


# FIXAÇÃO

The word "FIXAÇÃO" is written in a bold, blue, sans-serif font with a slight shadow effect. The letter 'Ç' has a tilde (~) above it and a cedilla (ç) below it. The text is centered horizontally. To the right of the text, there are two solid light purple circles. Below the text, there are two more solid light purple circles. To the right of these circles, the text "Prof. Carina Ladeira" is written in a black, sans-serif font. Below this text, the date "Novembro de 2008" is written in the same black, sans-serif font. A thin, light purple circle is positioned around the text "Prof. Carina Ladeira".

Prof. Carina Ladeira

Novembro de 2008

A decorative graphic consisting of five circles arranged horizontally. From left to right: a solid light purple circle, an empty white circle with a light purple outline, the word 'FIXAÇÃO' in bold black uppercase letters, another empty white circle with a light purple outline, and a solid light purple circle. The word 'FIXAÇÃO' is centered between the two empty circles.

# FIXAÇÃO

- Os tecidos vivos são sistemas dinâmicos que respondem à presença ou à ausência de estímulos
- Quando removidos do seu meio habitual iniciam-se fenómenos de autólise e putrefacção



# FIXAÇÃO

- É a primeira etapa histotécnica após colheita do material biológico
- Visa a preservação dos tecidos
- É uma etapa crucial
- Uma má fixação compromete todo o trabalho posterior, uma vez que é impossível reconstituir um tecido mal preservado

# PRINCÍPIOS GERAIS DA FIXAÇÃO

## Imobilização de células e tecidos

- Depois de removido, um órgão ou tecido começa imediatamente a sofrer alterações
- Para o seu estudo devem ser recriadas as condições que existiam no seu ambiente de origem
- A fixação deve promover a máxima semelhança entre o aspecto do tecido visto ao microscópio e o seu aspecto no estado vivo

# PRINCÍPIOS GERAIS DA FIXAÇÃO

## Inibição da autólise tecidual (1)

- Ocorre devido a algumas enzimas presentes continuarem os seus processos metabólicos – autodigestão enzimática
- Após morte celular, a membrana dos lisossomas é destruída levando à libertação de catapsinas para o citoplasma

# PRINCÍPIOS GERAIS DA FIXAÇÃO

## Inibição da autólise tecidual (2)

- A fixação deve inactivar as enzimas de forma a evitar a destruição das proteínas

Efeitos da autólise nos cortes histológicos:

- Sem detalhe celular
- Coloração difusa

# PRINCÍPIOS GERAIS DA FIXAÇÃO

## Inibição da autólise tecidual (3)

- O grau menor ou maior de autólise depende da localização, natureza e temperatura ambiente em que o tecido se encontra
- Exemplo: pâncreas, fígado, cérebro

# PRINCÍPIOS GERAIS DA FIXAÇÃO

## Inibição da putrefacção tecidual (1)

- Putrefacção é a destruição dos tecidos por acção microbiana, por efeito de toxinas e enzimas bacterianas
- Após a extirpação as defesas do organismo contra os microorganismos, incluindo os que constituem a flora normal

