. Effect of formalin tissue fixation and processing on immunohistochemistry. *Am J Surg Pathol.* 2000;24(7):1016-9.
 - 14) <http://www.leicabiosystems.com/pathologyleaders/articles/#/>
 - 15) Silveira SO. Orientação para práticas de laboratório. Laboratório de Histologia e Embriologia, UFSM.
 - 16) Patologia Geral - Db-301, Unidade I, Fop/Unicamp - Áreas De Semiologia E Patologia.
 - 17) Srinivasan M, Sedmak D, Jewell S. Effect of fixatives and tissue processing on the content and integrity of nucleic acids. *Am J Pathol.* 2002;161(6):1961-71.
 - 18) Masuda N, Ohnishi T, Kawamoto S, Monden M, Okubo K. Analysis of chemical modification of RNA from formalin-fixed samples and optimization of molecular biology applications for such samples. *Nucleic Acids Res* 1999, 27:4436-43
 - 19) Namimatsu S1, Ghazizadeh M, Sugisaki Y. Reversing the effects of formalin fixation with citraconic anhydride and heat: a universal antigen retrieval method. *J Histochem Cytochem.* 2005;53(1):3-11.
 - 20) <https://www.leicabiosystems.com/pathologyleaders/fixation-and-fixatives-4-popular-fixative-solutions/>
 - 21) <http://cloud.cnpqc.embrapa.br/wp-content/igu/fispq/laboratorios/Formaldeido.pdf>
 - 22) http://sistemasinter.cetesb.sp.gov.br/produtos/ficha_completa1.asp?consulta=FORMALDE%CCDO
 - 23) Limberger, Daniela Cristina Haas. Processos de recuperação, reuso e destinação do formol em laboratório de anatomia. Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Tecnologia, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Processos, 2011. Tese de Mestrado.