

PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO



Prof. Carina Ladeira

Novembro de 2008

PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO



- O processamento histológico é constituído por um conjunto de 3 etapas – desidratação, diafanização e impregnação
- Estas etapas vão permitir dar ao fragmento suportes interno e externo resistentes às manipulações futuras e permitir, posteriormente, a visualização ao M.O.C.



PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO

Etapas Gerais

- Desidratação
- Diafanização/Clarificação
- Impregnação



DESIDRATAÇÃO



DESIDRATAÇÃO

- Etapa que sucede a fixação
- 1.ª Etapa do Processamento histológico, se a fixação for considerada como processo de conservação
- **Objectivo:** retirar a água existente nos tecidos



DESIDRATAÇÃO

O processo de desidratação pode ser efectuado por:

- Método físico-químico
- Método químico

DESIDRATAÇÃO

Método Físico-Químico

Este método pode ser por:

- Criodissecação
- Criosubstituição



Método Físico-Químico

Criodissecação

- Consiste em congelar o tecido que é posteriormente desidratado através do vácuo
- Depois coloca-se o fragmento em parafina quente, que substituí a água que anteriormente existia
- **Inconveniente:** em tecidos muito ricos em água, esta pode cristalizar e originar artefactos



Método Físico-Químico

Criosubstituição

- Consiste em congelar o tecido e substituir a água cristalizada por etanol, butanol, propilenoglicol, líquido de Carnoy
- Técnica muito boa para tecidos muito ricos em água



DESIDRATAÇÃO

Método Químico

- Neste método são utilizados solventes orgânicos que apresentam uma grande solubilidade com a água, permitindo a extracção e substituição desta



DESIDRATAÇÃO

Método Químico

O desidratante ideal é:

- Solúvel em água
- Solúvel em parafina

- Passagem directa da desidratação para a impregnação



DESIDRATAÇÃO

Método Químico

- Este desidratante existe mas possui contra-indicações
- Assim, utiliza-se agentes desidratantes miscíveis em água
- Depois recorre-se à utilização de um líquido intermediário



DESIDRATAÇÃO

Método Químico

Agentes desidratantes

- Etanol
- Isopropanol
- Acetona
- Dioxano
- Tetrahidrofurano

DESIDRATAÇÃO

Etanol

- C_2H_6O
- Forma “pura” – etanol/álcool absoluto
- Muito solúvel em água
- É o + utilizado em AP
- Etanol “industrial” possui elevado grau de impurezas – mas é considerado 100% puro para AP

DESIDRATAÇÃO

Etanol

Características

- Inflamável
- Volátil
- Provoca uma retracção no tecido e endurecimento (rápido)
- Não é miscível com a parafina

DESIDRATAÇÃO

Etanol

- O álcool a 70%, devido à sua concentração, é aquele que provoca menor retracção – os fragmentos podem permanecer durante mais tempo
- O álcool a 95% devolve as cores dos tecidos, anteriormente à fixação – bom para tirar fotografias

DESIDRATAÇÃO

Isopropanol

- C_3H_8O
- Álcool isopropílico
- Tipo de álcool mais puro que o normal

DESIDRATAÇÃO

Isopropanol

Características

- Inflamável
- Acção mais lenta e tolerante que o etanol – menor retracção dos tecidos
- Não dissolve os corantes solúveis em etanol
- Não é miscível com a parafina
- Não dissolve a celoidina

DESIDRATAÇÃO

Acetona

- $\text{CH}_3(\text{CO})\text{CH}_3$
- Propanona
- Pode utilizar-se como agente desidratante quando a rapidez é um factor importante

DESIDRATAÇÃO

Acetona

Características

- Inflamável
- Muito volátil
- Mais rápida que o etanol
- Não é miscível com a parafina
- Tem tendência a endurecer os tecidos, se a desidratação for longa

DESIDRATAÇÃO

Dioxano

- $C_4H_8O_2$
- 1, 4-Dióxido de dietileno
- Agente desidratante ideal (solúvel com a água e com a parafina)

DESIDRATAÇÃO

Dioxano

Características

- Altamente inflamável
- Perigo de explosão (peróxidos)
- Muito tóxico por inalação e via cutânea
- Preço muito elevado

DESIDRATAÇÃO

Tetrahidrofurano

- OC_4H_8
- Óxido de dietileno, Óxido de tetrametileno ou THF
- Agente desidratante ideal (solúvel com a água e com a parafina)