# PRINCÍPIOS GERAIS DA FIXAÇÃO

## Inibição da putrefacção tecidual (2)

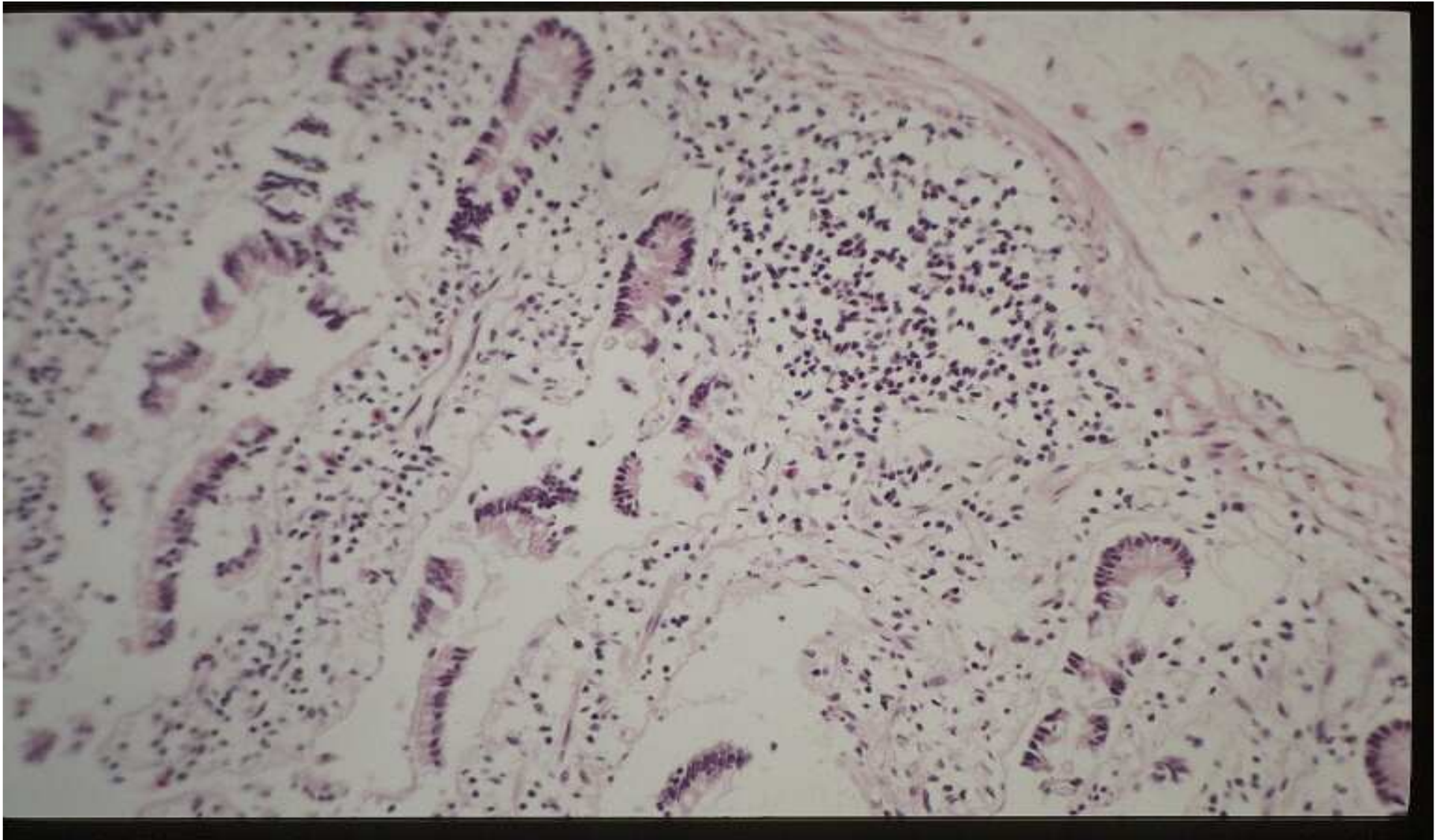
- Efeitos da putrefacção nos cortes histológicos:
- Vacúolos, por produção de gás
- Coloração difusa
- Sem detalhe celular

# PRINCÍPIOS GERAIS DA FIXAÇÃO

## Inibição da putrefacção tecidual (3)

- Os órgãos mais sujeitos são aqueles que possuem uma flora normal abundante, como o intestino
- A temperatura influencia este processo: maior temperatura, maior a velocidade de desenvolvimento do fenómeno

# Efeitos da putrefacção



# PRINCÍPIOS GERAIS DA FIXAÇÃO

## Solidificação do material coloidal

- As macromoléculas estão presentes nos tecidos no estado coloidal
- A fixação induz a novas ligações entre as macromoléculas e provoca a sua solidificação
- As soluções são transformadas em geles e os geles são estabilizados (ex.: quistos)

# PRINCÍPIOS GERAIS DA FIXAÇÃO

## Endurecimento dos tecidos

- O endurecimento dos tecidos é desejável desde que não seja muito acentuado, porque permite a manipulação das peças sem as danificar

