

Afya

Procedimento Operacional Padrão

LABORATÓRIOS DE
MORFOLOGIA E PATOLOGIA

FMIT | Afya

Cristiane Resende
Diretora Geral

Talyta Resende de Oliveira
Coordenadora Acadêmica

Karen Bianca Dias Ribeiro
Coordenadora Administrativo Financeira

Renata de Castro Matias
Coordenadora de Pesquisa, extensão, internacionalização e inovação

Josiane de Lourdes Pinto
Procuradora Institucional

Isadora Teixeira Lima
Coordenadora de Laboratórios

Itajubá-MG

POP: Procedimento Operacional Padrão

**LABORATÓRIOS DE
MORFOLOGIA E PATOLOGIA**

Eliane Aparecida de Andrade, Profª Dra.
Roseane de Souza Cândido Irulegui, Profª Ma.
Autor

Itajubá - MG

CIP - Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
FMIT, Biblioteca, Processos Técnicos

A553p

Andrade, Eliane Aparecida de
Procedimento Operacional Padrão: laboratórios de
morfologia e patologia / Eliane Aparecida de Andrade, Roseane
de Souza Cândido Irulegui. rev., [reimp.] -- Itajubá: FMIT,
2024. - 14 f.

(POP - Laboratórios de Morfologia e Patologia)
Revisor: Isadora Teixeira Lima, 2024.

1. Procedimento Operacional Padrão - POP. 2.
Laboratórios de Morfologia e Patologia. I. Autor. II. Título

Aissa Paula Nascimento
CRB6 - 2984/O

SUMÁRIO

1	APRESENTAÇÃO	5
2	PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO	6
1.1	OBJETIVO	6
1.2	CAMPO DE APLICAÇÃO	6
1.3	RESPONSABILIDADE NA EXECUÇÃO DO POP	6
1.4	NORMAS DO LABORATÓRIO	6
3	PROCEDIMENTO	7
3.1.1	Inclusão	8
3.1.2	Desidratação:	8
3.1.3	Diafanização:	8
3.1.4	Preparação da parafina de inclusão:	9
3.2	MICROTOMIA	9
3.3	COLORAÇÃO DOS CORTES	10
a)	Procedimento para coloração com HE	11
b)	Procedimento para coloração com Picrosirius - Red	12
c)	Procedimento para coloração com Tricrômio de Mallory	13
3.4	MONTAGEM FINAL DA LÂMINA	13
	REFERÊNCIAS	15

1 APRESENTAÇÃO

Na rotina diária dos laboratórios de morfologia e patologia há necessidade da utilização de microscópios. O microscópio é capaz de ampliar cortes de tecidos para análise morfológica e patológica, fornecendo detalhes para análise do material em análise. O aumento da amostra é dado pelo aumento conferido pela objetiva, multiplicado pelo aumento da ocular. O aumento estabelecido por essas lentes só é eficiente se acompanhada da resolução, que é a capacidade do microscópio em apresentar detalhes. A resolução de um microscópio está entre à menor distância entre dois pontos, possível de serem distinguidos separadamente. Portanto, quanto menor o valor do limite de resolução, maior sua capacidade de evidenciar detalhes, e maior o seu poder de resolução.

Para a utilização da microscopia é necessário um corte histológico seja ele de tecidos morfológicamente saudáveis ou patológico. Para a obtenção de um histológico há necessidade de uma preparação complexa, composta de várias etapas onde, há coleta do fragmento do órgão até a obtenção de uma lâmina permanente. Para que o processamento seja eficiente é necessário a obtenção de cortes finos a partir da microtomia.

O procedimento que antecede a microtomia é a fixação que é realizada logo após a coleta do material desejado, obtido por biopsia ou perfusão. Esse processo pode utilizar técnicas de congelamento ou fixação. Após o processo de fixação faz-se a desidratação utilizando banhos sucessivos de etanol em diferentes percentuais alcoólicos seguido de impregnação com parafina. Na Impregnação com parafina as peças de tecidos são banhadas três vezes por parafina em estufa a 60°C, 30 minutos cada.

2 PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO

2.1 OBJETIVO

O uso dos Laboratórios de Morfologia e Patologia da FMIT tem como objetivo garantir que o processo de aprendizagem ocorra por meio da padronização das boas práticas, desenvolver o ensino-aprendizado em um ambiente inovador e com metodologias ativas e colaborar para a manutenção das atividades de monitoria e das Ligas Acadêmicas da FMIT.

