



UNIVERSIDADE  
FEDERAL DO CEARÁ

ORGANIZADORAS

VIRGÍNIA CLÁUDIA CARNEIRO GIRÃO-CARMONA  
ANDRÉA SOARES ROCHA DA SILVA  
ANA CAROLINE ROCHA DE MELO LEITE

# HISTOLOGIA INTERATIVA

## ROTEIROS DE PESQUISA

### V. 1: MÉTODOS DE ESTUDO EM AMOSTRAS DE TECIDO

FORTALEZA

GRUPO EDUCAÇÃO, TECNOLOGIA E SAÚDE DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ  
LIGA ACADÊMICA DE EMBRIOLOGIA E MICROSCOPIA APLICADA DA FACULDADE DE  
MEDICINA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ

2021





UNIVERSIDADE  
FEDERAL DO CEARÁ

ORGANIZADORAS

VIRGÍNIA CLÁUDIA CARNEIRO GIRÃO-CARMONA  
ANDRÉA SOARES ROCHA DA SILVA  
ANA CAROLINE ROCHA DE MELO LEITE

# HISTOLOGIA INTERATIVA

## ROTEIROS DE PESQUISA

V. 1: MÉTODOS DE ESTUDO EM AMOSTRAS DE TECIDO

FORTALEZA

GRUPO EDUCAÇÃO, TECNOLOGIA E SAÚDE DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ  
LIGA ACADÊMICA DE EMBRIOLOGIA E MICROSCÓPIA APLICADA DA FACULDADE DE  
MEDICINA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ

2021





2021 Grupo Educação, Tecnologia e Saúde (GETS) da Universidade Federal do Ceará e Liga Acadêmica de Embriologia e Microscopia Aplicada da Faculdade de Medicina (LAEMA) da Universidade Federal do Ceará

A presente publicação está sob a Atribuição-NãoComercial CC BY-NC.



Histologia Interativa: Roteiros de Pesquisa  
V. 1: Métodos de estudo em amostras de tecidos  
E-book

H673 Histologia interativa : roteiros de pesquisa / organizadoras, Virgínia Cláudia Carneiro Girão-Carmona, Andréa Soares Rocha da Silva, Ana Caroline Rocha de Melo Leite. – Fortaleza : Grupo Educação, Tecnologia e Saúde da Universidade Federal do Ceará : Liga Acadêmica de Embriologia e Microscopia Aplicada da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, 2021.

388 p. : il. color.

v. 1 – Métodos de estudo em amostras de tecidos.

*e-book*

ISBN 978-65-00-33160-8

1. Histologia. I. Girão-Carmona, Virgínia Cláudia Carneiro. II. Silva, Andréa Soares Rocha da. III. Leite, Ana Caroline Rocha de Melo.

CDD: 611

**Universidade Federal do Ceará**

Reitor: José Cândido Lustosa Bittencourt de Albuquerque

Vice-reitor: José Glauco Lobo Filho

**Faculdade de Medicina**

Diretor: João Macedo Coelho Filho

Vice-diretora: Danielle Macedo Gaspar

**Departamento de Morfologia**

Chefe: Pedro Marcos Gomes Soares

Subchefe: Emmanuel Prata de Souza

**Departamento de Fisioterapia**

Chefe: Renata Bessa Pontes

Subchefe: Vilena Barros de Figueiredo

**Programa de Pós-graduação em Ciências Morfofuncionais**

Coordenação: Roberta Jeane Bezerra Jorge

Vice-coordenação: Renata Ferreira de Carvalho Leitão

**Grupo Educação, Tecnologia e Saúde (GETS) da Universidade Federal do Ceará**

Coordenação: Andréa Soares Rocha da Silva

**Liga Acadêmica de Embriologia e Microscopia Aplicada da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará (LAEMA)**

Coordenação: Virgínia Cláudia Carneiro Girão-Carmona

**Organizadoras:** Virgínia Cláudia Carneiro Girão-Carmona; Andréa Soares Rocha da Silva e Ana Caroline Rocha de Melo Leite

**Projeto gráfico inicial:** Paulo Costa dos Santos

**Diagramação e atualização de iconografia e projeto gráfico visual:** Luan dos Santos Mendes Costa

**Apoio técnico:** Weverton Lucas Silva Lima e Artur Monteiro da Silva

**Revisão e Normalização bibliográfica:** Paula Pinheiro da Nóbrega (CRB 3- 717)

Prezados leitores, em alguns capítulos deste e-book foram inseridos links para o acesso a sites, imagens e vídeos científicos que não tiveram a elaboração dos autores da presente publicação. Assim, respeitando os direitos autorais (morais e patrimoniais), solicitamos permissões expressas aos autores daqueles conteúdos, os quais, gentilmente, nos concederam a autorização para utilizá-los. Outras fontes que inserimos no livro estão regidas por licenças livres. Lembramos que todos os materiais, autorais e livres, estão elencados e completos na lista de referências que se encontra ao final de cada capítulo, resguardando, portanto, o direito de propriedade intelectual de cada autor citado nesta obra.

## AGRADECIMENTOS

É com muita gratidão e alegria que eu, Virgínia Cláudia Carneiro Girão-Carmona, idealizadora deste e-book, agradeço/destaco o interesse e dedicação demonstrados por todos que contribuíram para a elaboração da presente publicação.

Os laboratórios de pesquisa precisaram fechar suas portas, mas a ciência rompe fronteiras. Diante do contexto de isolamento social demandado pela pandemia da COVID-19, conseguimos, de forma colaborativa, produzir o e-book, tornando possível o acesso a diferentes protocolos de pesquisa para o estudo dos tecidos em um formato inovador, permitindo interatividade aos leitores, bem como autonomia para o entendimento dos métodos de estudo abordados na referida publicação.

Para tanto, a construção do conteúdo do e-book envolveu muitas mãos. Sem a participação e o envolvimento de todos os autores e colaboradores, a sua produção não se tornaria real. Deste modo, início meus agradecimentos...

A todos os professores autores, aos quais expressamos nosso agradecimento por terem aceitado participar do projeto.

Aos estudantes de pós-graduação que também contribuíram para a autoria de cada capítulo, agradecemos e esperamos que o esforço e o tempo dedicados tenham colaborado para o aprendizado de todos vocês.

Agradecemos, especialmente, à Professora Mestra Paula Pinheiro da Nóbrega, pelo empenho, dedicação e disponibilidade no suporte quanto à normalização bibliográfica e revisão do presente e-book; ao estudante do curso de graduação em Sistemas e Mídias Digitais da Universidade Federal do Ceará (UFC), Paulo Costa dos Santos, e do aluno do curso de graduação em Fisioterapia da Universidade Federal do Ceará (UFC), Luan dos Santos Mendes Costa, por todo afinho no processo de diagramação do e-book.

Faltam palavras para expressar a gratidão pela parceria das professoras Dra. Andréa Soares Rocha da Silva e Dra. Ana Caroline Rocha de Melo Leite. Elas acreditaram na proposta e foram grandes entusiastas e incentivadoras.

Assim, aos referidos docentes, por nos ensinarem, de fato, a importância de trabalharmos juntos e podermos ir muito além, nossa mais sincera gratidão!

**VIRGÍNIA CLÁUDIA CARNEIRO GIRÃO-CARMONA**  
Professora da Universidade Federal do Ceará  
Idealizadora da obra

**A todos que usam técnicas morfológicas aplicadas às suas pesquisas! Na esperança de que este material possa ser útil à compreensão de diferentes métodos de estudo em amostras de tecido.**

## APRESENTAÇÃO

O objetivo do e-book é proporcionar o conhecimento de diferentes métodos de estudo em amostras de tecido por meio de roteiros que possam conduzir o pesquisador a explorar a diversidade de técnicas e métodos de estudo em morfologia. A proposta também busca contribuir com os estudantes de pós-graduação, propiciando a oportunidade de encontrarem, de maneira organizada, dinâmica e interativa, informações específicas para o uso de diferentes técnicas morfológicas e/ou modelos experimentais. Para que os conteúdos fossem bem distribuídos e seguissem os conceitos apregoados pelo campo científico, contamos com a participação de pesquisadores dedicados, os quais escreveram os capítulos com muito esmero. Na oportunidade, agradecemos e listamos, alfabeticamente, os nomes dos autores que colaboraram transmitindo os seus valiosos conhecimentos para esta publicação.



**Adriana Terezinha Neves Novellino Alves**

Professora da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal Fluminense (FOUFF). Coordenadora do Laboratório de Pesquisa Clínica em Odontologia.

<http://lattes.cnpq.br/0898599282906713>

**Afonso Luiz Dantas Moura**

Mestrando do Programa de Pós-graduação em Física da Universidade Federal do Ceará (UFC).

<http://lattes.cnpq.br/8278493790105683>



**Aline Pic-Taylor**

Professora de Embriologia do Departamento de Genética e Morfologia da Universidade de Brasília (UnB). Pesquisadora vinculada às Pós-graduações em Ciências da Saúde, Ciências Médicas e Biologia Animal. Membro do Laboratório de Embriologia e Biologia do Desenvolvimento e dos Grupos de Pesquisa Morfologia e Imunologia Aplicada (UnB), Toxicologia Clínica e Ambiental (UnB) e Células-tronco Neurais (UnB).

<http://lattes.cnpq.br/8739951817243849>



**Ana Carolina Matias Dinelly Pinto**

Supervisora e analista do Laboratório de Sorologia - Fiocruz - CE. Coordenadora pedagógica da Prepara Cursos Papicu.

<http://lattes.cnpq.br/9647606420923547>



**Ana Caroline Rocha de Melo Leite**

Professora do Instituto de Ciências da Saúde. Pesquisadora vinculada ao Mestrado Acadêmico em Enfermagem (MAENF) da Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira (UNILAB). Membro do Grupo de Pesquisa Biotecnologia Aplicada (BIOTA) da UNILAB e do Grupo de Pesquisa Educação, Tecnologia e Saúde (GETS) da Universidade Federal do Ceará (UFC).

<http://lattes.cnpq.br/1433681003429411>



---

**Ana Karine Rocha de Melo Leite**

Professora do Centro Universitário Christus (Unichristus) e da Universidade de Fortaleza (Unifor). Membro do Grupo de Pesquisa em Manejo, Alimentação e Sanidade Animal (GPMASA).

<http://lattes.cnpq.br/3057934708334626>



**Anamaria Falcão Pereira**

Membro do Laboratório de Farmacologia da Inflamação e do Câncer (LAFICA) e do Grupo de Pesquisa Núcleo de Estudos das Toxicidades do Tratamento Oncológico (NETTO).

<http://lattes.cnpq.br/6132104184061755>



**Ana Paula Negreiros Nunes Alves**

Professora Titular de Patologia Bucal (FFOE/UFC). Pesquisadora vinculada aos Programas de Pós-graduação em Odontologia (FFOE/UFC) e de Medicina Translacional (NPDM/UFC).

<http://lattes.cnpq.br/5522921433940881>



**Andréa Soares Rocha da Silva**

Professora Associada do Departamento de Fisioterapia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará (UFC). Pesquisadora vinculada ao Programa de Pós-graduação em Ciência da Informação e ao Mestrado Profissional em Saúde da Família da UFC. Pesquisadora e líder do Grupo de Estudos em Educação, Tecnologia e Saúde (GETS - UFC).

<http://lattes.cnpq.br/1759902798115392>



**Andréa Viana Loureiro**

Doutoranda do Programa de Pós-graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará (UFC).

<http://lattes.cnpq.br/2971695747679584>



**Anupama Ghosh**

Professora Visitante do Departamento de Física. Pesquisadora da Central Analítica da Universidade Federal do Ceará (UFC).

<http://lattes.cnpq.br/1325922776934613>



**Barry John Sessle**

BDS, MDS, BSc, PhD, DSc (h.c.). Professor, University of Toronto Faculties of Dentistry and Medicine, and a Fellow of the Royal Society of Canada and Member of the Canadian Academy of Science. His research covers craniofacial pain and neuromuscular mechanisms and their clinical correlates, and he has published extensively on these topics.

<https://www.dentistry.utoronto.ca/faculty-profiles/barry-sessle>





---

**Bryan Hudson Hossy**

Professor de Histologia, Anatomia Humana e Cosmetologia do Centro Universitário Celso Lisboa (UCL).

<http://lattes.cnpq.br/4396818060921737>



**Carlos Lenz Cesar**

Professor do Departamento de Física da Universidade Federal do Ceará (UFC). Pesquisador vinculado ao Programa de Pós-graduação em Física da UFC.

<http://lattes.cnpq.br/9797420148146484>



**Conceição da Silva Martins**

Pós-doutoranda do Programa de Pós-graduação em Ciências Morfofuncionais da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará (UFC). Membro do Núcleo de Estudos em Microscopia e Processamento de Imagem (NEMPI).

<http://lattes.cnpq.br/1853562744182714>



**Cristiane Maria Pereira da Silva**

Mestranda do Programa de Pós-graduação em Farmacologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará (UFC).

<http://lattes.cnpq.br/0888793697578623>



**Davide Carlos Joaquim**

Doutorando do Programa de Pós-graduação em Ciências Morfofuncionais da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará (UFC).

<http://lattes.cnpq.br/9966732655461768>



**Deiziane Viana da Silva Costa**

Pesquisadora vinculada à Division of Infectious Diseases and International Health-Universidade da Virginia, Estados Unidos. Membro do Núcleo de Estudos em Microscopia e Processamento de Imagem (NEMPI) da Universidade Federal do Ceará (UFC).

<http://lattes.cnpq.br/6998195291555150>



**Emilio de Castro Miguel**

Professor do Departamento de Engenharia Metalúrgica e de Materiais. Pesquisador vinculado ao Programa de Pós-graduação em Sistemática, Uso e Conservação da Biodiversidade e Biotecnologia de Recursos Naturais da Universidade Federal do Ceará (UFC). Coordenador do Laboratório de Biomateriais da UFC.

<http://lattes.cnpq.br/0690009743607948>





### **Francisco Airton Castro da Rocha**

Professor Titular de Reumatologia. Pesquisador vinculado aos Programas de Pós-graduação em Ciências Médicas e Microbiologia Médica da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará (UFC).

<http://lattes.cnpq.br/4916026652021507>

### **Francisco Herculano Campos**

Doutorando do Programa de Pós-graduação em Ciências Morfofuncionais da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará (UFC) e professor da UNIFAMETRO.

<http://lattes.cnpq.br/5888057248860359>



### **Gerly Anne de Castro Brito**

Professora Titular de Histologia e Embriologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará (aposentada). Pesquisadora vinculada aos Programas de Pós-graduação em Ciências Morfofuncionais, em Farmacologia e em Ciências Médicas da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará (UFC).

<http://lattes.cnpq.br/8991062042568398>



### **Giulliano Rezende Silva**

Mestrando em Ciências Médicas. Pesquisador do Laboratório de Embriologia Humana e Aplicada (LEHA-UnB).

<http://lattes.cnpq.br/1517038060510254>



### **Hellíada Vasconcelos Chaves**

Professora do Curso de Odontologia da Universidade Federal do Ceará (UFC) - *Campus* Sobral. Pesquisadora e Coordenadora do Laboratório de Farmacologia de Sobral (LaFS) e do Núcleo de Estudos e Pesquisas em Dor Orofacial (NEPDOR). Pesquisadora vinculada à Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Medicina Translacional e em Odontologia. Professora visitante da Universidade de Toronto, Canadá.

<http://lattes.cnpq.br/4727435604122670>



### **Ingrid Chaves Cavalcante Kischinhevsky**

Oficial Dentista da Força Aérea Brasileira; Doutoranda em Clínica Odontológica pelo Programada de Pós Graduação em Odontologia da Universidade Federal Fluminense/UFF.

<http://lattes.cnpq.br/0519284025997887>



### **Iracema Matos de Melo**

Professora de Periodontia e Patologia Geral do Curso de Odontologia da Universidade Federal do Ceará, *Campus* de Sobral. Pesquisadora vinculada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde.

<http://lattes.cnpq.br/2231667162671725>





### Jacqueline Lopez Gross

DDS, MSC, FRCD. Adjunct Clinical professor at Western University, London, Ontario and lecturer at University of Toronto. Member of the Ontario Dental Association, Canadian Academy of Endodontics and American Association of Endodontics.

### Javier Adur

Pesquisador vinculado à Pós-Graduação da Faculdade de Engenharia da Universidade Nacional de Entre Ríos (UNER), Argentina. Pesquisador do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento em Bioinformática e Bioengenharia (IBB-CONICET). Secretário de Pesquisa e Pós-Graduação da Faculdade de Engenharia (FI-UNER).



<http://lattes.cnpq.br/5474210415660539>



### José Eduardo Baroneza

Professor de Histologia e Embriologia da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília (FM-UnB). Pesquisador vinculado ao Programa de Mestrado Profissional em Ensino de Biologia (PROFBIO). Coordenador do Laboratório de Embriologia Humana e Aplicada (LEHA-UnB).

<http://lattes.cnpq.br/6027220647875581>

### Laise Rodrigues de Andrade

Professora de Embriologia do Departamento de Genética e Morfologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília (IB-UnB). Membro do Laboratório de Embriologia e Biologia do Desenvolvimento do IB-UnB. Pesquisadora vinculada ao Programa de Pós-Graduação em Nanociência e Nanobiotecnologia da UnB. Membro dos grupos de pesquisa Materiais Nanoestruturados e Interações Biológicas e Nanomateriais.



<http://lattes.cnpq.br/9709334860647035>



### Limor Avivi-Arber

BSc (Med), BSc (Pharm), DMD, MSc, (Dip. Prosthodontics), PhD. Associate Professor, Faculty of Dentistry, University of Toronto, and a member of the University's Centre for the Study of Pain and the Collaborative Program in Neuroscience. She is the Secretary of the International College of Prosthodontists, a member of the Review Board of the Journal of Oral Rehabilitation and the International Journal of Prosthodontics, and a Guest Editor in Frontiers in Neuroscience Special Topic on Orofacial Functions: From Neural Mechanism to Rehabilitation.

<https://www.dentistry.utoronto.ca/faculty-profiles/limor-avivi-arber>

### Lívia Thaís Gontijo Miranda

Discente de Enfermagem da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília - Campus Darcy Ribeiro. Pesquisadora vinculada ao Laboratório de Embriologia Humana e Aplicada (LEHA-UnB). Membro do Grupo de Estudos em Saúde da Criança, Adolescente e Família (GESCAF-UnB).



<http://lattes.cnpq.br/6892552009455794>

---

**Luan dos Santos Mendes Costa**

Discente e Monitor do Curso de Fisioterapia pela Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará. Membro do Núcleo de Pesquisas e Inovações Tecnológicas em Reabilitação Humana e do Grupo de Pesquisas em Educação, Tecnologia e Saúde (GETS).

<http://lattes.cnpq.br/1187903879556430>



**Marcus Davis Machado Braga**

Professor de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará (aposentado). Coronel Médico do Corpo de Bombeiros do Estado do Ceará (na reserva).

<http://lattes.cnpq.br/3431327162515836>



**Margarida Maria de Lima Pompeu**

Professora Titular do Departamento de Patologia e Medicina Legal da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará (UFC).

<http://lattes.cnpq.br/2618502430533433>



**Maria Luana Gaudêncio dos Santos Moraes**

Doutoranda do Programa de Pós-graduação em Ciências Morfofuncionais da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará (UFC).

<http://lattes.cnpq.br/8963730050271094>



**Maria Luzia Herminia Teixeira de Sousa**

Professora de Periodontia e Cirurgia no Centro Universitário (UNINTA). Doutoranda do Programa de Pós-graduação em Clínica Odontológica da Universidade Federal do Ceará (UFC).

<http://lattes.cnpq.br/6354607024705906>



**Mariana Lima Vale**

Professora Associada do Departamento de Fisiologia e Farmacologia. Pesquisadora vinculada aos Programas de Pós-Graduação em Farmacologia e Ciências Morfofuncionais da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará (UFC). Coordenadora do Laboratório de Farmacologia da Inflamação e do Câncer (LAFICA) da UFC.

<http://lattes.cnpq.br/2233181081815735>



**Marlos de Medeiros Chaves**

Tecnologista em Saúde Pública da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), vinculado à Central Analítica da Universidade Federal do Ceará (UFC) pelo Convênio Técnico-científico FIOCRUZ-UFC.

<http://lattes.cnpq.br/5961912954763405>



### **Mirna Marques Bezerra Brayner**

Professora Titular de Farmacologia da Universidade Federal do Ceará (UFC). Pesquisadora vinculada ao Mestrado em Ciências da Saúde da UFC (*Campus de Sobral*), ao Mestrado Profissional em Farmacologia Clínica (UFC) e ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Translacional (UFC).

<http://lattes.cnpq.br/0614961188016863>



### **Mônica Diuana Calasans Maia**

Professora Titular da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal Fluminense (FOUFF) - Disciplina de Cirurgia Oral Menor. Pesquisadora do Laboratório de Pesquisa Clínica em Odontologia (LPCO-UFF). Pesquisadora da Rede de Bioengenharia do Estado do Rio de Janeiro e da Rede de NanoSaúde da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ).

<http://lattes.cnpq.br/9052519251465705>



### **Nadia Campos de Oliveira Miguel**

Professora Associada de Histologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). Pesquisadora vinculada ao Programa de Pesquisa em Biologia Celular e do Desenvolvimento do Instituto de Ciências Biomédicas (CCS) da UFRJ.

<http://lattes.cnpq.br/0240414887390653>



### **Paula Goes Pinheiro Dutra**

Professora de Imunologia do Departamento de Patologia e Medicina Legal da Universidade Federal do Ceará (UFC). Pesquisadora vinculada aos Programas de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais (PCMF) e Odontologia (PPGO) da UFC.

<http://lattes.cnpq.br/9146660561423508>



### **Paula Pinheiro da Nóbrega**

Mestra em Ciência da Informação pela Universidade Federal do Ceará (UFC). Bibliotecária. Membro do Grupo de Pesquisa em Educação, Tecnologia e Saúde (GETS - UFC).

<http://lattes.cnpq.br/7485497876734881>



### **Paulo Roberto Carvalho de Almeida**

Professor de Patologia. Médico Patologista do Departamento de Patologia e Medicina Legal. Pesquisador vinculado ao Programa de Pós-graduação em Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará (UFC).

<http://lattes.cnpq.br/6253317290789129>



### **Renata Ferreira de Carvalho Leitão**

Professora Associada de Histologia e Embriologia do Departamento de Morfologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará (UFC). Pesquisadora vinculada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Morfofuncionais da UFC.

<http://lattes.cnpq.br/5213035069793195>





**Rodrigo de Andrade Natal**

Professor de Fisiopatologia Médica na Universidade Nove de Julho, *Campi* de São Bernardo do Campo e Mauá.

<http://lattes.cnpq.br/2109143054530599>

**Rosemayre Souza Freire**

Técnica em Microscopia Confocal da Central Analítica da Universidade Federal do Ceará (UFC). Membro do Laboratório de Física Biológica da Universidade Federal do Ceará (UFC).

<http://lattes.cnpq.br/1618809984966711>



**Sergimar Kennedy de Paiva Pinheiro**

Doutorando em Biotecnologia de Recursos Naturais. Membro do Laboratório de Biomateriais (BIOMAT) da Universidade Federal do Ceará (UFC).

<http://lattes.cnpq.br/2457903333981771>

**Shirley Aline da Costa Arteaga da Silva**

Discente de Enfermagem da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília – Campus Darcy Ribeiro. Pesquisadora vinculada ao Laboratório de Embriologia Humana e Aplicada (LEHA-UnB). Membro da Liga de Combate ao Câncer (LCC-UnB).

