



# XIX Congresso Brasileiro de Histotecnologia

Os benefícios da fixação com formol tamponado e o processamento de biópsias e peças cirúrgicas

---

Leonardo Lordello

São Paulo  
2015



# Introdução

- Fixação.
- Clivagem.
- Desidratação.
- Clarificação.
- Infiltração.
- Inclusão.
- Microtomia.
- Coloração.
- Selagem.





# Fixação

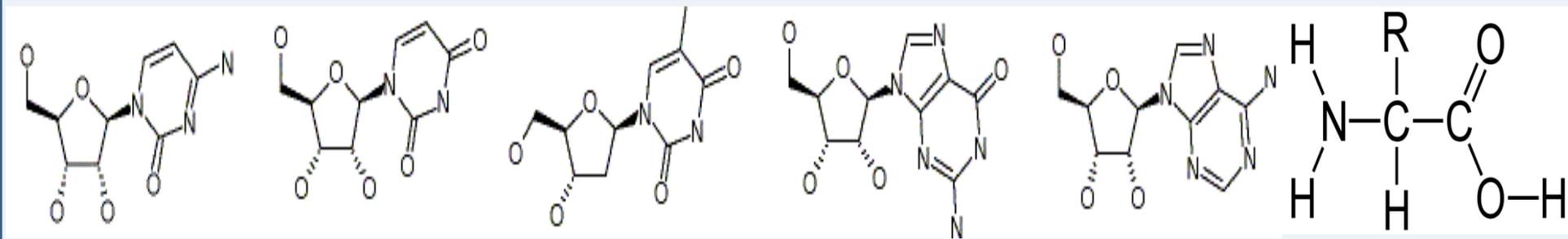
- Conjunto de eventos responsáveis por reduzir a perda de tecido e/ou biomoléculas de interesse, através da fixação de componentes subcelulares, seja por métodos químicos, físicos ou ambos combinados, impedindo a liberação e ação de enzimas líticas.
- Trata-se de impedir a autólise!!!





# Fixação

- Objetivos:
  - Prevenir a autólise.
  - Prevenir a ação bacteriana.
  - Gerar boas lâminas para o estudo.
  - Manter o tecido o mais próximo do que era real.
  - Preservar moléculas de interesse do estudo.



Referência: Rolls, G. Fixation and fixative – Factors influencing chemical fixation, formaldehyde and glutaraldehyde. Leica Biosystems. Manual, 2012.



# Fixação

- Efeitos sobre o tecido:
  - Endurecimento.
  - Solidificação.
  - Diferenciação óptica.
  - Efeitos de coloração.
  - Perda discreta da amostra.
  - Retração da amostra.



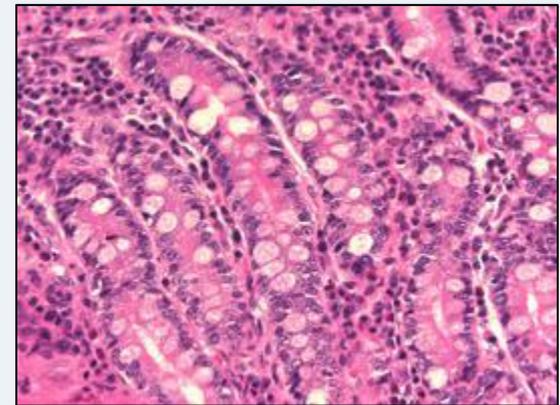
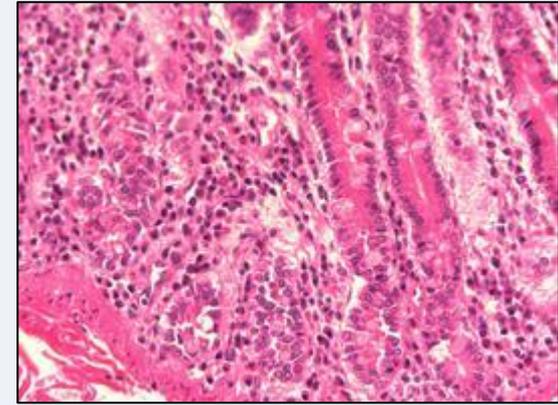
# Fixação

- Tipos de fixação:
  - Física:
    - Utilização de fatores físicos, como temperatura, ondas eletromagnéticas ou agitação molecular.
  - Química:
    - Utilização de substâncias químicas que formam reações com sítios específicos ou inespecíficos de biomoléculas, impedindo alteração tecidual.



