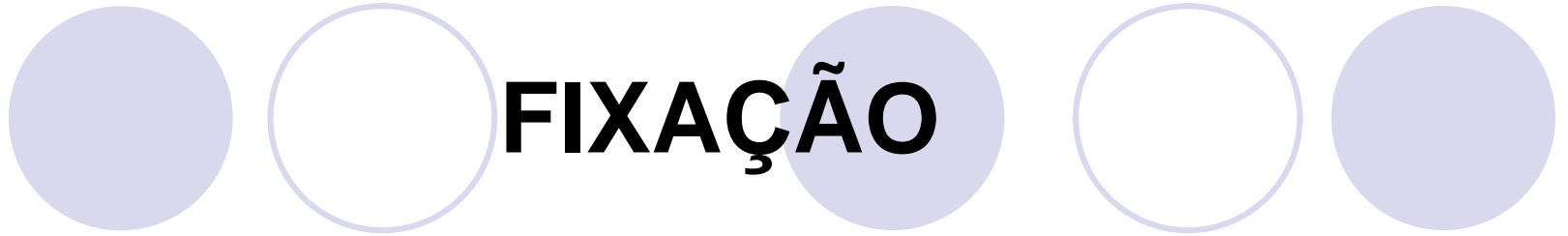


# FIXAÇÃO



Prof. Carina Ladeira

Outubro de 2007



# 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)

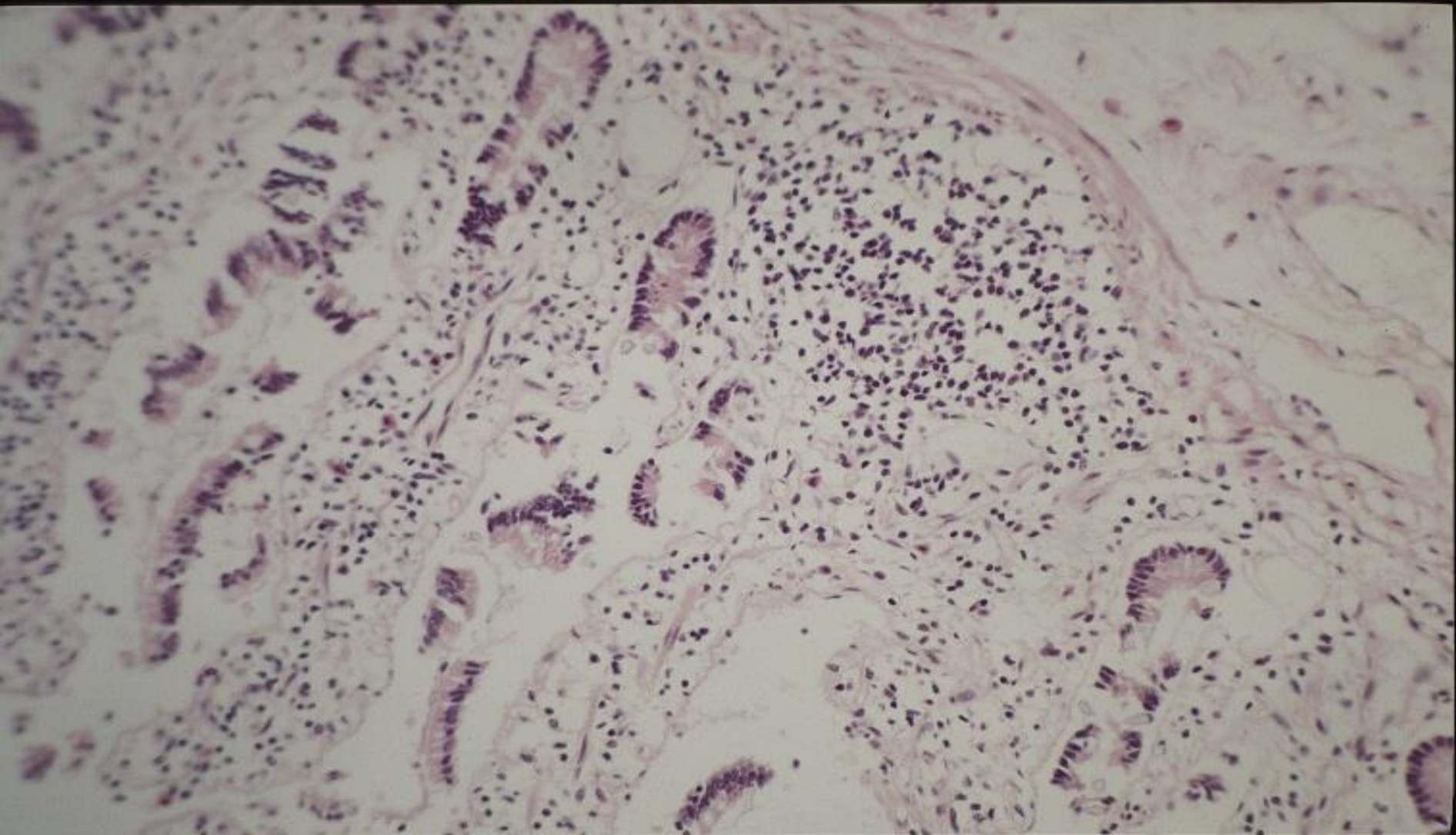
- Efeitos da putrefacção nos cortes histológicos:
- Vacúolos, por produção de gás
- Coloração difusa
- Sem detalhe celular