2.2 CAMPO DE APLICAÇÃO

Laboratórios de Morfologia e Patologia da FMIT.

2.3 RESPONSABILIDADE NA EXECUÇÃO DO POP

Docentes, técnicos, assistentes, discentes e demais usuários dos laboratórios de morfologia e patologia da FMIT.

2.4 NORMAS DO LABORATÓRIO

- Não é permitida a presença de pessoas não autorizadas no laboratório;
- Não se deve trabalhar sozinho no laboratório. É essencial fazê-lo durante o período de aula ou na presença do professor, técnico ou monitor;
- A chave do laboratório está na responsabilidade do técnico do laboratório e somente será liberada aos alunos e pesquisadores que tiverem autorização;
- Seguir sempre o Manual de Boas Práticas;
- É obrigatório o uso de EPI – Equipamento de Proteção Individual dentro do laboratório, como jaleco, sapato fechado, e luvas sempre durante a realização de qualquer procedimento além de gorro e máscara caso se faça necessário;
- Realizar a higienização das mãos antes e após as atividades;
- Todos os alunos que utilizarem o laboratório devem ser orientados pelo professor e técnico quanto ao seu funcionamento antes do início das atividades no laboratório;
- É proibida a entrada e o consumo de qualquer tipo de alimento ou bebida;
- Não fumar no interior do laboratório;

- Colocar bolsas, mochilas e cadernos em local apropriado;
- Não sentar ou se apoiar em bancadas, pias e equipamentos;
- Trabalhar com seriedade e atenção;
- Manter as bancadas e o laboratório limpo e organizado antes, durante e após as práticas;
- Procurar orientação em caso de dúvida ou emergência;
- Os microscópios devem ser obrigatoriamente ajeitados depois das aulas, seguindo os seguintes passos: retirar o equipamento da tomada; abaixar a mesa no máximo, retirar a lâmina da pinça; guardá-la em sua devida caixa; colocar na menor ocular (4x); enrolar o fio de energia no microscópio para evitar que pise ou caia o equipamento.

3 PROCEDIMENTOS

3.1 FIXAÇÃO DA AMOSTRA:

Os tecidos e órgãos devem ser fixados para os mesmos possam ter suas estruturas preservadas. A fixação também oferece resistência aos tecidos para as etapas seguintes. O fixador usualmente utilizado é o formaldeído preparado em tampão. O preparo da solução segue a fórmula abaixo:

Formol (solução a 37% de formaldeído).....	100ml
Água destilada.....	900ml
Fosfato de Sódio monobásico.....	4,0g
Fosfato de sódio de básico (anidro).....	6,5g

As peças de tecidos e órgãos para fixação são colocadas em recipientes identificados. Em seguida o fixador é colocado sobre a peça numa quantidade de aproximadamente 20 vezes maior que o tecido ou órgão a ser fixado. A fixação é feita por 24 horas. Após a fixação o fixador é descartado em recipiente de descarte adequado. A partir dessa etapa, as peças são colocadas imersas em etanol 70% e armazenadas em recipiente fechado por tempo indeterminado.

3.1.1 Inclusão

A inclusão é o processo de impregnação das peças em uma substância que possa conferir dureza ao material para posterior microtomia. A substância mais comum utilizada é a parafina, porém podem ser utilizadas resinas que conferem maior dureza e possibilidade de cortes mais finos.

Para a inclusão em parafina o material deverá ser inicialmente desidratado. Para facilitar o processo de inclusão o material é estabilizado dentro de cassetes histológicos e identificadas.

3.1.2 Desidratação:

A desidratação é feita com sucessivos banhos em etanol. É realizado três banhos em etanol 965 por 2h. Em seguida é feito três banhos em etanol 100% (absoluto) por 2h .

3.1.3 Diafanização:

A diafanização é feita com três banhos de 30 minutos em xilol. O procedimento de desidratação e diafanização segue abaixo:

Álcool 96º 1.....	2h
Álcool 96º 2.....	2h
Álcool 96º 3.....	2h
Álcool absoluto 1.....	2h
Álcool absoluto 2.....	2h
Álcool absoluto 3.....	2h
Xilol 1.....	30min
Xilol 2.....	30min
Xilol 3.....	30min

3.1.4 Preparação da parafina de inclusão:

A parafina histológica é derretida em estufa, bico de Bunsen ou chapa aquecedora, colocar para ferver, levantando fervura por três vezes em bico de Bunsen ou chapa aquecedora, e recolocar na estufa.