# Fixação

- Denaturação:
  - Alteração da estrutura terciária das proteínas através da retirada da água das células, desestabilizando as ligações hidrofóbicas.
- Ligação cruzada:
  - Alteração da estrutura terciária das proteínas através da ligação cruzada do formaldeído com sítios específicos



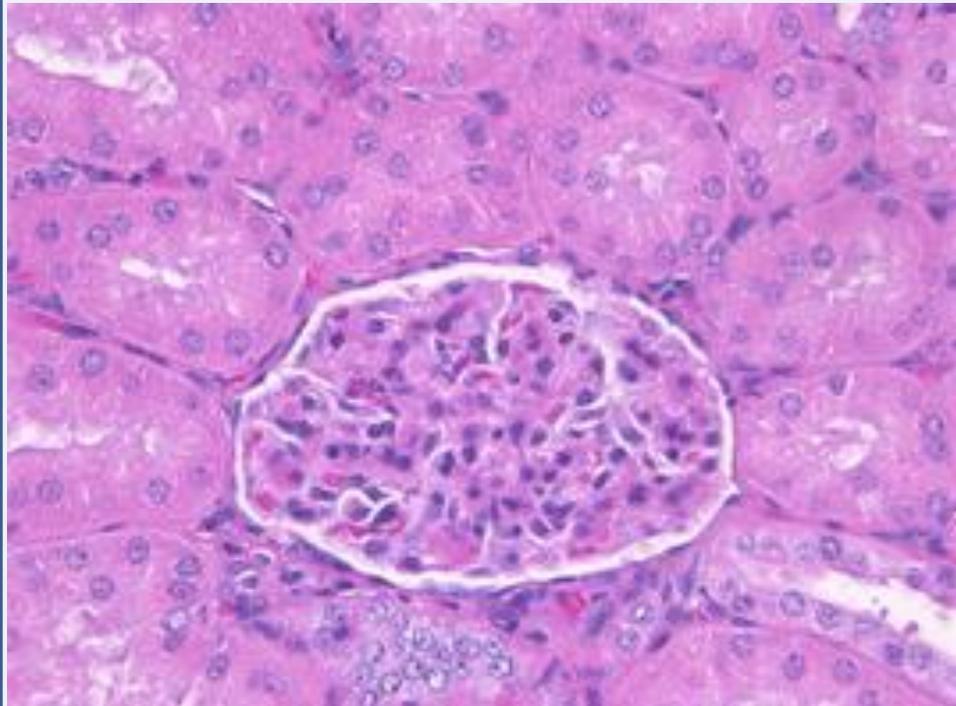


# Fixação Química

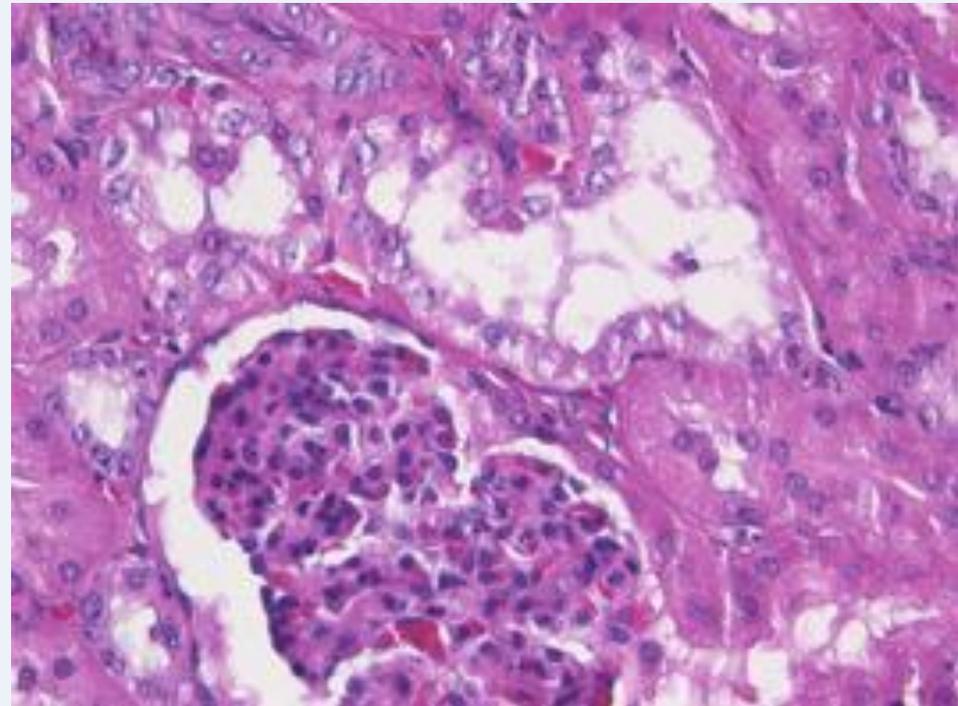
- Fixadores aldeídos:
  - Formaldeído, glutaraldeído e paraformaldeído comercial.
- Agentes oxidantes:
  - Tetróxido de ósmio, dicromato de potássio, permanganato de potássio e ácido crômico.
- Agentes desnaturantes ou coagulantes de proteínas:
  - Metanol, etanol, acetona e ácido acético.
- Mecanismo desconhecido:
  - Cloreto de mercúrio, ácido pícrico e sais de zinco.
- Combinação de reagentes:
  - Tetróxido de ósmio e glutaraldeído, tetróxido de ósmio e iodeto de zinco, glutaraldeído e carbodiamida e formaldeído com glutaraldeído.



# Fixação



Formalina tamponada 10%.



Álcool absoluto.

Referência: Rolls, G. The process of fixation and the nature of fixatives. Leica Biosystems. Manual, 2012.