# PRINCÍPIOS GERAIS DA FIXAÇÃO

## Modificação dos índices de refração

- Os vários elementos tecidulares têm um índice de refração homogéneo, logo é impossível diferenciá-los em cortes não corados
- A fixação modifica o índice de refração dos tecidos de forma não uniforme, permitindo distinguir certos detalhes celulares mesmo antes da coloração

# PRINCÍPIOS GERAIS DA FIXAÇÃO

## Modificação do volume (1)

- A fixação modifica de forma mais ou menos pronunciada o volume dos tecidos
- Esta modificação é maior ou menor consoante a quantidade de água que constitui o tecido e a diferença da pressão osmótica entre o fixador e os tecidos

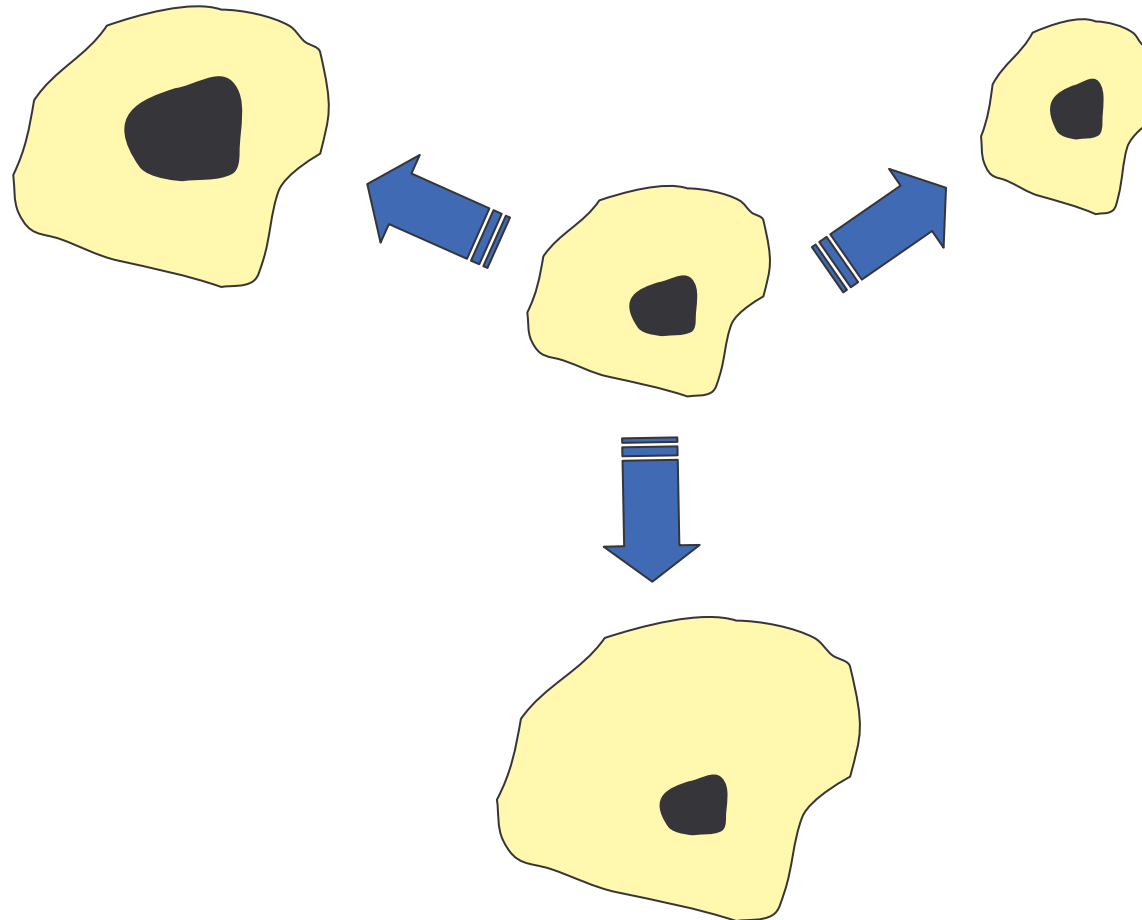
# PRINCÍPIOS GERAIS DA FIXAÇÃO

## Modificação do volume (2)

- Qualquer que seja o fixador, o tecido sofre nas fases seguintes uma retracção, que anula os efeitos de inchaço derivados da fixação
- A evitar: inchaço, retracção e principalmente distorção (modificação das proporções entre as diversas estruturas do tecido)

