

Caderno Técnico

Ano I n° 002 – Outubro de 2015

O Passo a Passo da Colheita e Remessa de Material para Exame Histopatológico

Eric Saymom Andrade Brito (CRMV- GO 6628)¹

Moema Pacheco Chediak Matos (CRMV- GO 1068)²

Veridiana Maria Brianezi Dignani de Moura (CRMV- GO 3863)²

¹ Residente, Setor de Patologia Animal, DMV, Escola de Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO

² Docente, Setor de Patologia Animal, DMV, Escola de Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO

Resumo

O exame histopatológico compreende método de auxílio diagnóstico de grande utilidade no dia a dia do médico veterinário, podendo ser realizado em tecidos colhidos de animais vivos ou mortos, provenientes dos diferentes segmentos da profissão, incluindo animais de companhia e aqueles destinados à produção. Entretanto, para que se possa obter o melhor da técnica e

alcançar resultado fidedigno, é preciso que o profissional veterinário siga um protocolo sistematizado de colheita, conservação e envio das amostras ao laboratório. Dessa forma, este informe técnico tem como principal objetivo apresentar o passo-a-passo da colheita de amostras teciduais destinadas à avaliação histopatológica.

Palavras-chave: colheita de amostras, histopatologia, biópsia, exame necroscópico, patologia veterinária.

Introdução

Nos diferentes cursos da área médica, incluindo o de medicina veterinária, a patologia compreende a ciência voltada ao estudo e entendimento dos mecanismos que desencadeiam lesões e doenças, assim como ao reconhecimento macroscópico e microscópico das mesmas. Para isso, são utilizados inúmeros métodos, dentre os quais destaca-se a análise histopatológica. A partir dessa técnica, em que amostras de tecido são avaliadas, é possível obter informações que permitem firmar, confirmar ou afastar uma hipótese diagnóstica, quer seja de origem inflamatória, infecciosa ou neoplásica.

O exame histopatológico consiste na análise sistemática de fragmentos de tecidos colhidos de animais vivos, por meio de procedimentos de biópsia, ou mortos, obtidos durante o exame necroscópico. Compreende exame de auxílio diagnóstico em que, por microscopia óptica, são avaliados aspectos cito-histomorfológicos, especialmente as modificações que ocorrem na forma das células e na estrutura dos tecidos, bem como as consequências funcionais decorrentes dessas alterações.

Contudo, para bem usufruir da versatilidade e do auxílio desse exame, é condição limitante que o profissional veterinário rea-

alize adequado procedimento de colheita, conservação e envio das amostras ao laboratório especializado. Essa sistemática inicia-se com a anamnese e o exame clínico detalhado, obtendo-se dados do proprietário e do animal, bem como aqueles relacionados aos sinais e sintomas, evolução e tratamento. Destaque-se que essas informações devem constar no formulário de requisição de exame histopatológico, já que muitas vezes as alterações microscópicas não se autodefinem, sendo necessária a interpretação do médico veterinário patologista, que a faz em associação aos dados fornecidos pelo solicitante do exame.

Frente a essas considerações e à crescente demanda por serviços especializados na área médico veterinária, o que inclui em grande parte exames de auxílio diagnóstico, este informe técnico tem por principal objetivo descrever a sistemática de colheita, conservação e envio de amostras de tecido destinadas a exame histopatológico. Com isso, busca-se auxiliar o profissional veterinário em seu desafio constante de estabelecer o diagnóstico, o prognóstico e escolher o protocolo de conduta adequado para cada paciente ou situação.

Colheita das amostras

Cabe ao médico veterinário avaliar cada situação e decidir pelo tipo de técnica auxiliar ao diagnóstico e proceder com a sistemática pertinente ao exame escolhido. A avaliação microscópica dos tecidos compreende opção tanto para situações *in vivo* quanto *post mortem*. No caso de óbito do animal, a colheita de amostras para exame histopatológico deve ser realizada logo após a morte. Isso porque quanto maior o tempo transcorrido entre o óbito e a obtenção dos fragmentos, mais avançado será o processo de autólise tecidual, condição esta que compromete a qualidade do material a ser avaliado ou mesmo impede a realização do exame.