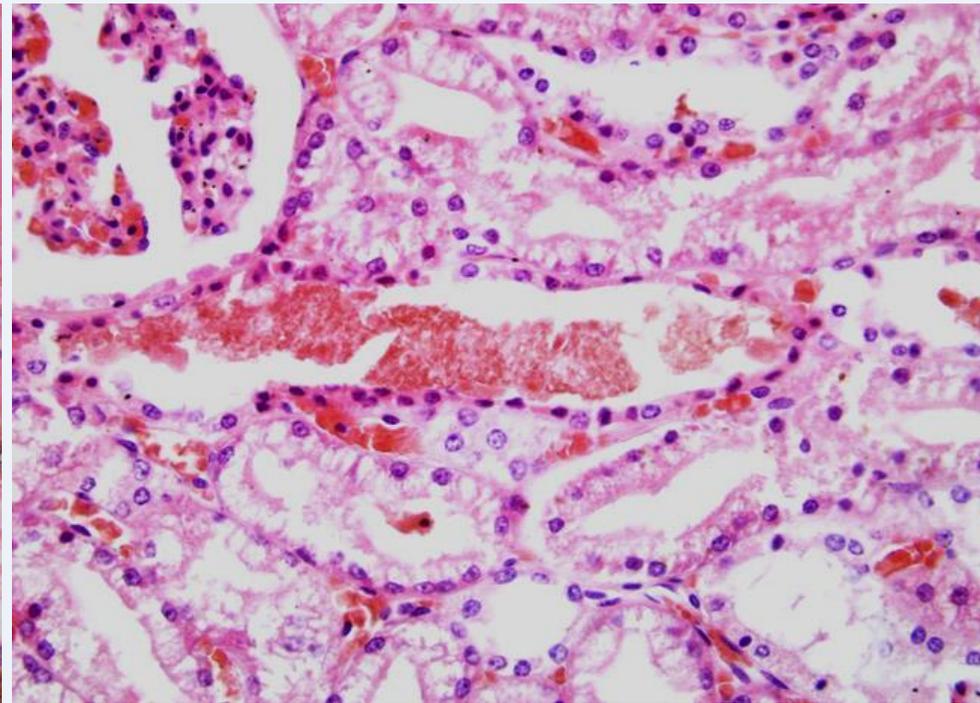
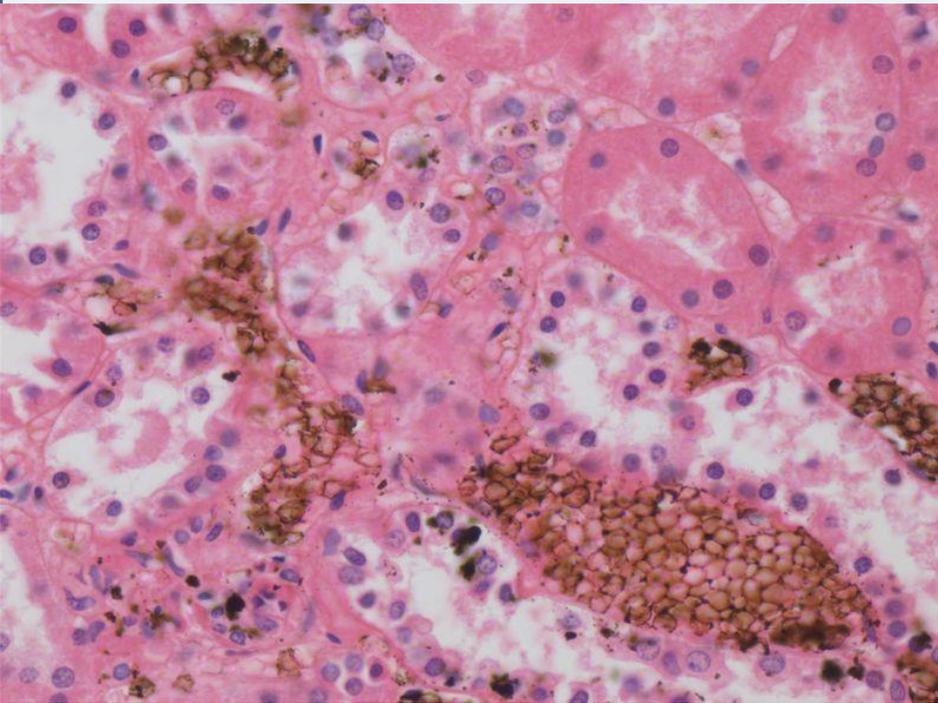


# Fixação

- Formaldeído:
  - Concentração original: 37% ou 40%.
  - Formalina = Formaldeído a 10%.
  - Reage com o oxigênio, gerando ácido fórmico.
  - Opções: carbonato de cálcio e tampões.
  - Formalina neutra tamponada 10% (pH: 6,8-7,4):
    - Formaldeído comercial.....100mL
    - Água destilada.....900mL
    - Fosfato de sódio monobásico.....4g
    - Fosfato de sódio dibásico .....6,5g



# Fixação



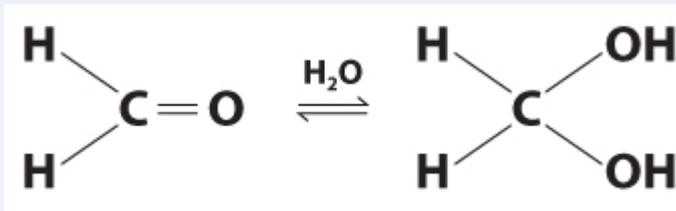
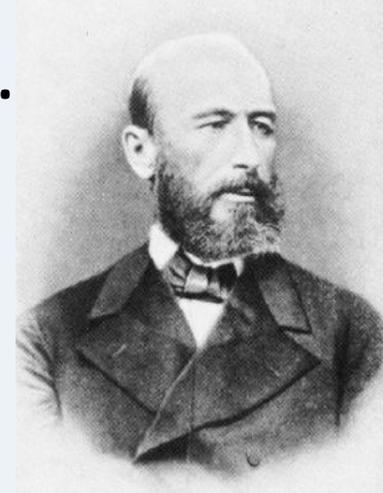
Hematina ácida formalínica

Referência: Rolls, G. The process of fixation and the nature of fixatives. Leica Biosystems. Manual, 2012.