Os cassetes histológicos contendo a amostra serão submetidos a dois banhos de parafina fundida em estufa a 60 °C por 1h cada um. Em seguida os cassetes deverão ser preenchidos com parafina, afim de se constituir um bloco de parafina incluindo a amostra.

3.2 MICROTOMIA

Etapa em que os blocos de parafina com as amostras incluídas serão submetidos ao micrótomo para obtenção de cortes sucessivos, delgados e uniformes.

Deve-se previamente preparar as lâminas que irão receber os cortes histológicos, as mesmas serão retiradas da embalagem e colocadas em uma solução detergente tipo Extran® a 1% em um recipiente grande e deixar de repouso por no mínimo 12h. Após esse período as lâminas receberão enxague em água corrente abundante até a extinção de todo o detergente. Coloca-se então as lâminas em álcool 96° e assim deverão permanecer até o momento de serem utilizadas, que então deverão ser secar com uma fralda.

Antes de se iniciar a microtomia deve-se extrair dos cassetes histológicos os blocos, e estes deverão ser aparados o máximo possível, isso evita que os cortes saiam enrugados.

Para obtenção dos cortes realiza-se o seguinte procedimento:

- a) Ajustar no micrométrico do micrótomo a espessura do corte para 5µm;
- b) Realizar o procedimento de corte;
- c) A fita de cortes liberada pelo procedimento de corte deve ser alcançada com auxílio de pinça;
- d) Em Banho-Maria Histológico com água destilada a 45° a 50°C, coloca-se a superfície mais brilhante da fita em contato com a água;
- e) Antes de soltar a fita com a pinça, deve-se fazer a fita percorrer a superfície da água;
- f) Utilizando a pinça, delicadamente separe os cortes e deixe-os no banho-maria até ficarem esticados;
- g) Com as lâminas limpas e desgorduradas, pescar cada corte de forma que os

mesmos fiquem situados no centro da lâmina.

Depois da pescaria, levar as lâminas com os cortes na estufa a 50° a 60° para secagem por no mínimo duas horas, sendo melhor por 12h. Desta maneira, a parafina derrete bem e os cortes grudam fortemente na lâmina.

3.3 COLORAÇÃO DOS CORTES

Etapa muito importante para visualização dos tecidos, será feita em três procedimentos distintos a fim de se obter os parâmetros morfotintoriais previstos para o objetivo do trabalho a ser realizado, seguem exemplos de corantes e sua importância:

- **Hematoxilina e Eosina (HE) (MELO, 2005)** – a fim de se identificar a morfologia celular e os seus padrões de equivalência entre a acidofilia e basofilia típicos para as células metabolicamente saudáveis presentes nos tecidos renais;
- **Picrosirius - Red (MELO, 2005)**, também conhecido como Picrosirius- hematoxilina como propósito de quantificar e qualificar as fibras de colágeno, utilizando-se a microscopia de polarização, onde espera-se observar as moléculas do corante dispostas em paralelo e às moléculas alongadas de colágeno, que apresentam birrefringência assumindo cores que variam desde o verde até o vermelho, conforme o grau de maturação destas fibras;
- **Tricrômico de Mallory (GIRARDI, 2005)** – para o evidenciamento da presença e disposição das fibras de colágeno que normalmente invadem os tecidos lesionados em substituição às células degeneradas.

Os cortes realizados na microtomia, necessitam de desparafinação e hidratação, o que permite então a coloração. Deve-se submeter os cortes em sequências de banhos de xilol, álcool e água, processo inverso da etapa de inclusão. Submeter as lâminas em 2 banhos de xilol de 10min cada, e na sequência 1 banho em álcool absoluto por 5min, 1 banho em álcool

95° por 5min, 1 banho em álcool 70° por 10 a 15min, em seguida lavar em água corrente e logo após corar.

