

Living up to Life



Fase pré-analítica em Anatomia Patológica

A importância do Processamento de Tecidos

José Ruivo Product Marketing Manager
Leica Microsystems

Fase pré-analítica em Anatomia Patológica

A importância do Processamento de Tecidos

Living up to Life



Fase pré-analítica em Anatomia Patológica

A importância do Processamento de Tecidos

A Medicina Clínica e Molecular estão a sofrer um revolução baseada no rápidos avanços em Biotecnologia, tais como DNA Microarrays e Proteomics

São necessárias respostas a questões fundamentais tais como o que torna um individuo susceptível a determinada doença, ou mais importante será esta a terapia correcta para este individuo?

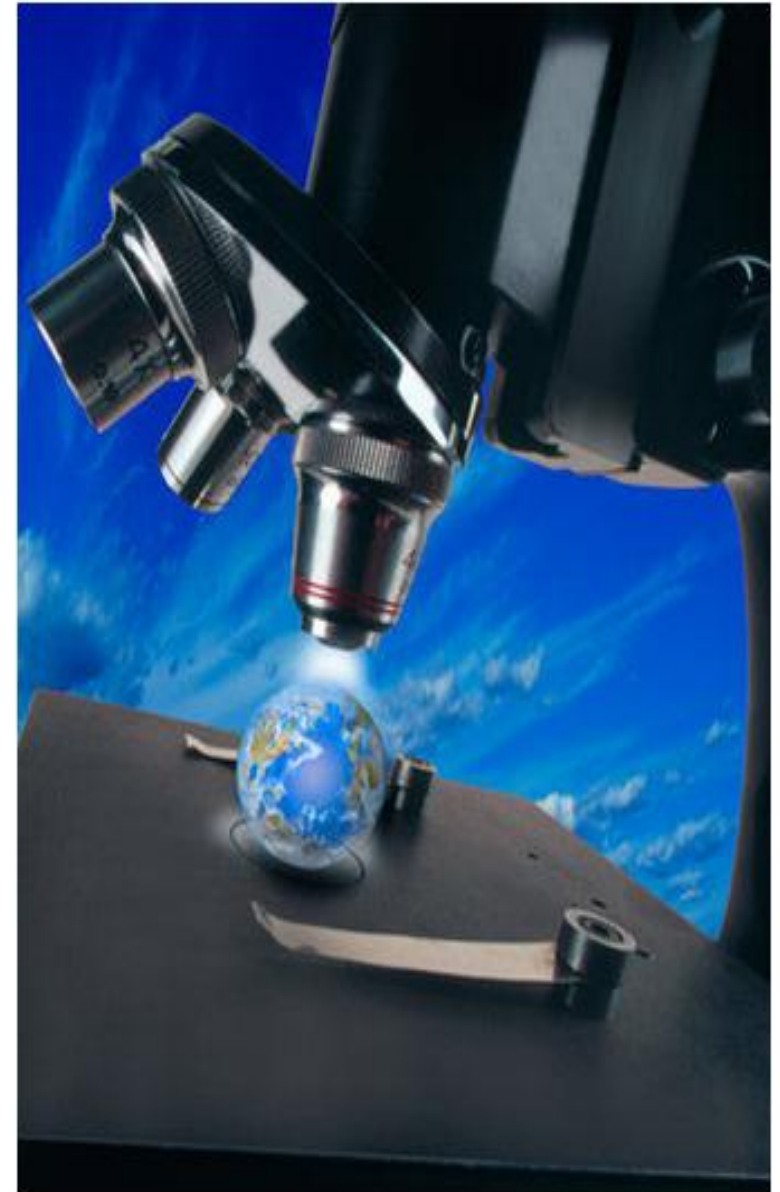
A resposta a estas e muitas outras questões está na análise dos tecidos.

Sabe-se hoje que os tecidos utilizados por organizações e profissionais em todo o mundo é diferente não só na sua origem, mas acima de tudo na sua fixação e processamento O que pode afectar o perfil molecular dos tecidos.

É imperativo que tenhamos conhecimento dos factores que estão a afectar este perfil molecular.