<http://lattes.cnpq.br/1383542537513624>



**Suellen Cristina Sartoretto Lorenzi**

Professora Adjunta da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal Fluminense (FOUFF) - Disciplina de Cirurgia Oral Menor. Pesquisadora do Laboratório de Pesquisa Clínica em Odontologia (LPCO-UFF).

<http://lattes.cnpq.br/7932927631777653>

**Susana Moreira de Souza**

Técnica do Laboratório de Técnicas Especiais e Imuno-histoquímica do Departamento de Patologia e Medicina Legal da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará (UFC).

<http://lattes.cnpq.br/0745514992235754>



**Thaiz Batista Azevedo Rangel Miguel**

Pesquisadora do Departamento de Engenharia de Alimentos da Universidade Federal do Ceará (UFC).

<http://lattes.cnpq.br/7828138137846646>

---

### Virgínia Cláudia Carneiro Girão-Carmona

Professora Associada de Histologia e Embriologia do Departamento de Morfologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará (UFC). Pesquisadora vinculada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Morfofuncionais da UFC. Coordenadora da Liga Acadêmica de Embriologia e Microscopia Aplicada. Membro do Laboratório de Investigação em Osteoartropatias e do Grupo de Pesquisa Educação, Tecnologia e Saúde (GETS) da UFC.



<http://lattes.cnpq.br/5491102217675347>

### Vivaldo Moura Neto



Professor Emérito da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) e Professor *Honoris Causa* da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará (UFC). Doutor *Honoris Causa* da Universidade Federal do Bahia (UFBA) e também da UNIGRANRIO. Diretor de Pesquisa do Instituto Estadual do Cérebro Paulo Niemeyer da Secretaria de Estado de Saúde do Estado do Rio de Janeiro. Agraciado com a Grã-Cruz da Ordem Nacional do Mérito Científico da República Brasileira.

<http://lattes.cnpq.br/4692980070480625>

## SUMÁRIO

### PREFÁCIO

<b>1 ORIENTAÇÕES DIDÁTICAS .....</b>	<b>20</b>
<i>Ana Caroline Rocha de Melo Leite</i>	
<i>Andréa Soares Rocha da Silva</i>	
<i>Davide Carlos Joaquim</i>	
<i>Francisco Herculano Campos Neto</i>	
<i>Virgínia Cláudia Carneiro Girão-Carmona</i>	
<b>2 MICROSCOPIA DE GERAÇÃO DE SEGUNDO-HARMÔNICO EM NEOPLASIAS .....</b>	<b>22</b>
<i>Rodrigo de Andrade Natal</i>	
<i>Javier Adur</i>	
<i>Carlos Lenz Cesar</i>	
<b>3 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA EM TECIDOS VEGETAIS .....</b>	<b>43</b>
<i>Sergimar Kennedy de Paiva Pinheiro</i>	
<i>Marlos de Medeiros Chaves</i>	
<i>Anupama Ghosh</i>	
<i>Thaiz Batista Azevedo Rangel Miguel</i>	
<i>Emilio de Castro Miguel</i>	
<b>4 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA EM ARTEMIA SALINA .....</b>	<b>57</b>
<i>Sergimar Kennedy de Paiva Pinheiro</i>	
<i>Marlos de Medeiros Chaves</i>	
<i>Thaiz Batista Azevedo Rangel Miguel</i>	
<i>Anupama Ghosh</i>	
<i>Emilio de Castro Miguel</i>	
<b>5 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO EM AMOSTRAS VEGETAIS .....</b>	<b>72</b>
<i>Sergimar Kennedy de Paiva Pinheiro</i>	
<i>Marlos de Medeiros Chaves</i>	
<i>Thaiz Batista Azevedo Rangel Miguel</i>	
<i>Anupama Ghosh</i>	
<i>Emilio de Castro Miguel</i>	
<b>6 A IMUNO-HISTOQUÍMICA NA PESQUISA EM ONCOLOGIA: DETECÇÃO DE BIOMARCADORES TUMORAIS .....</b>	<b>86</b>
<i>Paulo Roberto Carvalho de Almeida</i>	
<i>Susana Moreira de Souza</i>	
<b>7 IMUNOFLOURESCÊNCIA PARA O ESTUDO DO SISTEMA NERVOSO .....</b>	<b>106</b>
<i>Mariana Lima Vale</i>	
<i>Anamaria Falcão Pereira</i>	
<i>Cristiane Maria Pereira da Silva</i>	
<i>Rosemayre Souza Freire</i>	
<i>Afonso Luiz Dantas Moura</i>	



<b>8 MÉTODO DE ANÁLISE DE MICROSCOPIA CONFOCAL EM TECIDOS ANIMAL E VEGETAL</b> .....	<b>132</b>
<i>Rosemayre Souza Freire</i> <i>Mariana Lima Vale</i> <i>Afonso Luiz Dantas Moura</i> <i>Anamaria Falcão Pereira</i> <i>Cristiane Maria Pereira da Silva</i>	
<b>9 PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO DA PELE DE CAMUNDONGO HAIRLESS PARA AVALIAÇÃO DE MICROSCOPIA ÓPTICA DE ROTINA E MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO</b> .....	<b>145</b>
<i>Bryan Hudson Hossy</i> <i>Nadia Campos de Oliveira Miguel</i>	
<b>10 WESTERN BLOTTING APLICADO À PESQUISA PRÉ-CLÍNICA: PRINCÍPIOS BÁSICOS</b> .....	<b>160</b>
<i>Deiziane Viana da Silva Costa</i> <i>Renata Ferreira de Carvalho Leitão</i> <i>Andrea Viana Loureiro</i> <i>Conceição da Silva Martins</i> <i>Gerly Anne de Castro Brito</i>	
<b>11 IMUNO-HISTOQUÍMICA VOLTADA PARA A PESQUISA PRÉ-CLÍNICA</b> .....	<b>186</b>
<i>Conceição da Silva Martins</i> <i>Maria Luana Gaudêncio dos Santos Moraes</i> <i>Renata Ferreira de Carvalho Leitão</i> <i>Deiziane Viana da Silva Costa</i> <i>Gerly Anne de Castro Brito</i>	
<b>12 MÉTODOS DE HISTOQUÍMICA PARA AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA DA CARTILAGEM ARTICULAR</b> .....	<b>210</b>
<i>Virgínia Cláudia Carneiro Girão-Carmona</i> <i>Margarida Maria de Lima Pompeu</i> <i>Ana Caroline Rocha de Melo Leite</i> <i>Ana Carolina Matias Dinelly Pinto</i> <i>Mirna Marques Bezerra Brayner</i> <i>Francisco Airton Castro da Rocha</i>	
<b>13 AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA DE ANOMALIAS CONGÊNITAS ESTRUTURAIS EM FETOS DE ROEDORES</b> .....	<b>223</b>
<i>José Eduardo Baroneza</i> <i>Giulliano Rezende Silva</i> <i>Lívia Thais Gontijo Miranda</i> <i>Shirley Aline da Costa Arteaga da Silva</i> <i>Aline Pic-Taylor</i>	

<b>14 ENSAIO COM MEMBRANA CORIOALANTÓICA (CAM) DO EMBRIÃO DE GALINHA: UM MODELO ROBUSTO PARA IDENTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS PRÓ E ANTIANGIOGÊNICOS</b> .....	<b>245</b>
<i>Aline Pic-Taylor</i> <i>José Eduardo Baroneza</i> <i>Laise Rodrigues de Andrade</i>	
<b>15 ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS DE TOXICIDADE EM ENSAIOS PRÉ-CLÍNICOS</b> .....	<b>263</b>
<i>Ana Paula Negreiros Nunes Alves</i> <i>Marcus Davis Machado Braga</i>	
<b>16 ANÁLISE QUANTITATIVA DO TECIDO ÓSSEO EM ENSAIOS PRÉ-CLÍNICOS</b> .....	<b>292</b>
<i>Paula Goes Pinheiro Dutra</i> <i>Hellíada Vasconcelos Chaves</i> <i>Maria Luzia Herminia Teixeira de Sousa</i> <i>Iracema Matos de Melo</i> <i>Mirna Marques Bezerra Brayner</i>	
<b>17 MODELO EXPERIMENTAL DE ARTRITE INDUZIDA POR ZYMOBAN COMO FERRAMENTA PARA A AVALIAÇÃO DA MIGRAÇÃO CELULAR AGUDA</b> .....	<b>318</b>
<i>Ana Caroline Rocha de Melo Leite</i> <i>Virgínia Cláudia Carneiro Girão-Carmona</i> <i>Ana Karine Rocha de Melo Leite</i> <i>Mirna Marques Bezerra Brayner</i> <i>Francisco Airton Castro da Rocha</i>	
<b>18 PROCESSAMENTO DE AMOSTRAS MINERALIZADAS</b> .....	<b>326</b>
<i>Ingrid Chaves Cavalcante Kischinhevsky</i> <i>Adriana Terezinha Neves Novellino Alves</i> <i>Suelen Cristina Sartoretto Lorenzi</i> <i>Monica Diuana Calasans-Maia</i>	
<b>19 CLARITY: IMAGEM 3D ATRAVÉS DO CLAREAMENTO E TRANSPARÊNCIA DE TECIDOS</b> .....	<b>349</b>
<i>Hellíada Vasconcelos Chaves</i> <i>Jacqueline Lopez Gross</i> <i>Barry John Sessle Limor</i> <i>Avivi-Arber</i>	

## PREFÁCIO

Jovens alunos, Professores da área biológica, no ensino médio e superior, estamos abrindo agora um e-book da equipe coordenada pela Professora Virgínia Cláudia Carneiro Girão-Carmona e suas colaboradoras diretas, Andréa Soares Rocha da Silva e Ana Carolina Rocha de Melo Leite. O livro que a Professora Virgínia Girão, com suas colegas, organizou cuidadosamente para prender a atenção do leitor e certamente fazer com que ele acrescente ou atualize seus conhecimentos. Os convidados para a produção de capítulos foram cuidadosamente selecionados para darem o brilho do conhecimento moderno ao texto que geraram. O livro passa pela Microscopia, “alma” metodológica do e-book, como a microscopia de luz e a eletrônica, ou ainda a confocal, segue depois para a Histologia, com suas revelações imunológicas empregando procedimentos de imunofluorescência com aplicações no estudo de câncer, auxiliando o diagnóstico, no estudo do sistema nervoso e outros tecidos, como a pele. Fecha seus capítulos com as aplicações do *western blotting* à pesquisa pré-clínica.

Não posso deixar de citar que o livro começa com o capítulo coordenado pelo renomado físico, Professor Carlos Lenz Cezar, com o estudo do segundo-harmônico, tema que ele conhece muito, e certamente um dos melhores no país. Os capítulos que se seguem são apresentados por conhecidos professores da área e vai terminar com o capítulo da aplicação do *western blotting*, conduzido pela equipe da também renomada Professora Gerly Anne de Castro Brito, Professora Titular da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará. Universidade Federal que é uma liderança na região Nordeste e no seu semiárido, contribuindo para o crescimento do ensino superior e para a pesquisa de qualidade no país. De fato, a maioria dos Professores que escreveram os capítulos são lideranças nas suas áreas de ação e contribuem para a qualidade da Universidade Federal do Ceará.

O que é admirável também no capítulo foi o cuidado pedagógico que a Professora Virgínia Girão e sua equipe imprimiram ao livro, base na metodologia 5W2H, sábia metodologia que o leitor conhecerá pelo que explicam as organizadoras e pelo que encontraram na leitura deste livro, ou melhor, o e-book.

Sinto-me honrado em ter o livro nas mãos e traçar algumas poucas linhas sobre a qualidade da obra que, certamente, na mão dos leitores, eles verão o quanto crescerão em conhecimento.

**VIVALDO MOURA NETO**

Doutor *Honoris Causa* da Universidade Federal do Ceará  
Professor Emérito da Universidade Federal do Rio de Janeiro

# Orientações Didáticas

---



# 1 ORIENTAÇÕES DIDÁTICAS

Ana Caroline Rocha de Melo Leite  
Andréa Soares Rocha da Silva  
Davide Carlos Joaquim  
Francisco Herculano Campos Neto  
Virgínia Cláudia Carneiro Girão-Carmona

Durante o processo de formação acadêmica, a realização de projetos de pesquisa, sejam vinculados aos programas de pós-graduação na área de Ciências Biológicas ou às áreas que atuam na interface com a Biologia, demanda a utilização de diversas técnicas e modelos experimentais, permitindo a investigação científica.

Não é raro que um laboratório de pesquisa desenvolva e detenha protocolos de estudos, os quais são repassados e, muitas vezes, adaptados por outros laboratórios. Esta prática é consideravelmente utilizada para a divulgação científica. No entanto, em muitas situações, a metodologia empregada para alcançar um objetivo de pesquisa fica restrita ao laboratório que a desenvolveu, impossibilitando a condução de novos estudos.

Neste sentido, o presente livro tem como objetivo atender pesquisadores e estudantes de pós-graduação, de diferentes áreas, cujos projetos de pesquisa envolvam a utilização de amostras de tecido ou células, de origem animal ou vegetal, para alcançar os objetivos do seu projeto de pesquisa.

Buscando um direcionamento claro e simples, os capítulos deste livro foram produzidos seguindo a metodologia conhecida por 5W2H, a qual é considerada uma ferramenta administrativa que pode ser aplicada a diversas áreas e em diferentes contextos de uma organização, no planejamento estratégico, que serve para guiar a execução de ações.

Ela é formada por sete perguntas: **What? Why? Where? When? Who? How? E How much?** Seu objetivo principal é auxiliar o planejamento de ações, buscando responder a questionamentos e esclarecer dúvidas. O emprego da ferramenta neste livro contribuirá para a compreensão e a execução de diferentes métodos de estudo.

Para tanto, em cada capítulo do *E-book*, as perguntas propostas pela metodologia 5W2H foram adaptadas de modo a constituir um roteiro. Assim, tal padronização fornecerá uma sequência de ações que permitam a execução do protocolo ou modelo abordado, de forma clara e objetiva.

Esperamos que este livro propicie, além da divulgação de diferentes protocolos de investigação científica, a implementação de novas abordagens e métodos de estudo por muitos estudantes e pesquisadores.

# 1

## Temática



## 2 MICROSCOPIA DE GERAÇÃO DE SEGUNDO-HARMÔNICO EM NEOPLASIAS

Rodrigo de Andrade Natal  
Javier Adur  
Carlos Lenz Cesar



### O QUE SERÁ FEITO?

Estudo do colágeno no câncer por meio da Microscopia de Geração de Segundo Harmônico (SHG).

A microscopia de Geração de Segundo Harmônico - *Second Harmonic Generation* (SHG<sup>1</sup>) é uma ferramenta que permite visualizar a estrutura de colágeno de forma não destrutiva e minimamente invasiva. A microscopia SHG (1) não requer coloração específica, isto significa que as amostras não precisam ser submetidas ao processo de coloração (e.g. eosina-hematoxilina, tricromo de Masson, tricromo de Gomori, entre outros), (2) pode utilizar amostras fixadas e incluídas em parafina de longa data, e (3) pode ser realizada *in vivo* (ADUR et al., 2016). Além disso, não interfere nos procedimentos diagnósticos padrões, como histologia, histoquímica e imunoistoquímica, apenas complementa com mais informações.



### POR QUE SERÁ FEITO?

A importância dessa análise tem dois aspectos: (1) a importância do tecido em observação e (2) as peculiaridades da microscopia SHG que permitem extrair as informações desejadas.

**Importância do tecido:** A matriz extracelular (MEC) é definida como suporte estrutural não-celular dos tecidos. É fisiologicamente ativa e importante para comunicação intercelular, adesão e proliferação celular (FRANTZ; STEWART; WEAVER, 2010), sendo composta por aproximadamente 300 proteínas, cuja proporção dá a composição precisa para diferentes tecidos (NABA et al., 2012).

---

<sup>1</sup> Para facilitar as buscas dos leitores na literatura do tema, deixamos as siglas em inglês por serem utilizadas globalmente nas publicações.

Dentre os componentes da MEC, o colágeno é a proteína mais abundante em animais, sendo a base do tecido conjuntivo. Compreende aproximadamente 6% de toda a massa corporal, sendo o colágeno fibrilar (tipos I, II e III) o mais abundante, representando cerca de 80% a 90% do conteúdo total de colágeno do corpo (LODISH et al., 2000). Dessa forma, além de fornecer resistência mecânica aos tecidos, facilita as interações estruturais e bioquímicas das células. Em outras palavras, rigidez e elasticidade fornecidas pela malha de colágeno são fatores determinantes para migração e diferenciação celular, e alteração da expressão gênica (ENGLER et al., 2006; ROCHA-MENDOZA, et al., 2007; ABEDIN; KING, 2010).

Em neoplasias, o colágeno está associado com o aumento da rigidez tecidual, regulando a imunidade tumoral e a promoção de metástases (DISCHER et al., 2017; YAMAUCHI et al., 2018). Além disso, há tumores que apresentam extensa deposição de colágeno, conhecida como reação desmoplástica, o que limita aplicações terapêuticas, reduzindo a sobrevida dos pacientes (WHATCOTT et al., 2015). Diante disso, é notável a importância de pesquisas que se concentram em avaliar o papel da estrutura de colágeno no comportamento das células neoplásicas.

**Microscopia SHG - histórico sumário:** Em 1986, Freund; Deutsch e Sprecher (1986) foram os primeiros a usar o método para visualizar o colágeno do tendão da cauda do rato, com resolução espacial de ~50  $\mu\text{m}$ . Quinze anos depois, Campagnola et al. (2002) visualizaram o colágeno em tecido biológico com uma resolução espacial muito maior (~1  $\mu\text{m}$ ) e com rápida aquisição de dados (CAMPAGNOLA et al., 2002), adaptando um *laser* de 100 femtossegundos em um microscópio confocal de varredura a *laser*. Atualmente, essa microscopia permite a visualização do colágeno com resolução espacial limitada pelo limite de difração (abaixo de 300 nm) e oferece maior resolução espacial do que a microscopia confocal no mesmo comprimento de onda do feixe de *laser* (COX et al., 2003b; COX; MANCONI; KABLE, 2002). Desenvolvimentos recentes em super-resolução, especialmente Airyscan, trazem a promessa de melhorar a resolução espacial da microscopia SHG para 100 nm.

**Propriedades da microscopia SHG:** A microscopia SHG fornece informações valiosas sobre a estrutura do colágeno que possui um grande impacto nas neoplasias. A microscopia SHG é um processo coerente e não linear de geração de ondas eletromagnéticas secundárias com frequência dobrada (metade do comprimento de onda) resultante da interação não linear das ondas eletromagnéticas com a matéria. Um entendimento intuitivo dos princípios dessa microscopia fornece as bases para a interpretação dos resultados.



**Coerência:** A intensidade de luz  $I$  depende do quadrado do campo elétrico  $E$  oscilante associado a ela, ou seja,  $I = aE^2$ . Quando existe mais de uma fonte emissora coerente, todas emitindo ao mesmo tempo, a intensidade é dada primeiro somando os campos elétricos e depois elevando ao quadrado, isto é,  $I = a(E_1 + E_2 + \dots + E_n)^2$ . Se os campos elétricos de todas as fontes são idênticos e iguais ao  $E_o$ , a intensidade total será  $I = I_o n^2$ , onde  $I_o = aE_o^2$  é a intensidade de cada fonte. Vale notar que a intensidade depende do quadrado do número de fontes. Em contrapartida, no processo não coerente, cada fonte emite seu campo elétrico em momentos aleatórios, anulando os termos cruzados, e a intensidade total é dada por  $I = I_1 + I_2 + \dots + I_n$ . Neste caso, a intensidade de múltiplas fontes idênticas, mas não coerentes, será apenas proporcional ao número de fontes,  $I = I_o n$ . Isso significa que em um sistema com  $10^6$  moléculas idênticas à diferença entre processo coerente, proporcional a  $10^{12}$ , e um não coerente,  $10^6$  é imensa. O processo em que existe a geração do segundo harmônico não coerente é chamado de espalhamento hiper Rayleigh, enquanto o termo SHG é utilizado para os processos coerentes.

**Consequência da coerência:** O sinal gerado pelo colágeno organizado na forma fibrilar é muito maior do que o sinal gerado por moléculas de colágeno dispersas. Assim, a avaliação da arquitetura de colágeno no microambiente tumoral emite um sinal intenso e proporcional ao quadrado da quantidade dessa proteína, o que possibilita uma avaliação detalhada e verossímil.

**Geração de harmônicos:** A emissão de luz, assim como qualquer radiação eletromagnética, se deve a um dipolo que oscila conforme o tempo e opera como uma antena emissora. Dipolo é formado por uma carga  $+q$  e outra  $-q$  separadas por uma distância  $d$ , com o momento de dipolo dado por  $p = qd$ . Se a distância entre as cargas muda em função do tempo  $t$  na forma  $d = \cos(2\pi\nu t)$ , esse dipolo emite radiação eletromagnética na frequência  $\nu$ .

Nos tecidos, as moléculas com elétrons e núcleos formam os dipolos. Dessa forma, quando uma luz visível incide sobre a molécula com uma frequência  $\nu$ , seu campo elétrico exerce uma força  $F$  na forma  $F = qE \cos(2\pi\nu t)$ , sobre os elétrons. Os elétrons são forçados a oscilar por esse campo elétrico, mas não os núcleos, cujas massas são grandes demais. A resposta dos elétrons frente à força externa pode ser expressa como uma série de potências

na forma  $F = -kx - \alpha x^2 - \beta x^3 - \gamma x^4 + \dots$ , onde  $x$  é a posição do elétron. O primeiro termo  $F = -kx$  é conhecido como lei de Hooke, que é apenas uma aproximação da resposta real do elétron, dada pela série de potências em  $x$ , em que os termos das potências maiores vão diminuindo com a potência, ou seja,  $kx \gg \alpha x^2 \gg \beta x^3 \gg \gamma x^4 \gg \dots$ , justificando a abrangência da lei de Hooke que usou apenas o primeiro termo. Este primeiro termo  $kx$  vai oscilar e emitir luz com a mesma frequência da luz incidente, sendo conhecido como espalhamento Rayleigh. Já o segundo termo  $\alpha x^2$  vai oscilar com  $\cos^2(2\pi\nu t)$ , gerando o segundo harmônico, pois  $\cos^2 \theta = \frac{1}{2}[1 + \cos(2\theta)]$  e o termo com  $2\theta$  oscilam com  $\cos[2\pi(2\nu)t]$ , ou seja, o dobro da frequência  $2\nu$ . O terceiro termo  $\beta x^3$  vai gerar o triplo da frequência, conhecido como geração de terceiro-harmônico (THG) (PELEGATI et al., 2012). De modo geral, termos com  $x^n$  geram o enésimo harmônico da frequência incidente, que podem ser difíceis de detectar porque são termos cada vez menores.

**Consequência do SHG:** O segundo harmônico, portanto, é uma emissão de luz com o dobro da frequência  $2\nu$ , ou metade do comprimento de onda  $\frac{\lambda}{2}$  do comprimento de onda da luz incidente. Um feixe em 760 nm, por exemplo, gera o segundo harmônico em 380 nm. O sinal de SHG é facilmente separado tanto do feixe de 760 nm como de fluorescências do tecido por meio de filtros dicróicos.

