

# PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO



---

Prof. Carina Ladeira

Novembro de 2007



# 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

---

- $\text{OC}_4\text{H}_8$
- 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

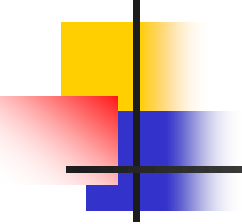
# FACTORES QUE INFLUENCIAM A DESIDRATAÇÃO



---

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



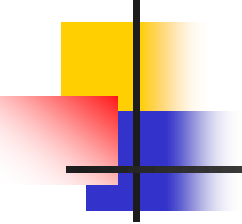
# Factores que influenciam a desidratação

## **Concentração do desidratante**

---

Para uma desidrataçã 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 desidratação
- 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 desidratação
- 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

---

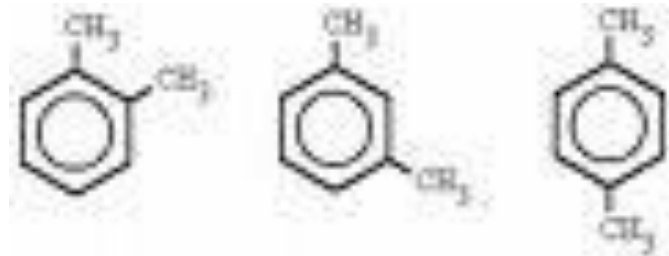
Principais agentes diafanizadores:

- 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

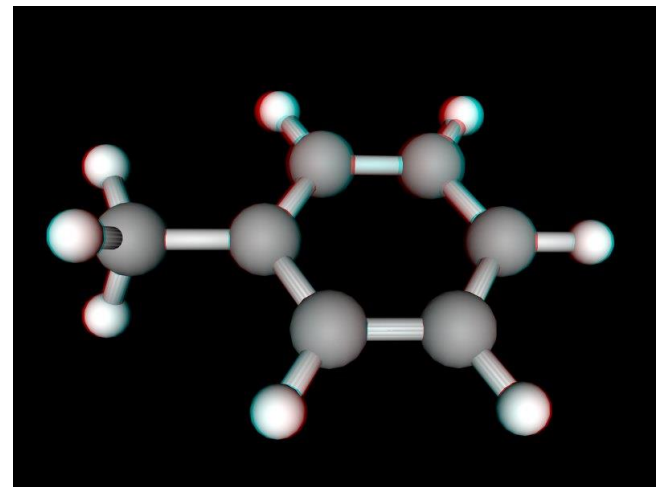
---

- 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

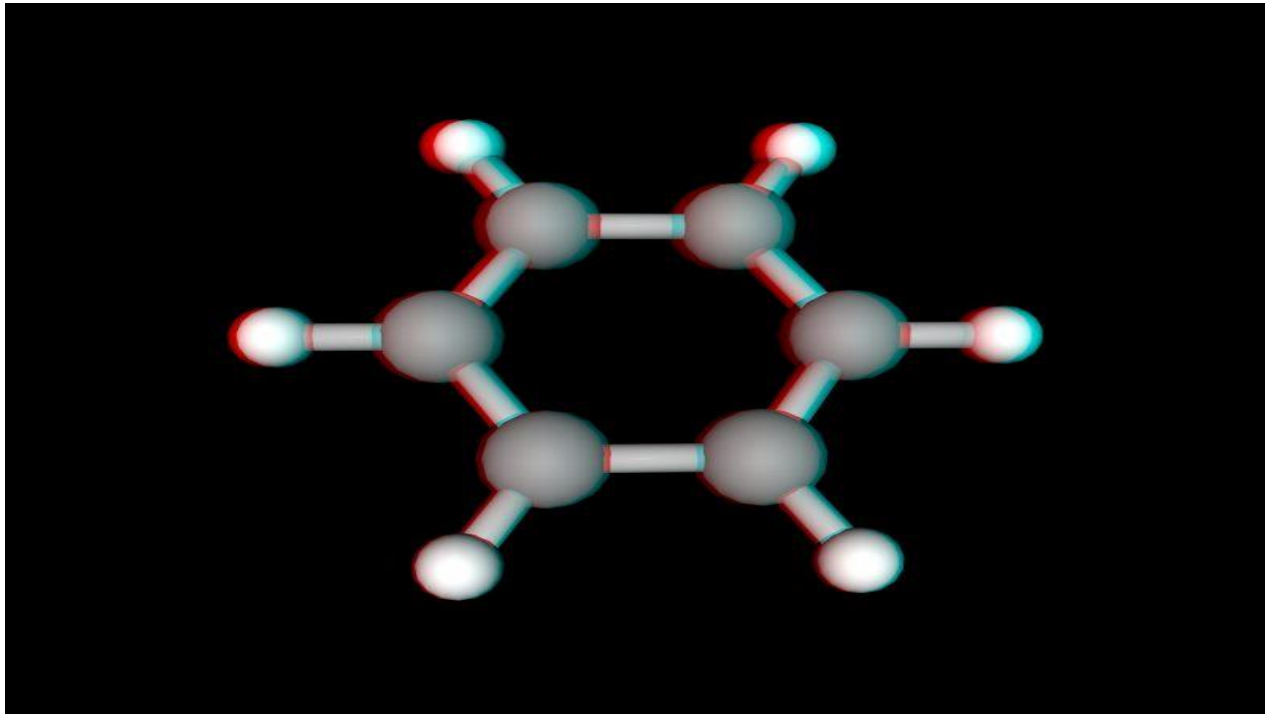
---

- 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 heterogênea, 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

---

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

---

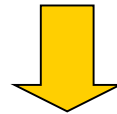
- Granulosa
- Manchas compactas
- Liquefaz-se desigualmente
- Fusão aleatória