DESIDRATAÇÃO

Tetrahidrofurano

Características

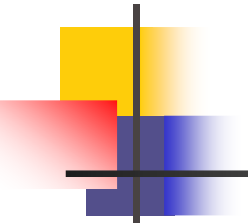
- Altamente inflamável
- Perigo de explosão (peróxidos)
- Menos tóxico que o dioxano
- Acção muito rápida
- Danifica pouco os tecidos



FACTORES QUE INFLUENCIAM A DESIDRATAÇÃO

A desidratação está dependente de vários factores:

- Concentração do agente desidratante
- Volume do agente desidratante
- Tamanho e consistência do fragmento
- Duração da desidratação
- Temperatura
- Vácuo
- Agitação

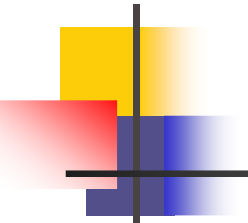


Factores que influenciam a desidratação

Concentração do desidratante

Para uma desidrataação o mais completa possível é necessário:

- Banhos com concentrações crescentes – método gradual
- Últimos banhos com o agente no estado puro



Factores que influenciam a desidratação

Concentração do desidratante

Exemplo: etanol

- Iniciar com álcool 70%
- Prosseguir com aumentos de 10% (moderar a retracção)
- Mudança periódica: a água retirada dos fragmentos vai diminuir a []



Factores que influenciam a desidratação

Volume do desidratante

- Maior a quantidade de fragmentos, maior será a quantidade de agente a ser utilizada
- Maior o n.º de banhos, maior e melhor a desidrataçãõ
- Banho de grande quantidade *vs* banhos mais pequenos

Factores que influenciam a desidratação

Tamanho e consistência dos fragmentos

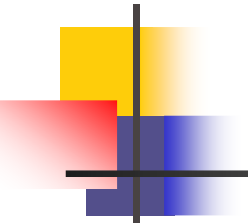
- Fragmentos maiores: desidratação + difícil
- Maior quantidade de água
- Maior dificuldade do agente desidratante penetrar
- Tecidos fibrosos e densos são + difíceis de desidratar



Factores que influenciam a desidratação

Duração da desidratação

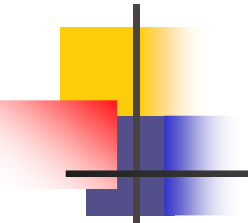
- **Duração:** o tempo necessário até equilibrar as proporções água/etanol
- Quando o equilíbrio é atingido (proporção igual) retiram-se os fragmentos de forma a minimizar a retracção e o endurecimento
- Álcool a 100% - fragmentos quebradiços



Factores que influenciam a desidratação

Temperatura

- Aumento da temperatura acelera a desidratação
- Aumenta os efeitos negativos: retracção e endurecimento
- Aumenta o perigo de incêndio
- A evaporação do agente desidratante, mais volátil que a água, leva à hidratação



Factores que influenciam a desidratação

Vácuo

- Não tem efeitos na duração da desidrataação
- Ajuda a retirar o ar dos tecidos



Factores que influenciam a desidratação

Agitação

- **Agitação constante:** desidratação + rápida e eficiente
- **Sem agitação:** a água é + densa deposita-se no fundo do recipiente – fragmentos hidratados



EFEITOS DE UMA MÁ DESIDRATAÇÃO

Uma má desidratação pode ocorrer por:

- Permanência longa – endurece excessivamente o tecido
- Permanência curta – os efeitos fazem-se sentir nas etapas seguintes a curto ou a longo prazo



EFEITOS DE UMA MÁ DESIDRATAÇÃO

Efeitos a curto prazo

- Fragmento com consistência heterogênea, dificultando o corte
- A água restante no tecido, devido à sua incompatibilidade com o meio de inclusão, não permite que este entre no mesmo



EFEITOS DE UMA MÁ DESIDRATAÇÃO

Efeitos a longo prazo

- É possível o corte, num fragmento de consistência reduzida
- Em contacto com o ar, a água evapora, o tecido retrai e separa-se da parafina envolvente (bloco)



RESUMO DA DESIDRATAÇÃO

- Desidratação: conceito geral
- Métodos físico-químico e químico
- Agentes desidratantes
- Factores que influenciam a desidratação
- Efeitos de uma má desidratação



DIAFANIZAÇÃO



DIAFANIZAÇÃO

- Consiste na substituição do agente desidratante no tecido, normalmente etanol, por um solvente da parafina
- É um processo de clarificação, uma vez que após a sua acção os tecidos ficam transparentes (provocado pelo elevado índice de refração)



DIAFANIZAÇÃO

Características comuns dos agentes diafanizadores:

- Muito tóxicos
 - Inflamáveis
 - Não são miscíveis em água
 - Miscíveis na parafina
 - Mais densos que o etanol
 - Possuem pouca compatibilidade com o tecido
 - Normalmente são hidrocarbonetos
- } Assegurar uma boa ventilação



DIAFANIZAÇÃO

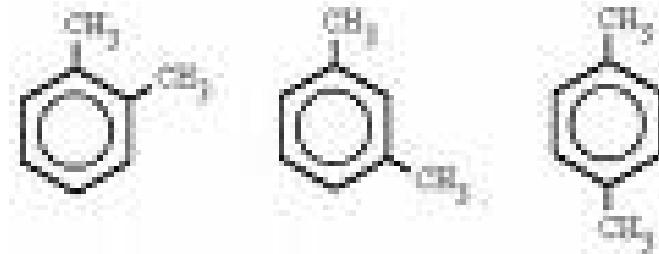
Principais agentes diafanizadores:

- Xileno
- Tolueno
- Benzeno

DIAFANIZAÇÃO

Xileno

- $C_6H_4(CH_3)_2$
- Dimetil benzeno
- A solução comercial é constituída por uma mistura de orto-, meta- e para-xilol
- Diafanizador mais utilizado no processamento e coloração



DIAFANIZAÇÃO

Xileno - Vantagens

- É o mais rápido (30 min. a 1h)
- Endurece pouco os tecidos
- Eliminação fácil dos tecidos
- Fácil observação do fim do processo
- Não dissolve a celoidina

DIAFANIZAÇÃO

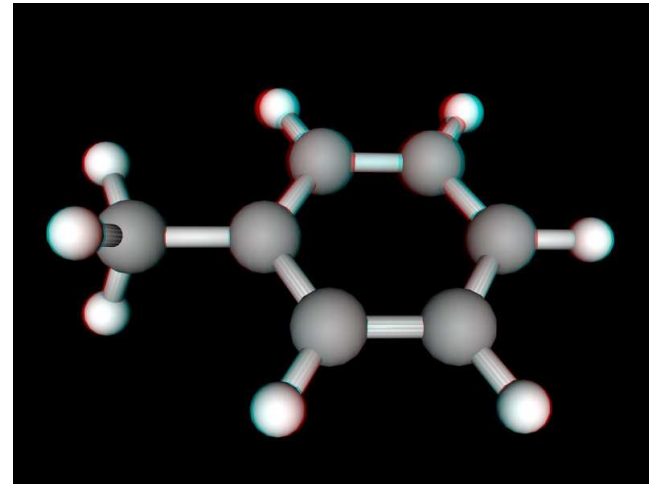
Xileno - Desvantagens

- Aclara os tecidos somente a partir do etanol absoluto
- Endurece os tecidos por exposição longa
- Tendência para endurecer tecidos fibrosos, musculares e cartilagíneos
- Torna os tecidos quebradiços
- Tendência para acidificar

DIAFANIZAÇÃO

Tolueno

- $C_6H_5CH_3$
- Metil benzeno



- Considerado o diafanizador ideal por muitos técnicos

DIAFANIZAÇÃO

Tolueno - Vantagens

- É rápido (1 a 2h)
- Endurece menos os tecidos que o xilol
- Não torna os tecidos quebradiços
- Tolerância de + de 12h para os tecidos
- Fácil observação do fim do processo
- É + volátil que o xileno
- É + tolerante à contaminação da água