**Regra de seleção:** dependendo da simetria do material, a SHG pode ser impossibilitada. Força é o produto da massa pela aceleração, de modo que uma inversão, ou seja, trocar  $x$  por  $-x$ , ( $x \rightarrow -x$ ), troca o sinal da aceleração e, conseqüentemente, da força. Isso implica que a força é uma grandeza antissimétrica, ou seja,  $F(-x) = -F(x)$ . Em materiais com simetria de inversão nada pode mudar na troca de  $x \rightarrow -x$ , ou seja,  $F(-x) = F(x)$ , conseqüentemente  $kx - \alpha x^2 + \beta x^3 - \gamma x^4 + \dots = kx - \alpha x^2 + \beta x^3 - \gamma x^4 + \dots$ , percebemos que apenas as potências ímpares seguem a regra da antissimetria  $F(-x) = -F(x)$ , e todos os coeficientes pares  $\alpha, \gamma, \dots$  serão nulos. Nesse caso, não existirá SHG. Uma condição, portanto, para existir SHG, é que a molécula geradora não possua simetria de inversão, ou seja, molécula não quiral. Em

particular, as moléculas de colágeno não centrossimétricas são capazes de gerar um forte sinal (MERTZ; MOREAUX, 2001; COX et al., 2003a).

**Consequência da regra de seleção:** As estruturas de tecidos com simetria de inversão e organização fibrilar são raras. Os sinais de SHG mais intensos na biologia advém das hélices triplas de colágenos e de amido, e da Miosina em músculos esqueléticos e cardíacos. Portanto, a especificidade da microscopia SHG é alta, não se confundindo com outras estruturas.

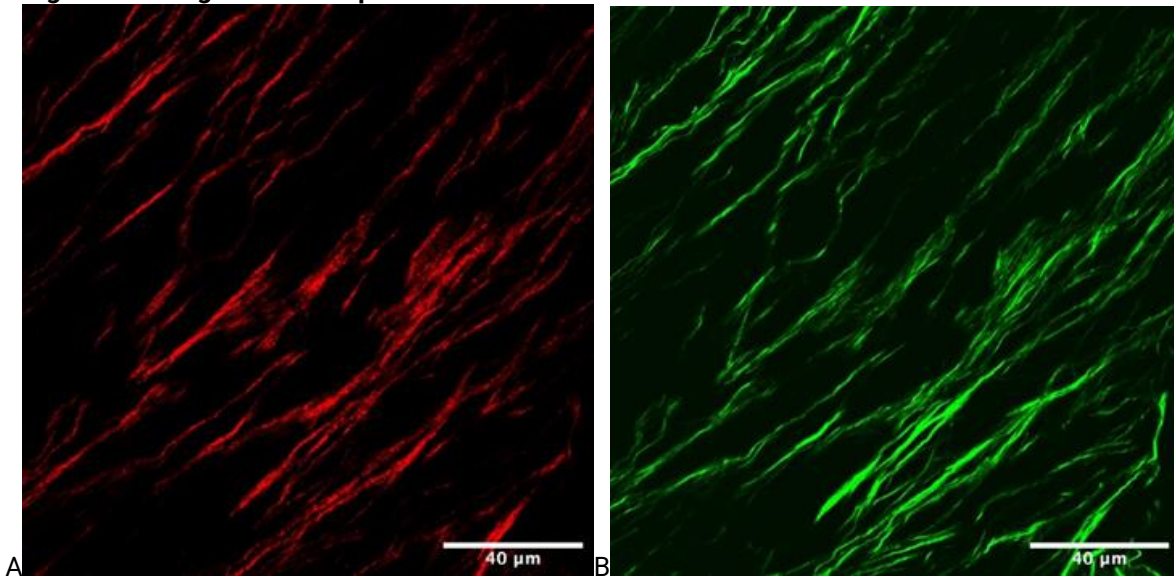
**Confocalidade do SHG:** A SHG também pode ser vista com a utilização de dois fótons incidentes com frequência  $\nu$ , e energia  $h\nu$ , gerando um fóton com frequência  $2\nu$  e o dobro da energia  $2h\nu$ , onde  $h$  é a constante de Planck. Nesse contexto, a probabilidade de que a SHG aconteça depende de dois fótons coincidindo no tempo e no espaço. Dessa forma, para conseguir a superposição dos fótons no tempo e no espaço é necessária a utilização de *lasers* pulsados, de preferência com centenas ou dezenas de femto ( $10^{-15}$ ) segundos. A coincidência espacial acontece no foco do feixe, tornando a técnica intrinsecamente confocal, ou seja, a luz só é gerada no foco do *laser*. Imagens podem, então, ser obtidas por uma varredura do *laser* em um microscópio confocal de varredura a *laser*.

**Consequência da confocalidade:** Para aquisição de imagens SHG são necessários microscópios de varredura a *laser* e *lasers* de pulso curto de femtossegundos.

**Direcionalidade da SHG:** A SHG pode ser detectada na mesma direção do feixe incidente (sinal transmitido ou *forward*), desde que a amostra seja transparente, ou na direção oposta (sinal refletido ou *backward*). Devido à coerência, o sinal transmitido é sempre mais intenso que o refletido, sendo que a razão entre as duas depende da espessura do arranjo molecular que gera a SHG. Em resumo, quanto mais espessa maior a intensidade transmitida em relação à refletida. Em condições ideais, essa razão pode ser utilizada para calcular a espessura das fibras de colágeno (Figura 1).

**Consequência da direcionalidade:** a razão transmitida/refletida na microscopia SHG é capaz de distinguir fibras de diferentes espessuras, e, em casos ideais, até calcular a sua espessura.

Figura 1 – Imagens obtidas por sinal de SHG refletido e transmitido



Fonte: Acervo dos autores.

Nota: Apresenta a direcionalidade da SHG em amostra de carcinoma de mama do tipo lobular, em (A) estão representadas as fibras de colágeno com o sinal refletido e em (B) o sinal transmitido. Note que o sinal refletido remete às fibras finas de colágeno, o que implica em uma imagem mais aerada; já o sinal transmitido é a soma das fibras finas e grossas, gerando um sinal mais intenso e visível.

**Dependência da polarização na SHG:** O sinal de SHG é maior quando a polarização da luz incidente coincide com a direção das fibrilas, e será mínimo para a polarização perpendicular ao alongamento das fibrilas. A polarização do *laser* incidente vai se perdendo em amostras altamente espalhadores, mas a variação com o ângulo entre a polarização de feixe e direção das fibrilas ainda é razoavelmente grande. Se houver o desejo apenas de obter imagens das fibrilas de colágeno, esse efeito poderá ser desprezado, mas caso se pretenda realizar uma análise quantitativa nas imagens obtidas, ele deverá ser considerado. A utilização de feixes com polarização circular, que podem ser obtidos usando placas de  $\frac{1}{4}$  de onda, evita esse efeito de polarização. O uso de tal metodologia como procedimento padrão evita muitos dos questionamentos realizados pelos revisores quando um trabalho é submetido.

**Consequência da polarização:** Para análise quantitativa, usar luz circularmente polarizada.

**Dependência do comprimento de onda na microscopia SHG:** Para microscopia por SHG, utilizam-se *lasers* com comprimentos de onda próximos ao infravermelho. Esse intervalo pode variar entre 800 nm a 1000 nm, sendo o sinal da SHG detectado entre 400 nm a 500 nm, um intervalo ideal para os microscópios comerciais. Já *lasers* abaixo de 700 nm gerariam sinais abaixo de 350 nm, que seriam eliminados pela óptica usual dos microscópios. Além disso, o comprimento de onda no infravermelho tende a ser menos absorvido e espalhado pelos materiais biológicos, causando menos fotodano e *photobleaching*. Como o espalhamento da

luz cai com  $1/\lambda^4$ , onde  $\lambda$  é o comprimento de onda, os *lasers* no infravermelho podem penetrar mais na amostra, e imagens de regiões mais profundas podem ser obtidas com a penetração, podendo chegar a 0,2 mm. A princípio, o sinal de SHG é razoavelmente insensível ao comprimento de onda, com exceção para casos em que se atinge uma ressonância com algum nível eletrônico molecular, logo qualquer comprimento poderia ser utilizado para aquisição de imagens SHG. Entretanto, na grande maioria das vezes, a microscopia SHG é realizada simultaneamente com microscopia multifóton, pois o equipamento é o mesmo, e dois filtros ópticos separam os sinais de SHG da fluorescência. Na fluorescência o comprimento de onda de excitação é fundamental. Dessa forma, *lasers* sintonizáveis agregam muito valor às microscopias de óptica não linear em geral, e SHG em particular.

**Consequência da dependência do comprimento de onda na microscopia SHG:** Além da utilização do *laser* de femtossegundos, é preciso que o seu comprimento de onda, de preferência em *lasers* sintonizáveis, caia no intervalo de 720 nm até 1600 nm, para que o sinal de SHG caia no intervalo de 360 nm até 800 nm, compatível com a óptica e detetores dos microscópios confocais comerciais. Fora desse intervalo, apenas sistemas customizados, caros e trabalhosos permitiriam aquisição de imagens SHG.

**Dependência da potência/intensidade média, potência/intensidade de pico com a duração do pulso e taxa de repetição do laser:**

Potência  $P$  é definida como energia por unidade de tempo e a intensidade  $I$  como potência por unidade de área, sendo, portanto, muito maior no foco do feixe onde a área é menor. Vamos denotar  $P_p, I_p$  como a potência, e intensidade de pico e  $P_m, I_m$  como potência e intensidade médias, e analisar a relação entre elas com a duração do pulso e a taxa de repetição. O sinal de SHG depende do quadrado da intensidade de pico,

$I_p^2 = P_p^2 / A$ , já os danos térmicos na amostra dependem da intensidade média  $I_m$ . Um *laser*

pulsado emite pulsos com duração temporal  $\tau$  que são repetidos a cada  $\tau_{rep}$ . A taxa

(frequência) de repetição é dada por  $\nu_{rep} = \frac{1}{\tau_{rep}}$ . A energia de um único pulso é dada por

$E_{pulso} = P_p \tau$  e será a única energia emitida em  $\tau_{rep}$ , no intervalo entre um pulso e o próximo.

Nesse caso, a potência média será  $P_m = \frac{E_{pulso}}{\tau_{rep}} = \left( \frac{\tau}{\tau_{rep}} \right) P_p$ .

Para ter uma ideia do quanto isso representa, vamos considerar um *laser* de Titânio:

Safira, com duração do pulso de 100 femtossegundos ( $\tau = 100 \times 10^{-15} s$ ) e taxa de repetição de  $\nu_{rep} = 100 MHz$ , ou tempo de repetição de 10 nanossegundos ( $\tau_{rep} = 10 \times 10^{-9} s$ ). A potência de

pico será de  $P_p = \left( \frac{\tau_{rep}}{\tau} \right) P_m = 10^5 P_m$ . Ou seja, para 10 mW de potência média, a potência de pico será de 100 W. Assim, percebe-se o quanto um feixe de apenas 10 mW, pouco capaz de gerar danos térmicos, tem uma potência de pico de 100 W. A intensidade vai depender do grau de focalização, mas uma comparação interessante é notar que *lasers* com 100 W são utilizados para cortar aço. Apesar da altíssima potência de pico, o dano à amostra é bem pequeno porque a potência média e energia do pulso são muito pequenas. Por isso usar pulsos de nanossegundos em lugar de femtossegundos significará maior potencial de dano à amostra.

**Resumo das propriedades gerais da microscopia SHG:** Em resumo, a microscopia SHG é um processo com muitos benefícios para a microscopia. Primeiro, como o procedimento é intrinsecamente confocal, a técnica permite reconstruir imagens em 3 dimensões com alta resolução. Além disso, dispensa a utilização de marcadores exógenos, não interferindo na observação do processo celular, que também significa pouco manuseio da amostra e possibilidade de observações *in vivo*. O contraste tende a ser muito maior do que o das outras microscopias de óptica linear. Pode ser realizado em cortes de 50 a 100 microns de espessura, bem maiores do que os 5 microns usuais das lâminas de patologia. Isso permite a reconstrução tridimensional das fibras, lembrando que os cortes histológicos na patologia não são feitos seguindo a direcionalidade das fibras de colágeno. Cortes pouco espessos tendem a mostrar fibras que terminam repentinamente porque sua continuidade está fora do plano de corte na terceira dimensão.



## ONDE SERÁ FEITO?

A microscopia por SHG é usada para investigar a orientação das fibras de colágeno e suas alterações ou remodelamentos em vários tecidos, e durante diferentes tempos dos processos fisiológicos e patológicos. Em especial, nas neoplasias, o conteúdo e a distribuição das fibras de colágeno são profundamente modificados, isto provoca alterações nas propriedades biológicas das células tumorais, incluindo mutações gênicas, fatores de transcrição, vias de transdução de sinais e receptores.

As imagens obtidas destacam a morfologia e mudanças na estrutura do colágeno, que indicam estados específicos da doença. Nesse contexto, podem ser observados indicadores da remodelação do colágeno no estroma tumoral, que por sua vez desempenha papel fundamental na compressão do processo de invasão neoplásica, bem como avaliação da metástase.



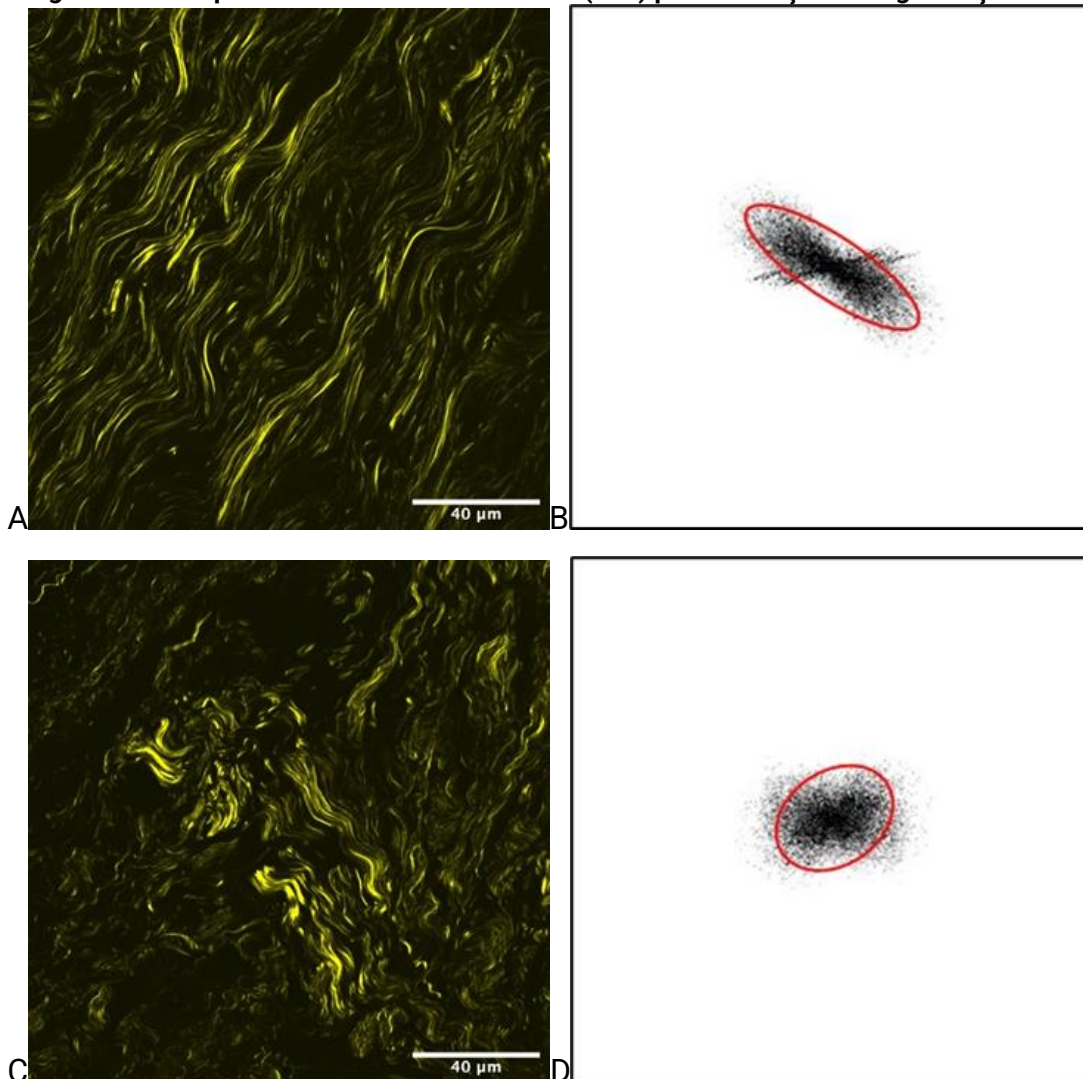
## QUANDO SERÁ FEITO?

Recentemente, a microscopia por SHG foi aplicada com sucesso ao estudo de muitos tipos de câncer, mama (PROVENZANO et al., 2006), esôfago (CHEN et al., 2014; XU et al., 2017), pâncreas (DRIFKA et al., 2015), cólon (ZHUO et al., 2012; XIA et al., 2017; MAIER et al., 2021), etc. Aliado a isso, recursos de avaliação de imagens permitem avaliar a orientação, agrupamento e textura das fibras de colágeno. Dessa forma, novas informações sobre a disposição do colágeno, bem como sua interação com as células neoplásicas foram elucidadas, e novas fronteiras do conhecimento foram alcançadas.

Diferentes métodos de análise de imagem são utilizados para obter informações sobre a estrutura de colágeno e sua relação com as células tumorais (ADUR et al., 2014b). Alguns desses métodos são implementáveis com o uso do *software* grátis ImageJ - NIH, Bethesda, Maryland, Estados Unidos da América (EUA). Nesses casos, a análise pode ser feita baseada nos níveis moleculares e supramoleculares. No primeiro caso, a anisotropia de polarização da SHG e a relação dos sinais transmitidos e refletidos são metodologias mais poderosas para determinar a organização molecular do colágeno. No entanto, os métodos orientados para a análise supramolecular (escala arquitetural) são mais precisos para avaliar a organização das fibras, formação de feixes, comprimento das fibras, distância entre as fibras, entre outros aspectos. Esta análise é a mais utilizada para interpretar as imagens obtidas a partir dos espécimes de neoplasia.

Por outro lado, a transformação rápida de Fourier - *Fast Fourier Transform* (FFT) provou ser um bom método para atribuir o grau de organização das fibras de colágeno. A organização das fibras de colágeno pode ser calculada realizando um ajuste elíptico nas imagens FFT e traçando a razão entre o maior e o menor eixo dessa elipse, conhecido como razão de aspecto (AR). Valor próximo a 1 indica uma amostra mais anisotrópica, isto é, com fibras de colágeno alinhadas em diversos ângulos. Por outro lado, valor próximo a 0, amostra mais isotrópica, com as fibras alinhadas em um mesmo ângulo (Figura 2).

Figura 2 - Exemplos de *Fast Fourier Transform* (FFT) para avaliação da organização do colágeno



Fonte: Acervo dos autores.

Nota: As imagens (A) e (C) representam as fibras de colágeno de amostras distintas de carcinoma do tipo não-especial de mama, observando que em (A) as fibras são paralelas e com mesma direção, ou seja, organizadas, enquanto em (C) as fibras possuem múltiplas direções. A figura (B) representa a TRF da imagem (A). Observa-se a formação de uma elipse onde a razão de aspecto (AR) é igual a 0,22, enquanto em (D), TRF da imagem (C), apresenta um AR igual a 0,59. Como o AR da imagem (A) é menor que o da imagem (C), observa-se que em (A) as fibras de colágeno são mais organizadas quando comparadas à imagem (C).

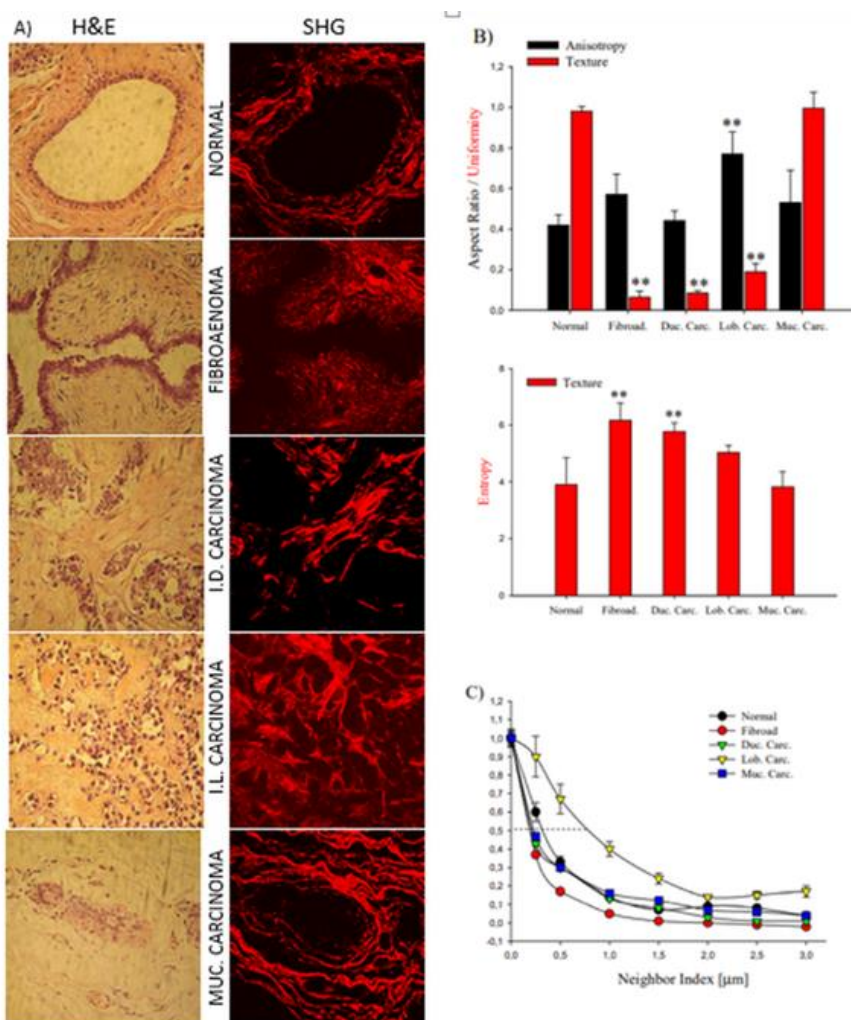
A matriz de coocorrência de nível de cinza ou *gray level co-occurrence matrix* (GLCM) permite a classificação de diferentes tecidos com base na avaliação do arranjo geométrico do colágeno. Dessa forma, fornece informações sobre as relações espaciais entre os valores de intensidade do *pixel* numa determinada imagem. A análise de GLCM pode ser realizada por diferentes métodos, comumente classificados como métodos de contraste, de ordenação e estatísticos. Os de ordenação são particularmente aplicáveis a imagens contendo estruturas fibrilares e podem ser empregados para fornecer uma medição quantitativa da orientação mútua dos feixes de fibras de colágeno. Portanto, se avaliar o parâmetro energia,



sendo esta a raiz quadrada da soma dos valores do *pixel* no GLCM, valores mais baixos indicam menor homogeneidade, isto é, maior variação na espessura dos feixes de colágeno.

Em adição, os métodos estatísticos são baseados na análise estatística da dependência do valor do *pixel*. Esta avaliação pode ser usada para determinar a repetição de um certo padrão em uma imagem. Entre os métodos, a correlação provavelmente representa a abordagem mais poderosa, uma vez que valores altos indicam repetição de um mesmo padrão de fibra de colágeno depositada no tecido (Figura 3).