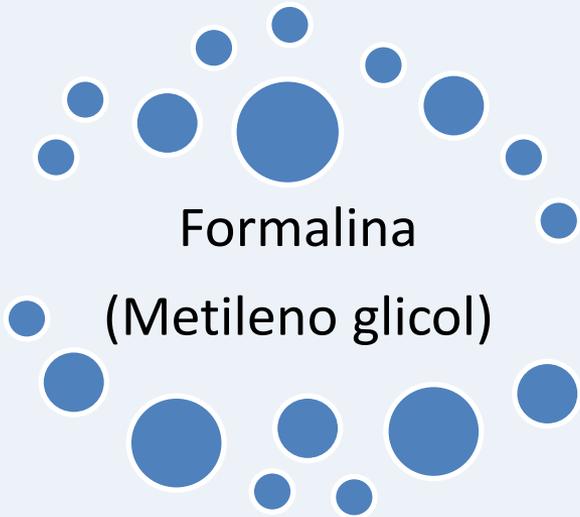
# Formaldeído

- Aleksandr Butlerov, em 1859.
- Ferdinand Blum, em 1865.
- Paradoxo penetração-fixação:
  - Formaldeído e metileno-glicol.





# Formaldeído



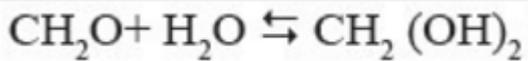
Formalina

(Metileno glicol)



TECIDO

(Carbonil-Formaldeído)