# PRINCÍPIOS GERAIS DA FIXAÇÃO

## Modificação do volume (3)



# PRINCÍPIOS GERAIS DA FIXAÇÃO

## Insolubilização dos constituintes celulares

- Utilizar fixadores que não conduzam à solubilização de determinada estrutura ou substância que se pretende estudar
- Exemplo: preservação de glicogénio no endométrio

# PRINCÍPIOS GERAIS DA FIXAÇÃO

## Modificação das afinidades tinturiais

A fixação pode ter um efeito positivo ou negativo na coloração, ex.: Ácido acético e a fixação dos ácidos nucleicos

- **Positivo:** separa os ácidos nucleicos das histonas libertando os grupos reactivos (fosfatos) facilitando a sua detecção
- **Negativo:** se a fixação for longa extrai os ácidos nucleicos e anula o seu estudo



# MÉTODOS DE FIXAÇÃO

Existem diversos métodos de fixação, que podemos dividir de forma geral em:

- Métodos Físicos
- Métodos Químicos



# MÉTODOS DE FIXAÇÃO

## Métodos Físicos

- Baseiam-se essencialmente na temperatura:
- **Frio**
- **Calor**

# MÉTODOS DE FIXAÇÃO

## Método Físico – Frio (1)

- Baseia-se essencialmente na congelação do tecido de forma a deter a putrefacção e autólise
- Utilizado para o estudo morfológico ou funcional – conserva o conteúdo enzimático e antigénico do tecido

# MÉTODOS DE FIXAÇÃO

## Método Físico – Frio (2)

- A congelação deve ser instantânea para ser boa
- A congelação lenta e progressiva provoca a formação de cristais nos tecidos
- Utiliza-se a congelação, também, na conservação de cadáveres em câmaras frigoríficas

# MÉTODOS DE FIXAÇÃO

## Método Físico – Frio (3)

Pode-se diferenciar os seguintes métodos:

- Congelação instantânea por imersão em isopentano
- Criodissecação ou Liofilização
- Criossustituição

# MÉTODO FÍSICO – FRIO

## Congelação instantânea por imersão em isopentano

- Isopentano a  $-50^{\circ}\text{C}$
- Aconselhado para peças muito pequenas
- Pode conservar indefinidamente a  $-70^{\circ}\text{C}$

# MÉTODO FÍSICO – FRIO

## Criodisseccção ou Liofilização

- 1.º esfria-se instantaneamente com nitrogénio líquido
- 2.º desidratação em câmara de vácuo
- Provoca a sublimação directa da água congelada
- Conserva na íntegra a estrutura antigénica
- Mantém indefinidamente condições perfeitas

# MÉTODO FÍSICO – FRIO

## Criossustituição

- Substituição da água do tecido congelado por outro líquido hidrossolúvel, de forma lenta e progressiva
- O intercâmbio deve ser feito no congelador e à temperatura da substância hidrossolúvel (ex.: etanol + acetona + propilenoglicol)

# MÉTODOS DE FIXAÇÃO

## Método Físico - Calor

- Altera profundamente os tecidos
- O uso deve ser evitado
- Utilizado em casos de diagnóstico imediato
- Eventual fixação de esfregaços
- Utilização de forno de microondas

# MÉTODO FÍSICO – CALOR

## Microondas

- Biópsias de pequeno tamanho
- Solução isotónica de NaCl
- Fixação pela acção das microondas durante 3 a 5'
- Preservação de antigénios



# MÉTODOS DE FIXAÇÃO

## Método Químico

- Mais utilizado
- Diferentes tipos de fixação
- Consiste na utilização de agentes químicos, normalmente líquidos, designados de fixadores



# MÉTODO QUÍMICO

## Tipos de Fixação

- O método químico possui diferentes tipos de fixação, tais como:
  - Vapores
  - Perfusão
  - Imersão



# TIPOS DE FIXAÇÃO

## Vapores

- Aquecimento do fixador
- Coloca-se o tecido a fixar por cima do fixador
- A libertação de vapores vai provocar a fixação da peça