Embora seja possível colher amostras de boa qualidade até algumas horas após a morte, é prudente que não se estabeleça tempo máximo para esse procedimento, já que são muitas as variáveis que interferem nesse intervalo. Cabe ao médico veterinário avaliar a condição dos tecidos durante o exame necroscópico e decidir sobre a viabilidade dos mesmos. Destaque-se que a condição climática, o tipo de ambiente e a enfermidade que levou o animal ao óbito interferem diretamente na viabilidade tecidual e, portanto, no tempo máximo de colheita. Assim, o recomendado é realizar os procedimentos de necropsia, colheita e conservação das amostras o mais breve, tanto quanto possível imediatamente após a morte. Já nos casos em que a obtenção dos fragmentos se dá com o animal vivo, a viabilidade tecidual deve ser considerada do ponto de vista local, evitando-se a colher fragmentos que contenham apenas tecido necrótico, por exemplo.

Outro ponto de grande importância em relação à obtenção de material destinado à análise histopatológica refere-se ao tamanho e número das amostras. Novamente cabe ao médico veterinário que realiza o procedimento de colheita, decidir sobre quais e quantos fragmentos obter. Na avaliação *post mortem* realiza-se a inspeção macroscópica dos diferentes órgãos e, quando observadas alterações, estas são eleitas para a colheita. Nos casos de fragmentos provenientes de procedimentos de biopsia, estes podem ser obtidos por métodos incisionais ou excisionais, que são executados em ambiente ambulatorial ou cirúrgico. Para isso, são utilizados instrumentais como bisturis, punches, tesouras, pinças e agulhas de biopsia específicas (Figura 1).

Comumente recomenda-se a remoção de fragmentos medindo até 3 cm³, que contemham área representativa da alteração e do órgão ou tecido de referência (Figura 2), já que nos limites da lesão as modificações costumam ser marcantes, além de viabilizar a correspondência com o tecido de origem. Entretanto, quando a lesão se apresentar de forma difusa, a escolha pode ser aleatória, desde que represente o todo. Ressalte-se que em todos os casos o fragmento deve representar o local de origem e a lesão. Raras são as situações em que é preciso colher grandes segmentos ou o órgão inteiro, a exemplo do que ocorre quando se faz necessária a conservação do encéfalo em sua totalidade para a realização de cortes seriados. Nesses casos, regras específicas de conservação devem ser aplicadas.