**Figura 3 - Análise de textura para diversos subtipos histológicos de câncer de mama**



**Fonte:** Extraído e adaptado de Adur et. al (2012b).

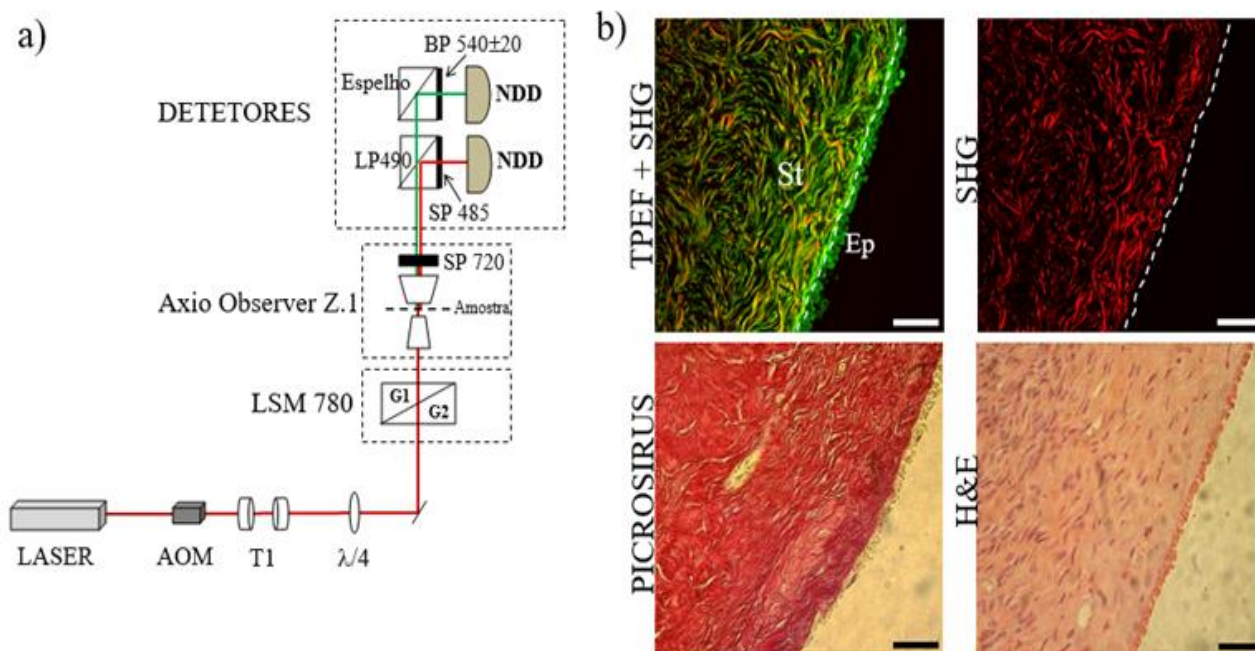
**Nota:** (A) Imagens representativas de cortes histológicos corados com hematoxilina-eosina e SHG (vermelho) de tecidos mamários diagnosticados como normais (primeira linha), fibroadenoma (segunda linha), carcinoma do tipo não especial (terceira linha), carcinoma lobular invasivo (quarta linha) e carcinoma mucinoso (quinta linha). As quantificações TRF e GLCM foram feitas nas imagens de SHG em quatro regiões de interesse de formato quadrado ( $200 \times 200 \text{ pixels}$ ). (B) Barras pretas representam TRF e barras vermelhas representam medições GLCM, respectivamente. Os asteriscos indicam um aumento ou diminuição muito significativo(a) em comparação com os tecidos não tumorais (t-teste,  $p = 0,01$ ). (C) Valores de relação de correlação em tecidos mamários versus distância de *pixels*; a correlação para distâncias que variam de 1 a 12 *pixels* ( $0,25$  a  $3,0 \mu\text{m}$ ) na direção horizontal de  $101 \times 101 \text{ pixels}$  de ROI de interesse foi calculada. Linha pontilhada = Valor Corr50. Fibroad.: fibroadenoma; Duc. Carc.: carcinoma do tipo não especial; Lob. Carc.: carcinoma lobular; e Muc. Carc.: Carcinoma mucinoso.

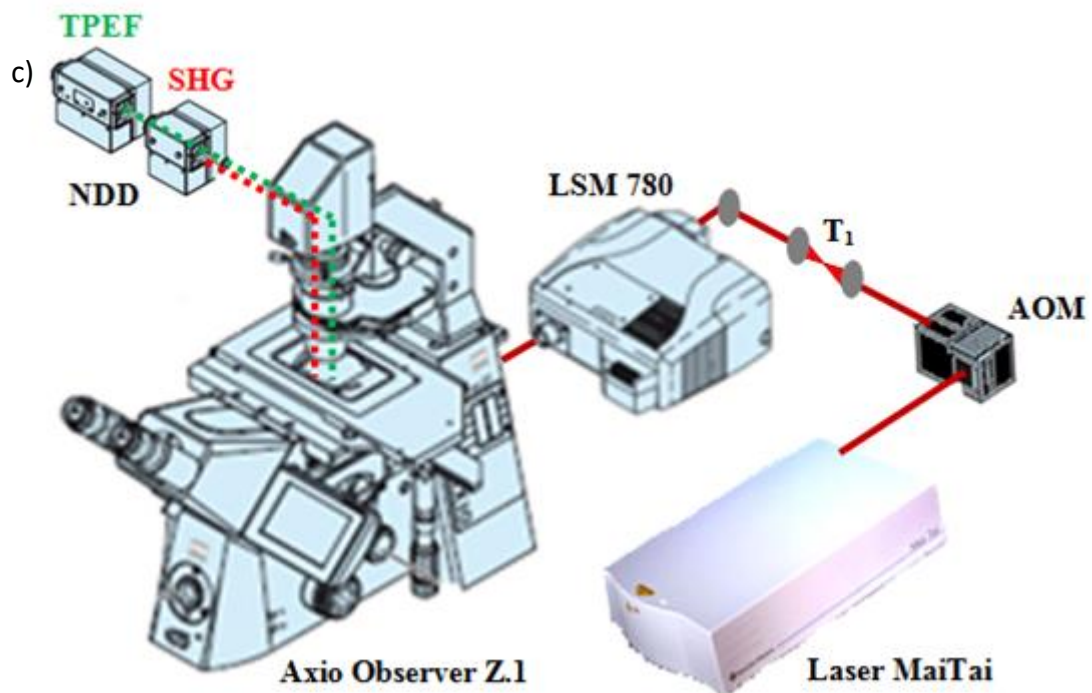


## POR QUEM/COM O QUE SERÁ FEITO?

Os principais requisitos técnicos para microscopia por SHG são semelhantes aos de outro tipo de microscopia não linear, e incluem: microscópio de varredura a *laser*, *laser* de femtossegundos com comprimento de onda próximo ao infravermelho e elementos ópticos, e detectores adequados para faixa visível - infravermelho (Figura 4). As fontes de excitação mais comumente usadas são os *lasers* de Titânio-Safira (Ti:S) ou Neodímio-YAG (Nd: YAG) pulsados, com uma duração de pulso de 100 a 200 fs, embora *lasers* de nanossegundos também tenham sido usados (GEORGIU et al., 2000). Ti:S tem a vantagem de ser sintonizável no intervalo de 680 nm até 1060 nm, com o sinal de SHG caindo no intervalo de 340 nm até 530 nm. Para evitar problemas com a óptica opaca dos microscópios abaixo de 350 nm, é melhor usá-lo acima de 700 nm. Já o *laser* de Nd:YAG só opera em 1064 nm, logo o sinal SHG será em 532 nm. Recentemente, apareceram comercialmente sistemas *lasers* de femtossegundos, sintonizáveis de 680 nm até 1300 nm.

Figura 4 - Exemplo de plataforma microscópica para realização de microscopia por SHG





**Fonte:** Adur et al. (2014c).

**Nota:** (A) Configuração experimental para microscopia TPEF e SHG com base em um microscópio invertido *Axio Observer Z.1* e cabeça de varredura confocal *LSM 780-NLO* (Carl Zeiss), AOM: modulador óptico acústico, T1: telescópio,  $\lambda/4$ : placa de um quarto de onda, G1 / G2: espelhos do galvanômetro, SP: filtro passa-baixo, BP: filtro passa-banda, LP: filtro passa-alto, NDD: Detector não descanizado. O SHG (linhas vermelhas) e TPEF (linhas verdes) são coletados em uma configuração de luz transmitida. (B) Imagens representativas de TPEF e SHG obtidas com a configuração mostrada em (A). As imagens abaixo mostram cortes seriados de *picrosirius* corados para corroboração de colágeno e amostra hematoxilina-eosina utilizada para o diagnóstico. St: estroma, Ep: epitélio, interface estroma/epitélio, que é indicado com contorno branco. Escala 20  $\mu\text{m}$ . (C) Visão real do equipamento.



## QUANTO TEM SIDO USADO NA PESQUISA?

No câncer de mama, por exemplo, foram descritas três formas de deposição de fibras de colágeno, conhecidas como assinatura de colágeno associada ao tumor (TACS). No TACS-1, as fibras de colágeno são densas e depositadas ao redor do tumor, o que é indicado pelo aumento da intensidade do sinal de SHG. No TACS-2, as fibras de colágeno tendem a ser mais lineares e depositadas ao redor do tumor, indicando crescimento e aumento no volume tumoral. Finalmente, no TACS-3, as fibras de colágeno são lineares e radialmente depositadas, isto é, perpendiculares à borda tumoral, facilitando a motilidade celular e indicando um potencial de crescimento invasivo e metastático do tumor (PROVENZANO et al., 2006). Pacientes com diagnóstico de câncer de mama invasivo com fenótipo TACS-3 são associados com baixa sobrevida (CONKLIN et al., 2011).

É reconhecido que a arquitetura das fibras de colágeno pode ser fortemente influenciada por genes supressores tumorais. Por exemplo, a mutação do gene TP53 provoca uma maior deposição de fibras lineares no microambiente tumoral, alinhadas perpendicularmente às células tumorais. A justificativa é porque a inativação do p53 provoca uma intensificação da via de sinalização JAK2-STAT3, responsável por induzir a transcrição de genes associados ao colágeno (WÖRMANN et al., 2016).

Não obstante a deposição organizada de fibras lineares de colágeno, é diretamente associada com o aumento da rigidez da MEC (WEI et al., 2015; PROVENZANO, 2008). Nesse ambiente, as células tumorais adquirem fenótipo agressivo, com maior motilidade, acarretando invasão e metástase. Dessa forma, a clínica dos pacientes que possuem esse fenótipo é caracterizada por metástase precoce e sobrevida reduzida. Um dos possíveis mecanismos indica que a maior rigidez promove uma redução da expressão de proteína G3BP2, ligante citoplasmático do TWIST1. Dessa forma, como não há proteína que retém o TWIST1 no citoplasma, este fator de transcrição é deslocado para o núcleo celular, promovendo a expressão de genes relacionados à transição epitélio-mesênquima (TEM) (WEI et al., 2015). Adicionalmente, há uma redução da ativação de STAT5, levando ao aumento da fosforilação de ERK-Akt, o qual promove proliferação celular (BARCUS et al., 2017). Outro ponto importante envolve a ativação de FAK (BARCUS et al., 2013), acionando a via PI3K-Akt-mTOR, a qual altera o metabolismo celular tumoral, marcado por aumento da atividade glicolítica (MAH et al., 2018).

De forma complementar, demonstrou-se que a maior deposição de fibras lineares de colágeno estaria associada com a expressão de marcadores de TEM, tal qual a  $\alpha$ -SMA em tumores de pâncreas (DRIFKA et al., 2016), COX-2 em câncer de mama (LYONS et al., 2011; ESBONA et al., 2018), entre outros.

A microscopia de SHG não fica apenas limitada à compreensão celular, a avaliação das imagens obtidas também é capaz de distinguir tecido saudável de neoplásico em diferentes tipos de câncer. Este fato é especialmente útil na medida em que permite uma melhor detecção histológica e diagnóstico preciso. Mudanças na quantidade, organização, tamanho, linearidade das fibras de colágeno são detectáveis e viáveis para realizar tal distinção.

A relação entre as imagens transmitidas e refletidas que indicam indiretamente a relação entre fibras finas e grossas de colágeno permite diferenciar o tecido ovariano normal do neoplásico (NADIARNYKH et al., 2010). Não obstante a avaliação da textura das imagens permite identificar a evolução dessa neoplasia, mostrando diferenças entre

adenoma, carcinoma *borderline* e o próprio carcinoma invasivo, seja ele seroso ou mucinoso (ADUR et al., 2012a; ZEITOUNE et al., 2017). Interessante notar que a acurácia na distinção pode chegar até 97% (WEN et al., 2014).

De forma complementar, no melanoma, a redução da quantidade de fibras de colágeno depositadas ao longo da borda tumoral permite definir as margens cirúrgicas de exérese da lesão com a mesma acurácia que a própria coloração de hematoxilina e eosina ou a utilização de marcadores imunohistoquímicos, como o MelanA (THRASIVOULOU et al., 2011). Vale ressaltar que, como se trata de uma lesão cutânea, a microscopia pode ser feita *in vivo*, sem necessidade de retirar fragmentos e processá-los (BALU et al., 2014).

Quando comparado ao estroma mamário sem alterações neoplásicas, o carcinoma invasivo de tipo não especial apresenta maior deposição de fibras de colágeno (NATAL et al., 2018; ADUR et al., 2012b; NATAL et al., 2019). Em outras lesões mamárias, como o fibroadenoma, também apresenta maiores quantidades de colágeno do que o tecido mamário saudável (ZHENG et al., 2011; NIE et al., 2015). Essa diferença permite a distinção com até 71,4% e 84,4% de sensibilidade e especificidade, respectivamente. Outras neoplasias também apresentam diferenciação da arquitetura do colágeno quando comparadas ao tecido de origem sem a lesão, como é o caso do esôfago (CHEN et al., 2014; XU et al., 2017), pâncreas (DRIFKA et al., 2015), cólon (ZHUO et al., 2012; XIA et al., 2017; MAIER et al., 2021; ADUR et al., 2014a; BIANCHI et al., 2014; BIANCHI et al., 2013), ovário (ADUR et al., 2014c; ADUR et al., 2011), entre outros.

Embora as imagens tenham por muito tempo desempenhado um papel importante na compreensão do comportamento celular e no diagnóstico das neoplasias, hoje é possível traçar o comportamento clínico da neoplasia, isto é, seu prognóstico. Como dito anteriormente, o fenótipo TACS-3, fibras lineares de colágeno depositadas perpendicularmente à borda tumoral, definem um comportamento mais agressivo da neoplasia mamária, com maior taxa de recorrência e progressão, reduzindo a sobrevivência dos pacientes (CONKLIN et al., 2011; CONKLIN et al., 2018). Não é exclusividade do câncer de mama essa mesma descrição de deposição, também está envolvida com o pior prognóstico nos casos de carcinoma pancreático (DRIFKA et al., 2016) e carcinoma urotelial (BROOKS et al., 2016). Outros modelos mais complexos baseados na estrutura das fibras de colágeno permitem prever o risco de metástase peritoneal (CHEN et al., 2021) e acometimento linfonodal (CHEN et al., 2019) do carcinoma gástrico.

A maior deposição de colágeno, bem como a organização em formas de bandas, isto é, estruturas mais espessas de colágeno, são associadas ao pior prognóstico

nos pacientes com câncer gástrico (ZHOU et al., 2017) e de vulva (CASTOR et al., 2020). De forma adicional, essa maior deposição também está associada a neoplasias de alto grau histológico, isto é, elevado pleomorfismo nuclear e indiferenciação celular, como é o caso do carcinoma hepatocelular (LIN et al., 2018) e carcinoma de células claras renais (BEST et al., 2019).

Em linhas gerais, é possível inferir que a maior deposição de fibras lineares de colágeno depositadas ao longo das bordas tumorais, não só enrijece a MEC, como também promove sinalização celular compatível com o aumento da invasão e metástase. Dessa forma, não é estranho observar a existência de associação com características histológicas mais agressivas, bem como prognóstico mais reservado. Vale pontuar que isso é especialmente válido para neoplasias de origem epitelial, uma vez que aquelas de origem não epitelial apresentam outras formas de deposição de colágeno e associações. Um exemplo interessante é o glioblastoma multiforme, uma vez que a maior deposição organizada de fibras lineares de colágeno se associou com melhor prognóstico (POINTER et al., 2017).

Atualmente, a microscopia de SHG é amplamente utilizada na oncologia, de um lado para desvendar a relação entre as diferentes estruturas de colágeno e o comportamento celular, do outro para traçar novas formas de diagnóstico de precisão e indicação de prognóstico. Portanto, a integração de estudos em neoplasias e MEC são altamente vantajosos por gerar imagens complementares para compreensão dos processos fisiopatológicos e clínicos. Como as técnicas microscópicas fornecem informações topográficas, aliadas às características biológicas dos componentes tumorais, elas representam ferramentas importantes para uma compreensão mais completa das neoplasias.

## REFERÊNCIAS

ABEDIN, Monika; KING, Nicole. Diverse evolutionary paths to cell adhesion. **Trends in Cell Biology**, v. 20, n. 12, p. 734-742, Dec. 2010.

ADUR, Javier *et al.* Colon adenocarcinoma diagnosis in human samples by multicontrast nonlinear optical microscopy of hematoxylin and eosin stained histological sections. **Journal of Cancer Therapy**, v. 5, p. 1259-1269, Nov. 2014a.

ADUR, J. *et al.* Multimodal and non-linear optical microscopy applications in reproductive biology. **Microscopy Research & Technique**, v. 79, p. 567-582, 2016.

ADUR, Javier *et al.* Nonlinear optical microscopy signal processing strategies in cancer. **Cancer Informatics**, v. 13, p. 67-76, Apr. 2014b.

ADUR, Javier *et al.* Optical biomarkers of serous and mucinous human ovarian tumor assessed with nonlinear optics microscopies. **PLoS One**, v. 7, n. 10, p. 1-13, Oct. 2012a.

ADUR, Javier F. *et al.* Quantitative changes in human epithelial cancers and osteogenesis imperfecta disease detected using nonlinear multicontrast microscopy. **Journal of Biomedical Optics**, v. 17, n. 8, p. 1-10, Aug. 2012b.

ADUR, Javier *et al.* Recognition of serous ovarian tumors in human samples by multimodal nonlinear optical microscopy. **Journal of Biomedical Optics**, v. 16, n. 9, p. 1-10, Sept. 2011.

ADUR, Javier *et al.* Second harmonic generation microscopy as a powerful diagnostic imaging modality for human ovarian cancer. **Journal of Biophotonics**, v. 7, n. 1-2, p. 37-48, Jan. 2014c.

BALU, Michaela *et al.* Distinguishing between benign and malignant melanocytic nevi by in vivo multiphoton microscopy. **Cancer Research**, v. 74, n. 10, p. 2688-2697, May 2014.

BARCUS, Craig E. *et al.* Elevated collagen-I augments tumor progressive signals, intravasation and metastasis of prolactin-induced estrogen receptor alpha positive mammary tumor cells. **Breast Cancer Research**, v. 19, n. 9, p. 1-13, 2017.

BARCUS, Craig E. *et al.* Stiff collagen matrices increase tumorigenic prolactin signaling in breast cancer cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 288, n. 18, p. 12722-12732, May 2013.

BEST, Sara L. *et al.* Collagen organization of renal cell carcinoma differs between low and high grade tumors. **BMC Cancer**, v. 19, n. 490, p. 1-8, 2019.

BIANCHI, Mariana *et al.* Endothelin-2 differential expression in normal and early-stages of colon cancer development. **Journal of Cancer Therapy**, v. 4, n. 6B, p. 26-33, July 2013.

BIANCHI, Mariana *et al.* Mouse colorectal cancer an early detection approach using nonlinear microscopy. **Bio-Medical Materials and Engineering**, v. 24, p. 3419-3426, 2014.

BROOKS, Michael *et al.* Positive association of collagen type I with non-muscle invasive bladder cancer progression. **Oncotarget**, v. 7, p. 82609-82619, Sept. 2016.

CAMPAGNOLA, Paul J. *et al.* Three-dimensional high-resolution second-harmonic generation imaging of endogenous structural proteins in biological tissues. **Biophysical Journal**, v. 82, n. 1, 493-508, Jan. 2002.

CASTOR, Maria das Graças de Fátima Cavalcanti *et al.* Study on collagen parameters in vulvar cancer and preneoplastic lesions by second harmonic generation microscopy. **Scientific Reports**, v. 10, n. 5568, p. 1-8, 2020.

CHEN, Dexin *et al.* Association of the collagen signature in the tumor microenvironment with lymph node metastasis in early gastric cancer. **JAMA Surgery**, v. 154, n. 3, p. 1-9, Jan. 2019.

CHEN, Dexin *et al.* Predicting postoperative peritoneal metastasis in gastric cancer with serosal invasion using a collagen nomogram. **Nature Communications**, v. 12, n. 179, p. 1-11, 2021.

CHEN, W. S. *et al.* Multiphoton microscopic imaging of human normal and cancerous oesophagus tissue. **Journal of Microscopy**, v. 253, n. 1, p. 79-82, 2014.

CONKLIN, Mathew W. *et al.* Aligned collagen is a prognostic signature for survival in human breast carcinoma. **The American Journal of Pathology**, v. 178, n. 3, p. 1221-1232, Mar. 2011.

CONKLIN, Mathew W. *et al.* Collagen alignment as a predictor of recurrence after ductal carcinoma in situ. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, v. 27, n. 2, p. 138-145, Feb. 2018.

COX, Guy C. *et al.* Characterization of the second harmonic signal from collagen. *In*: PERIASAMY, Ammasi; SO, Peter T. C. (ed.). **Multiphoton microscopy in the biomedical sciences III**. [S.l.]: SPIE, 2003a.

COX, Guy *et al.* 3-Dimensional imaging of collagen using second harmonic generation. **Journal of Structural Biology**, v. 141, n. 1, p. 53-62, Jan. 2003b.

COX, Guy C.; MANCONI, Frank; KABLE, Eleanor. Second harmonic imaging of collagen in mammalian tissue. *In*: PERIASAMY, Ammasi; SO, Peter T. C. (ed.). **Multiphoton microscopy in the biomedical sciences II**. [S.l.]: SPIE, 2002. p. 148-156. (Proceedings, 4620).

DISCHER, Dennis E. *et al.* Matrix mechanosensing: from scaling concepts in 'omics data to mechanisms in the nucleus, regeneration, and cancer. **Annual Review of Biophysics**, v. 46, p. 295-315, 2017.

DRIFKA, Cole R. *et al.* Highly aligned stromal collagen is a negative prognostic factor following pancreatic ductal adenocarcinoma resection. **Oncotarget**, v. 7, p. 76197-76213, Oct. 2016.



DRIFKA, Cole R. *et al.* Periductal stromal collagen topology of pancreatic ductal adenocarcinoma differs from that of normal and chronic pancreatitis. **Modern Pathology**, v. 28, p. 1470-1480, 2015.

ENGLER, Adam J. *et al.* Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. **Cell**, v. 126, n. 4, p. 677-689, 2006.

ESBONA, Karla *et al.* The presence of Cyclooxygenase 2, tumor-associated macrophages, and collagen alignment as prognostic markers for invasive breast carcinoma patients. **The American Journal of Pathology**, v. 188, n. 3, p. 559-573, Mar. 2018.

FRANTZ, Christian; STEWART, Kathleen M.; WEAVER, Valerie M. The extracellular matrix at a glance. **Journal of Cell Science**, v. 123, n. 24, p. 4195-4200, 2010.