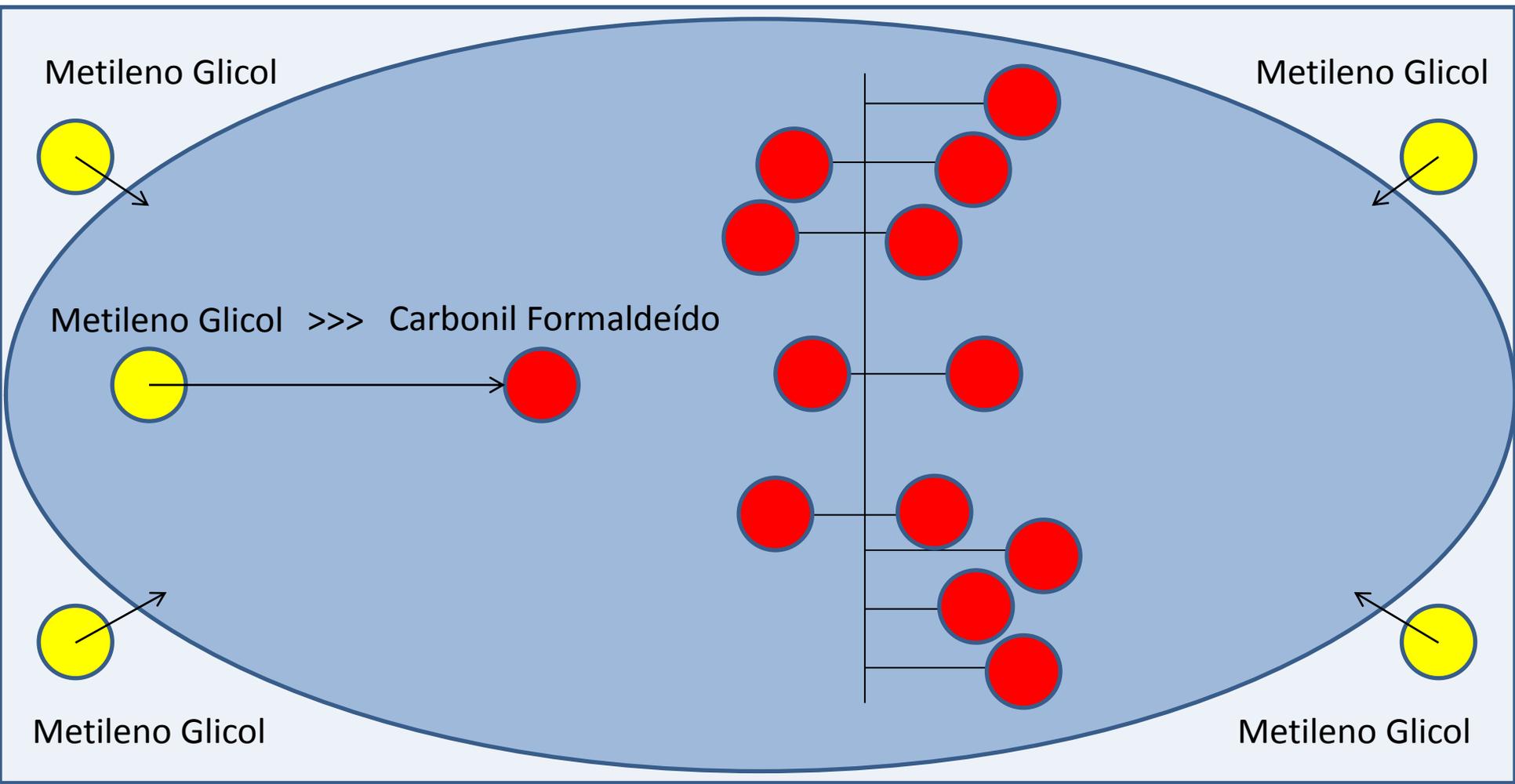


Penetração

Fixação



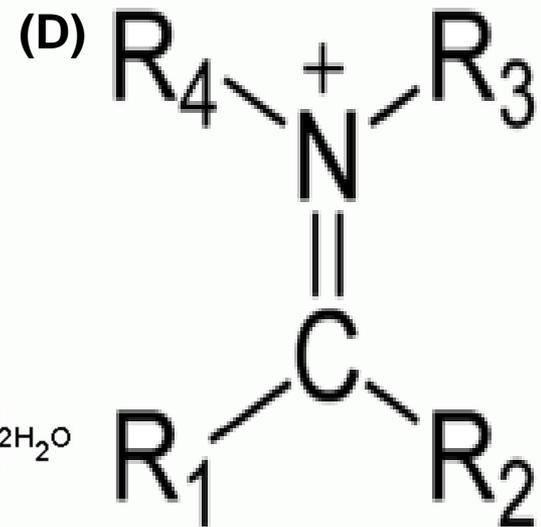
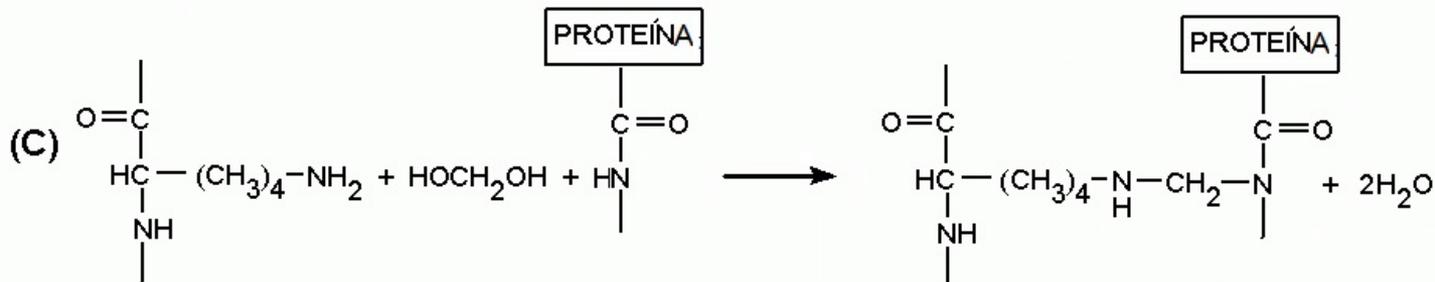
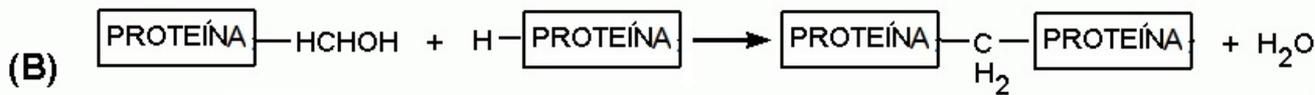
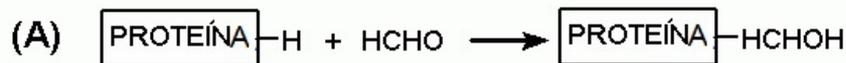
# Formaldeído





# Formaldeído

- Aminas, purinas e tióis (1).
  - Tempo da reação: 24h-48 horas.
- Amidas, asparaginas, guanidinas e tirosinas (2).
  - Tempo da reação: 30 dias.