Xilol 1.....10min
 Xilol 2.....10min
 Álcool absoluto.....5min
 Álcool 95°.....5min
 Álcool 70°.....10-15min
 Lavar em água destilada

a) Procedimento para coloração com HE

Soluções corantes:

EOSINA – para hematoxilina de Harris

Eosina amarela em pó.....5g
 Água destilada..... 500 ml
 Ácido acético (optativo).....0,25 ml

HEMATOXILINA DE HARRIS

Hematoxilina

Cristalizada.....2,5g
 Alúmen de potássio ou de amônio50g
 Álcool absoluto.....25ml
 Água destilada..... 500ml
 Óxido de mercúrio (vermelho).....1,25g
 OU iodeto de sódio0,25g
 Ácido acético glacial (optativo).....20 ml

Preparo da Hematoxilina de Harris: Dissolver a hematoxilina no álcool ligeiramente aquecido, dissolver o alúmen em água aquecida. Misturar as soluções e aquecer até ferver. Tirar do fogo e adicionar imediatamente e aos poucos o óxido de mercúrio (agitando para não explodir). Resfriar a solução o mais rapidamente possível, mergulhando o frasco num vasilhame (ou nupia) contendo água fria. Acrescentar o ácido acético e filtrar. Estocar em vidro escuro. Dura cerca de 3 meses. Deve-se filtrar a solução toda vez que for usar.

1. Desparafinar e hidratar os cortes;
2. Corar com hematoxilina, por 2 a 10 minutos, conforme a idade da hematoxilina;
3. Lavar em água corrente por 10 minutos;
4. Corar pela eosina por 2 minutos;
5. Lavar em água corrente (até que a água esteja limpa);
6. Seguir com processo de montagem (passar rapidamente pelo álcool 70%)

b) Procedimento para coloração com Picrosirius – Red

Para a realização dessa coloração é utilizado o kit de coloração *Picrosirius Red Stain Kit*[®] constituído por três soluções denominadas SOLUÇÃO A, B e C.

1. Inicia-se com o processo de desparafinação e hidratação com água destilada citada anteriormente;
2. Colocar os cortes na SOLUÇÃO A por 2 minutos;
3. Lavar com água destilada;
4. Colocar na SOLUÇÃO B durante 60 minutos;
5. Colocar na SOLUÇÃO C durante 2 minutos;
6. Colocar em Álcool a 70% durante 45 segundos;
7. Seguir com o processo de montagem.

c) Procedimento para coloração com Tricrômio de Mallory

Soluções corantes:

SOLUÇÃO A:

Fucsina ácida.....0,5g

Água Destilada.....100ml

SOLUÇÃO B:

Azul de anilina.....0,5g

Orange G.....2g

Ácido Fosfotúngstico.....1g

1. Desparafinar e hidratar os cortes;
2. Corar pela solução A durante 2 minutos;
3. Passar diretamente para a solução B, corando durante 5 a 10 minutos;
4. Lavar em água corrente até tirar o excesso de corante;
5. Passar pelo álcool 80° por alguns segundos;
6. Seguir com o processo de montagem.

3.4 MONTAGEM FINAL DA LÂMINA

Etapa que consiste em cobrir o corte aderido à lâmina com uma lamínula utilizando resina líquida sobre o corte para garantir a conservação do mesmo por anos.

Após a coloração, a lâmina deverá passar pelas seguintes etapas:

Álcool 70°-----	5min
Álcool 95°-----	3min
Álcool absoluto-----	3min
Álcool-Xilol (1:1)-----	10min
Xilol-----	5min
Resina de montagem Permout®-----	30min ou mais.

Com o meio de montagem totalmente seco, a lâmina deve ser limpa com um pano ou lenço de papel embebidos em xilol, para retirar o excesso de resina que se acumulou nas bordas da lamínula.

Estando totalmente limpa a lâmina, deve-se então identificá-las com etiquetas contendo as seguintes informações: Identificador do grupo de animais, número do animal, nº do corte e coloração (p.ex.: CBy-1/2/6/HE).

REFERÊNCIAS

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção Relacionada à Assistência à Saúde. Módulo 1: **Biossegurança e Manutenção de Equipamentos em Laboratório de Microbiologia Clínica**/Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa, 2013.

PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO – HISTOLOGIA E EMBRIOLOGIA. Universidade Católica de Brasília, 2022. Disponível em:<MANUAL DE PROCEDIMENTOS (catolica.edu.br)>. Acesso em: 20/05/2024

Data da última revisão:	POP – LABORATÓRIOS DE MORFOLOGIA E PATOLOGIA	Responsável pela Revisão:
20/05/2024		Isadora Teixeira Lima