# 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

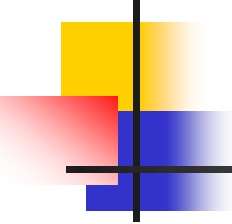


# Factores que influenciam a impregnação – Temperatura

---

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



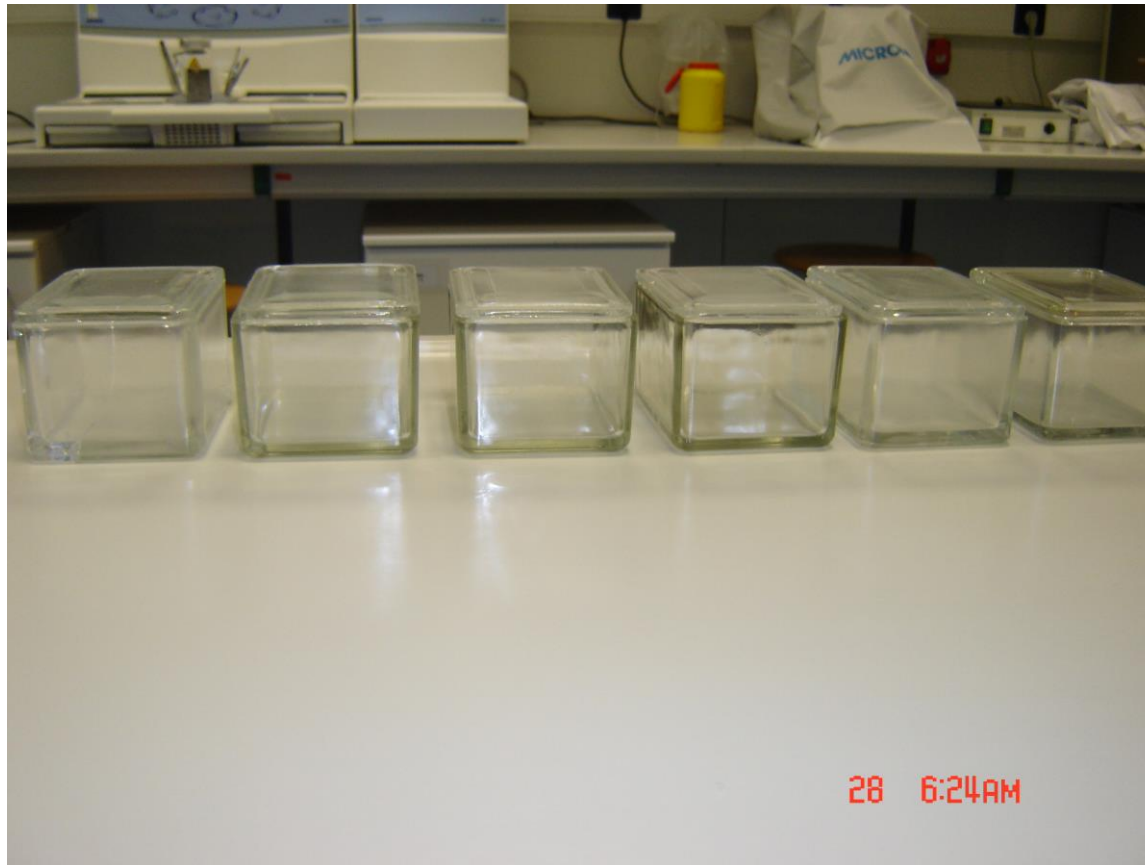
# Tipo de Processamento

## 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

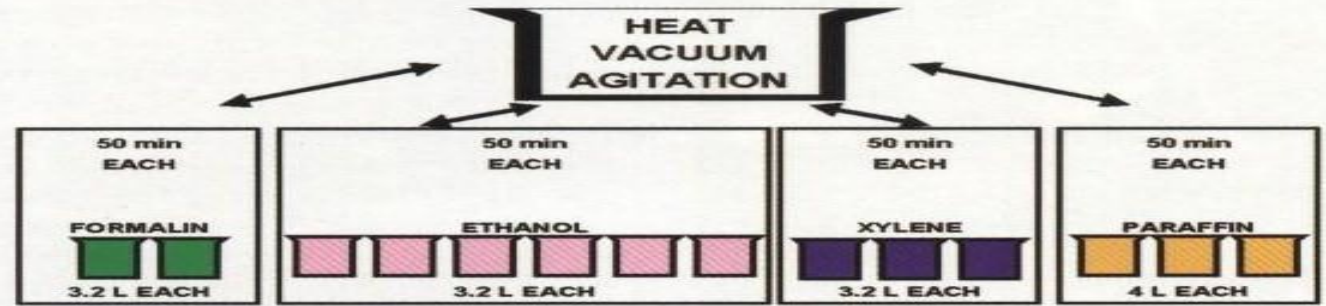
---

- 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

A

### TISSUE PROCESSING CONVENTIONAL METHOD



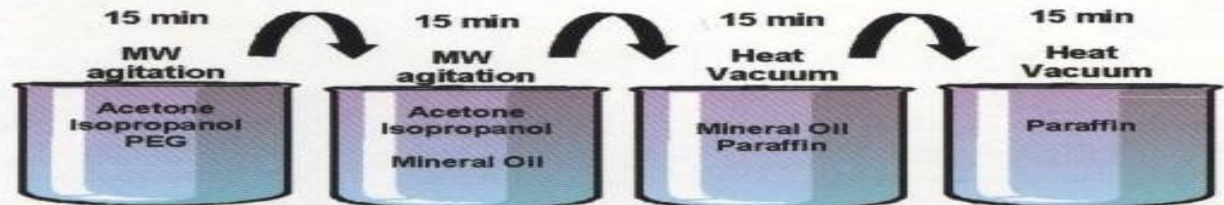
B

### MICROWAVE TISSUE PROCESSING METHODS



C

### CRTP





# RESUMO DOS TIPOS DE PROCESSAMENTO

---

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