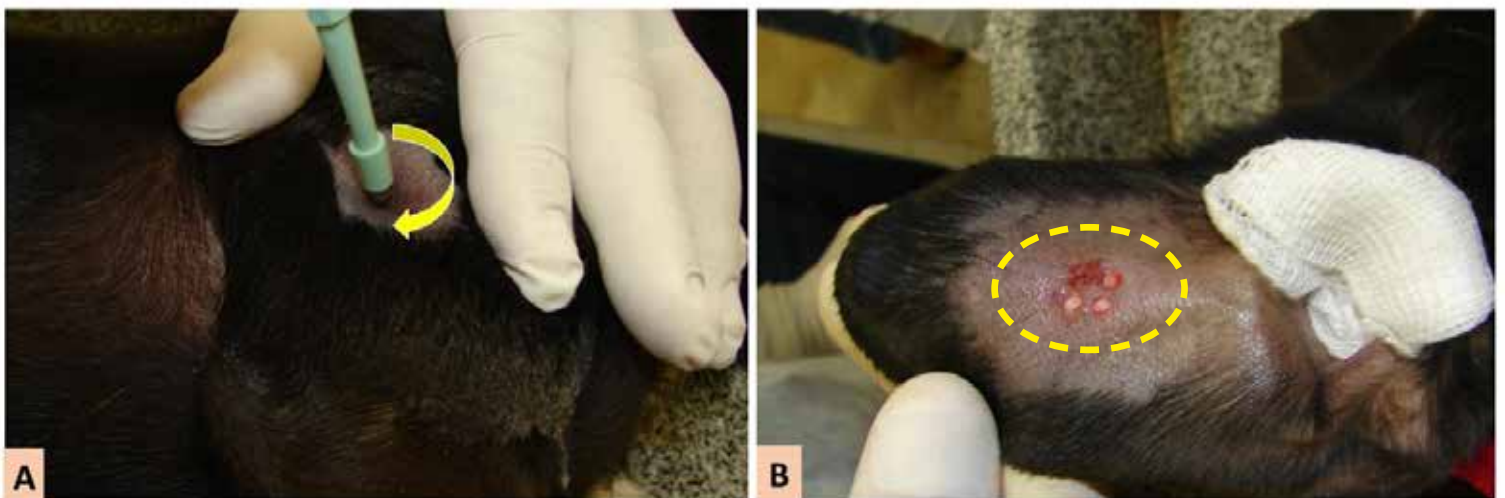


Figura 1 - Procedimento de biopsia de pele com punch. A) Escolher a área em que o fragmento será colhido, aproximar a extremidade cortante do equipamento à pele, pressionar e girar no sentido horário (seta). B) Aspecto da pele após a colheita dos fragmentos com o auxílio do punch.

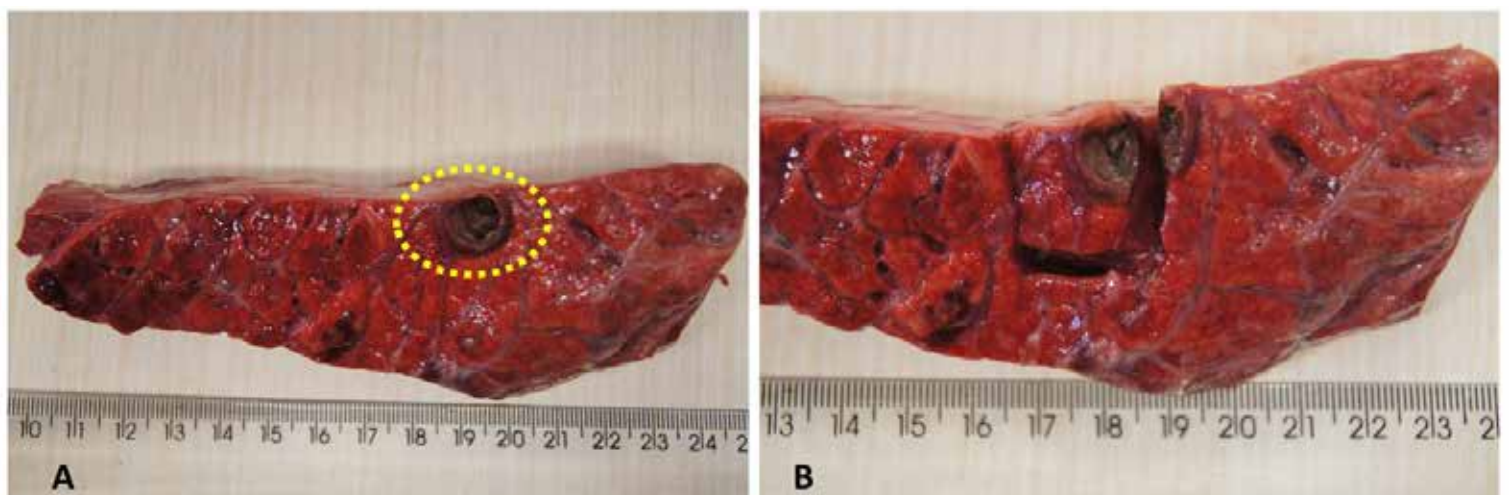


Figura 2 - Procedimento de colheita de fragmento de pulmão bovino. A) Lesão focal, redonda, medindo 2 cm de diâmetro (linha pontilhada). B) Linhas de corte da amostra a ser colhida para exame histopatológico, incluindo segmento da lesão e do parênquima do órgão de referência.

