

Protocolo de processamento histológico e análise quantitativa

Larissa Camila da Silva

O presente estudo trata-se de um protocolo de processamento histológico e posterior análise quantitativa de células, especificamente micróglia. Este protocolo foi automatizado em um código de programação em python, o mesmo tem como objetivo auxiliar pesquisadores durante a realização de estudos experimentais que envolvem utilização de animais, análise histológica e quantitativa celular. No código desenvolvido, o pesquisador inserindo poucas informações sobre o experimento o qual está desenvolvendo recebe automaticamente orientações sobre como ele deve prosseguir o experimento. O protocolo está dividido em cinco fases, que são elas a seleção do animal, a cirurgia estereotáxica, o preparo do tecido, a marcação tecidual, e a microscopia. Após toda a fase de processamento histológico, ocorre a fase de análise quantitativa (YOUNG, Kimberly; MORRISON, Helena; 2018).

I. SELEÇÃO DO ANIMAL

Desde o século V a.c. iniciou-se a utilização de animais em experimentos científicos, e essa prática foi intensificada nos anos 1800. Com isso ocorreram muitos avanços em conhecimentos, principalmente na área da saúde. No Brasil, os pesquisadores tem seus estudos com modelos animais orientados por algumas normas e princípios criadas por diversas instituições nacionais e internacionais, isso devido a ausência de lei específica para regulamentar a utilização de animais em pesquisas científicas. Dessa forma, seguindo as orientações mencionadas anteriormente, a seleção do modelo animal a ser utilizado no experimento se dá pelo objetivo e especificação do estudo. Dentre os modelos animais mais utilizados em pesquisa científica temos o rato wistar, o camundongo e o sagui (RAYMUNDO, Marcia Mocellin; GOLDIM, José Roberto; 2009).

II. CIRURGIA ESTEREOTÁXICA

Se trata de uma forma de intervenção cirúrgica que utiliza um sistema de coordenadas para localizar pequenas estruturas no cérebro. Para a realização da cirurgia estereotáxica é importante verificar o peso do animal e realizar o procedimento de anestesia, através de anestésicos como a xilazina, a ketamina e o isoflurano. A xilazina que atua como relaxante muscular diminuindo a rigidez das estruturas musculares do animal tem sua dose recomendada entre 5-10 mg/kg, a ketamina de 50-90 mg/kg, e o nível anestésico do animal pode ser mantido com a porcentagem de isoflurano entre 3 a 4. Em seguida, deve ser escolhida a via de administração de acordo com o anestésico selecionado. A literatura recomenda para os anestésicos xilazina e ketamina a via intraperitoneal

e para o isoflurano a via inalatória (PAXINOS, George; WATSON, Charles; 2006).

Após a fase de anestesia do animal, deve ser realizado o posicionamento deste no estereotáxico para dar início ao procedimento cirúrgico. O animal deve ser posicionado de modo em que as barras se mantenham localizadas no ouvido externo dele, e deve ser realizada a verificação do posicionamento no mínimo três vezes antes de iniciar o procedimento cirúrgico (ANDREOLI, Lorena; SIMPLÍCIO, Hougelle; MORYA, Edgard; 2018).

III. PREPARO DO TECIDO

Durante a fase de preparo do tecido a primeira ação a ser realizada é a remoção do cérebro do animal de acordo com um protocolo de laboratório padrão selecionado pelo pesquisador. Em seguida, o tecido cerebral deve ser seccionado de acordo com a espessura desejada para o experimento. O método de perfusão deve ser selecionado assim como as soluções que serão utilizadas. Dentre as soluções mais utilizadas temos a salina heparinizada e o paraformaldeído. O tecido cerebral deve ser colocado em um frasco de 10 mL contendo 5 mL de uma solução selecionada, logo ocorrerá o enxague e o tecido cerebral deverá ser mantido em por 24 horas e outra solução. Dentre as mais utilizadas, temos o tampão de fosfato, o paraformaldeído tamponado e a sacarose tamponada. E além disso, o método de eutanásia deve ser selecionado de acordo com o desenho do estudo (YOUNG, Kimberly; MORRISON, Helena; 2018).