DIAFANIZAÇÃO

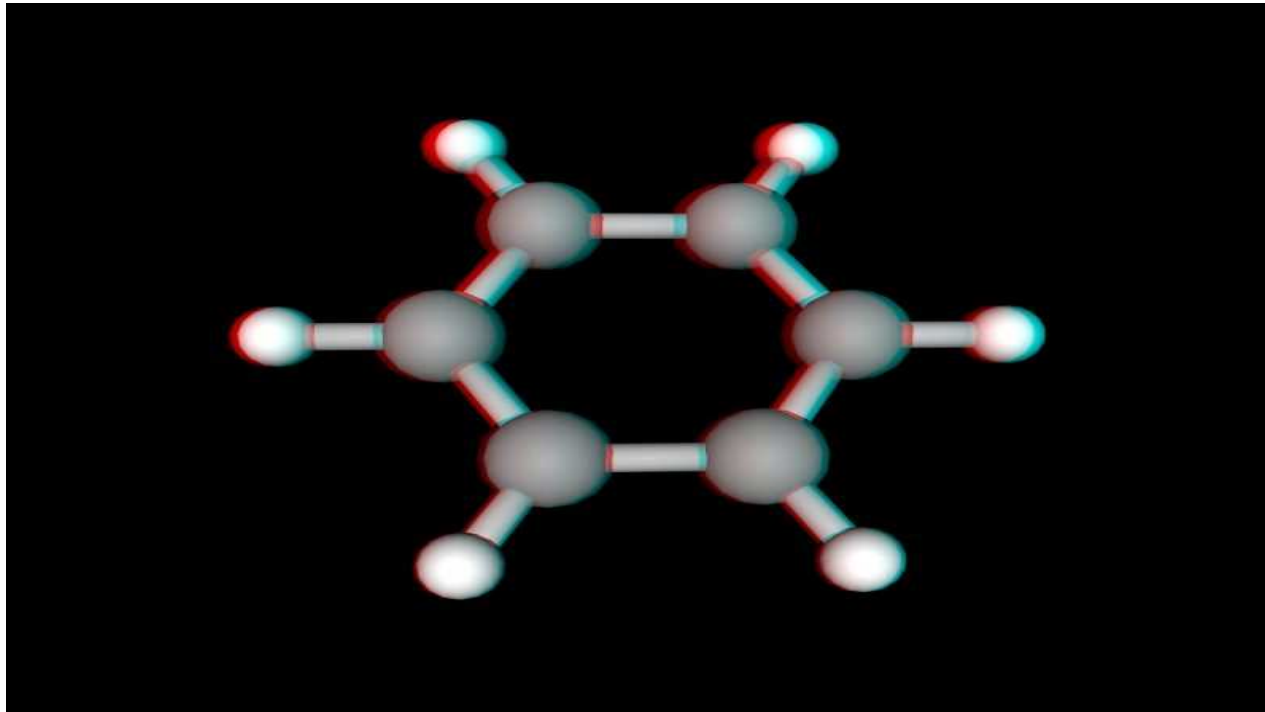
Tolueno - Desvantagens

- Aclara os tecidos somente a partir do etanol absoluto
- Tendência para acidificar

DIAFANIZAÇÃO

Benzeno

- C_6H_8



DIAFANIZAÇÃO

Benzeno - Vantagens

- É relativamente rápido (1 a 3h)
- Endurece muito pouco os tecidos
- Não torna os tecidos quebradiços
- Provoca pouca retracção
- É muito volátil, evapora-se rapidamente do banho de parafina, diminuindo a frequência de mudança desta

DIAFANIZAÇÃO

Benzeno - Desvantagens

- É cancerígeno, afecta sobretudo sangue e medula óssea, podendo a longo prazo desenvolverem-se anemias
- Endurece tecidos fibrosos, músculo e tendões
- Difícil manutenção do nível de volume nos processadores abertos

DIAFANIZAÇÃO

Factores que influenciam

- Volume do agente diafanizador
- Tamanho e consistência do fragmento
- Duração da diafanização
- Temperatura
- Vácuo
- Agitação



Factores que influenciam a diafanização

Volume do diafanizador

- Maior a quantidade de fragmentos, maior será a quantidade de agente a ser utilizada
- Maior o n.º de banhos, maior e melhor a diafanização
- Banho de grande quantidade *vs* banhos mais pequenos

Factores que influenciam a diafanização

Tamanho e consistência dos fragmentos

- Fragmentos maiores – diafanização + difícil
- Maior quantidade de etanol, que é solúvel no agente diafanizador



Factores que influenciam a diafanização

Duração da diafanização

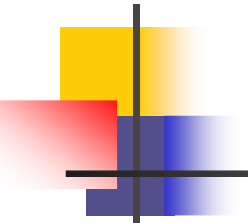
- **Duração:** o tempo necessário até equilibrar as proporções etanol/xilol
- Quando o equilíbrio é atingido (proporção igual) retiram-se os fragmentos de forma a minimizar consequências negativas



Factores que influenciam a diafanização

Temperatura

- Aumento da temperatura acelera a diafanização
- Aumenta os efeitos negativos: endurecimento
- Aumenta o perigo de incêndio



Factores que influenciam a diafanização

Vácuo

- Não tem efeitos na duração da diafanização
- Ajuda a retirar o ar dos tecidos



Factores que influenciam a diafanização

Agitação

- A agitação durante a diafanização possui efeitos negativos
- O xilol é mais denso que o etanol
- Não agitar permite que o diafanizador fique separado do etanol



EFEITOS DE UMA MÁ DIAFANIZAÇÃO

Uma má diafanização pode ocorrer por:

- Permanência longa – endurece excessivamente o tecido
- Permanência curta – os efeitos fazem-se sentir nas etapas seguintes a curto ou a longo prazo



EFEITOS DE UMA MÁ DIAFANIZAÇÃO

Efeitos a curto prazo

- Fragmento com consistência heterogénea, dificultando o corte
- O etanol ainda existente no tecido vai impedir a impregnação em parafina



EFEITOS DE UMA MÁ DIAFANIZAÇÃO

Efeitos a longo prazo

- É possível o corte, num fragmento de consistência reduzida
- Em contacto com o ar, o etanol evapora, o tecido retrai e separa-se da parafina envolvente (bloco)



RESUMO DA DIAFANIZAÇÃO

- Diafanização: conceito geral
- Agentes diafanizadores – características, vantagens e desvantagens
- Factores que influenciam a diafanização
- Efeitos de uma má diafanização



IMPREGNAÇÃO



IMPREGNAÇÃO

- É a etapa final do processamento, sendo as outras 2 etapas de preparação dos tecidos para a impregnação
- Consiste no preenchimento dos espaços vazios, anteriormente ocupados por xilol, por substâncias que irão proporcionar uma consistência firme



IMPREGNAÇÃO

- O meio utilizado na impregnação deve ser igual ao meio utilizado na inclusão
- A substância mais utilizada na impregnação é a parafina
- No entanto, existem outros meios de impregnação, tais como: celoidina, gelatina, ceras esterificadas e polietileno

IMPREGNAÇÃO

Parafina

- C_nCH_{2n+2}
- Sólida à temperatura ambiente
- Substância branca cristalizada e gordurosa
- Constituída por carbonetos saturados que se encontram nos resíduos de destilação do petróleo
- Insolúvel na água e no álcool
- Solúvel nos agentes diafanizadores

IMPREGNAÇÃO

Parafina

- Pontos de fusão variáveis, no entanto devem ter um ponto de fusão de cerca de 35°C superior à TA
- Funde quando colocada a temperatura superior ao seu ponto de fusão, não superior a 60°C

IMPREGNAÇÃO

Parafina

Segundo o ponto de fusão (PF) podem-se classificar as parafinas de:

- **Moles** – PF entre 46 e 55°C
- **Duras** – PF entre 56°C – 58°C



IMPREGNAÇÃO

Parafina Mole

Ideal para:

- Tecidos moles
- Tecidos conjuntivos
- Tecido conjuntivo fetal

IMPREGNAÇÃO

Parafina Dura

Ideal para:

- Tecidos duros
- Tecidos fibrosos e densos
- Tecido ósseo

IMPREGNAÇÃO

Parafina

- Apesar da especificidade das parafinas para cada tecido, é impraticável em laboratório hospitalar a separação dos tecidos
- A parafina + utilizada é a 56-58°C para todos os tecidos em geral

IMPREGNAÇÃO

Parafina

- A parafina utilizada em AP não é pura
- A parafina pura têm tendência para secar, tornando a longo prazo os blocos difíceis de cortar
- Não é suficientemente elástica, estalando e dificultando o corte

IMPREGNAÇÃO

Parafina - Aditivos

Assim, foram acrescentadas substâncias à parafina de forma a melhorar a sua eficácia:

- Polímeros plásticos
- Borracha
- Cera de abelhas

IMPREGNAÇÃO

Parafina - Aditivos

Polímeros plásticos

- Aumentam a consistência e elasticidade
- Permitem a formação de cortes em série (“ténias”)

IMPREGNAÇÃO

Parafina - Aditivos

Borracha

- Aumenta a elasticidade
- Impede a formação de rugas

IMPREGNAÇÃO

Parafina

Cera de abelhas

- Fornece consistência para um corte uniforme
- Aumenta a elasticidade
- Evita rugas nos cortes

IMPREGNAÇÃO

Parafina - Aditivos

De forma geral, os aditivos permitem:

- Aumentar a consistência
- Fornecer elasticidade
- Aumentar o grau de dureza (aumenta o suporte em tecidos + duros)
- Alterar o ponto de fusão
- Alterar a estrutura cristalina da parafina

IMPREGNAÇÃO

Parafina

Existem determinadas características que permitem classificar as parafinas como:

- Parafinas de boa qualidade
- Parafinas de má qualidade

IMPREGNAÇÃO

Parafina – Boa Qualidade

- Homogénea
- Compacta
- Opalina – sem pontos, manchas brancas compactas
- Amolece pouco a pouco
- Fusão iniciada pelos bordos

IMPREGNAÇÃO

Parafina – Má Qualidade

- Granulosa
- Manchas compactas
- Liquefaz-se desigualmente
- Fusão aleatória

IMPREGNAÇÃO

Parafina

- O tipo de parafina a utilizar deveria ser adequado ao tipo de tecido a manipular



IMPOSSÍVEL

- Cada laboratório adopta o tipo de parafina ao tipo de fragmentos, espessura dos fragmentos, TA, etc.