Conservação das amostras

Realizado o procedimento de colheita, o passo imediatamente seguinte compreende a conservação das amostras. Independente do método utilizado para a obtenção, todos os fragmentos de tecido destinados a exame histopatológico devem ser fixados em solução específica, visando a preservação. A formalina a 10% tamponada, em temperatura ambiente, representa a solução fixadora de eleição para amostras teciduais submetidas à avaliação histopatológica de rotina, pois interrompe os processos de autólise e heterólise de forma eficiente e torna difusíveis substâncias insolúveis, a exemplo dos corantes utilizados rotineiramente nas técnicas histoquímicas. Vale lembrar que, uma vez fixada, a amostra pode ser mantida por tempo indeterminado, sempre embebida pela solução fixadora inicial ou por outro conservante que a substitua, como o álcool 70°.

Dentre as vantagens da solução de formalina a 10% como fixador tecidual padrão destacam-se o baixo custo, a acessibilidade, a facilidade na preparação e a funcionalidade. É preparada a partir da mistura simples de formaldeído comercial líquido (37%), água filtrada ou destilada e os sais fosfato de sódio monobásico e dibásico (Quadro 1). Entretanto, por se tratar de conteúdo potencialmente irritante e cancerígeno, é importante evitar o contato direto e a inalação. Por isso, quando for necessário preparar a solução, procure fazê-la em ambiente laboratorial e utilizando equipamentos básicos de proteção individual (EPI), como jaleco, luvas, óculos de proteção e máscara.

Quadro 1 - Itens para o preparo da solução de formalina a 10% tamponada*

Item	Quantidade
Formol comercial (37%)	100 ml
Água filtrada ou destilada	900 ml
Fosfato de sódio monobásico	4 g
Fosfato de sódio dibásico	6,5 g

*Misturar todos os itens até a completa dissolução dos sais e obtenção de líquido homogêneo e transparente. Recomenda-se corrigir o pH em 7,0. O tempo médio de fixação para amostras de até 3 cm³ é de 24 horas.

Para que a penetração da solução fixadora no tecido seja eficaz, a proporção entre o volume da amostra e do fixador deve estar entre 1:10 e 1:20. O tamanho do fragmento também interfere na velocidade da fixação, por isso, para evitar falhas de fixação e conservação, recomenda-se que as amostras não ultrapassem 3 cm³. O tempo de fixação varia de acordo com o tamanho e a quantidade das amostras. Contudo, seguindo as recomendações de colheita e conservação, esse período é de, no máximo, 48 horas. Os fragmentos de biópsia, por exemplo, costumam ser diminutos e são completamente fixados em até seis horas. Já vários fragmentos de até 3 cm³ em um mesmo frasco estarão fixados em 24 a 48 horas.

O recipiente ideal para o armazenamento dos fragmentos deve possuir características como abertura larga e tampa que proporcione boa e excelente vedação. Isso permite a inserção e a remoção do material sem causar danos ao mesmo e ao técnico que irá manipular as amostras no laboratório. Também evita vazamentos indesejáveis da solução fixadora, que costuma causar reações irritantes medianamente a inalação e o contato direto. Além disso, a perda da solução fixadora por evaporação pode limitar a qualidade da fixação e interferir no resultado final do exame.

Comumente são utilizados recipientes confeccionados em vidro ou plástico duro, de tamanhos variados, a depender da quantidade de amostras a ser armazenada. A identificação do recipiente deve ser realizada com etiqueta externa, contendo os dados básicos do proprietário, do animal e a origem dos fragmentos colhidos. É pertinente lembrar que todo material encaminhado para exame histopatológico deve conter identificação no recipiente das amostras e ser acompanhado de informações complementares referentes ao proprietário, animal, histórico clínico e achados macroscópicos, com

descrição pormenorizada das lesões. A figura 3 ilustra o recipiente de armazenamento, a proporção entre o tamanho da amostra e o volume da solução fixadora e a identificação do frasco.