# TIPOS DE FIXAÇÃO

## Perfusão

- Técnica utilizada em animais de experimentação
- Consiste na “injecção” de líquido fixador no sistema circulatório com o animal anestesiado
- Em AP utiliza-se uma técnica similar à perfusão, ex.: na árvore brônquica



# TIPOS DE FIXAÇÃO

## Imersão

- Consiste em emergir completamente o tecido no líquido fixador
- Existem factores que influenciam a fixação por imersão



# IMERSÃO

## Factores que influenciam a Fixação

- Intervalo entre a colheita do material e a fixação
- Rapidez de penetração do fixador
- Volume do líquido fixador
- Espessura do material biológico
- Consistência dos tecidos
- Tempo da fixação
- Concentração do fixador



# IMERSÃO

## Factores que influenciam a Fixação

- Temperatura
- pH
- Lavagens pós-fixação
- Pressão Osmótica
- Tipo de Fixador

# Factores que influenciam a Fixação

## Intervalo entre a colheita e a fixação

Fixar o material biológico o mais rápido possível após a sua colheita:

- Material de necrópsia
- Material de intervenções cirúrgicas e biópsias

# Intervalo entre a colheita e a fixação

## Material de Necrópsia

- A necrópsia deve ser efectuada imediatamente após a morte do indivíduo
- Caso não seja possível, colocar o cadáver, o mais breve possível, na câmara frigorífica
- O modo de fixar os fragmentos é idêntico ao das peças cirúrgicas e biópsias

# Intervalo entre a colheita e a fixação

## Material de intervenção cirúrgica e biópsias

- Nunca utilizar soro fisiológico ou água para o transporte do material biológico porque pode causar maceração, isto é, desintegração dos tecidos
- Solicitar os cirurgiões para utilizarem recipientes próprios, com líquido fixador e não enviarem material sobre gaze

# Intervalo entre a colheita e a fixação

## Material de intervenção cirúrgica e biópsias

- Cuidados de fixação a ter em situações especiais:
  - Pulmão
  - Mama
  - Intestino
  - Estômago

# Factores que influenciam a Fixação

## Rapidez de penetração do fixador

- A velocidade de penetração é uma propriedade intrínseca de cada fixador
- A importância deste factor tem a ver com a composição das misturas fixadoras, em que as qualidades de uns devem compensar os defeitos de outros

# Factores que influenciam a Fixação

## Rapidez de penetração do fixador

- Exemplos de fixadores por ordem decrescente de rapidez:
  - Ácido acético
  - Ácido tricloroacético
  - Formol a 10%
  - Etanol a 95%
  - Cloreto de mercúrio
  - Ác. Pícrico em sol. Aquosa saturada
  - Bicromato de potássio
  - Tetróxido de ósmio

# Factores que influenciam a Fixação

## Volume do líquido fixador

- A quantidade de líquido fixador influencia directamente a rapidez de reacção da fixação
- Para obter resultados óptimos o volume do fixador deve ser entre 20 a 40 xs superior ao da peça

# Factores que influenciam a Fixação

## Espessura do material biológico

- Quanto menor a espessura do material biológico, mais rápida e eficiente será a fixação
- Espessura máxima recomendada – 5 mm

# Factores que influenciam a Fixação

## Consistência dos tecidos

- Quanto mais denso um tecido mais difícil se torna a penetração do fixador

# Factores que influenciam a Fixação

## Tempo da fixação

O tempo de fixação depende da maioria das outras variáveis, nomeadamente:

- Espessura das peças
- Volume das peças
- Volume do fixador
- Temperatura
- Tipo de fixador

# Factores que influenciam a Fixação

## Concentração do fixador

- Quanto maior a concentração de um líquido fixador maior a rapidez de fixação
- No entanto, deve-se ter cuidado, uma vez que concentrações elevadas podem ser prejudiciais para a estrutura do material biológico

# Factores que influenciam a Fixação

## Temperatura

- A fixação enquanto reacção química e como tal é influenciada pela temperatura
- O aumento da temperatura acelera a fixação
- O frio retarda a fixação, pelo método químico
- A temperatura ambiente deve ser sempre tida em conta