# Fatores que Influenciam a Fixação

## Lei de Fick

$$\phi(x,t) = -D \frac{\partial c(x,t)}{\partial x}$$

$$[D] = \frac{[\text{quantidade de partículas}]}{[\text{área}] \times [\text{tempo}]} \times \frac{[\text{volume}] \times [\text{comprimento}]}{[\text{quantidade de partículas}]} = \frac{[\text{área}]}{[\text{tempo}]}$$

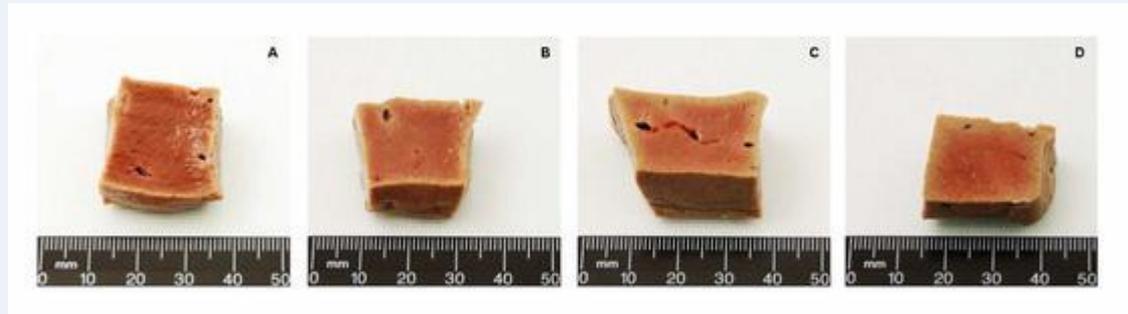


Adolf Eugen Fick



# Fatores que Influenciam a Fixação

- Temperatura.
- pH.
- Volume.
- Tempo.
- Pressão.
- Superfície.
- Concentração.
- Vasos capilares e fibras musculares.





# Effects of Preanalytical Variables on the Detection of Proteins by Immunohistochemistry in Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded Tissue

Kelly B. Engel, PhD; Helen M. Moore, PhD  
*Arch Pathol Lab Med.* 2011;135:537-543

- Concentração, pH e tampão associado ou não.
- Formalina tamponada a 10%, pH5 a pH7.
- Pode haver variação de acordo com anticorpo.
- Tris X PBS.
- *Guidelines* referem tamponamento com PBS.
- Não existem dados sobre o tempo de uso do fixador, preparação comercial ou laboratorial.



## Tissue fixation and the effect of molecular fixatives on downstream staining procedures

[William J. Howat](#)<sup>□</sup> and [Beverley A. Wilson](#)

Methods. 2014 Nov; 70(1): 12–19.

- Fixação é parte vital de uma amostra tecidual e não pode ser subestimada.
- A escolha do fixador deve ser de acordo com o objetivo do estudo.
- Formalina tamponada é o fixador mais utilizado.
- O uso de outros fixadores para detecção de antígenos, extração de DNA, RNA ou proteínas não mostrou vantagem significativa quando existe necessidade de avaliação morfológica.



# A Review of Preanalytical Factors Affecting Molecular, Protein, and Morphological Analysis of Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded (FFPE) Tissue

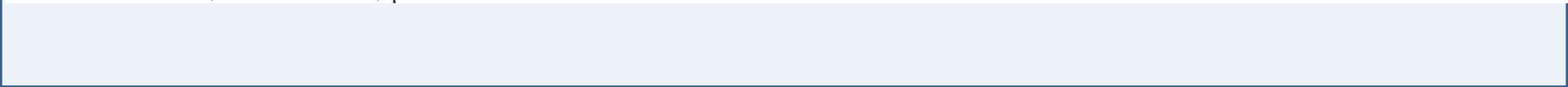
## How Well Do You Know Your FFPE Specimen?