IMPREGNAÇÃO

Celoidina

- É constituída por nitrocelulose
- É utilizada dissolvida em éter + etanol
- Esta técnica não utiliza calor, pois consiste na evaporação do solvente
- Diminui a retracção
- Ideal para órgãos inteiros, osso descalcificado, olhos (a parafina descola a retina) e tecido nervoso

IMPREGNAÇÃO

Celoidina

- A técnica é muito lenta (várias semanas)
- Cortes com espessura superior a 10-15 mm
- Arquivo dos blocos em etanol – muito complicado
- Celoidina + solventes = mto inflamáveis

IMPREGNAÇÃO

Gelatina

- Dá suporte a tecidos delicados e fragmentos muito pequenos
- Gelatina a 25%
- Endurece-se o bloco em formaldeído a 10% antes do corte
- Corte difícil

IMPREGNAÇÃO

Ceras esterificadas

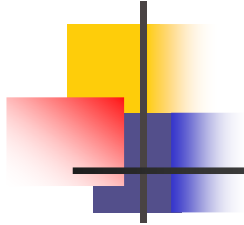
- PF inferior à parafina
- Permitem um corte + fino
- Endurecimento deve ser feito progressivamente – retracção do tecido
- Custo elevado

IMPREGNAÇÃO

Polietileno

- Ceras hidrossolúveis
- Carbowax (+ conhecida)
- Passagem directa da fixação para a impregnação (1 Carbowax 4000: 9 Carbowax 1500)
- Com este método é possível preservar substâncias solúveis nos solventes orgânicos

REGRAS DA IMPREGNAÇÃO



- Deve-se eliminar totalmente o agente diafanizante, para oferecer um bloco de consistência adequada
- Retirar as impurezas que se vão depositando no fundo do recipiente utilizado



FACTORES QUE INFLUENCIAM A IMPREGNAÇÃO

- Agente diafanizador
- Temperatura
- Vácuo



Factores que influenciam a impregnação – Agente diafanizador

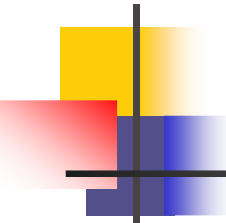
- A solubilidade com a parafina condiciona a rapidez da sua eliminação
- A volatilidade do diafanizador, faz com que este desapareça + lenta ou rapidamente do banho de parafina



Factores que influenciam a impregnação – Temperatura

A temperatura da parafina é muito importante porque:

- **Temperatura alta** – provoca retracção e dureza dos fragmentos, dificultando o corte
- **Temperatura baixa** – não se dá a impregnação
- Durante a impregnação: 60°C



Factores que influenciam a impregnação – Vácuo

- Eliminação de bolhas de ar
- Eliminação do agente diafanizador
- Facilita a penetração da parafina



EFEITOS DE UMA MÁ IMPREGNAÇÃO

Demasiado longa

- Retracção e endurecimento dos fragmentos

Demasiado curta

- Fragmentos com consistência heterogénea, logo, difíceis de cortar



RESUMO DA IMPREGNAÇÃO

- Impregnação – conceito geral
- Parafina
- Aditivos
- Outras substâncias impregnadoras
- Factores que influenciam a impregnação
- Efeitos de uma má impregnação

TIPOS DE

PROCESSAMENTO





Tipos de Processamento

- O processamento mais comum em AP, actualmente pode ser realizado de 3 formas:
- Manual
- Automático
- Microondas