(Am J Pathol 2002, 161:1961–1971) tradução livre

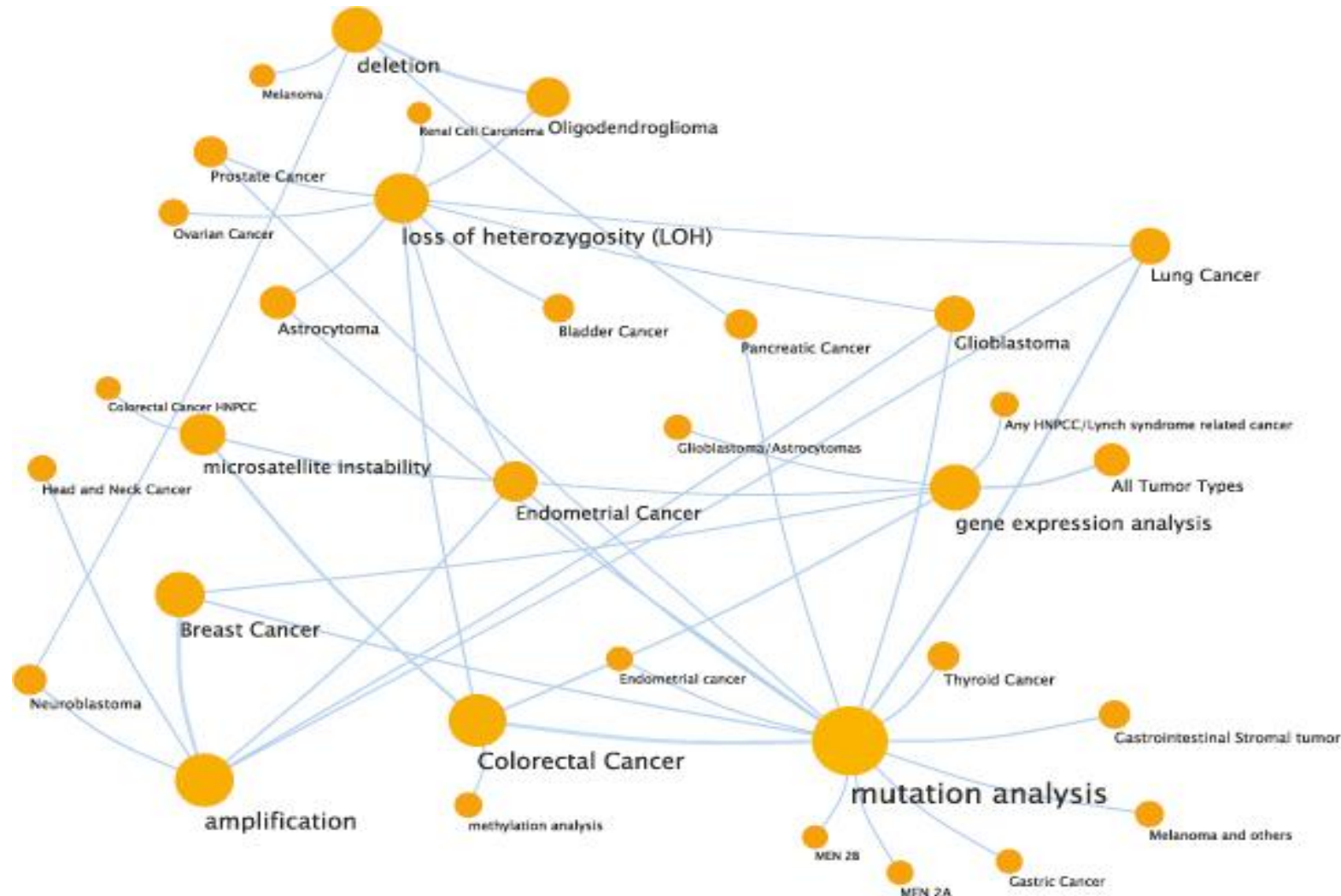
É imperativo Padronizar e criar procedimentos que sejam validados e baseados em normas internacionais e /ou nacionais, de boas práticas.



Fase pré-analítica em Anatomia Patológica

A importância do Processamento de Tecidos

Muitas pessoas envolvidas, Muitos processos



Fase pré-analítica em Anatomia Patológica

A importância do Processamento de Tecidos

Fases de Análise: pré-analítica, Analítica e pós-analítica



Fase pré-analítica em Anatomia Patológica

A importância do Processamento de Tecidos

Fase pré-analítica

- A Norma UNE EN ISO 15189 define os procedimentos pré-analíticos como:
- Os processos que começam cronologicamente com o pedido do exame, incluem os pedidos de análises, a preparação do doente, a colheita de amostra e o transporte até ao interior do laboratório.
- Terminam quando se inicia o procedimento analítico

PROCESOS BÁSICOS Y ESTÁNDARES DE CALIDAD:
UNIDADES DE ANATOMÍA PATOLÓGICA
Unidad de Cáncer
Departamento de Enfermedades no Transmisibles.
División de Prevención y Control de Enfermedades.
Subsecretaría de Salud Pública.
Ministerio de Salud del Chile

Equipo técnico de experto:
Fancy Gaete.
Médico Anatomopatólogo.
Hospital Santiago Oriente Dr. Luis Tisné Brousse.
Asesora Unidad de Cáncer
Ministerio de Salud Chile.