# Factores que influenciam a Fixação

pH

- Os valores de pH extremos podem ter efeitos nocivos, bem como as variações
- Utilizam-se fixadores com um pH variável entre 6 e 8

# Factores que influenciam a Fixação

## Lavagem pós-fixação

- Alguns fixadores formam pigmentos artefactuais nos tecidos, sendo necessárias lavagens pós-fixação

## Pigmento Formólico

- Removido com Ácido pícrico alcoólico e com Carbonato de lítio

# Factores que influenciam a Fixação

## Lavagem pós-fixação

### Pigmento de Ácido pícrico

- Removido com Carbonato de lítio

### Pigmento de Mercúrio

- Removido com Iodina de Lugol e Tiosulfato de sódio

# Factores que influenciam a Fixação

## Pressão Osmótica

- A osmolaridade das misturas fixadoras é importante
- Qualquer fixador provoca efeitos de retracção nos tecidos
- Soluções hipertónicas acentuam a retracção
- Soluções hipotónicas podem provocar o rementamento das células

# Factores que influenciam a Fixação

## Tipo de Fixador

- Existem várias formas de classificar fixadores, entre as quais:
  - O modo de actuação
  - Mecanismo de acção
  - A natureza das estruturas a fixar



# **Tipo de Fixador**

## Modo de Actuação

Segundo o modo de actuação os fixadores são classificados em:

- Aditivos
- Não aditivos
- Coagulantes
- Não coagulantes



## Modo de Actuação

### Fixadores Aditivos

- Ligam-se quimicamente ou adicionam-se aos tecidos alterando-os
- **+ comuns:** Cloreto de mercúrio, Trióxido de crómio, Formaldeído, Glutaraldeído, Ácido pícrico, Sulfato ou Cloreto de zinco, entre outros.



# Modo de Actuação

## Fixadores Não Aditivos

- Não se combinam quimicamente com os tecidos
- **+ comuns:** Acetona, Metanol e Etanol



# Modo de Actuação

## Fixadores Coagulantes

- Estabelecem uma rede no tecido que permite que as soluções penetrem rapidamente no interior do tecido
- Ocorre precipitação proteica devido à entrada e à acção dos fixadores no interior das células
- **+ comuns:** Álcoois, Cloreto de mercúrio, Trióxido de crómio, Ácido pícrico, etc.



# Modo de Actuação

## Fixadores Não Coagulantes

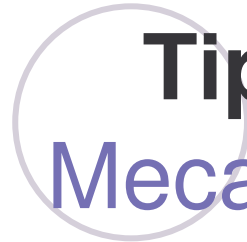
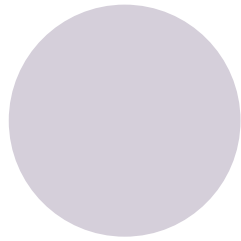
- Actuam criando um gel que torna a penetração pelas soluções subsequentes difícil
- **+ comuns:** Formaldeído, Glutaraldeído, Ácido acético, etc.



# Modo de Actuação

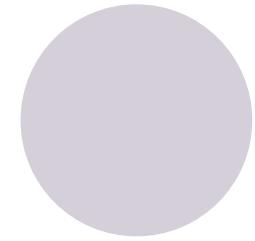
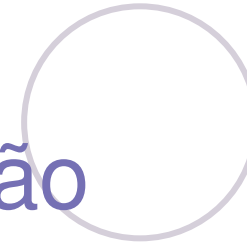
## Fixadores Aditivos

- Os valores de pH extremos podem ter efeitos nocivos, bem como as variações
- Utilizam-se fixadores com um pH variável entre 6 e 8



## Tipo de Fixador

### Mecanismo de Acção



Segundo o mecanismo de acção os fixadores são classificados em:

- Álcoois
- Aldeídos
- Agentes Oxidantes
- Mercúrios
- Picratos



# Mecanismo de Acção

## Álcoois

- Provocam a desnaturação das proteínas e não são utilizados rotineiramente para tecidos, pois tornam-nos frágeis e firmes
- Utilizados em esfregaços citológicos, pois actuam rapidamente e proporcionam uma boa visualização do detalhe nuclear
- Metanol e Etanol