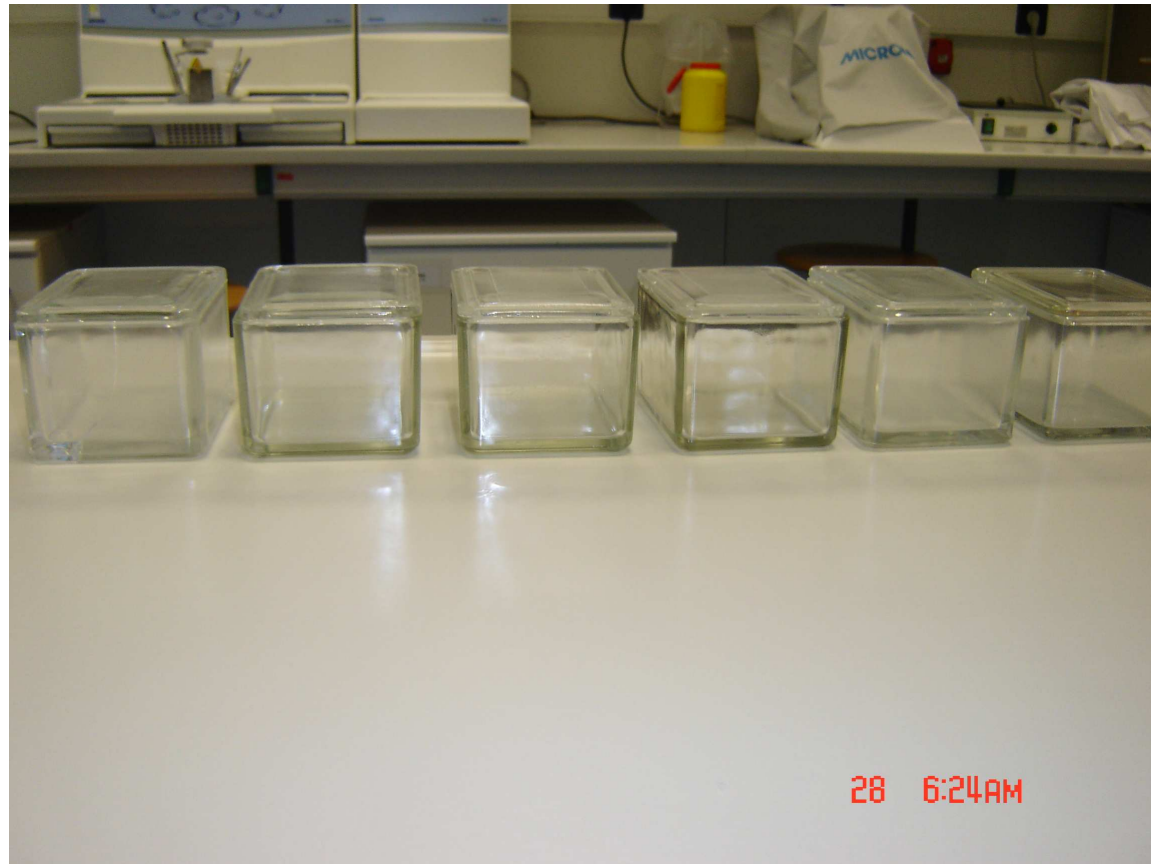
Tipo de Processamento

Manual



- O processamento manual consiste na realização das 3 etapas do processamento, e os passos intrínsecos a estas, de forma manual, isto é, os fragmentos são retirados e colocados no recipiente seguinte com auxílio directo do técnico

Tipo de Processamento Manual



Tipo de Processamento

Manual



Vantagens

- Os fragmentos podem variar de tamanho
- Controlo da diafanização
- Não há problemas com avarias e falta de energia eléctrica



Tipo de Processamento

Manual

Desvantagens

- Moroso
- O técnico fica sujeito a maior contacto com os agentes químicos prejudiciais
- Não realiza programas de fim de semana e outros especiais
- Não realiza vácuo, agitação, etc.
- Erro humano

Tipo de Processamento Automático



- A maioria dos laboratórios de Histopatologia possuem processadores automáticos de tecidos
- Necessidade com o crescimento do volume de trabalho e preocupações com saúde do trabalhador

Tipo de Processamento Automático





Tipo de Processamento Automático

Vantagens

- Rápido
- Agitação, vácuo, aquecimento
- Tratamento homogéneo
- Programas ao fim de semana, feriados, *overnight*
- Diminui o erro humano
- Diminui a exposição do técnico a agentes químicos perigosos
- Tempo investido noutras actividades laborais



Tipo de Processamento Automático

Desvantagens

- Falta de energia eléctrica
- Anomalias nos aparelhos
- Não há um controlo visual por parte do técnico, ex.: fim da diafanização
- Homogeneidade das amostras requerida para estarem adaptadas ao programa



Tipo de Processamento Microondas

- Estudos efectuados há 20 anos atrás dizem que as microondas (MW) podem acelerar a difusão dos reagentes utilizados na Histopatologia, sem danificar a morfologia