*B. Paíee Bass, PhD; Kelly B. Engel, PhD; Sarah R. Grevtak, PhD; Helen M. Moore, PhD*



<b>Comprehensive (All 4 Analytes Have Been Evaluated)</b>	<b>Incomplete (Some but Not All Analytes Have Been Evaluated)</b>	<b>Unexplored (No Analytes Have Been Evaluated)</b>
Cold ischemia Decalcification Fixation duration Duration of paraffin block storage	Postmortem interval Warm ischemia time Specimen size Prefixation handling Fixative buffer Tissue to fixative ratio Fixation temperature Fixative delivery method Dehydration reagent and conditions Clearing reagent and conditions Paraffin embedding reagent and conditions FFPE block size or section thickness Type of slide or adhesive Slide drying duration and temperature Storage duration of slide-mounted FFPE sections	Pathology ink Fixative age Commercial versus in-house fixative Use of recycled formalin Movement during fixation Light exposure during fixation Fixation container Fixation alone or with other biospecimens Postfixation wash solution and conditions Reagents and conditions of interim alcohol storage Use of recycled dehydration and clearing reagents Automated versus manual processing Use of recycled paraffin for impregnation and embedding Embedding conditions Slide pretreatment Equipment and conditions of sectioning and section transfer

Abbreviation: FFPE, formalin-fixed, paraffin-embedded.





# A Review of Preanalytical Factors Affecting Molecular, Protein, and Morphological Analysis of Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded (FFPE) Tissue

## How Well Do You Know Your FFPE Specimen?

B. Paíee Bass, PhD; Kelly B. Engel, PhD; Sarah R. Grevtak, PhD; Helen M. Moore, PhD

- Fragmento igual ou inferior a 3mm<sup>3</sup>.
- Tempo *postmortem* inferior a 4 horas.
- Tempo de isquemia fria inferior a 1 hora.
- Fixação em formalina tamponada 10%.
- Tempo de fixação entre 8 horas e 24 horas.
- Temperatura ambiente ou a 4°C.
- Blocos armazenados por menos de 1 ano.
- Lâminas montadas por menos de 1 semana.



# Processamento histológico

- Desidratação:
  - Álcool.
    - Etanol (70%)-> 1mm/30', 3mm/90'.
    - Metanol.
    - Isopropanol.
  - Acetonal, fenol, etoxietanol, polietileno glicol e dioxano.
- Clarificação/Diafanização:
  - Xilol.
  - Benzeno, tolueno, butil acetato e clorofórmio.
- Infiltração/Impregnação por parafina:
  - Parafina (56°C a 57°C / 39°C a 68°C).
  - Glicerina, nitrocelulose e acrílico.



# Imunoistoquímica

- 1991, Shin *et al.*
- Tempo, tampão, temperatura, tipo de recuperação, utilização de microondas.
- Não se sabe exatamente quais são os epítomos com os quais o formol reage, nem o mecanismo real de recuperação antigênica.
  - Quebra das ligações cruzadas?
  - Bloqueio difuso das proteínas?
  - Precipitação de proteínas?
  - Reidratação do tecido?
  - Remoção de complexos de cálcio?
  - Mobilização de parafina residual?

Referência: Eltoun I, Fredenburgh J, Grizzle WE. Advanced concepts in fixation: 1. Effects of fixation on immunohistochemistry, reversibility of fixation and recovery of proteins, nucleic acids, and other molecules from fixed and processed tissues. 2. Developmental methods of fixation. *J Histotechnol.* 2001.



# Futuro?

- Expandir o uso de formalina tamponada a 10%.
- Otimização da qualidade de fixação em relação ao tempo e volume.
- Avaliação dos efeitos sobre proteínas, RNA e DNA, considerando-se diferentes fixadores.
- Estudos de parâmetros técnicos relacionados a diferentes fixadores em relação a alterações morfológica em diferentes tecidos, bem como referente à extração de macromoléculas.



Obrigado.