Procedimentos pré-analíticos

- Em Anatomia Patológica os procedimentos pré-analíticos são extraordinariamente complexos quando comparados com os de Laboratório Clínico, principalmente porque em sentido restricto incluem:

**Colheita,
Identificação
Transporte ,
Recepção,
Registo
e correcta
Identificação.**

**O estudo
macroscópico
das amostras e
a obtenção de
sub-amostras
representativas**

**A Fixação, o
Processamento
e a Inclusão dos
tecidos em
parafina
E o corte
histológicos**

**Todos os
tratamentos
prévios dos
tecidos antes
do
procedimento
analítico em
causa.**

Fase pré-analítica em Anatomia Patológica

A importância do Processamento de Tecidos

Factores que afectam a Fixação

Table 1. Fixation Parameters for Optimal Tissue Preservation

Group I: Prefixation parameters

1. Constant factors
 - a. Nature of the anesthetic
 - b. Duration of anesthesia
 - c. Anoxic injury *in situ*

2. Variable factors
 - a. Prefixation time

Group II: Intrafixation parameters

1. Properties of the fixatives
 - a. Chemistry and mechanism of action
 - b. Tissue penetration
2. Condition of fixation
 - a. Temperature
 - b. Duration
 - c. pH
 - d. Osmolarity
 - e. Concentration
 - f. Size of the specimen
 - g. Volume of the fixative

Group III: Post-fixation parameters

1. Storage parameters
 - a. Duration
 - b. Temperature
 - c. Condition (vacuum/nonvacuum packed)
2. Nature of the biological factor to be analyzed
 - a. Proteins
 - b. Enzymes
 - c. Lipids
 - d. Nucleic acids
 - e. Mucopolysaccharides
 - f. Biogenic amines
 - g. Glycogen

Fase pré-analítica em Anatomia Patológica

A importância do Processamento de Tecidos

Processamento de Tecidos

Alguns fixadores

- 10 % Formol Saline
10 % Neutral Buffered Formalin
Heidenhain's Susa
Formol Sublimate (Formol Corrosive)
Zenker's
Zenker – Formol (Helly's)
Bouin's
Brasil's alcoholic picroformol (w/TCA)
Flemming's
- Heidenhain's
Flemming's w/o acetic acid
Helly's
Formalin w/ post chroming
Regaud's (Moller's)
Orth's
Carnoy's
Bouin's

Fase pré-analítica em Anatomia Patológica

A importância do Processamento de Tecidos

Processamento de Tecidos

- **O Objectivo do Processamento de Tecidos é permitir a inclusão dos tecidos num meio sólido, suficientemente firme para sustentar o tecido e e conferir rigidez que permita o corte histológico. Preservando características químicas e moleculares dos diferentes elementos tecidulares**
- **Fases do Processamento:**
 - 1- Desidratação.
 - 2- Clarificação.
 - 3- Impregnação/Infiltração.

Pode ser Manual ou Automático



Leica ASP6025

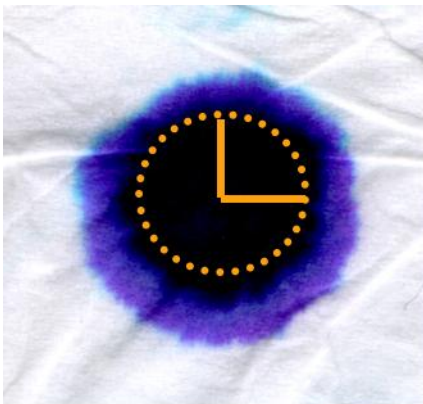
Fase pré-analítica em Anatomia Patológica