FREUND, Isaac; DEUTSCH, Moshe; SPRECHER, Aaron. Connective tissue polarity: optical second-harmonic microscopy, crossed-beam summation, and small-angle scattering in rat-tail tendon. **Biophysical Journal**, v. 50, p. 693-712, Oct. 1986.

GEORGIU, E. *et al.* Second and third optical harmonic generation in type I collagen, by nanosecond laser irradiation, over a broad spectral region. **Optics Communication**, v. 176, n. 1-3, p. 253-260, Mar. 2000.

LIN, Hongxin *et al.* Label-free classification of hepatocellular-carcinoma grading using second harmonic generation microscopy. **Biomedical Optics Express**, v. 9, n. 8, p. 3783-3793, 2018.

LODISH, Harvey *et al.* **Molecular cell biology**. New York: W. H. Freeman, 2000.

LYONS, Traci R. *et al.* Postpartum mammary gland involution drives progression of ductal carcinoma in situ through collagen and COX-2. **Nature Medicine**, v. 17, p. 1109-1116, 2011.

MAH, Emma J. *et al.* Collagen density modulates triple-negative breast cancer cell metabolism through adhesion-mediated contractility. **Scientific Reports**, v. 8, n. 17094, p. 1-11, Nov. 2018.

MAIER, Franz *et al.* The heterogeneous morphology of networked collagen in distal colon and rectum of mice quantified via nonlinear microscopy. **Journal of Mechanical Behaviour of Biomedical Materials**, v. 113, p. 1-13, Jan. 2021.

MERTZ, J.; MOREAUX, L. Second-harmonic generation by focused excitation of inhomogeneously distributed scatterers. **Optics Communication**, v. 196, n. 1-2, p. 325-330, Sept. 2001.

NABA, Alexandra *et al.* The matrisome: in silico definition and in vivo characterization by proteomics of normal and tumor extracellular matrices. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 11, n. 14, p. 1-18, 2012.

NADIARNYKH, Oleg *et al.* Alterations of the extracellular matrix in ovarian cancer studied by second harmonic generation imaging microscopy. **BMC Cancer**, v. 10, n. 94, p. 1-14, Mar. 2010.

NATAL, Rodrigo A. *et al.* Collagen analysis by second-harmonic generation microscopy predicts outcome of luminal breast cancer. **Tumour Biology**, v. 40, n. 4, p. 1-12, Apr. 2018.

NATAL, Rodrigo de Andrade *et al.* Exploring collagen parameters in pure special types of invasive breast cancer. **Scientific Reports**, v. 9, n. 7715, p. 1-11, 2019.

NIE, Y. T. *et al.* Differentiating the two main histologic categories of fibroadenoma tissue from normal breast tissue by using multiphoton microscopy. **Journal of Microscopy**, v. 258, n. 1, p. 79-85, Apr. 2015.

PELEGATI, Vitor B. *et al.* Harmonic optical microscopy and fluorescence lifetime imaging platform for multimodal imaging. **Microscopy Research & Technology**, v. 75, n. 10, p. 1383-1394, Oct. 2012.

POINTER, Kelli B. *et al.* Association of collagen architecture with glioblastoma patient survival. **Journal of Neurosurgery**, v. 126, n. 6, p. 1812-1821, June 2017.

PROVENZANO, Paolo P. *et al.* Collagen reorganization at the tumor-stromal interface facilitates local invasion. **BMC Medicine**, v. 4, n. 38, p. 1-16, 2006.

PROVENZANO, Paolo P. *et al.* Contact guidance mediated three-dimensional cell migration is regulated by Rho/ROCK-dependent matrix reorganization. **Biophysical Journal**, v. 95, n. 11, p. 5374-5384, Dec. 2008.

ROCHA-MENDOZA, Israel *et al.* Sum frequency vibrational spectroscopy: the molecular origins of the optical second-order nonlinearity of collagen. **Biophysical Journal**, v. 93, n. 12, p. 4433-4444, Dec. 2007.

THRASIVOULOU, C. *et al.* Optical delineation of human malignant melanoma using second harmonic imaging of collagen. **Biomedical Optics Express**, v. 2, n. 5, p. 1282-1295, 2011.

WEI, Spencer C. *et al.* Matrix stiffness drives epithelial-mesenchymal transition and tumour metastasis through a TWIST1-G3BP2 mechanotransduction pathway. **Nature Cell Biology**, v. 17, p. 678-688, 2015.

WEN, Bruce L. *et al.* Texture analysis applied to second harmonic generation image data for ovarian cancer classification. **Journal of Biomedical Optics**, v. 19, n. 9, p. 1-6, Sept. 2014.

WHATCOTT, Clifford J. *et al.* Desmoplasia in primary tumors and metastatic lesions of pancreatic cancer. **Clinical Cancer Research**, v. 21, p. 3561-3568, 2015.

WÖRMANN, Sonja M. *et al.* Loss of P53 function activates JAK2-STAT3 signaling to promote pancreatic tumor growth, stroma modification, and gemcitabine resistance in mice and is associated with patient survival. **Gastroenterology**, v. 151, p. 180-193, 2016.

XIA, Guowei *et al.* Non-linear optical imaging and quantitative analysis of the pathological changes in normal and carcinomatous human colorectal muscularis. **Anatomical Pathology**, v. 49, n. 6, p. 627-632, Oct. 2017.

XU, Jian *et al.* Multiphoton microscopy for label-free identification of intramural metastasis in human esophageal squamous cell carcinoma. **Biomedical Optics Express**, v. 8, n. 7, p. 3360-3368, July 2017.

YAMAUCHI, Mitsuo *et al.* The fibrotic tumor stroma. **Journal of Clinical Investigation**, v. 128, n. 1, p. 16-25, 2018.

ZEITOUNE, Angel A. *et al.* Epithelial ovarian cancer diagnosis of second-harmonic generation images: a semiautomatic collagen fibers quantification protocol. **Cancer Informatics**, v. 16, p. 1-12, 2017.

ZHENG, Liqin *et al.* Label-free discrimination of normal and fibroadenomal breast tissues using second harmonic generation imaging. **Scanning**, v. 33, n. 4, p. 208-210, July/Aug. 2011.

ZHUO, Shuangmu *et al.* Label-free imaging of basement membranes differentiates normal, precancerous, and cancerous colonic tissues by second-harmonic generation microscopy. **PLoS One**, v. 7, n. 6, p. 1-4, June 2012.

ZHOU, Zhi-Hua *et al.* Reorganized collagen in the tumor microenvironment of gastric cancer and its association with prognosis. **Journal of Cancer**, v. 8, n. 8, p. 1466-1476, 2017.

## 3 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA EM TECIDOS VEGETAIS

Sergimar Kennedy de Paiva Pinheiro  
Marlos de Medeiros Chaves  
Anupama Ghosh  
Thaiz Batista Azevedo Rangel Miguel  
Emilio de Castro Miguel



### O QUE SERÁ FEITO?

Superfícies de amostras vegetais podem ser analisadas com maior riqueza de detalhes utilizando a microscopia eletrônica de varredura (MEV). Por meio dessa técnica é possível avaliar características como número e estrutura de estômatos em folhas e outros órgãos, cutícula de estruturas secretoras, lesões e danos nos tecidos causados por agentes contaminantes, entre outros. Além disso, a caracterização e a descrição da superfície da amostra são realizadas com mais detalhes, uma vez que a resolução do MEV é maior que a do microscópio óptico convencional.

Dessa forma, o uso do MEV é de extrema importância para o estudo e caracterização da superfície de amostras, tendo em vista a possibilidade de revelar estruturas com riqueza de detalhes e profundidade de campo incomparáveis em relação à microscopia óptica (MO).



### POR QUE SERÁ FEITO?

Essa técnica de microscopia utiliza elétrons para a formação da imagem em alta resolução, o que permite melhor caracterização do material e análise química da superfície da amostra utilizando os raios-x característicos. Tal análise é bastante útil quando o material em questão for submetido a algum composto químico ou a nanopartículas, e se desejar avaliar a quantidade desse composto na amostra. Também pode ser utilizada para análise de morfologia e composição química de superfícies.

Outra possibilidade seria utilizar o modo ambiental, muito útil para amostras biológicas que não podem passar pelo protocolo de processamento para MEV. Com esse modo de análise é possível diminuir consideravelmente danos na amostra, causados pelo

feixe de elétrons, bem como gerar imagens de alta resolução quando comparadas com a microscopia óptica (MO).

### **Princípios de funcionamento do microscópio eletrônico de varredura (MEV)**

Os olhos humanos podem atingir apenas uma resolução limitada (0,1-0,2 mm); é por isso que o microscópio óptico foi inventado. Contudo, esse equipamento é limitado pelo comprimento de onda da luz visível. De acordo com a fórmula de Abbe, resolução ( $d$ ) = comprimento de onda da luz usada ( $\lambda$ ) / 2 x abertura numérica da lente (NA). Assim, o melhor microscópio óptico não pode ter resolução superior a 200 nm devido à limitação imposta pelo comprimento de onda da luz visível (400 nm-800 nm). Após a série de descobertas relacionadas à dualidade de partícula-onda de elétrons com alta velocidade, abriu-se a possibilidade de usar um feixe de elétrons altamente acelerados como fonte de irradiação em um microscópio e o “comprimento de onda ( $\lambda_e$ )” dessa “luz”, portanto, a resolução pode ser controlada pela energia cinética aplicada. O cálculo mostra que um elétron com energia cinética de 100 keV tem  $\lambda_e = 0,004$  nm, portanto, resolução extremamente alta. Ernst Ruska e seus colaboradores inventaram o primeiro microscópio eletrônico de transmissão (MET) em 1931 e no ano de 1935 o conceito do primeiro microscópio eletrônico de varredura (MEV) foi elaborado por M. Knoll. Embora o MET tenha resolução mais alta, sua operação é cara e requer uma amostra muito fina (espessura menos de 100 nm) para que o feixe de elétrons atravessasse a amostra. Por outro lado, o MEV pode ser usado para “ver” a superfície de amostras bastante grossas (na ordem de cm) e o baixo custo de operação.

Para entender o princípio de funcionamento do MEV, é importante primeiro compreender os fenômenos que ocorrem quando um feixe altamente energético de elétrons colide com uma amostra composta de átomos. Quando um fluxo de elétrons com energia cinética muito alta atinge a superfície de uma amostra, eles sofrem colisões, ambas elásticas e não elásticas, contínuas e sucessivas com os elétrons e núcleos presentes nos átomos da amostra, perdendo energia e mudando de direção a cada colisão. A parte desses elétrons volta à superfície após sofrer várias colisões, as quais são chamadas de elétrons retroespalhados (ER). Eles possuem energia na faixa de keV e carregam as informações sobre a composição elementar, topografia e orientação cristalográfica da amostra. Os elétrons altamente energéticos do feixe até mesmo eliminam os elétrons fracamente ligados da camada mais externa dos átomos da amostra,

e esses elétrons, embora tenham uma energia muito baixa (ordem de eV), se gerados perto da superfície, saem desta. Eles são chamados de elétrons secundários (ES) e carregam principalmente as informações topográficas da amostra. O feixe de elétrons também é capaz de eliminar os elétrons fortemente ligados da camada interna do átomo. Tirar um elétron da camada interna torna o átomo instável e, para ajustar isso, um elétron da camada externa salta para dentro, emitindo certa quantidade de energia, que é transmitida como um raio-X. Como as energias desses raios-X são muito específicas, eles agem como a assinatura de um elemento e, portanto, são chamados de raios-X característicos. Embora ER, ES e raios-X característicos sejam analisados principalmente em MEV, outros fenômenos como geração raios-X contínuo, elétrons Auger e fótons na faixa visível acontecem quando um feixe de elétrons altamente energético atinge a amostra.

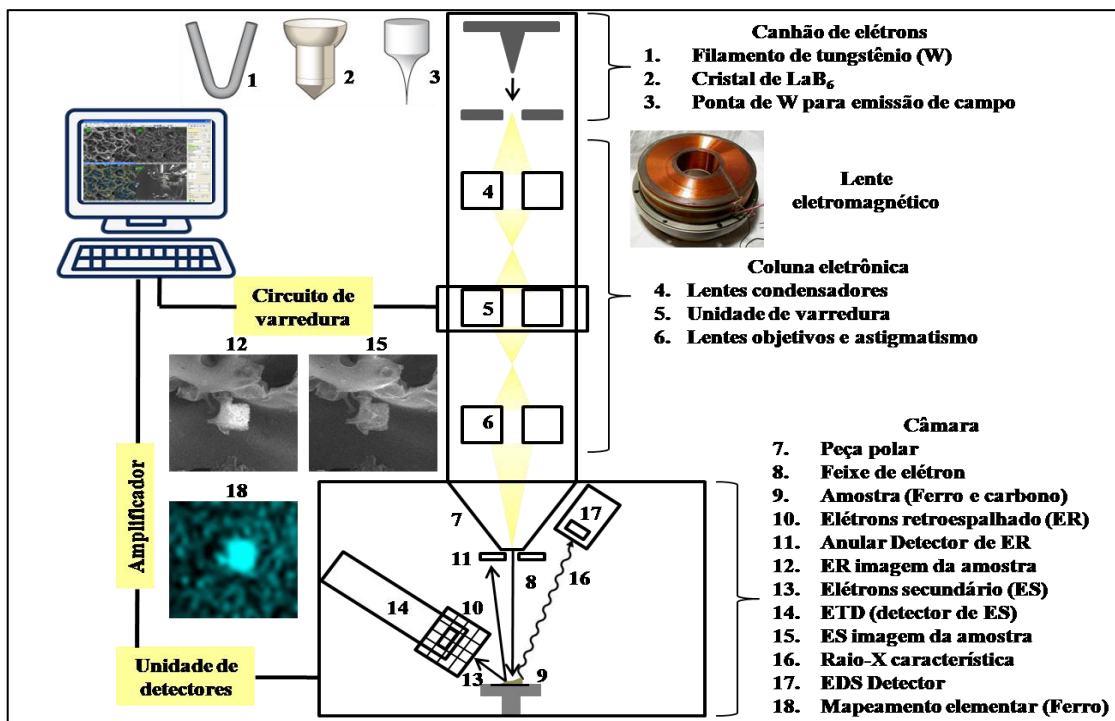
Um microscópio eletrônico é construído no mesmo princípio do microscópio óptico, apenas mudando a fonte como elétron altamente energético ao invés de luz visível, e mudando as peças ópticas compatíveis com as eletrônicas. Para ter uma fonte de elétrons monocromática e estável, são utilizadas fontes de emissão termiônica e de emissão de campo. O tungstênio (W) é usado como matéria-prima devido ao seu ponto de fusão muito alto. LaB<sub>6</sub> é outro material usado com essa finalidade por causa de seu valor de função de trabalho (a quantidade de energia necessária para ejetar um elétron da superfície do material) incomumente baixo. Posteriormente, com o advento da nanotecnologia, a ponteira de W foi fabricada com diâmetro na faixa de nm, gerando um campo elétrico muito forte na ponta, facilitando a emissão de elétrons. Uma vez gerado o fluxo estável, eles são guiados através da coluna eletrônica composta por lentes e aberturas, cujos objetivos são focalizar o feixe, bem como torná-lo o mais longe possível livre de aberrações. As lentes usadas em MEV são basicamente bobinas eletromagnéticas que podem dobrar o fluxo do feixe de elétrons com o campo eletromagnético gerado, a fim de focar ou desfocar o feixe na amostra. Além disso, uma unidade de varredura é incluída ao SEM; quem orienta o feixe focalizado para se mover no plano XY (plano da amostra). A amostra a ser analisada é colocada em uma câmara a vácuo abaixo da peça polar e os detectores são colocados dentro da câmara em várias posições, obedecendo as geometrias diferentes para captar ER, ES e raios-X característicos. A detecção de ER e ES é realizada por efeito de cintilação onde os elétrons geram sinal fotônico ou por detectores de semicondutores de estado sólido, onde a energia do elétron é transferida para gerar pares de elétrons e buracos no semicondutor, seguido pela transição desses elétrons na banda de condução, criando sinal elétrico. Os ER são altamente energéticos e podem ser

detectados diretamente, enquanto os ES precisam ser acelerados, bem como orientados com campo elétrico antes de ser detectado. Isso é feito por um detector especial, detector Everhart-Thornley (ETD), que é facilmente reconhecido por uma gaiola de metal (gaiola de Faraday) ao seu redor. Outro detector, colocado em um determinado ângulo dentro da câmara, detecta os raios-X característicos. Esses sinais são transferidos para o sistema de computação, criando uma imagem em tempo real na tela. As imagens estão em escala de cinza, com a área mais clara correspondendo a uma maior quantidade de sinais (ER ou ES) e a área mais escura correspondendo a menor quantidade de sinais. No caso do ER, esse contraste se deve à composição elementar; mais brilhante significa o elemento mais pesado e mais escuro significa o elemento mais leve, enquanto no caso do ES o contraste se deve à topografia da superfície, semelhante a uma fotografia tirada em uma câmera preta e branca, apenas em escala muito menor e com grande profundidade de campo (distância acima e abaixo do plano focal em que a imagem continua focada). Na Figura 1 a seguir, um diagrama esquemático de um MEV é ilustrado com a elaboração das partes básicas, bem como dos fenômenos básicos. Imagens de ER e ES de uma amostra (partículas de ferro na matriz de carbono) também são mostradas, indicando o contraste composicional e topográfico, juntamente com um mapeamento elementar (para ferro) mostrado na mesma região, que é feito usando o raio-X característico emitido pelas partículas de ferro presentes na amostra.

A funcionalidade do MEV reside principalmente em sua praticidade e versatilidade. Quase tudo, a partir de rochas, solos, tecidos animais e vegetais, metais, plásticos, papéis, dentre outros, pode ser analisado em MEV. Para melhorar a aplicabilidade, MEV adaptou alguns pré-tratamentos da amostra. Um deles é metalização, onde um revestimento muito fino (5-10 nm) e conformado de metal altamente condutor, como ouro, prata etc., é depositado na superfície da amostra, fornecendo um melhor sinal, bem como minimizando o acúmulo de carga na amostra, especialmente as não condutoras, como a rocha. Outro é a secagem de ponto crítico, onde o CO<sub>2</sub> é utilizado na liofilização de amostras úmidas, como tecidos animais e vegetais, onde a umidade é retirada da amostra sem prejudicar sua topografia. No próprio microscópio, com o tempo, vários novos recursos foram adicionados. Por exemplo, ao invés de o modo tradicional de alto vácuo (um forte vácuo é necessário na câmara MEV para os elétrons do feixe, bem como ER e ES para ser possível viajar livremente sem colidir com moléculas de ar e ionizá-lo); a microscopia pode ser feita embaixo do vácuo ou em modo ambiental com a utilização

de detectores adequados, o que permite fazer microscopia com amostra não condutora, não revestida ou amostra úmida.

Figura 1 - As partes principais de MEV e as interações principais de feixe e amostra. Imagens representativas de ER e ES de uma amostra (partículas de ferro na matriz de carbono) junto com um mapeamento elementar (para ferro)



Fonte: Elaboração dos autores.



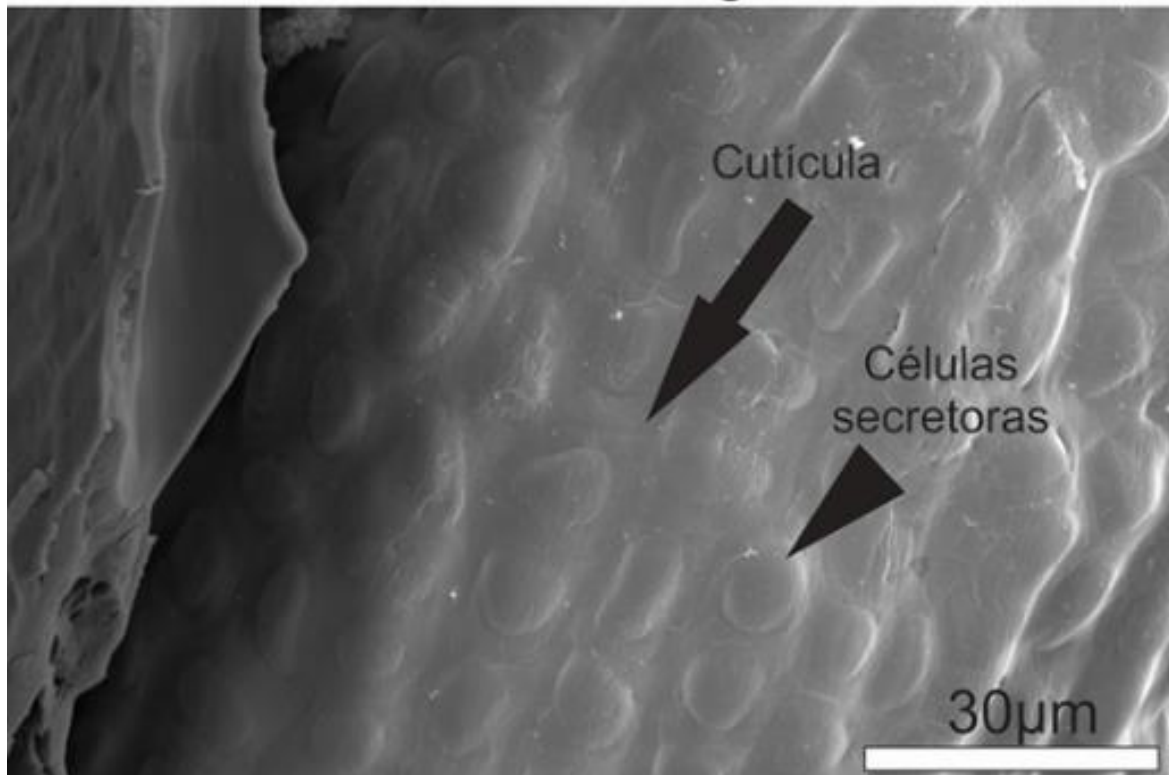
## ONDE SERÁ FEITO?

A análise MEV poderá ser realizada em qualquer tecido que possa passar pelas etapas de processamento, seja ele tecido vegetal ou animal. A imagem a seguir representa uma amostra vegetal que passou pelas etapas de processamento para MEV (Foto 1).



Foto 1 - Micrografia de estrutura secretora da espécie *M. citrifolia*

## Tecido íntegro

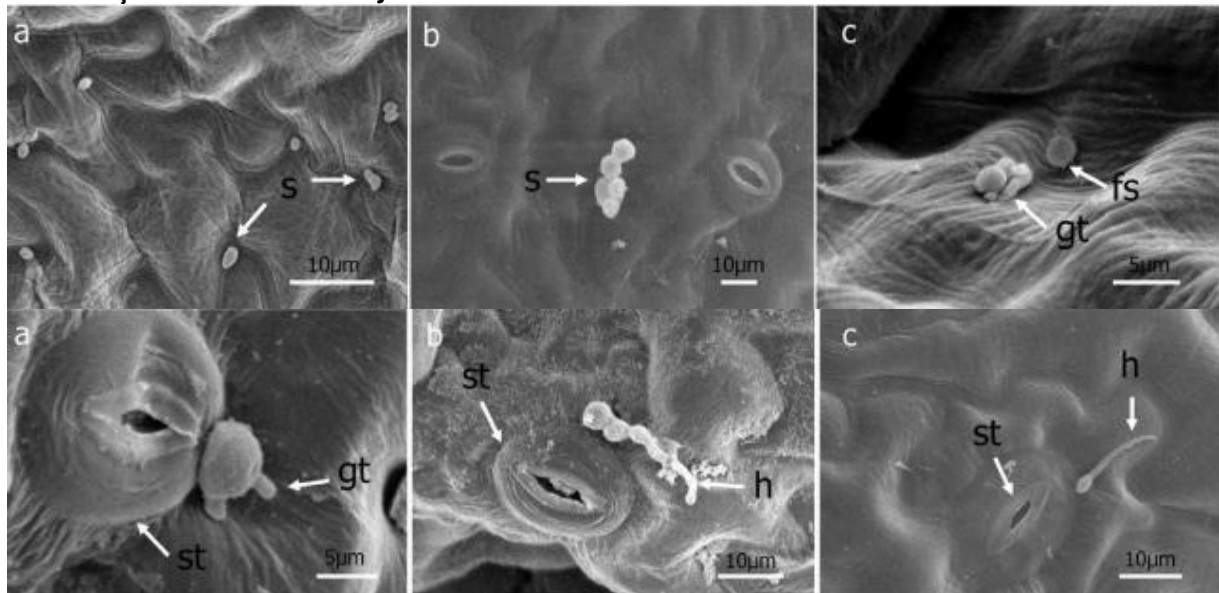


Fonte: Acervo dos autores.