# Mecanismo de Acção

## Aldeídos

- A fixação ocorre pelo estabelecimento de ligações cruzadas formadas pelos aminoácidos
- Estas ligações não danificam grandemente a estrutura das proteínas
- Preservação antigénica
- Formaldeído, Glutaraldeído



# Mecanismo de Acção

## Agentes Oxidantes

- Formam ligações cruzadas (à semelhança dos aldeídos)
- Causam desnaturação proteica extensa
- Utilizados em processamentos especiais
- Utilização pouco frequente
- Tetróxido de ósmio, Dicromato de potássio



# Mecanismo de Acção

## Mercúrios

- Mecanismo de fixação desconhecido
- Penetração tecidual pobre, provoca rigidez
- Rápido
- Bom detalhe nuclear
- Fixação de tecidos hematopoiéticos e retículos endoteliais
- Cloreto de mercúrio (tóxico)



# Mecanismo de Acção

## Picratos

- Mecanismo de acção desconhecido
- Bom detalhe nuclear
- Não causa demasiada firmeza tecidular
- Ácido pícrico, Líquido de Bouin



# Tipo de Fixador

## Natureza da Estrutura a Fixar

Natureza das estruturas a fixar:

- Ácidos Nucleicos
- Proteínas
- Lípidos
- Glícidos

# Natureza da Estrutura a Fixar

## Ácidos Nucleicos

- No núcleo encontra-se DNA, RNA e proteínas
- A maior parte dos fixadores parece não reagir com estes
- O Ácido acético fixa perfeitamente núcleos e cromossomas
- Carnoy, Bicloreto de mercúrio, Bouin Hollande

# Natureza da Estrutura a Fixar

## Proteínas

- Os fixadores aditivos alteram a estrutura terciária
- Os fixadores coagulantes provocam insolubilidade das proteínas ao mudar a estrutura terciária
- Formaldeído, Ácido pícrico, Etanol, Biclreto de mercúrio

# Natureza da Estrutura a Fixar

## Lípidos

- A maior parte dos fixadores preserva os lípidos, nomeadamente o Formaldeído
- Existem 2 fixadores que fixam os lípidos de modo a que estes não se dissolvam durante os restantes passos do processamento histológico, alterando a sua reactividade química
- Tetróxido de ósmio e Ácido crómico

# Natureza da Estrutura a Fixar

## Glícidos

- Alguns destes são dissolvidos durante a fixação
- A retenção de glicogénio e alguma glicose deve-se à acção de uma rede proteica formada durante o processo
- As formas menos polarizadas de glicogénio serão dificilmente fixadas por fixadores de rotina
- As formas mais polarizadas são retidas por uma variedade de fixadores
- Álcoois, Carnoy

# Natureza da Estrutura a Fixar

## Outras

- Aspectos gerais da célula: Carnoy, Zenker, Álcool, Ác. Pícrico, Bouin, Formaldeído
- Citoplasma: Bouin, Carnoy, Líquido de Helly
- Tecido Nervoso: Orth
- Esfregaços: Zenker, Álcool



- Formaldeído
- Líquido de Bouin
- Etanol



# FIXADORES

## Formaldeído

- É o aldeído mais simples
- Forma molecular  $H_2CO$
- Nome oficial IUPAC – Metanal
- Fixador simples, não coagulante, aditivo
- Une cadeias proteicas (polimerização), formando pontes entre as proteínas
- É o fixador universal em Histopatologia



# FIXADORES

## Formaldeído

- **Paraformaldeído:** sólido estável, insolúvel em água, constituído por polímeros de alto peso molecular (polioximetilenoglicol)
- Quando aquecido, em solução aquosa, gera um gás – o **Formaldeído**



# FIXADORES

## Formaldeído

- **Formaldeído:** gás incolor, caracterizado pelo seu cheiro muito forte, inflamável,
- **Formol ou Formalina:** solução aquosa de Formaldeído, sendo solúvel em água até 40%