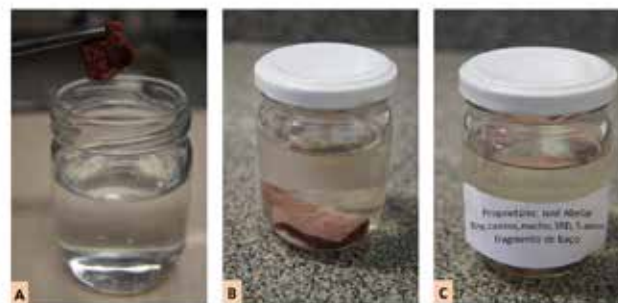


Figura 3 - Procedimento de conservação da amostra para exame histopatológico. A) Frasco de boca larga, permitindo adequada inserção e remoção do(s) fragmento(s). B) Proporção adequada entre o volume da amostra e da solução fixadora, assim como tampa que permite boa vedação. C) Identificação do frasco com uma ou mais amostras. Etiqueta externa contendo os dados básicos do proprietário, do animal e do fragmento.

A prática de se conservar mais de uma amostra em um único frasco é comum em procedimentos de necropsia, em que frequentemente se colhe um fragmento de cada órgão que apresente lesão. Como se tratam de tecidos distintos, não é necessário conservá-los em frascos diferentes, mas devem ser mantidas as recomendações quanto ao tamanho máximo da amostra e o volume proporcional da solução fixadora.

Por outro lado, muitas vezes, quando se colhe mais de uma amostra de um órgão ou tecido do mesmo animal, pode ser importante alocar os fragmentos em frascos separados, com suas respectivas identificações, a fim de que se proceda a análise identificada de cada amostra. Por exemplo, uma cadela adulta que apresente múltiplos aumentos de volume na cadeia mamária. Não é incomum que cada um desses aumentos represente diagnósticos distintos. Assim, recomenda-se que os fragmentos sejam conservados individualmente em frascos com a respectiva identificação anatômica (Figura 4). O mesmo deve ser realizado no caso de amostras de pele colhidas de diferentes sítios anatômicos de um animal ou em qualquer outra situação em que a análise identificada seja um requisito.

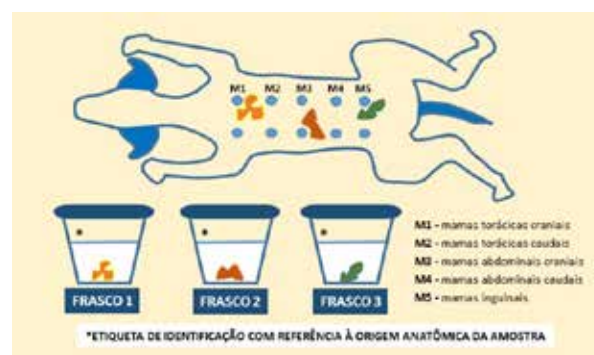


Figura 4 - Procedimento de conservação de amostra identificada para exame histopatológico. Exemplo: Uma cadela com três aumentos de volume distribuídos pela cadeia mamária. Após o procedimento de biópsia, alocar as amostras em frascos individuais com sua respectiva identificação. Frasco 1 - Proprietário: Cláudio Araújo; Teka, canino, fêmea, SRD, 9 anos; aumento de volume na mama torácica cranial esquerda. Frasco 2 - Proprietário: Cláudio Araújo; Teka, canino, fêmea, SRD, 9 anos; aumento de volume na mama abdominal cranial direita. Frasco 3 - Proprietário: Cláudio Araújo; Teka, canino, fêmea, SRD, 9 anos; aumento de volume na mama inguinal esquerda. Informações referentes ao proprietário, animal, histórico, evolução e descrição macroscópica das lesões devem ser detalhadas no documento de solicitação de exame.

Amostras que retêm grande quantidade de sangue acabam por escurecer demasiadamente a solução fixadora. Nesses casos, recomenda-se a troca da solução fixadora após as primeiras 24 horas de fixação.