A imagem acima mostra a superfície de estrutura secretora presente em estípulas de *Morinda citrifolia* L. Observa-se ótima preservação do tecido, caracterizado pela integridade da cutícula que se apresenta lisa e sem rupturas. Também é possível observar as células secretoras túrgidas, indicando que, possivelmente, não ocorreu perda do conteúdo celular. A integridade do tecido foi mantida, pois foram seguidas todas as etapas do processamento (descritas adiante).

Essa outra imagem representa o avanço de infecção causado por *Peronospora belbahrii* em folhas de manjeriço doce, desde a incubação dos esporos ao desenvolvimento das hifas (Foto 2).

Foto 2 - Micrografias eletrônicas de varredura de esporângios de *Peronospora belbahrii* logo após a inoculação em folhas de manjeriço



Fonte: Zhang et al. (2019).

## QUANDO SERÁ FEITO?

Quando se deseja caracterizar a superfície de algum tecido ou avaliar sua integridade por meio do padrão morfológico. Em amostras que foram submetidas a algum trauma, podemos observar o grau de lesão desse tecido.

Além disso, amostras que foram submetidas a substâncias tóxicas podem sofrer alterações morfológicas e danos à superfície. A análise micromorfológica da superfície da amostra fornece dados significativos em relação ao grau de toxicidade da substância a qual foi submetida. Em estudo utilizando NPsAg na concentração de 100ppm, foram observados enrugamento da superfície e menor comprimento das raízes de alface (PINHEIRO et al., 2020).



## POR QUEM/COM O QUE SERÁ FEITO?

O protocolo descrito abaixo descreve o processamento de amostras vegetais para microscopia eletrônica de varredura.

1º) Fixação do material em solução fixadora contendo glutaraldeído 2,5%, paraformaldeído 4% e tampão cacodilato de sódio  $0,05 \text{ mol L}^{-1}$  à temperatura ambiente. A fixação deve durar, no mínimo, 4 horas.

2º) Lavagem com solução tampão cacodilato de sódio  $0,05 \text{ mol L}^{-1}$  por 40 minutos.

3º) Lavagem com solução tampão cacodilato de sódio  $0,05 \text{ mol L}^{-1}$  por 40 minutos.

4º) Lavagem com solução tampão cacodilato de sódio  $0,05 \text{ mol L}^{-1}$  por 40 minutos.

5º) Desidratação em série crescente de etanol:

- a. Etanol 50% - 45 minutos.
- b. Etanol 70% - 45 minutos.
- c. Etanol 90% - 45 minutos.
- d. Etanol 100% - 45 minutos.
- e. Etanol 100% - 45 minutos.
- f. Etanol 100% - 45 minutos.

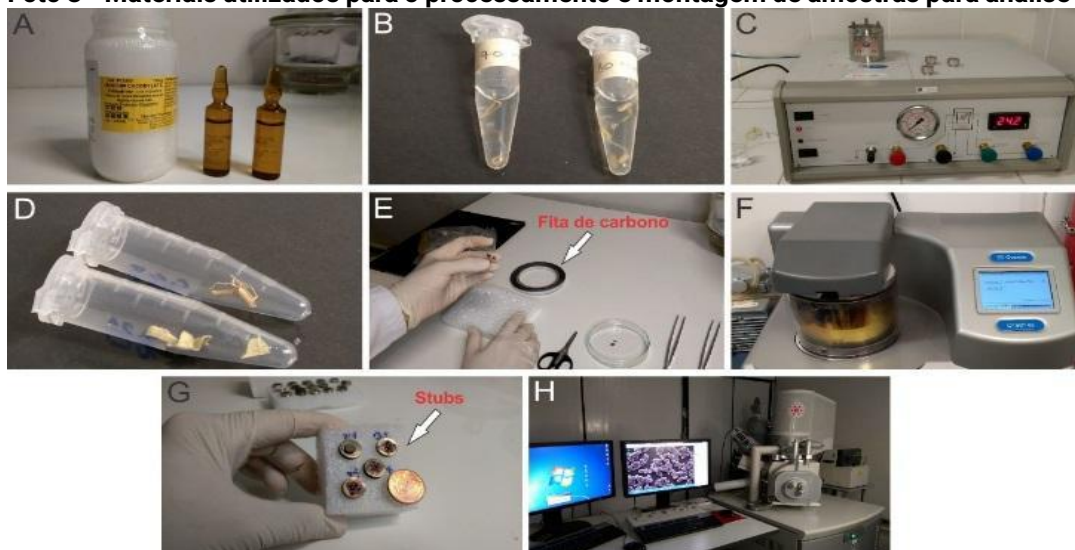
6º) Secagem do material por de ponto crítico.

7º) Montagem do material em *stubs*.

8º) Metalização.

9º) Observação em MEV.

**Foto 3 - Materiais utilizados para o processamento e montagem de amostras para análise em MEV**



**Fonte:** Acervo dos autores.

**Nota:** (A): Fixador. (B): Amostra vegetal em solução fixadora. (C): Equipamento de ponto crítico (Secagem das amostras). (D): Amostra vegetal seca. (E): Montagem do material seco. (F): Metalizadora (Metalização da amostra com ouro 20nm). (G): Amostras aderidas com fita de carbono em *stubs* (Material metalizado). (H): Microscópio eletrônico de varredura (Quanta 450 FEG).

### Cálculo para o preparo da solução fixadora:

Utilizar essa fórmula  $C_1V_1 = C_2V_2$  onde,

$C_1$  - Concentração inicial

$V_1$  - Volume inicial

$C_2$  - Concentração inicial

$V_2$  - Volume inicial

### Concentração inicial dos reagentes:

Glutaraldeído 50%

Paraformaldeído 16%

Tampão cacodilato de sódio  $0,2 \text{ mol L}^{-1}$

### Cálculo para 50 mL de solução fixadora:

Glutaraldeído	Paraformaldeído	Tampão cacodilato de sódio
$50\% \times V_1 = 2,5\% \times 50 \text{ mL}$	$16\% \times V_1 = 4\% \times 50 \text{ mL}$	$0,2 \text{ mol L}^{-1} \times V_1 = 0,05 \text{ mol L}^{-1} \times 50 \text{ mL}$
$V_1 = 2,5 \text{ mL}$	$V_1 = 12,5 \text{ mL}$	$V_1 = 12,5 \text{ mL}$

Soma de todas as soluções =  $2,5 \text{ mL} + 12,5 \text{ mL} + 12,5 \text{ mL}$

Total =  $27,5 \text{ mL}$ ; avolumar com água destilada até  $50 \text{ mL}$

Para o preparo da solução de desidratação (Etanol), seguir os cálculos descritos anteriormente. Para a fixação deve ser selecionado um fragmento pequeno (menor que  $0,5 \text{ cm}$ ). Tal fragmento deve ser imerso na solução fixadora assim que retirado do tecido original. Se possível realizar o corte do fragmento em uma gota da solução fixadora, o tempo ideal de fixação será de 8-12h.

Uma vez fixado corretamente, o material pode ser armazenado em geladeira por longos períodos. Quando for o caso, se deve verificar o nível da solução fixadora de modo que o fragmento nunca fique exposto ao ar.

A solução fixadora é preparada utilizando glutaraldeído 2,5%, paraformaldeído 4% e solução tampão cacodilato de sódio  $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ . O tampão cacodilato de sódio pode ser substituído por tampão fosfato sódico. Na etapa de desidratação, o etanol pode ser substituído por acetona.

Caso não disponha de aparelho de ponto crítico, a secagem poderá ser realizada com hexametildisilazano (HMDS) ou outros meios de secagem. Após todas as

etapas do processamento, fazer a montagem do material em *stubs*, metalizar e realizar a análise em microscópio eletrônico de varredura com detector para elétrons secundários.

**Seguem abaixo os *links* para vídeos sobre processamento e montagem das amostras para MEV:**

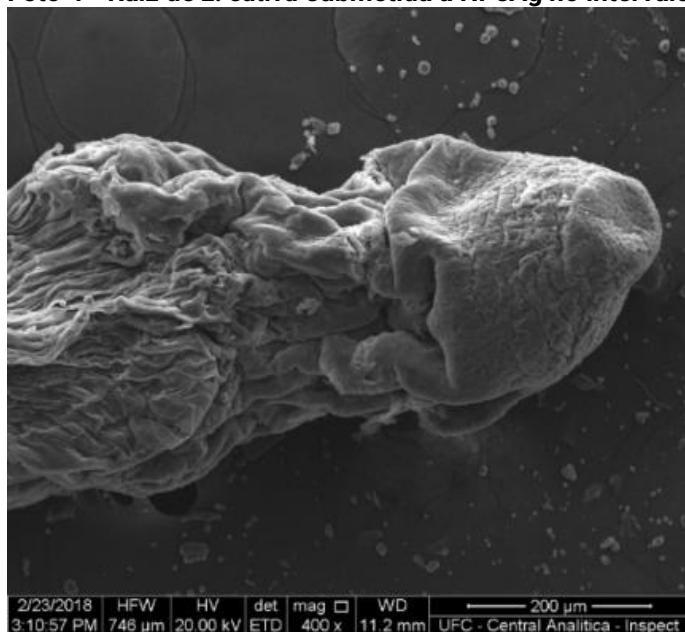
- Ponto Crítico: <https://youtu.be/GTngpJ6rx1c> (MICROSCOPIA..., 2021d).
- Montagem de amostras: <https://youtu.be/D5ikFv28hps> (MICROSCOPIA..., 2021b).
- Metalização: <https://youtu.be/aWUv1sF0mkg> (MICROSCOPIA..., 2021a).
- Operação Quanta 450 FEG: [https://youtu.be/Rq\\_Fs0DohcM](https://youtu.be/Rq_Fs0DohcM) (MICROSCOPIA..., 2021c).



## COMO SERÁ FEITO?

A Foto 4 mostra a análise morfológica da superfície da raiz de *Lactuca sativa* que passou por processamento para MEV. A análise foi realizada a partir de três amostras processadas de forma semelhante. Esse material foi submetido a nanopartículas de prata (NpsAg) na concentração de 100ppm. Tal exposição alterou a morfologia da raiz, apresentando toxicidade.

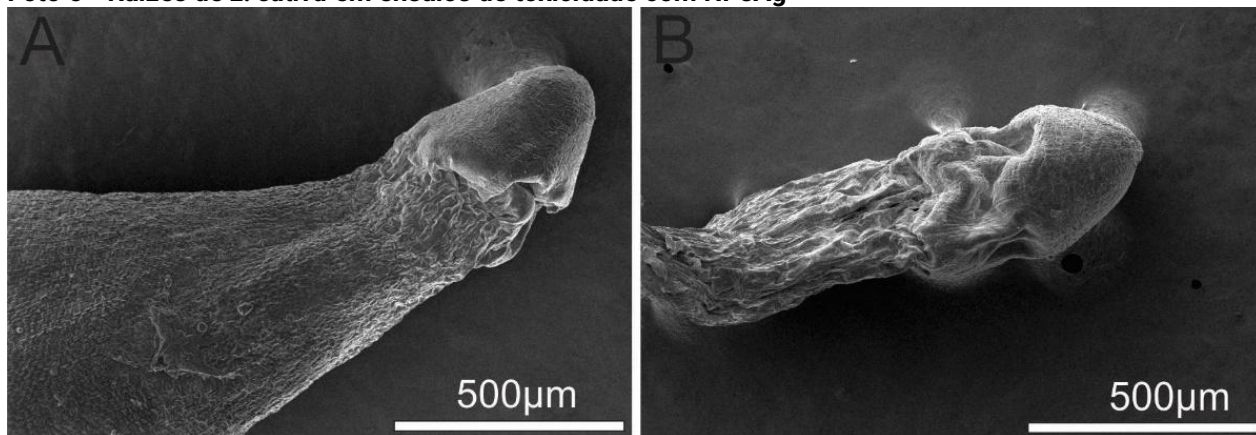
**Foto 4 - Raiz de *L. sativa* submetida a NPsAg no intervalo de 7 dias**



**Fonte:** Acervo dos autores.

A superfície exibiu acentuado enrugamento e a interação de nanopartículas com a raiz retardou seu desenvolvimento. Em ensaios de toxicidade, a comparação deve ser feita entre o grupo controle e grupo submetido a NP, no qual, de acordo com a análise de morfologia, será traçado o padrão de toxicidade (Foto 5).

**Foto 5 - Raízes de *L. sativa* em ensaios de toxicidade com NPsAg**



**Fonte:** Acervo dos autores.

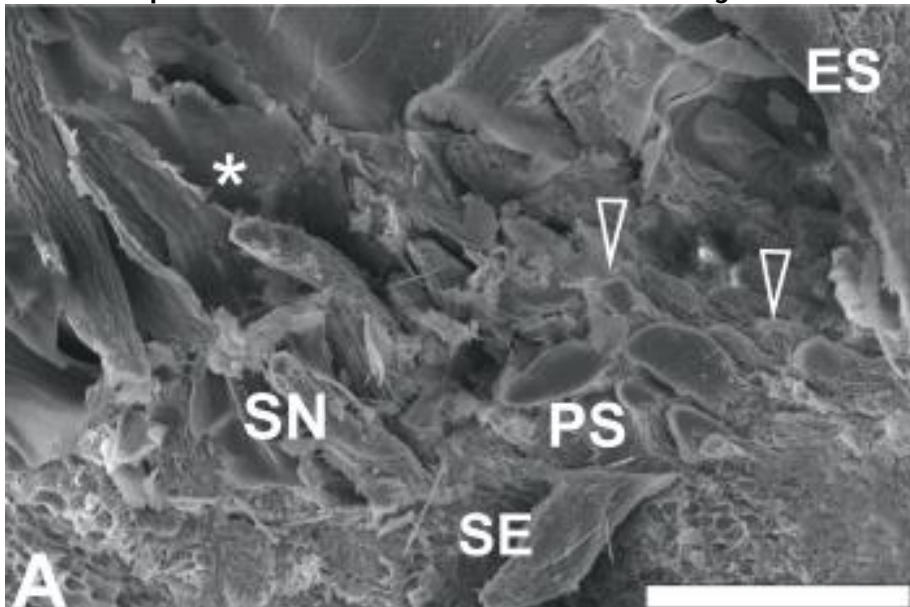
**Nota:** (A): Controle de água destilada. (B): NpsAg concentração de 100 ppm.



## QUANTO TEM SIDO USADO NA PESQUISA?

A análise de MEV tem sido utilizada em vários estudos com o objetivo de avaliar a morfologia, tamanho, e outras características da superfície, seja material de natureza vegetal ou animal. Em estudo com estrutura secretora, Pinheiro et al. (2019) descreveram o processo de ontogênese de *Morinda citrifolia* utilizando a análise MEV. A análise foi de extrema importância, pois por meio das características da superfície foi possível descrever o estágio de desenvolvimento da estrutura (Foto 6).

Foto 6 - Estípula com estrutura secretora em diferente estágio de desenvolvimento



**Fonte:** Pinheiro et al. (2019).

**Nota:** (ES): Estípula. (PS): Estágio pré-secretor. (SE): Estágio secretor. (SN): Estágio senescente.

Em estudo utilizando microscopia eletrônica de varredura foram obtidas informações sobre a morfologia e características da superfície de células vegetais de *Zhumeria majdae* e *Taxus baccata* (GOLINEJAD et al., 2020).

A microscopia eletrônica de varredura tem sido utilizada em diversas áreas para a análise morfológica e caracterização estrutural. Além disso, a técnica tem sido utilizada para avaliar o padrão morfológico de danos referentes a análises toxicológicas.

## REFERÊNCIAS

GOLINEJAD, Setareh; MIRJALILI, Mohammad Hossein. Fast and cost-effective preparation of plant cells for scanning electron microscopy (SEM) analysis. **Analytical Biochemistry**, v. 609, p. 1-6, Aug. 2020.

MICROSCOPIA eletrônica de varredura: metalização de amostras. Fortaleza: Universidade Federal do Ceará, 2021a. 1 vídeo (4min6s). Publicado pela Coordenação da Central Analítica da Universidade Federal do Ceará. O vídeo é parte do capítulo Microscopia eletrônica de varredura do e-book intitulado Técnicas e métodos de estudo em tecidos, organizado pela Professora Virgínia Cláudia Carneiro Girão Carmona do Departamento de Morfologia da Universidade Federal do Ceará. Disponível em: <https://www.youtube.com/watch?v=aWUv1sF0mkg>. Acesso em: 23 maio 2021.

MICROSCOPIA eletrônica de varredura: montagem de amostras. Fortaleza: Universidade Federal do Ceará, 2021b. 1 vídeo (3min8s). Publicado pela Coordenação da Central Analítica da Universidade Federal do Ceará. O vídeo é parte do capítulo Microscopia eletrônica de varredura do e-book intitulado Técnicas e métodos de estudo em tecidos, organizado pela Professora Virgínia Cláudia Carneiro Girão Carmona do Departamento de Morfologia da Universidade Federal do Ceará. Disponível em: <https://www.youtube.com/watch?v=D5ikFv28hps>. Acesso em: 23 maio 2021.

MICROSCOPIA eletrônica de varredura: operação quanta FEG 450. Fortaleza: Universidade Federal do Ceará, 2021c. 1 vídeo (6min45s). Publicado pela Coordenação da Central Analítica da Universidade Federal do Ceará. O vídeo é parte do capítulo Microscopia eletrônica de varredura do e-book intitulado Técnicas e métodos de estudo em tecidos, organizado pela Professora Virgínia Cláudia Carneiro Girão Carmona do Departamento de Morfologia da Universidade Federal do Ceará. Disponível em: [https://www.youtube.com/watch?v=Rq\\_Fs0DohcM](https://www.youtube.com/watch?v=Rq_Fs0DohcM). Acesso em: 23 maio 2021.

MICROSCOPIA eletrônica de varredura: ponto crítico. Fortaleza: Universidade Federal do Ceará, 2021d. 1 vídeo (4min9s). Publicado pela Coordenação da Central Analítica da Universidade Federal do Ceará. O vídeo é parte do capítulo Microscopia eletrônica de varredura do e-book intitulado Técnicas e métodos de estudo em tecidos, organizado pela Professora Virgínia Cláudia Carneiro Girão Carmona do Departamento de Morfologia da Universidade Federal do Ceará. Disponível em: <https://youtu.be/GTngpJ6rx1c>. Acesso em: 23 maio 2021.

PINHEIRO, S. K. de Paiva *et al.* Ontogenesis and secretion mechanism of *Morinda citrifolia* L. (Rubiaceae) colleters. **South African Journal of Botany**, v. 121, p. 26-33, 2019.

PINHEIRO, S. K. de Paiva *et al.* Toxic effects of silver nanoparticles on the germination and root development of lettuce (*Lactuca sativa*). **Australian Journal of Botany**, v. 68, n. 2, p. 127-136, 2020.

ZHANG, Guirong *et al.* Characterization of the infection process by *Peronospora belbahrii* on basil by scanning electron microscopy. **Heliyon**, v. 5, n. 1, p. 1-15, 2019. Disponível em: <https://www.cell.com/action/showPdf?pii=S2405-8440%2818%2935382-9>. Acesso em: 24 maio 2021.



## SUGESTÕES DE LEITURAS

DESHMUKH, Rehan *et al.* Ultrastructural changes in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) induced by a novel cyclic peptide ASP-1 from *Bacillus subtilis*: a scanning electron microscopy (SEM) study. **Revista Argentina de Microbiologia**, p. 1-6, 2021.

GOLDSTEIN, Joseph I. *et al.* **Scanning electron microscopy and x-ray microanalysis**. 4th ed. New York: Springer, 2018.

MIGUEL, E. de Castro *et al.* Colleters in *Bathysa nicholsonii* K. Schum. (Rubiaceae): ultrastructure, secretion protein composition, and antifungal activity. **Plant Biology**, v. 8, n. 5, p. 715-722, June 2006.

MIGUEL, E. C. *et al.* Ontogenesis secretion and senescence of *Tocoyena bullata* (Vell.) Mart. (Rubiaceae) colleters. **Plant Biology**, v. 18, n. 5, p. 851-858, May 2016.

MIGUEL, Emilio de Castro *et al.* Outer cell wall structure and the secretion mechanism of colleters of *Bathysa nicholsonii* K. Schum. (Rubiaceae). **Acta Botanica Brasilica**, v. 31, n. 3, p. 411-419, Sept. 2017.

MIGUEL, Emilio de Castro *et al.* Ultrastructure of secretory and senescence phase in colleters of *Bathysa gymnocarpa* and *B. stipulata* (Rubiaceae). **Revista Brasileira de Botânica**, v. 33, n. 3, p. 425-436, 2010.

MIGUEL, Emilio de Castro; MORAES, Daniel Gomes de; CUNHA, Maura da. Stipular colleters in *Psychotria nuda* (Cham. & Schltdl.) Wawra (Rubiaceae): micromorphology, anatomy and crystals microanalysis. **Acta Botanica Brasilica**, São Paulo, v. 23, n. 4, p. 1034-1039, Dec. 2009. Disponível em: [https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0102-33062009000400013](https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-33062009000400013). Acesso em: 24 maio 2021.

MIGUEL, Thaiz Batista Azevedo Rangel *et al.* Protective effect of natural and processed coconut water by non-thermal technologies against oxidative stress in brine shrimp (*Artemia salina*). **Food and Bioprocess Technology**, v. 4, p. 702-716, Jan. 2021.

MIKKELSEN, Lars P. *et al.* Scanning electron microscopy datasets for local fibre volume fraction determination in non-crimp glass-fibre reinforced composites. **Data in Brief**, v. 35, p. 1-7, Apr. 2021.

MURAVNIK, L. E.; KOSTINA, O. V.; SHAVARDA, A. L. Development, structure and secretion compounds of stipule colleters in *Pentas lanceolata* (Rubiaceae). **South African Journal of Botany**, v. 93, p. 27-36, 2014.

POMPEU, Pedro *et al.* Protocol to measure the membrane tension and bending modulus of cells using optical tweezers and scanning electron microscopy. **STAR Protocols**, v. 2, n. 1, p. 1-31, 2021. Disponível em: <https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S2666166720302707?token=C164D484E90AF8ED6721BBD3835C7ADED50460866108F3353BAF2ECA145E089CB5F97B10601D7EB7625A7623561C721A&originRegion=us-east-1&originCreation=20210524035526>. Acesso em: 24 maio 2021.