A importância do Processamento de Tecidos

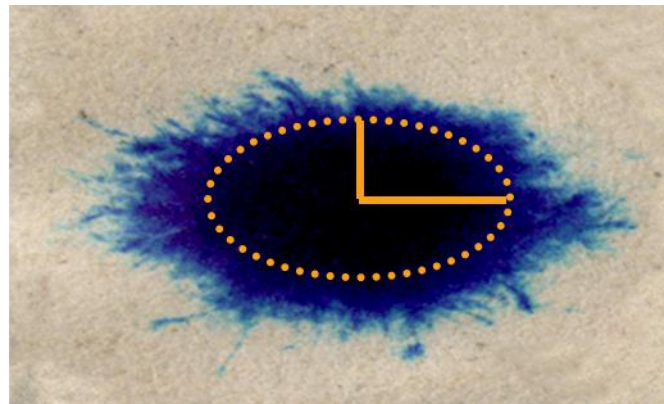
Difusão em tecidos Biológicos

"Diffusion Tensor Processing and Visualization - Ross Whitaker University of Utah"

É o movimento dos líquidos através dos tecidos
por vezes mais rápido numa direcção que noutras



Kleenex

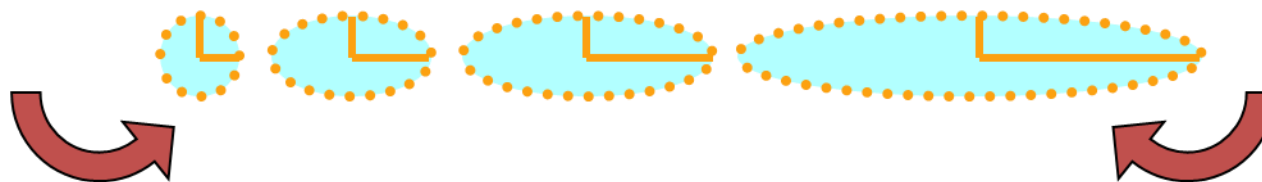


Papel de Jornal

- Anisotropia: a taxa de difusão depende da direcção

isotrofico

anisotrofico



Fase pré-analítica em Anatomia Patológica

A importância do Processamento de Tecidos

A Física da Difusão

- A densidade do tecido varia no tempo de acordo com uma equação diferencial (PDE):

The diagram shows the diffusion equation $\frac{\partial \mu}{\partial t} = \nabla \cdot D \nabla \mu$ on a black background. A bracket under the left side is labeled 'Change in density'. A pink arrow points from the label 'Diffusion – matrix, tensor (2x2 or 3x3)' to the 'D' in the equation. A bracket under the right side is labeled 'Derivatives (gradients) in space'.

$$\frac{\partial \mu}{\partial t} = \nabla \cdot D \nabla \mu$$

Change in density

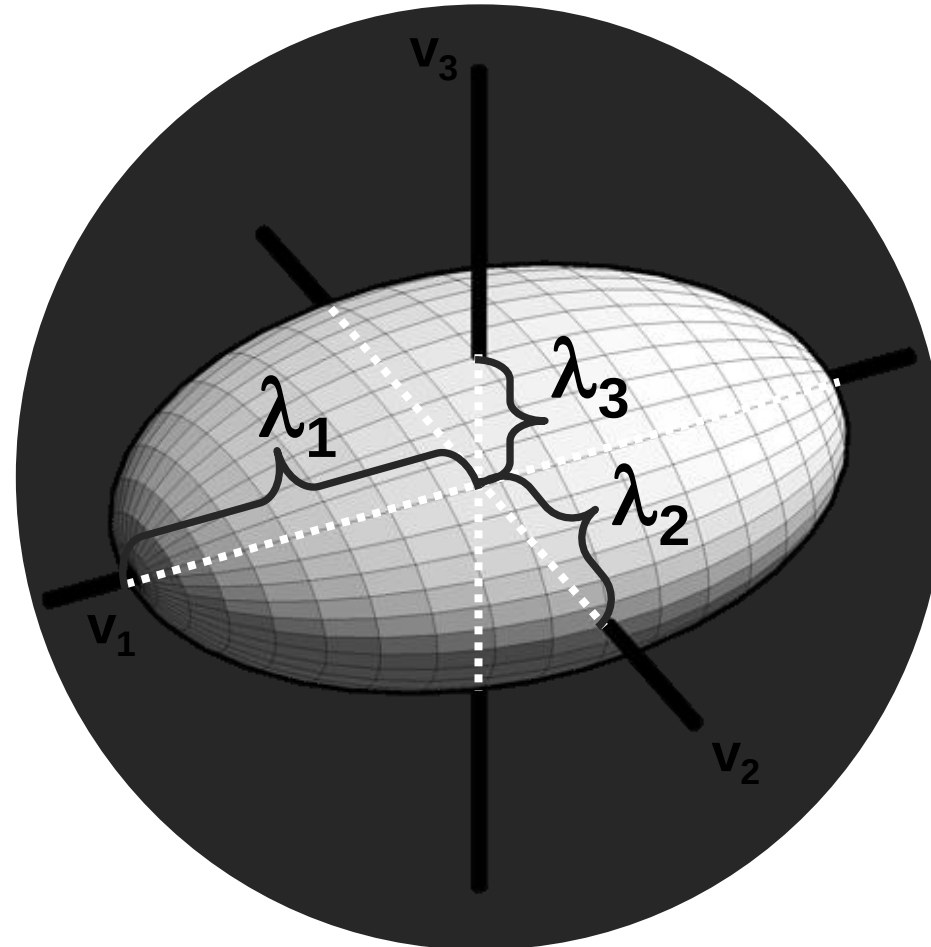
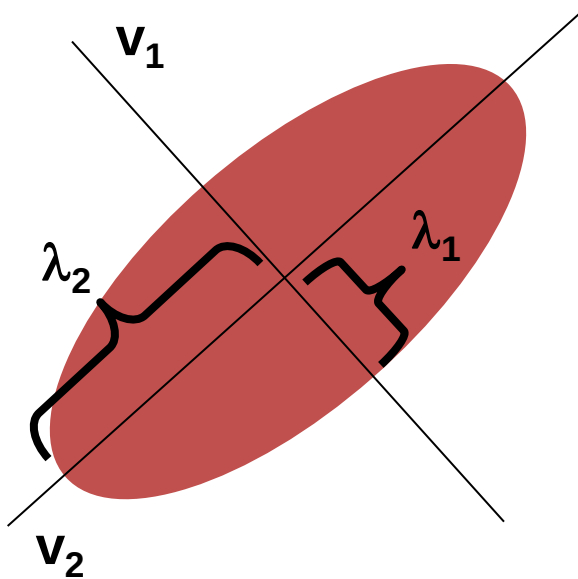
Diffusion – matrix, tensor (2x2 or 3x3)