IV. MARCAÇÃO TECIDUAL

Nessa fase teremos dois métodos para alcançar o objetivo final, que será a marcação tecidual para diferenciação celular que irá auxiliar na fase de microscopia e análise celular quantitativa. Dessa forma, o pesquisador poderá optar pela utilização da imunofluorescência e a coloração de Nissl (PAIVA, Geruza Olivieri de et al.; 2011).

A. Imunofluorescência

A Imunofluorescência trata-se de uma técnica que possibilita a visualização de antígenos nos tecidos, através da utilização de anticorpos específicos, marcados com fluorocromo que são capazes de absorver a luz ultra-violeta emitindo em determinado comprimento de onda e permitindo tal observação ao microscópio (LEE, J. Y. J.; WAN, H.; 2017).

Durante esta fase, quando o pesquisador opta pela utilização de imunofluorescência, deve ser realizada a reidratação dos tecidos em tampão de fosfato, o bloqueio dos sítios inespecíficos, repetição do procedimento de lavagem e

hidratação, permanecendo em incubação OVERNIGHT com anticorpos primários. Finalizando através de lavagem com acréscimo de anticorpos secundários, lavagem e montagem das lâminas (BAINS, Kainaaz.; 2019).

B. Coloração de Nissl

Os corpúsculos ou grânulos de Nissl são acumulações basófilas, que são encontradas no citoplasma de células nervosas. E este nome se dá devido a um famoso neurologista alemão, Franz Nissl. Tais corpúsculos são retículo endoplasmático rugoso com ribossomos, onde ocorrem síntese de proteínas (GOMES, Marleide da Mota.; 2019)

A presença de corpúsculos de Nissl gera uma coloração intensa através da afinidade com corantes básicos. A coloração de Nissl se trata de uma coloração seletiva desenvolvida pelo próprio Nissl, se baseia em uma coloração por anilina utilizada para marcar grânulos extracelulares de RNA (FORNARI, Raquel Vecchio; COSTA, Thaisy Moraes; FERREIRA, Tatiana Lima.; 2019).

Durante esta fase, quando o pesquisador opta por utilizar a coloração de Nissl, algumas etapas devem ser seguidas. A primeira etapa consiste em colocar lâminas em cresil violeta, em seguida deve ser realizada a imersão em solução de ácido cético. A terceira etapa consiste na imersão em baterias alcoólicas com as respectivas porcentagens 70, 80, 90 e 100. Logo após deve ser realizada a imersão em xilol puro e por fim deve ser realizado o fechamento das lâminas (SCORZA, Fulvio Alexandre et al.; 2005).

V. MICROSCOPIA

Após a todas as fases que envolvem a preparação do tecido seguimos para a fase de análise tecidual através da microscopia. Durante esta fase, é possível obter imagens ampliadas do tecido, e distinção dos tipos celulares observados. Em nosso estudo, o tipo de célula que será analisada é a micróglia (PADILHA, Angelo Fernando.; 2013).

A. Micróglia

Principal célula envolvida na resposta neuro-inflamatória, sendo as primeiras células a se apresentar no local da lesão a fim de combater o agente estressor a partir da liberação de fatores tróficos e anti inflamatórios, atuando como macrófagos residentes no cérebro. A micróglia tem sua origem na linhagem mielóide e acaba por infiltrar-se no sistema nervoso central no decorrer do desenvolvimento embrionário. Foi inicialmente descoberta e descrita por Pío del Río-Hortega em 1919 (EREIFEJ, 2012; POLIKOV et al., 2005; RIO-HORTEGA, 1919).

Quando não encontram-se ativas, a micróglia tende a ser observada inativa ou até mesmo ramificada, mas quando temos alguma lesão proveniente de eletrodos ou qualquer outro dispositivo que venha a lesar o tecido a micróglia irá se apresentar altamente ramificada, apresentando um aumento de sua proliferação bem como alteração de suas características morfológicas onde está vai se apresentar com um formato amebóide. Dentre suas principais funções podemos destacar a fagocitose de materiais estranhos que estejam ocasionando

a resposta imune e a regulação da produção de enzimas para que estes possam auxiliar na degradação dos corpos estranhos (BEAR et al., 2020; WOLF et al., 2017).