## 4 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA EM ARTEMIA SALINA

Sergimar Kennedy de Paiva Pinheiro  
Marlos de Medeiros Chaves  
Thaiz Batista Azevedo Rangel Miguel  
Anupama Ghosh  
Emilio de Castro Miguel



### O QUE SERÁ FEITO?

A análise micromorfológica de *A. salina* será realizada por microscopia eletrônica de varredura (MEV). O uso de elétrons na aquisição das imagens proporciona mais riqueza de detalhes durante a análise da superfície da amostra.

Nesse contexto, a análise por MEV consiste em uma ferramenta de extrema importância quando se deseja maior nível de detalhes morfológicos em relação à amostra estudada.



### POR QUE SERÁ FEITO?

Esta técnica permite visualizar detalhes estruturais e avaliar a superfície da amostra. Além disso, informações como rugosidade e lesão cuticular poderão ser observadas em *A. salina* com o uso da referida técnica. O gênero *Artemia* é amplamente utilizado em estudos ecotoxicológicos (NUNES et al., 2006) devido à alta adaptação às condições de laboratório, baixo custo de manutenção, curto ciclo de vida e a alta taxa de reprodução (MANFRA et al., 2014).

Devido ao uso de *A. salina* como objeto de estudo em vários ensaios toxicológicos, é de extrema importância a análise detalhada da morfologia para validação dos resultados. Além disso, a alteração anatômica dos indivíduos também pode ser avaliada com o uso dessa técnica.

### Princípios de funcionamento do microscópio eletrônico de varredura (MEV)

Os olhos humanos podem atingir apenas uma resolução limitada (0,1-0,2 mm), é por isso que o microscópio óptico foi inventado. Contudo, esse equipamento é limitado pelo comprimento de onda da luz visível. De acordo com a fórmula de Abbe, resolução ( $d$ ) = comprimento de onda da luz usada ( $\lambda$ ) / 2 x abertura numérica da lente (NA). Dessa forma, o melhor microscópio óptico não pode ter resolução superior a 200 nm devido à limitação imposta pelo comprimento de onda da luz visível (400 nm-800 nm). Após a série de descobertas relacionadas à dualidade de partícula-onda de elétrons com alta velocidade, abriu-se a possibilidade de usar um feixe de elétrons altamente acelerados como fonte de irradiação em um microscópio, e o “comprimento de onda ( $\lambda_e$ )” dessa “luz”. Portanto, a resolução pode ser controlada pela energia cinética aplicada. O cálculo mostra que um elétron com energia cinética de 100 keV tem  $\lambda_e = 0,004$  nm, representando uma resolução extremamente alta. Ernst Ruska e seus colaboradores inventaram o primeiro microscópio eletrônico de transmissão (MET) em 1931 e no ano de 1935 o conceito do primeiro microscópio eletrônico de varredura (MEV) foi elaborado por M. Knoll. Embora o MET tenha resolução mais alta, sua operação é muito cara e requer uma amostra muito fina (espessura menos de 100 nm) para que o feixe de elétrons atravessasse a amostra. Por outro lado, o MEV pode ser usado para “ver” a superfície de amostras bastante grossas (na ordem de cm) e o baixo custo de operação.

Para entender o princípio de funcionamento do MEV, é importante primeiro compreender os fenômenos que ocorrem quando um feixe altamente energético de elétrons colide com uma amostra, composta de átomos. Quando um fluxo de elétrons com energia cinética muito alta atinge a superfície de uma amostra, eles sofrem colisões, ambas elásticas e não elásticas, contínuas e sucessivas com os elétrons e núcleos presentes nos átomos da amostra, perdendo energia e mudando de direção a cada colisão. Parte desses elétrons volta à superfície após sofrer várias colisões e são chamados de elétrons retroespalhados (ER). Eles possuem energia na faixa de keV e carregam as informações sobre a composição elementar, topografia e orientação cristalográfica da amostra. Os elétrons altamente energéticos do feixe até mesmo eliminam os elétrons da camada mais externa, fracamente ligados, dos átomos da amostra e esses elétrons, embora tenham uma energia muito baixa (na ordem de eV), se gerados perto da superfície, saem dela. Eles são chamados de elétrons secundários (ES) e carregam principalmente as informações topográficas da amostra. O feixe de elétrons também é capaz de eliminar os

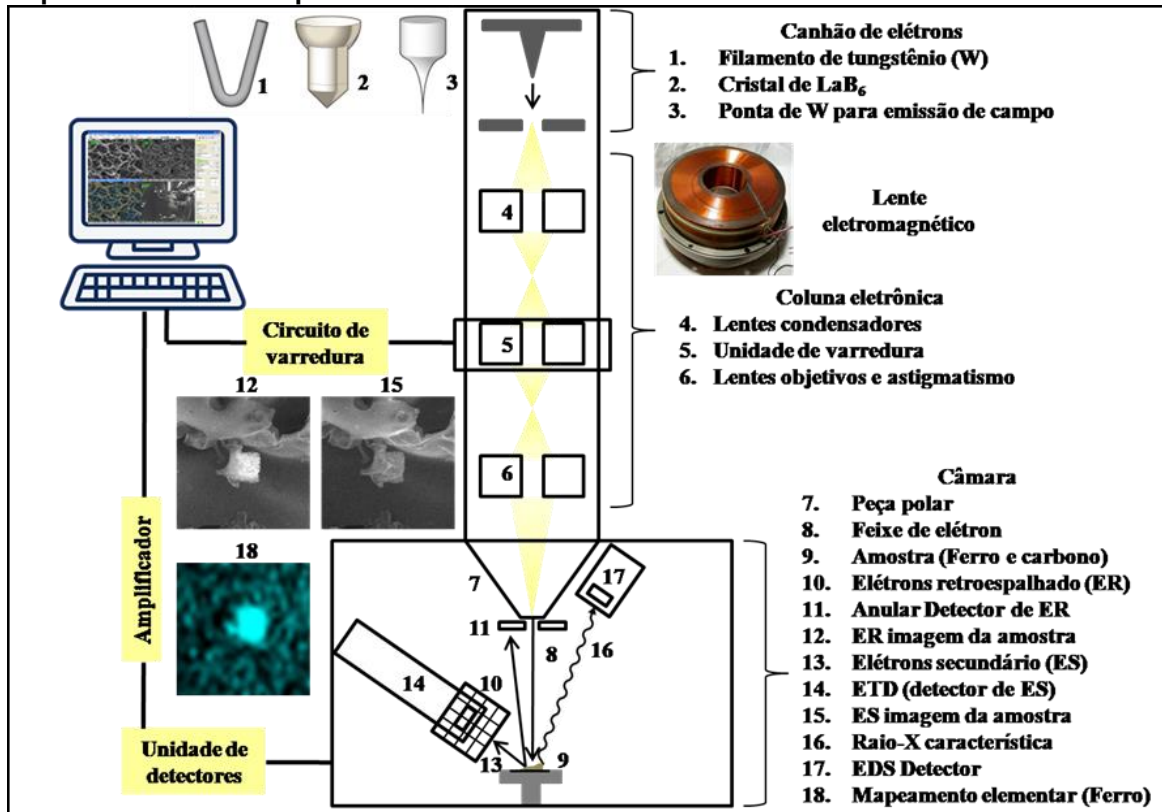
elétrons fortemente ligados da camada interna do átomo. Tirar um elétron da camada interna torna o átomo instável e, para ajustar isso, um elétron da camada externa salta para dentro, emitindo certa quantidade de energia, que é transmitida como um raio-X. Como as energias desses raios-X são muito específicas, eles agem como a assinatura de um elemento e, portanto, são chamados de raios-X característicos. Embora ER, ES e raios-X característicos sejam analisados principalmente em MEV, outros fenômenos, como geração raios-X contínuos, elétrons Auger e fótons na faixa visível acontecem quando um feixe de elétrons altamente energético atinge a amostra.

Um microscópio eletrônico é construído no mesmo princípio do microscópio óptico, apenas mudando a fonte como elétron altamente energético ao invés de luz visível, e mudando as peças ópticas compatíveis com as eletrônicas. Para ter uma fonte de elétrons monocromática e estável, são utilizadas fontes de emissão termiônica e de emissão de campo. O tungstênio (W) é usado como matéria-prima devido ao seu ponto de fusão muito alto. LaB<sub>6</sub> é outro material usado com essa finalidade por causa de seu valor de função de trabalho (a quantidade de energia necessária para ejetar um elétron da superfície do material) incomumente baixo. Posteriormente, com o advento da nanotecnologia, a ponteira de W foi fabricada com diâmetro na faixa de nm, gerando um campo elétrico muito forte na ponta, facilitando a emissão de elétrons. Uma vez gerado o fluxo estável, ele é guiado através da coluna eletrônica composta por lentes e aberturas, cujos objetivos são focalizar o feixe, bem como torná-lo o mais longe possível e livre de aberrações. As lentes usadas em MEV são basicamente bobinas eletromagnéticas, que podem dobrar o fluxo do feixe de elétrons com o campo eletromagnético gerado, a fim de focar ou desfocar o feixe na amostra. Além disso, uma unidade de varredura é incluída ao SEM, que orienta o feixe focalizado para se mover no plano XY (plano da amostra). A amostra a ser analisada é colocada em uma câmara a vácuo abaixo da peça polar e os detectores são colocados dentro da câmara em várias posições, obedecendo as geometrias diferentes para captar ER, ES e raios-X característicos. A detecção de ER e ES é realizada por efeito de cintilação, onde os elétrons geram sinal fotônico ou por detectores de semicondutores de estado sólido, onde a energia do elétron é transferida para gerar pares de elétrons e buracos no semicondutor, seguida pela transição desses elétrons na banda de condução, criando sinal elétrico. Os ER são altamente energéticos e podem ser detectados diretamente, enquanto os ES precisam ser acelerados, bem como ser orientados pelo campo elétrico antes de ser detectado. Isso é feito por um detector especial, detector Everhart-Thornley (ETD), que é facilmente reconhecido por uma gaiola

de metal (gaiola de Faraday) ao seu redor. Outro detector, colocado em um determinado ângulo dentro da câmara detecta os raios-X característicos. Esses sinais são transferidos para o sistema de computação, criando uma imagem em tempo real na tela. As imagens estão em escala de cinza com a área mais clara correspondendo a mais sinais (ER ou ES) e a área mais escura correspondendo a menos sinais. No caso do ER, esse contraste se deve à composição elementar; a mais brilhante significa o elemento mais pesado e mais escuro significa o elemento mais leve, enquanto no caso do ES o contraste se deve à topografia da superfície, semelhante a uma fotografia tirada por uma câmera em preto e branco, apenas em escala muito menor e com grande profundidade de campo (distância acima e abaixo do plano focal em que a imagem continua focada). Na Figura 1 a seguir, um diagrama esquemático de um MEV será ilustrado com a elaboração das partes básicas, bem como dos fenômenos básicos. Imagens de ER e ES de uma amostra - partículas de ferro na matriz de carbono também são mostradas, indicando o contraste composicional e topográfico com um mapeamento elementar para ferro, mostrado na mesma região que é feito usando o raio-X característico emitido pelas partículas de ferro presentes na amostra.

A funcionalidade do MEV reside principalmente em sua praticidade e versatilidade. Quase tudo a partir de rochas, solos, tecidos animais e vegetais, metais, plásticos, papéis, entre outros, pode ser analisado em MEV. Para melhorar a aplicabilidade, MEV adaptou alguns pré-tratamentos da amostra. Um deles é a metalização, onde um revestimento muito fino (5-10 nm) e conformado de metal altamente condutor, como exemplo, o ouro e a prata, é depositado na superfície da amostra, fornecendo um melhor sinal, bem como minimizando o acúmulo de carga na amostra, especialmente as não condutoras, como a rocha. Outro é a secagem de ponto crítico, onde o CO<sub>2</sub> é utilizado na liofilização de amostras úmidas, como tecidos animais e vegetais, onde a umidade é retirada da amostra sem prejudicar sua topografia. Com o tempo, no próprio microscópio vários novos recursos foram adicionados. Por exemplo, ao invés do modo tradicional de alto vácuo, um forte vácuo é necessário na câmara MEV para os elétrons do feixe, bem como ER e ES para viajar livremente sem colidir com moléculas de ar e ionizá-los, a microscopia pode ser feita em baixo vácuo ou em modo ambiental com a utilização de detectores adequados, o que permite fazer microscopia com amostra não condutora, não revestida ou amostra úmida.

Figura 1 - As partes principais de MEV e as interações principais de feixe e amostra. Imagens representativas de ER e ES de uma amostra (partículas de ferro na matriz de carbono) com um mapeamento elemental para ferro



Fonte: Elaboração dos autores.



## ONDE SERÁ FEITO?

Além de *A. salina*, outros modelos experimentais podem ser utilizados para avaliar a toxicidade de diferentes contaminantes, como o peixe-zebra (MERRIFIELD et al., 2013), microrganismos (ULLOA-OGAZ et al., 2017) e material vegetal (PINHEIRO et al., 2020).

Todas essas amostras passaram por processamento, foram montadas e metalizadas e utilizaram a microscopia eletrônica como ferramenta para avaliar danos morfológicos.



## QUANDO SERÁ FEITO?

A análise micromorfológica tem sido utilizada para avaliar danos causados por contaminantes na superfície da amostra quando o objetivo está relacionado a avaliar o grau de toxicidade. Em estudo utilizando patógenos presentes em alimentos, foi observado que nanopartículas de selênio apresentaram atividade antimicrobiana, causando danos à superfície do microrganismo (NGUYEN et al., 2017).

Em outro estudo, nanopartículas de ferrita causaram rupturas no corpo de *A. salina*, ocasionando alterações morfológicas (WANG et al., 2017). Em material vegetal, nanopartículas de prata (NPsAg) afetaram o desenvolvimento de raízes de *Lactuca sativa*, acarretando enrugamento da superfície e alterações morfológicas, como observado pela microscopia eletrônica de varredura (PINHEIRO et al., 2020).



## POR QUEM/COM O QUE SERÁ FEITO?

Para o processamento de amostra animal, o protocolo de processamento abaixo deve ser seguido:

- 1º) Fixação do material em solução fixadora contendo glutaraldeído 2,5%, paraformaldeído 4% e tampão cacodilato de sódio  $0,05 \text{ mol L}^{-1}$  à temperatura ambiente. A fixação deve durar, no mínimo, 4 horas.
- 2º) Lavagem com solução tampão cacodilato de sódio  $0,05 \text{ mol L}^{-1}$  por 40 minutos.
- 3º) Lavagem com solução tampão cacodilato de sódio  $0,05 \text{ mol L}^{-1}$  por 40 minutos.
- 4º) Lavagem com solução tampão cacodilato de sódio  $0,05 \text{ mol L}^{-1}$  por 40 minutos.
- 5º) Desidratação em série crescente de etanol:
  - a. Etanol 50% - 45 minutos.
  - b. Etanol 70% - 45 minutos.
  - c. Etanol 90% - 45 minutos.
  - d. Etanol 100% - 45 minutos.

- e. Etanol 100% - 45 minutos.
- f. Etanol 100% - 45 minutos.

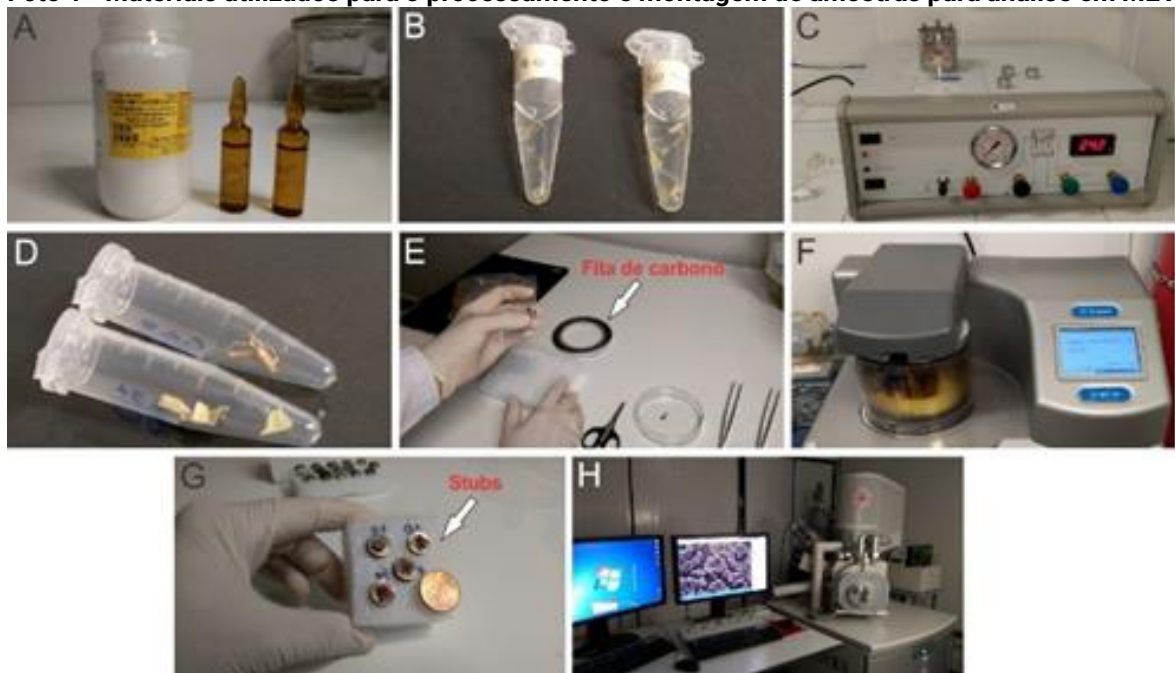
6º) Secagem do material por de ponto crítico.

7º) Montagem do material em *stubs*.

8º) Metalização.

9º) Observação em MEV.

**Foto 1 - Materiais utilizados para o processamento e montagem de amostras para análise em MEV**



**Fonte:** Acervo dos autores

**Nota:** (A): Fixador; (B): Amostra vegetal em solução fixadora. (C): Equipamento de ponto crítico (Secagem das amostras). (D): Amostra vegetal seca. (E): Montagem do material seco. (F): Metalizadora (Metalização da amostra com ouro 20nm). (G): Amostras aderidas com fita de carbono em *stubs* (Material metalizado). (H): Microscópio eletrônico de varredura (Quanta 450 FEG).

#### **Cálculo para o preparo da solução fixadora:**

Utilizar essa fórmula  $C_1V_1 = C_2V_2$  onde,

$C_1$  – Concentração inicial

$V_1$  – Volume inicial

$C_2$  – Concentração inicial

$V_2$  – Volume inicial



### Concentração inicial dos reagentes:

Glutaraldeído 50%

Paraformaldeído 16%

Tampão cacodilato de sódio 0,2 mol L<sup>-1</sup>

### Cálculo para 50 mL de solução fixadora:

Glutaraldeído	Paraformaldeído	Tampão cacodilato de sódio
50% x V <sub>1</sub> = 2,5% x 50 mL	16% x V <sub>1</sub> = 4 % x 50 mL	0,2 mol L <sup>-1</sup> x V <sub>1</sub> = 0,05 mol L <sup>-1</sup> x 50 mL
V <sub>1</sub> = 2,5 mL	V <sub>1</sub> = 12,5 mL	V <sub>1</sub> = 12,5 mL

Soma de todas as soluções = 2,5 mL + 12,5 mL + 12,5 mL

Total = 27,5 mL, avolumar com água destilada até 50 mL

Para o preparo da solução de desidratação (Etanol), seguir os cálculos descritos anteriormente. Os indivíduos devem ser imersos na solução fixadora assim que retirados do meio de teste. O tempo ideal de fixação é de 8-12h. Uma vez fixado corretamente, o material pode ser armazenado em geladeira por longos períodos. Quando for o caso, deverá haver a verificação do nível da solução fixadora, de modo que o fragmento nunca fique exposto ao ar.

A solução fixadora é preparada utilizando glutaraldeído 2,5%, paraformaldeído 4% e solução tampão cacodilato de sódio 0,05 mol L<sup>-1</sup>. O tampão cacodilato de sódio pode ser substituído por tampão fosfato sódico. Na etapa de desidratação, o etanol pode ser substituído por acetona. Caso não disponha de aparelho de ponto crítico, a secagem poderá ser realizada com hexametildisilazano (HMDS). Após todas as etapas do processamento, realizar a análise em microscópio eletrônico de varredura com detector para elétrons secundários.

### Seguem abaixo *links* para vídeos sobre processamento e montagem das amostras para MEV:

Ponto Crítico: <https://youtu.be/GTngpJ6rx1c> (MICROSCOPIA..., 2021d).

Montagem de amostras: <https://youtu.be/D5ikFv28hps> (MICROSCOPIA..., 2021b).

Metalização: <https://youtu.be/aWUv1sFOmkg> (MICROSCOPIA..., 2021a).

Operação Quanta 450 FEG: [https://youtu.be/Rq\\_Fs0DohcM](https://youtu.be/Rq_Fs0DohcM) (MICROSCOPIA..., 2021c).

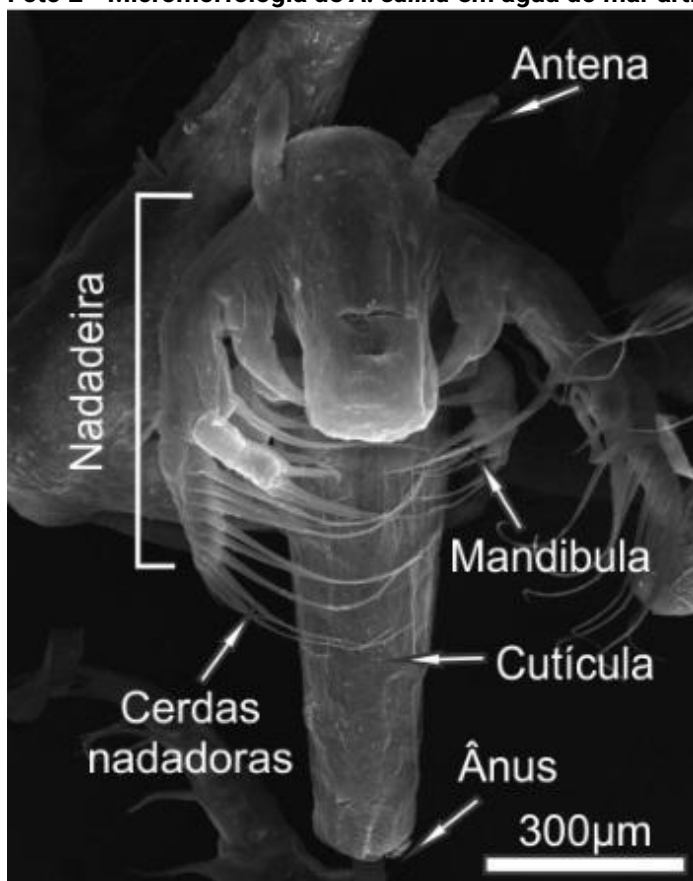


## COMO SERÁ FEITO?

A análise micromorfológica de *A. salina* será realizada utilizando indivíduos que foram submetidos a tratamentos específicos e passaram por processamento para microscopia eletrônica de varredura.

Seguindo o protocolo de processamento, foi possível preservar a estrutura corporal de *A. salina*. Observe que a anatomia foi mantida com preservação de estruturas importantes relacionadas à sobrevivência do indivíduo. Foram observados os pares de antena e nadadeiras, apresentando boa preservação. Todas as cerdas nadadoras estavam presentes e com mandíbula preservada. Além disso, não foi observado enrugamento de cutícula e ânus sem alteração morfológica (Foto 2).