Particularidades de conservação das amostras de acordo com o tipo de tecido

Certos tipos de tecido possuem singularidades ao modo de fixação da amostra. Tecidos que naturalmente possuem grande reserva de volume sanguíneo, a exemplo do fígado, se colhidos em tamanho que ultrapassem o recomendado, apresentarão processo de fixação comprometido. Nesses casos, devido ao tamanho da amostra, o agente fixador leva mais tempo para penetrar as regiões mais profundas do fragmento, conservando somente áreas periféricas, o que ocasiona, no interior do tecido, aspecto de carne cozida. Isso limita e até mesmo inviabiliza a análise microscópica.

Outra particularidade refere-se aos órgãos de morfologia tubular ou com lúmen, como esôfago, estômago, intestino, bexiga, vesícula biliar e outras superfícies mucosas. Esse tipo de tecido pode sofrer alterações iatrogênicas quando submetidos à manipulação excessiva ou raspagem com o instrumental de necropsia, impedindo a avaliação microscópica fidedigna. Assim, recomenda-se que esses órgãos, em especial os que compõem o tubo digestivo, sejam colhidos fechados, em cortes transversais, evitando-se a abertura longitudinal. Contudo, se optar pela abertura, manipule o mínimo possível. Em ambos os casos, para os procedimentos de fixação e conservação utilize uma superfície plana, como uma placa de isopor fina ou papelão, para estender e estabilizar a amostra e, em seguida, coloque a superfície mucosa em contato direto com a solução fixadora (Figura 5).

Ainda, quando da colheita de órgãos encapsulados, como linfonodos

inteiros, realizar cortes na superfície capsular ou infundir a solução fixadora no tecido a fim de facilitar a penetração da mesma no parênquima. No caso de amostras de órgãos que possam flutuar na solução fixadora, a exemplo do pulmão, recomenda-se cobri-las com algodão ou papel toalha para mantê-las imersas no líquido fixador.

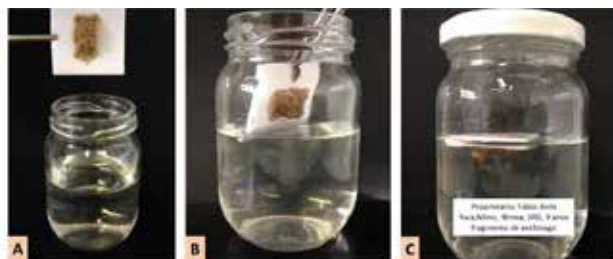


Figura 5 - Procedimento de conservação de fragmento de órgão de morfologia tubular ou com lúmen. A) Fragmento de estômago grapeado em uma superfície plana e firme (isopor), tendo exposta sua face mucosa. B) Fragmento de estômago com a face mucosa em contato com a solução fixadora. C) Frasco identificado, com fragmento preso à superfície plana e em contato direto com o líquido fixador. Informações referentes ao proprietário, animal, histórico, evolução e descrição macroscópica das lesões devem ser detalhadas no documento de solicitação de exame.

Envio das amostras ao laboratório

Após os procedimentos de colheita, armazenamento, fixação e identificação das amostras, é momento de encaminhar o material ao laboratório especializado. Essa etapa pode ser realizada na sequência das demais ou em ocasião oportuna ao profissional veterinário responsável pela solicitação do exame, pois uma vez imersas em formol a 10% tamponada, as amostras podem ser mantidas por tempo indeterminado, sempre em local seco e arejado.

O encaminhamento das amostras ao laboratório pode ser via postal, quando o laboratório se localiza a grande distância, ou em mãos, pelo profissional ou o proprietário. Em ambas as situações, recomenda-se que os recipientes com as amostras (embalagem primária) sejam lacrados em sacos plásticos (embalagem secundária) e alocados em uma embalagem terciária, como uma caixa de papelão, tomando-se o cuidado de preencher os espaços vazios com papel ou plástico, para evitar o deslocamento dos frascos dentro da caixa. No

caso da via postal, indicar com uma seta o lado da caixa que deve ficar para cima, destacar o aviso de conteúdo frágil na embalagem, inserir o símbolo de material biológico das Nações Unidas e descrever informações sobre destinatário e remetente, incluindo telefones para contato.