VI. ANÁLISE QUANTITATIVA

Essa é a última fase do estudo e consequentemente do código desenvolvido. Nesta fase, será realizada a quantificação celular de micróglia ativas e inativas e o resultado final será expresso em um gráfico em pizza informando a porcentagem de cada grupo presente no tecido analisado através da microscopia (YOUNG, Kimberly; MORRISON, Helena; 2018).

REFERENCES

- [1] ANDREOLI, Lorena; SIMPLÍCIO, Hougelle; MORYA, Edgard. Egg Model Training Protocol for Stereotaxic Neurosurgery and Microelectrode Implantation. World neurosurgery, v. 111, p. 243-250, 2018.
- [2] BAINS, Kainaaz. Immunofluorescence as an investigative tool in diagnosis of Oral mucosal lesions-A Review. Journal of Advanced Medical and Dental Sciences Research, v. 7, n. 12, 2019.
- [3] BEAR, M.; CONNORS, B.; PARADISO, M. A. Neuroscience: Exploring the brain. [S.l.]: Jones Bartlett Learning, LLC, 2020.
- [4] EREIFEJ, E. S. Studying the glial cell response to biomaterials and surface topography for improving the neural electrode interface. 2012.
- [5] FORNARI, Raquel Vecchio; COSTA, Thaisy Moraes; FERREIRA, Tatiana Lima. Mapeamento das regiões encefálicas envolvidas na evocação da memória contextual remota em animais treinados com diferentes intensidades de choques. In: IX ENCONTRO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA-2019. 2019.
- [6] GOMES, Marleide da Mota. Franz Nissl (1860-1919), noted neuropsychiatrist and neuropathologist, staining the neuron, but not limiting it. Dementia neuropsychologia, v. 13, n. 3, p. 352-355, 2019.
- [7] LEE, J. Y. J.; WAN, H. Application of Immunofluorescence in the Diagnosis of Oral Diseases. J Dent Oral Biol. 2017; 2 (2), v. 1029, 2017.
- [8] PAIVA, Geruza Olivieri de et al. Estudo da expressão do canal para sódio dependente de voltagem nav1. 6 nas células esféricas e globulares em arbusto do núcleo coclear do sistema auditivo. 2011.
- [9] PADILHA, Angelo Fernando. Microscopia eletrônica de transmissão. Departamento de engenharia metalúrgica e de materiais da EPUSP, 2013.
- [10] PAXINOS, George; WATSON, Charles. The rat brain in stereotaxic coordinates: hard cover edition. Elsevier, 2006.
- [11] POLIKOV, V. S.; TRESCO, P. A.; REICHERT, W. M. Response of brain tissue to chronically implanted neural electrodes. Journal of neuroscience methods, Elsevier, v. 148, n. 1, p. 1-18, 2005.
- [12] RAYMUNDO, Marcia Mocellin; GOLDIM, José Roberto. Ética da pesquisa em modelos animais. revista Bioética, v. 10, n. 1, 2009.
- [13] RIO-HORTEGA, P. del. El "Tercer elemento" de los centros nerviosos: poder fagocitario y movilidad de la microglia. [S.l.: s.n.], 1919.
- [14] SCORZA, Fulvio Alexandre et al. Qualitative study of hippocampal formation in hypertensive rats with epilepsy. Arquivos de neuro-psiquiatria, v. 63, n. 2A, p. 283-288, 2005.
- [15] WOLF, S. A.; BODDEKE, H.; KETTENMANN, H. Microglia in physiology and disease. Annual review of physiology, Annual Reviews, v. 79, p. 619-643, 2017.
- [16] YOUNG, Kimberly; MORRISON, Helena. Quantifying microglia morphology from photomicrographs of immunohistochemistry prepared tissue using ImageJ. JoVE (Journal of Visualized Experiments), n. 136, p. e57648, 2018.