# PRINCÍPIOS GERAIS DA FIXAÇÃO

## Inibição da putrefacção tecidular (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

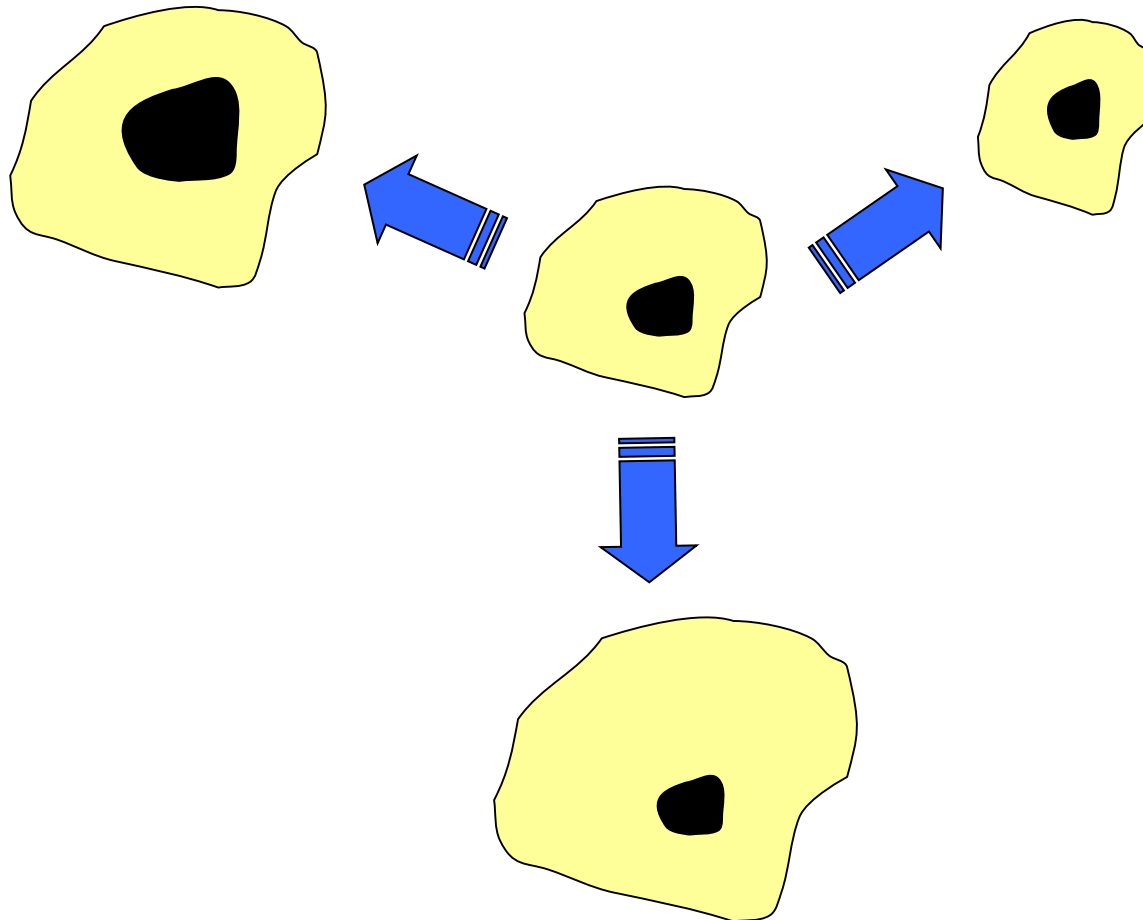
# PRINCÍPIOS GERAIS DA FIXAÇÃO

## 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

## Criodissecação 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

The slide features a decorative header with five circles of varying shades of purple and blue. The text 'Tipo de Fixador' is centered in bold black font, and 'Natureza da Estrutura a Fixar' is centered below it in blue font.

# 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, Biclureto 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, Bicloreto 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

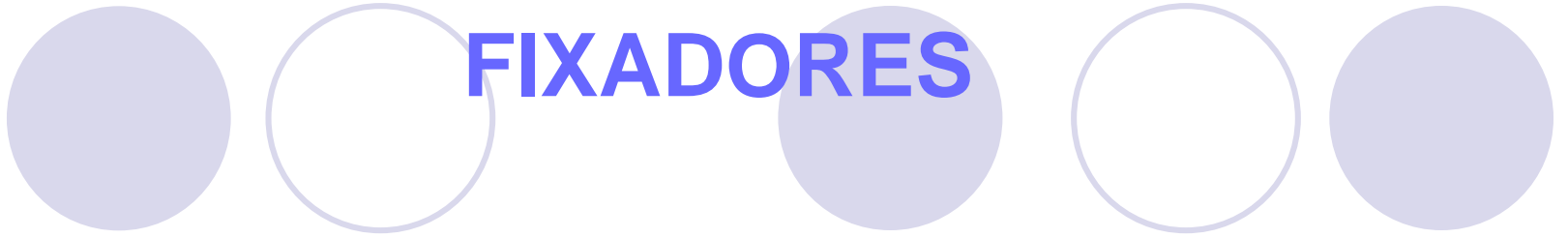
## Glúcidos

- 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

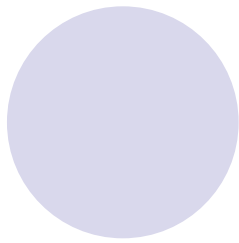
- É o aldeído mais simples
- Forma molecular  $H_2CO$
- Nome oficial IUPAC – Metanal
- Fixador simples, não coagulante, aditivo
- Une cadeias proteicas (polimerização), formando pontes entre as proteínas
- É o fixador universal em Histopatologia



# FIXADORES

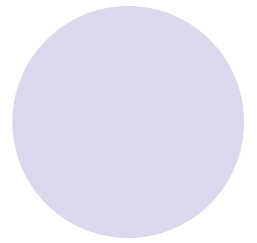
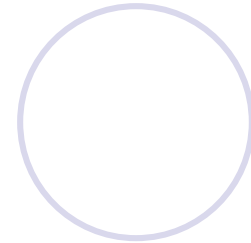
## Formaldeído

- **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 íões 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 adicionado 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



# FIXADORES

## Etanol

- 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