Independente da via, é de grande importância que os frascos com amostras cheguem ao laboratório acompanhados de um documento de solicitação de exame contendo os dados do proprietário e do animal ou da propriedade, o histórico detalhado, a evolução e a descrição das lesões, incluindo localização e aspectos morfológicos (tamanho, superfície, consistência, cor, número, etc). É válido lembrar que o resultado final do exame pode sofrer interferência negativa devido à falta de informações por parte do solicitante. Em casos de dúvidas e para acesso ao formulário específico de solicitação de exame, entre em contato com o laboratório para o qual a amostra será enviada.

Considerações finais

É de conhecimento de todo médico veterinário a importância dos exames de auxílio diagnóstico em suas atividades de rotina, especialmente nos dias atuais. Isso se deve, em grande parte, pelo avanço das técnicas, muitas dessas acessíveis em todo o território nacional, e pela crescente demanda por qualidade e especificidade no diagnóstico por parte dos proprietários. Entretanto, para obter o melhor de cada uma dessas técnicas auxiliares, o profissional veterinário que solicita a análise e muitas vezes participa ativamente de alguma etapa do exame, precisa estar atento aos protocolos de procedimento descritos para cada técnica, como no caso do exame histopatológico. Ao proceder de forma sistematizada e preocupar-se com questões

importantes, como a viabilidade e o tamanho da amostra, o recipiente e a fixação adequados, bem como com o fornecimento de informações ao laboratório que realizará o exame, o solicitante comumente garante resultado à altura de suas expectativas.

De outra parte, também é comum que o requisitante se frustrante de resultados inconclusivos por falhas na colheita ou falta de informações. Assim, para obter o melhor da análise histopatológica, ressalta-se a importância de seguir o passo a passo da colheita, conservação e remessa de amostras ao laboratório, além da colaboração mútua entre o médico veterinário solicitante e o médico veterinário patologista.

Bibliografia de Referência

KING, JM; ROTH-JHONSON, L; NEWSON, ME. The necropsy book: a guide for veterinary students, residents, clinicians, pathologists, and biological researchers. Charles Louis Davis, DVM Foundation Publisher, 5ª ed., 2007. 251p.

MATOS, MPC; MOURA, VMDB. Manual de necropsia, colheita e envio de amostras para diagnóstico laboratorial de enfermidades de bovinos. São Paulo: Zoetis, 2013. 31p.

MITCHEL, RN; KUMAR, V; ABBAS, AK; FAUSTO, N. Robbins e Cotran: Fundamentos da patologia. Rio de Janeiro: Elsevier, 2006. 829p.

MOURA, VMDB; MATOS, MPC; THOMÉ, HE; BRITO, LAB; FISCHER, P. Técnica de necropsia e colheita de material para exames laboratoriais em ruminantes, equinos e suínos. São Paulo: MedVet, 2015. 92p.

MYERS, RK; MCGAVIN, MD; ZACHARY, JF. Adaptações, lesões e morte celular: bases morfológicas, bioquímicas e genéticas. In: Bases da Patologia em Veterinária. Rio de Janeiro: Elsevier, 2013. p. 2-59.

SILVEIRA, D; SOBESTIANSKY, J. Técnica de necropsia em suínos: Coleta e remessa de material para laboratório. Goiânia: Art 3 Impressos Especiais, 1997. 112p.

SOBESTIANSKY, J; BARCELLOS, D; MORENO, AM; SOBESTIANSKY, A; POLEZE, E. Suínos: coleta e remessa de materiais para laboratórios para fins de diagnóstico. Goiânia: Gráfica Art 3, 2005. 121p.

VASCONCELOS, AC. Necropsia e Remessa de Material para Laboratório em Medicina Veterinária. Brasília, MEC/ABEAS, 1988. 74p.