# FIXADORES

## Formaldeído

- Como fixador de tecidos, o formol é usado a uma concentração de 10% em solução aquosa (formaldeído a 4%)
- O tecido cerebral é fixado em formol a 15%
- Em solução aquosa coexiste com a sua forma hidratada (metilenoglicol), podendo polimerizar sob a forma de um precipitado branco (polioximetilenoglicol)



# FIXADORES

## Formaldeído

- As soluções comerciais (37-40%) contêm cerca de 10% de metanol, que tem como função evitar a polimerização do metilenoglicol
- Também possuem iões formato na sua constituição
- Segundo a reacção de *Cannizzaro*, quando 2 moléculas de formaldeído interagem, 1 é reduzida a metanol e a outra oxidada a Ácido fórmico



# FIXADORES

## Formaldeído

- Esta reacção é lenta, fazendo com que a formação de metanol e ácido fórmico seja verificada em situações de armazenamento prolongado
- A diminuição de pH (devido à formação de ácido fórmico) leva a uma redução da qualidade da coloração, especialmente das técnicas histoquímicas



# FIXADORES

## Formaldeído

- Para manter a solução aquosa de formaldeído a um pH neutro durante muito tempo, deve-se adicionar fosfato monobásico e dibásico – **Formol Tamponado**



# FIXADORES

## Formaldeído

Características como:

- Não precipitar proteínas
- Preservar o tecido adiposo
- Fixar lípidos complexos (fosfolípidos)
- Não actuar em gorduras neutras
- + todas as características que definem um bom fixador

**Fazem o formaldeído o fixador de eleição em AP**



# FIXADORES

## Formaldeído

- Penetra rapidamente e de forma uniforme nos tecidos
- Endurece moderadamente os tecidos
- Provoca pouca retracção
- Fixador lento: fixa entre 6 e 48h (8h:1mm)
- Tempo máximo de fixação: indeterminado, após alguns meses as colorações tornam-se difusas



# FIXADORES

## Formaldeído

- É tóxico quando ingerido, inalado, quando entra em contacto com a pele, quando atinge o sistema circulatório por via intravenosa, intraperitoneal ou subcutânea
- O vapor irrita todas as estruturas do sistema respiratório superior e mucosas
- Provoca pouca retracção



# FIXADORES

## Líquido de Bouin

- É uma mistura de substâncias fixadoras
- Constituído por: Ácido pícrico, Formaldeído a 37-40% e Ácido acético
- Fixador mais indicado para alguns exames histoquímicos
- Preserva bem os aspectos gerais da célula com um bom detalhe citoplasmático



# FIXADORES

## Líquido de Bouin

- Utilizado em biópsias gastrointestinais, porque torna os núcleos mais aptos para processos de coloração posteriores
- Utilizado em gânglios: aspecto fluorescente vs tamanho reduzido
- A coloração amarela conferida pelo Ácido pícrico pode ser removida com álcool a 50 ou a 70% ou álcool a 70% saturado com Carbonato de lítio



# FIXADORES

## Líquido de Bouin

- Fixador rápido: fixa entre 4 e 24h (4h:1mm)
- Tempo de fixação máximo: 8 dias, após este tempo os fragmentos endurecem excessivamente, dificultando o corte



- Líquido incolor, inflamável
- Fixador coagulante, não aditivo – desnatura e coagula todas as proteínas do tecido excepto das nucleoproteínas
- Utilizado preferencialmente para a preservação de componentes do tecido solúveis em água (ex.: glicogénio)



- Dissolve os lípidos
- Torna o fragmento duro e quebradiço
- Faz desaparecer todos os grânulos e pigmentos acidófilos

# QUALIDADES DE UM BOM FIXADOR

- Penetração rápida e homogénea
- Não provocar retracção
- Evidenciar estruturas intracelulares
- Evitar o desaparecimento de formações solúveis (ex.:glicogénio)
- Conferir solidez e insolubilidade suficientes para permitir suportar as manipulações subsequentes
- Não criar artefactos e assegurar uma imagem fiel



# RESUMO

- Conceito de fixação
- Princípios gerais da fixação
- Métodos de fixação
- Tipos de fixação
- Factores que influenciam a fixação
- Tipos de fixadores
- Fixadores
- Qualidades de um bom fixador