Tipo de Processamento

Microondas



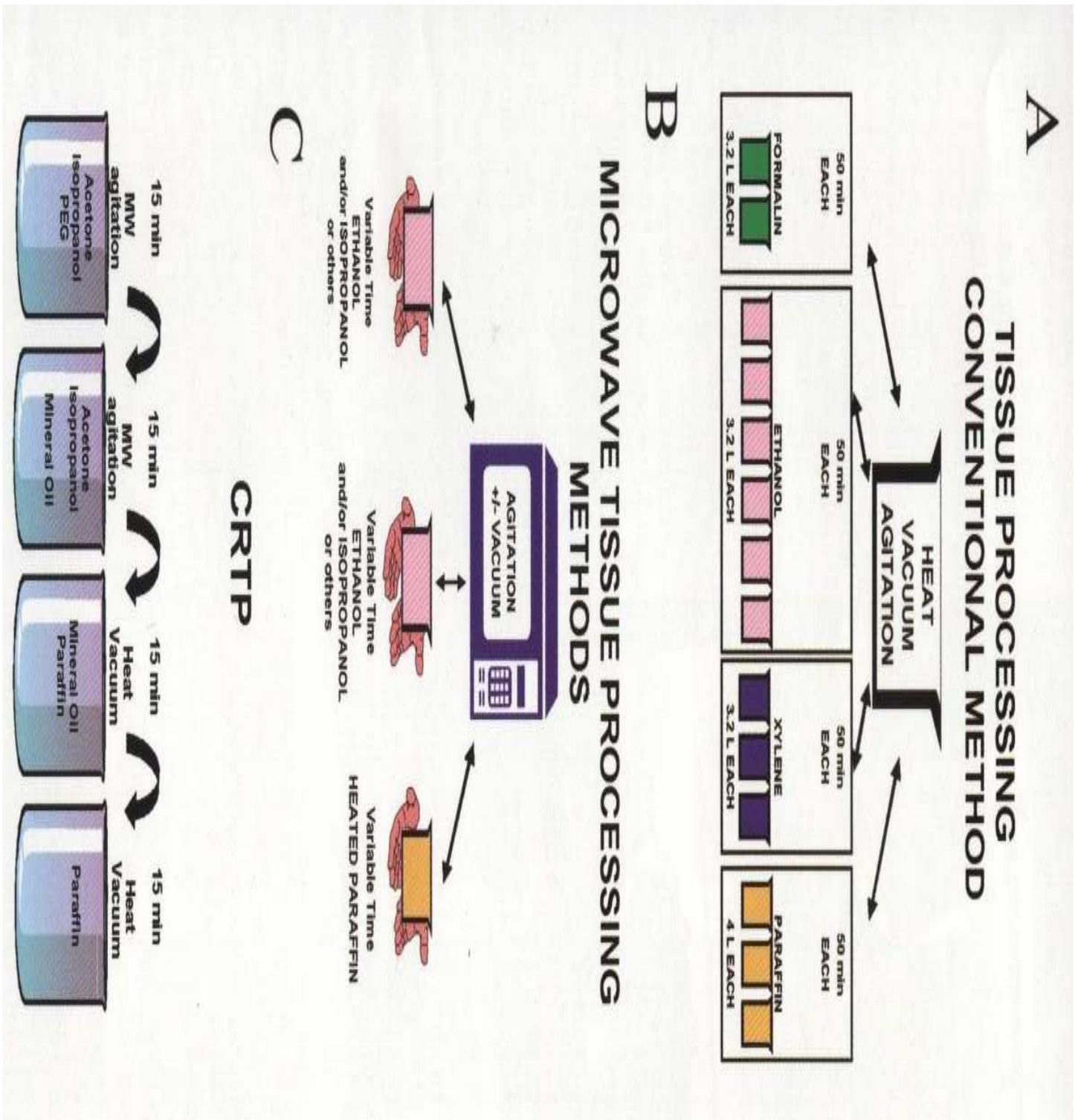
- No processamento histológico por MW é constituído por 4 passos e utiliza 3 reagentes:
 1. Etanol absoluto
 2. Isopropanol
 3. Parafina líquida a 67°C
 4. Parafina líquida a 82°C



Tipo de Processamento Microondas

- O processamento em MW tem 2 grandes **vantagens**:
- Redução de tempo (biópsias em 30' e fragmentos com espessura <2 mm em menos de 1h)
- Eliminação da manipulação do xileno

Comparação do processamento automático e de MW





RESUMO DOS TIPOS DE PROCESSAMENTO

- Processamento Manual
- Processamento Automático
- Processamento por Microondas
- Vantagens e desvantagens