Derivatives (gradients) in space

Fase pré-analítica em Anatomia Patológica

A importância do Processamento de Tecidos

A Física da Difusão



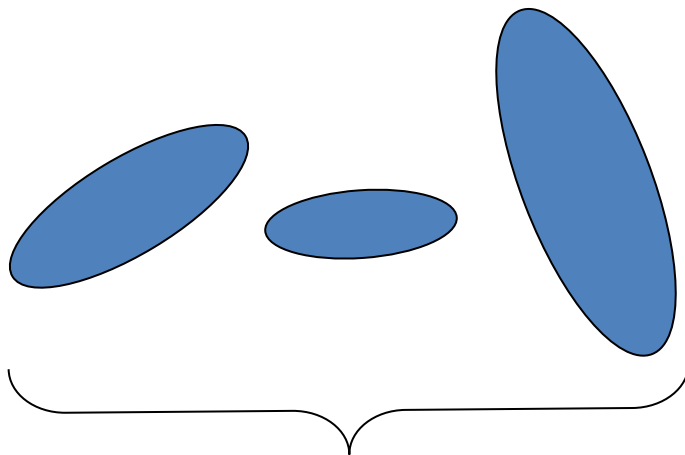
Eigen Direções e valores (principais)

Fase pré-analítica em Anatomia Patológica

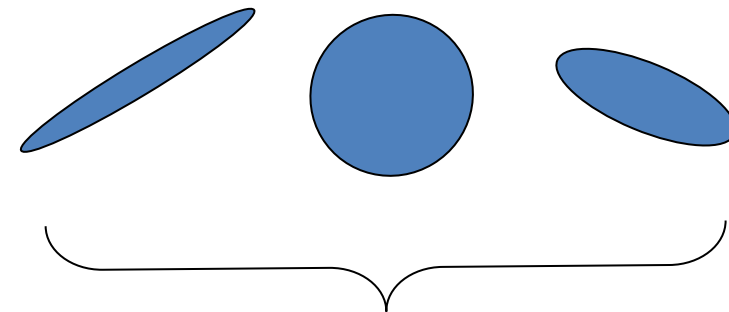
A importância do Processamento de Tecidos

A Física da Difusão

- A Forma versus o tamanho e a natureza do tecido



Diferentes tamanhos/orientações



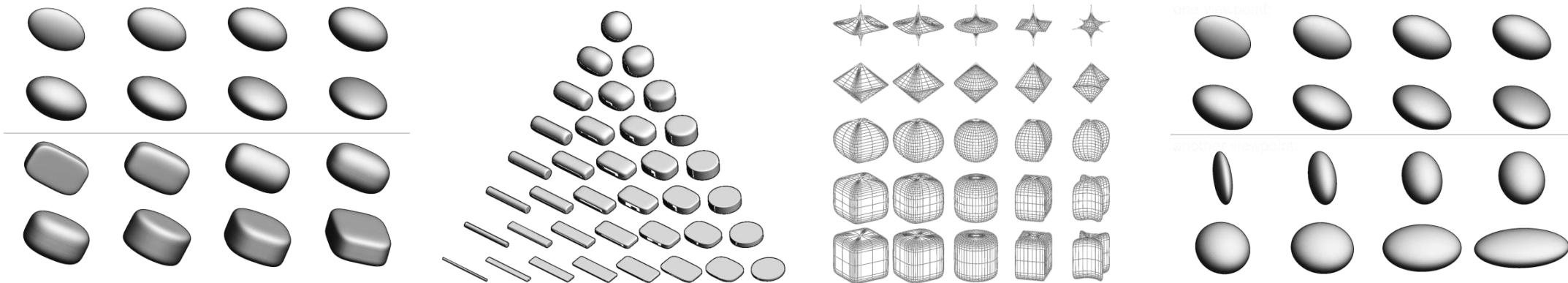
Diferentes formas

Fase pré-analítica em Anatomia Patológica

A importância do Processamento de Tecidos

A Física da Difusão

- O pior cenário: Natureza diferente
tamanho diferente
forma diferente



Fase pré-analítica em Anatomia Patológica

A importância do Processamento de Tecidos

Processamento de Tecidos

Alguns reagentes

- **Agentes desidratantes**

Alcool
Acetona
Dioxane
Cellosolve
Trietil Fosfato
THF



- **Agentes Clarificantes**

Xilol
Tolueno
Benzeno
Cloroformio
Oleo de Cedro
Oleo de aniline
Azeite



- **Agentes Impregnantes/infiltrantes**

Cera de Parafina
Copolimeros de parafina
Celoidina
gelatine
Polimeros de Plastico



Processamento de Tecidos

Algumas Guidelines internacionais

- ASCO CAP HER2 GUIDELINES (The American Society of Clinical Oncology and the College of American Pathologists)
- ASCO GUIDELINES EGFR
- ASCO HER2 ACCURACY GUIDELINES
- manual de boas práticas AP-Despacho MS nº13832-2007
- standardizing_immunohistochemistry_assays_part2
- Albanell, J. (2009) Consenso Her-2 Espanha
- Elis, I (2004) Consenso Her-2 UK
- Goldstein, N. (2007) Recommendations for Improved Standardization
- Hammond, M (2010) ASCO CAP Guidelines ER and PgR
- Hanna, W (2007) Consenso Her-2 Canadá
- Khoury, T. (2009) Delay of formalin fixation in breast biomarkers
- Nizzoli, R (2003) Her2 ICQ in FNAs
- O'Leary, T. (2009) Protein fixation and antigen retrieval
- Perry, N (2006) European guidelines for quality assurance in breast
- Wolff, A. (2007) Consenso Her-2 ASCO_CAP_2007
- Yildiz-Aktas I (2012) The effect of cold ischemic time in ER, PgR and HER2

Fase pré-analítica em Anatomia Patológica

A importância do Processamento de Tecidos

Processador de Tecidos

- Deve proporcionar um processamento de alta qualidade
- Permitir um aumento de produtividade
- Deve contribuir de forma significativa para a segurança da Amostra
- Deve ser Automatizado e Fechado
- Deve permitir registo de acontecimentos
- Deve permitir o controle e autorotação de reagentes
- Deve medir a qualidade dos reagentes através de sensores



Leica ASP6025

Fase pré-analítica em Anatomia Patológica

A importância do Processamento de Tecidos

Processador de Tecidos

- Deve ter sistemas de segurança direccionados para a amostra e para o utilizador
 - No Break e software de gestão de reagentes
 - Enchimento e drenagem de reagentes sem contacto manual
- deve permitir processamento rápido e convencional
 - tempos curtos de turnaround
- Minimizar a intervenção Humana, recorrendo a reagentes dedicados
- permitir a utilização de reagente “limpo”
Assistência Remota que permita monitorização continua
- Processamento com xilol e livre de xilol
- Assistência pós venda qualificada e acessível



NADA É INSIGNIFICANTE

Albert Einstein

Living up to Life