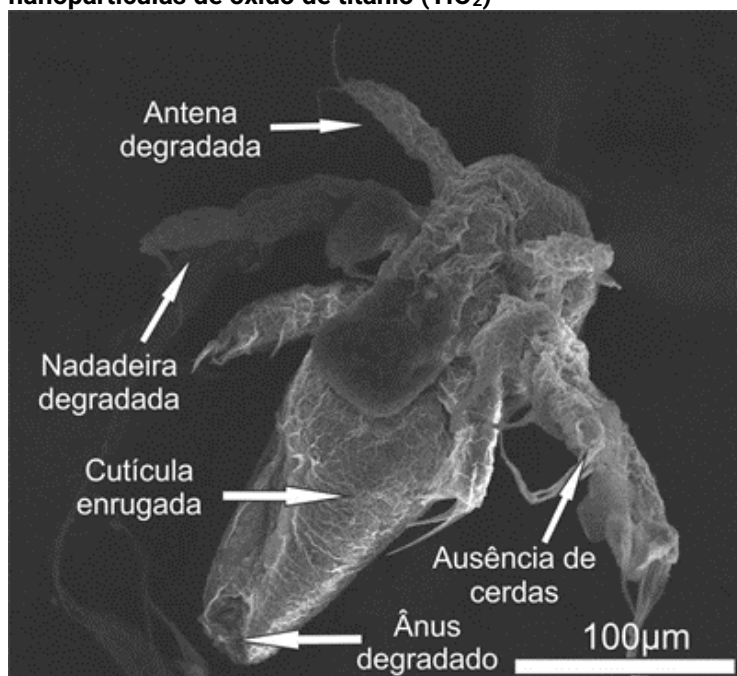
Foto 2 - Micromorfologia de *A. salina* em água do mar artificial



Fonte: Acervo dos autores.

A imagem a seguir mostra alteração morfológica em *A. salina* decorrente da interação com nanopartículas de óxido de titânio ( $\text{TiO}_2$ ). Observe danos anatômicos responsáveis pela sobrevivência do animal. Verifique a degradação da antena e nadadeira, estruturas responsáveis pela locomoção do animal. Além disso, foi observada a ausência das cerdas, estrutura que auxilia na locomoção. A cutícula apresentou acentuado grau de enrugamento. O ânus sofreu deformação, comprometendo o sistema excretor (Foto 3).

**Foto 3 - Micromorfologia de *A. salina* com danos morfológicos causados pela interação com nanopartículas de óxido de titânio ( $\text{TiO}_2$ )**



Fonte: Acervo dos autores.

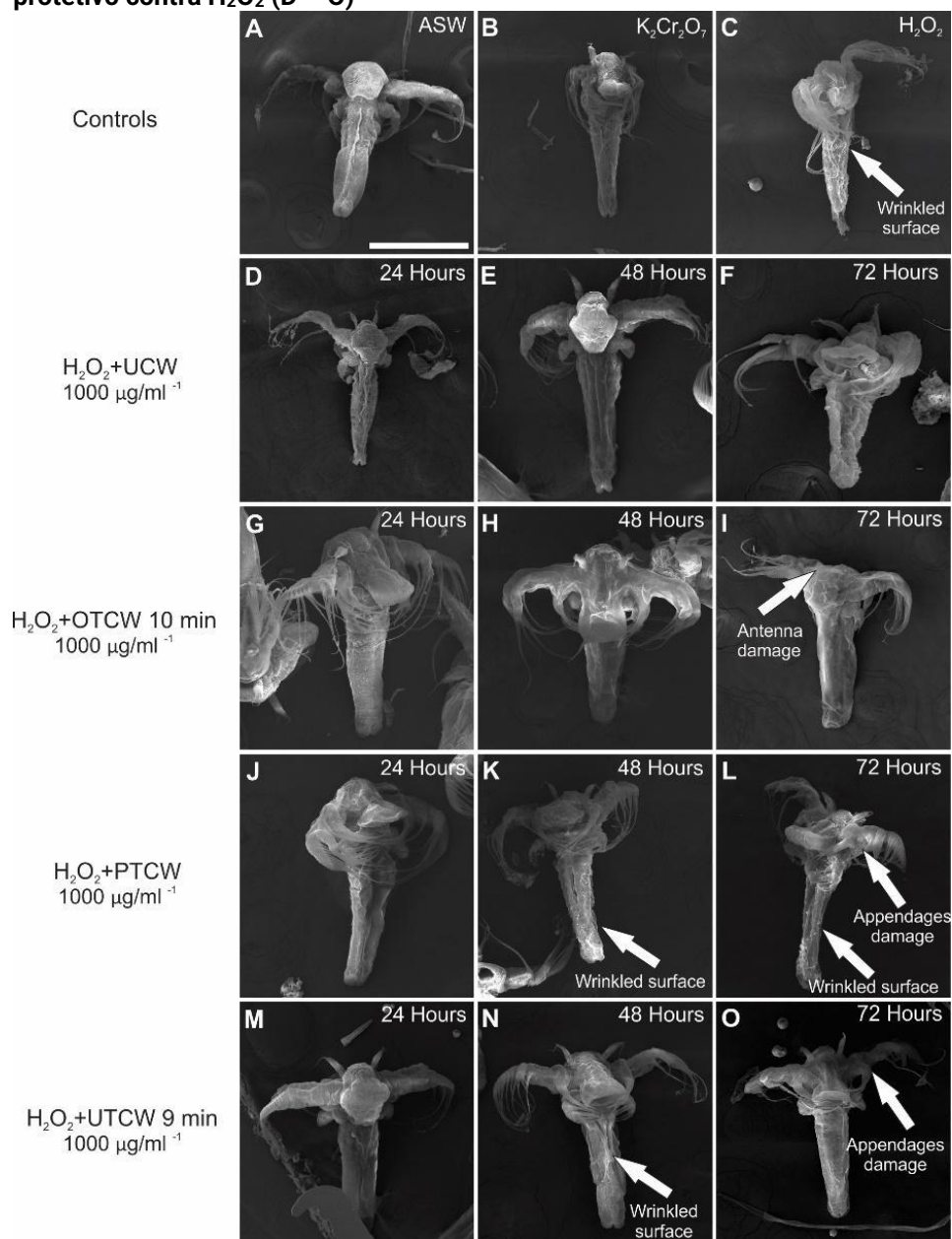


## QUANTO TEM SIDO UTILIZADO NA PESQUISA?

Ensaio toxicológicos utilizando diferentes indivíduos buscam avaliar o quanto um contaminante pode ser tóxico e pela análise morfológica é possível observar alterações significativas que podem afetar a sobrevivência do indivíduo.

Além disso, ensaios que avaliam o efeito protetivo de uma determinada solução em *A. salina* também utilizam parâmetros morfológicos pela análise MEV. Em estudo conduzido por Miguel et al. (2021), foi avaliado o efeito protetivo da água de coco contra peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) por meio da análise micromorfológica do indivíduo (Foto 4).

Foto 4 - Grupo-controle de *A. salina* (A – C) e grupo submetido a diferentes tratamentos do efeito protetivo contra  $H_2O_2$  (D – O)

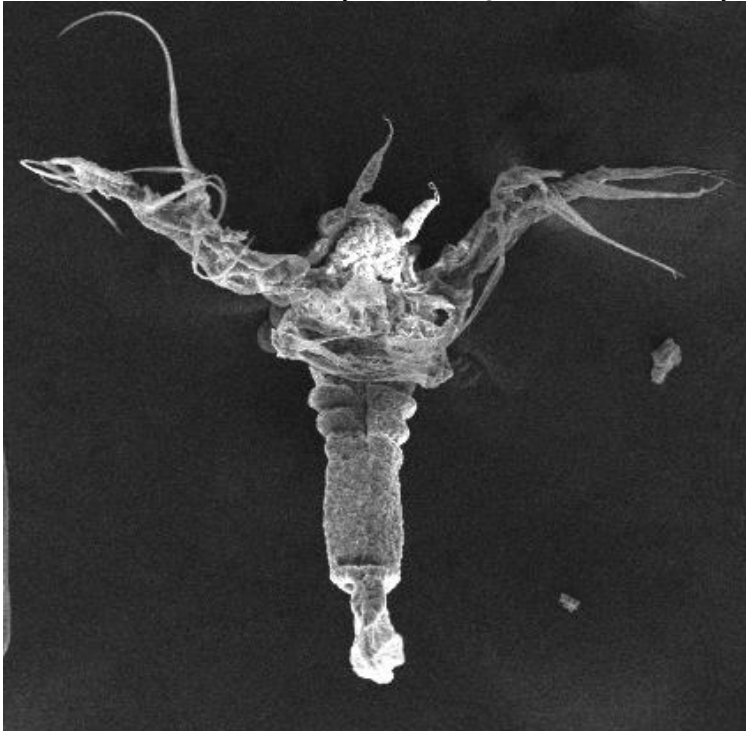


Fonte: Miguel et al. (2021).

Em estudo realizado por Wang et al. (2017) foi observado acúmulo de nanopartículas de ferrita nas nadadeiras de *A. salina* e alteração morfológica com danos nas superfícies do indivíduo

Em outro estudo, a interação de *A. salina* com nanopartículas de óxido de titânio foi avaliada por meio da microscopia eletrônica e com ênfase em danos morfológicos. Foram observados enrugamentos de cutícula com degradação do corpo do animal (Foto 5).

**Foto 5 - *A. salina* com alteração morfológica devido à interação com  $\text{NpsTiO}_2$**



**Fonte:** Acervo dos autores.

A análise por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV) permite avaliar de forma consistente danos causados à morfologia em diferentes espécies, sendo uma ferramenta indispensável para avaliar a toxicidade de diferentes contaminantes.

## REFERÊNCIAS

MANFRA, Loredana *et al.* Ecotoxicity of diethylene glycol and risk assessment for marine environment. **Journal of Hazardous Materials**, v. 284, p. 130-135, 2014.

MERRIFIELD, Daniel L. *et al.* Ingestion of metal-nanoparticle contaminated food disrupts endogenous microbiota in zebrafish (*Danio rerio*). **Environmental Pollution**, v. 174, p. 157-163, 2013.

MICROSCOPIA eletrônica de varredura: metalização de amostras. Fortaleza: Universidade Federal do Ceará, 2021a. 1 vídeo (4min6s). Publicado pela Coordenação da Central Analítica da Universidade Federal do Ceará. O vídeo é parte do capítulo Microscopia eletrônica de varredura do e-book intitulado Técnicas e métodos de estudo em tecidos, organizado pela Professora Virgínia Cláudia Carneiro Girão Carmona do Departamento de Morfologia da Universidade Federal do Ceará. Disponível em: <https://www.youtube.com/watch?v=aWUv1sFOmkg>. Acesso em: 23 maio 2021.

MICROSCOPIA eletrônica de varredura: montagem de amostras. Fortaleza: Universidade Federal do Ceará, 2021b. 1 vídeo (3min8s). Publicado pela Coordenação da Central Analítica da Universidade Federal do Ceará. O vídeo é parte do capítulo Microscopia eletrônica de varredura do e-book intitulado Técnicas e métodos de estudo em tecidos, organizado pela Professora Virgínia Cláudia Carneiro Girão Carmona do Departamento de Morfologia da Universidade Federal do Ceará. Disponível em: <https://www.youtube.com/watch?v=D5ikFv28hps>. Acesso em: 23 maio 2021.

MICROSCOPIA eletrônica de varredura: operação quanta FEG 450. Fortaleza: Universidade Federal do Ceará, 2021c. 1 vídeo (6min45s). Publicado pela Coordenação da Central Analítica da Universidade Federal do Ceará. O vídeo é parte do capítulo Microscopia eletrônica de varredura do e-book intitulado Técnicas e métodos de estudo em tecidos, organizado pela Professora Virgínia Cláudia Carneiro Girão Carmona do Departamento de Morfologia da Universidade Federal do Ceará. Disponível em: [https://www.youtube.com/watch?v=Rq\\_Fs0DohcM](https://www.youtube.com/watch?v=Rq_Fs0DohcM). Acesso em: 23 maio 2021.

MICROSCOPIA eletrônica de varredura: ponto crítico. Fortaleza: Universidade Federal do Ceará, 2021d. 1 vídeo (4min9s). Publicado pela Coordenação da Central Analítica da Universidade Federal do Ceará. O vídeo é parte do capítulo Microscopia eletrônica de varredura do e-book intitulado Técnicas e métodos de estudo em tecidos, organizado pela Professora Virgínia Cláudia Carneiro Girão Carmona do Departamento de Morfologia da Universidade Federal do Ceará. Disponível em: <https://youtu.be/GTngpJ6rx1c>. Acesso em: 23 maio 2021.

MIGUEL, Thaiz Batista Azevedo Rangel *et al.* Protective effect of natural and processed coconut water by non-thermal technologies against oxidative stress in brine shrimp (*Artemia salina*). **Food and Bioprocess Technology**, v. 14, p. 702-716, Feb. 2021.

NGUYEN, Trang H. D. *et al.* Antibacterial properties of selenium nanoparticles and their toxicity to Caco-2 cells. **Food Control**, v. 77, p. 17-24, 2017.

NUNES, Bruno S. *et al.* Use of the genus *Artemia* in ecotoxicity testing. **Environmental Pollution**, v. 144, n. 2, p. 453-462, 2006.

PINHEIRO, Sergimar K. de Paiva *et al.* Toxic effects of silver nanoparticles on the germination and root development of lettuce (*Lactuca sativa*). **Australian Journal of Botany**, v. 68, n. 2, p. 127-136, May 2020.

ULLOA-OGAZ, Ana Laura *et al.* Oxidative damage to *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27833 and *Staphylococcus aureus* ATCC 24213 induced by CuO-NPs. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 24, n. 27, p. 22048-22060, Sept. 2017.

WANG, Chungie *et al.* Toxicity of  $\alpha$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanoparticles to *Artemia salina* cysts and three stages of larvae. **Science of the Total Environment**, v. 598, p. 847-855, Nov. 2017.

## SUGESTÕES DE LEITURA

AN, Hio Jin *et al.* Comparative toxicity of silver nanoparticles (AgNPs) and silver nanowires (AgNWs) on saltwater microcrustacean, *Artemia salina*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part - C: Toxicology and Pharmacology**, v. 218, p. 62-69, 2019.

ARULVASU, Chinnasamy *et al.* Toxicity effect of silver nanoparticles in brine shrimp *artemia*. **The Scientific World Journal**, v. 2014, p. 1-11, 2014.

ATES, Mehmet *et al.* Assessment of Oxidative Stress on *Artemia salina* and *Daphnia magna* After Exposure to Zn and ZnO Nanoparticles. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 104, n. 2, p. 206-214, Springer 2020.

ATES, Mehmet *et al.* Comparative evolution of impact of Zn and ZnO nanoparticles on brine shrimp (*Artemia salina*) larvae: effects of particles size and solubility on toxicity. **Environmental Science: Processes and Impacts**, v. 15, n. 1, p. 225-233, Jan. 2013.

COX, Ashley *et al.* Reprint of: Silver and titanium dioxide nanoparticle toxicity in plants: A review of current research. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 110, p. 33-49, Jan. 2017.

GOLDSTEIN, Joseph I. *et al.* **Scanning electron microscopy and x-ray microanalysis**. 4th ed. New York, NY: Springer, 2018.

LACAVE, José María *et al.* Acute toxicity, bioaccumulation and effects of dietary transfer of silver from brine shrimp exposed to PVP/PEI-coated silver nanoparticles to zebrafish. **Comparative Biochemistry and Physiology Part - C: Toxicology and Pharmacology**, v. 199, p. 69-80, 2017.

LADHAR, Chiraz *et al.* Impact of dietary cadmium sulphide nanoparticles on *Danio rerio* zebrafish at very low contamination pressure. **Nanotoxicology**, v. 8, n. 6, p. 676-685, 2014.

LAWRENCE, C. *et al.* The effects of feeding frequency on growth and reproduction in zebrafish (*Danio rerio*). **Aquaculture**, v. 368/369, p. 103-108, 2012.

LIBRALATO, Giovanni. The case of *Artemia* spp. in nanoecotoxicology. **Marine Environmental Research**, v. 101, n. 1, p. 38-43, 2014.

MADHAV, M. R. *et al.* Toxicity and accumulation of Copper oxide (CuO) nanoparticles in different life stages of *Artemia salina*. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 52, p. 227-238, June 2017.

MATRANGA, Valeria; CORSI, Ilaria. Toxic effects of engineered nanoparticles in the marine environment: model organisms and molecular approaches. **Marine Environmental Research**, v. 76, p. 32-40, May 2012.

SOUSA, Patrícia da Cunha *et al.* Morphological and ultrastructural changes in seminal coagulum of the squirrel monkey (*Saimiri collinsi* Osgood, 1916) before and after liquefaction. **Animal Reproduction Science**, v. 226, p. 1-11, Mar. 2021.



## 5 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO EM AMOSTRAS VEGETAIS

Sergimar Kennedy de Paiva Pinheiro  
Marlos de Medeiros Chaves  
Thaiz Batista Azevedo Rangel Miguel  
Anupama Ghosh  
Emilio de Castro Miguel



### O QUE SERÁ FEITO?

A amostra vegetal pode ser analisada utilizando microscopia eletrônica de transmissão. Detalhes ultraestruturais são evidenciados com o uso dessa técnica e mudanças em nível celular podem ser observadas com alta resolução.

Nesse contexto, a dinâmica do processo celular como desenvolvimento e morte celular pode ser acompanhada através da microscopia eletrônica de transmissão (MET) (MIGUEL et al. 2016; PAIVA; MACHADO, 2006).



### POR QUE SERÁ FEITO?

A técnica tem grande relevância no estudo da avaliação da toxicidade de nanopartículas e outros contaminantes em tecido vegetal. Além disso, a microscopia eletrônica de transmissão permite acompanhar a dinâmica e interação das nanopartículas na célula (PINHEIRO et al., 2020).

Outras técnicas de microscopia, como a microscopia eletrônica de varredura (MEV) e a microscopia de luz (ML) não permitem visualizar o acúmulo e a dinâmica em nível celular das nanopartículas. Além disso, ocorre o estresse causado por agentes externos a organelas na célula somente observado com o uso do MET (ARAÚJO et al., 2021). O uso da técnica MET se apresenta como ferramenta de grande importância para avaliação ultraestrutural das células em diferentes tecidos.

## Princípios de funcionamento do microscópio eletrônico de transmissão (MET)

Após a descoberta da dualidade onda-partícula de elétron acelerado por Louis de Broglie (1925), seguido por experimentos de difração de elétrons conduzidos por dois grupos separados, Davisson/Germer e Thomson/Reid (1927), Knoll e Ruska (1932) apresentaram o primeiro microscópio eletrônico de transmissão (MET) e Ruska recebeu o Prêmio Nobel em 1936 por isso. O MET começou a ser desenvolvido comercialmente depois; primeiramente pela Metropolitan-Vickers EM1 (Reino Unido, 1936) e após pela Siemens e Halske (Alemanha, 1939). Mais tarde várias outras empresas passaram a desenvolver o MET, como a Hitachi, JEOL, Philips, dentre outras. A alta resolução do MET tornou possível visualizar materiais em escalas atômicas, bem como o padrão de difração de elétrons (DE) na mesma escala gerado no MET, que foi descoberto pela primeira vez por Kossel e Mollenstedt (1939). Além de imagem e DE, o MET pode ser utilizado na análise da composição química da amostra pelas espectroscopias, aproveitando os fenômenos associados à interação de feixe e amostra: espectrometria dispersiva de energia de raios-X (EDS) e espectrometria de perda de energia de elétrons (EELS), sendo importantes entre eles. Além disso, a tecnologia de MET pode ser combinada com a de MEV para gerar microscópio eletrônico de varredura por transmissão (MEVT), que usa uma sonda do feixe de elétrons muito nítida (<5 nm de diâmetro) para fazer a varredura sobre a superfície de uma amostra fina para imagem de alta resolução e DE com várias informações. O primeiro MEVT foi projetado e construído por Manfred von Ardenne em Berlim em 1937-1938.

O elétron, por ser uma partícula leve e carregada negativamente, sofre deflexões ao passar por um átomo composto por um núcleo carregado positivamente e circundado por elétrons carregados negativamente. Essas deflexões podem ser entendidas tanto do ponto de vista da partícula quanto da onda, pois um elétron de alta energia cinética possui ambas as propriedades. Essas deflexões são a base do MET, tanto na geração de imagens quanto na geração de padrões de DE. Em MET, uma amostra muito fina pode ser usada com espessura contendo menos de 100 nm, através da qual uma quantidade considerável do feixe de elétrons é transmitida para frente. A maior parte dele permanece inalterada com sua direção e energia, que chamamos de feixe direto, enquanto uma parte dele sofre espalhamento devido a colisões com átomos.

Esse espalhamento pode ser classificado como elástico (sem perda de energia) e não-elástico (com perda de energia), pensando como partículas, sendo a analogia perfeita às bolas de sinuca. Considerando a ponta da vista da onda, esses

espalhamentos também podem ser divididos em coerentes (tendo uma relação de fase) e incoerentes (sem nenhuma relação de fase). Elétrons espalhados elasticamente são geralmente coerentes em ângulos baixos ( $1-10^\circ$ ) e se tornam incoerentes em ângulos mais altos ( $> 10^\circ$ ), enquanto o espalhamento inelástico é quase sempre incoerente.

Com relação aos elétrons, elasticamente formam a imagem e os padrões de difração e contraste são determinados pelos fatores de espalhamento e de estrutura. O fator de espalhamento atômico é uma função relacionada à distribuição de espalhamento de um elétron de feixe devido a um único átomo da amostra que depende de parâmetros como o número atômico desse átomo, o ângulo de espalhamento e a energia do feixe. O fator de estrutura é definido como a soma dos fatores de espalhamento atômico dos átomos individuais na célula unitária da amostra, multiplicado por um fator de fase, relacionado à diferença de fase entre as ondas espalhadas de átomos em diferentes planos de cristal, portanto, depende da estrutura cristalina da amostra.

Isso se reflete no padrão de DE, onde para os monocristais, pontos brilhantes aparecem com padrões geométricos regulares; para materiais policristalinos, os círculos concêntricos aparecem como raios fixos, relacionando as distâncias do plano da rede; para os materiais amorfos, nenhum padrão geométrico pode ser definido, somente um ponto central brilhante, representando o feixe direto com uma intensidade decrescente e a probabilidade cada vez menor de espalhamento elástico e coerente em ângulos elevados. Os espalhamentos inelásticos geram muitos outros sinais, como elétrons com perda de energia, os raios-X característicos, luz visível, etc. Todos esses têm informações químicas e estruturais da amostra.

Os raios-X característicos gerados em MET podem fornecer detecção elementar em escala nanométrica, enquanto os mesmos raios-X em MEV podem gerar um mapeamento elementar com resolução muito alta. Os elétrons, após sofrerem colisão inelástica, perdem energia e a análise de sua distribuição de energia dá origem a uma rota de análise diferente, chamada de espectrometria de perda de energia de elétrons (EELS), através da qual uma série de informações sobre a amostra pode ser adquirida, como o estado de ligação e valência, a estrutura atômica do vizinho mais próximo, sua resposta dielétrica, a densidade de elétrons livres, etc.

A instrumentação do MET (e MEV) tem bastante semelhança com a do MEV. Os emissores termiônicos ( $\text{LaB}_6$ ), bem como a ponta de tungstênio para emissão do campo são utilizados como fonte de elétrons no MET. A coluna de elétrons do MET e MEV apresenta diferenças em relação à coluna do MEV: (1) a amostra fina fica dentro dessa

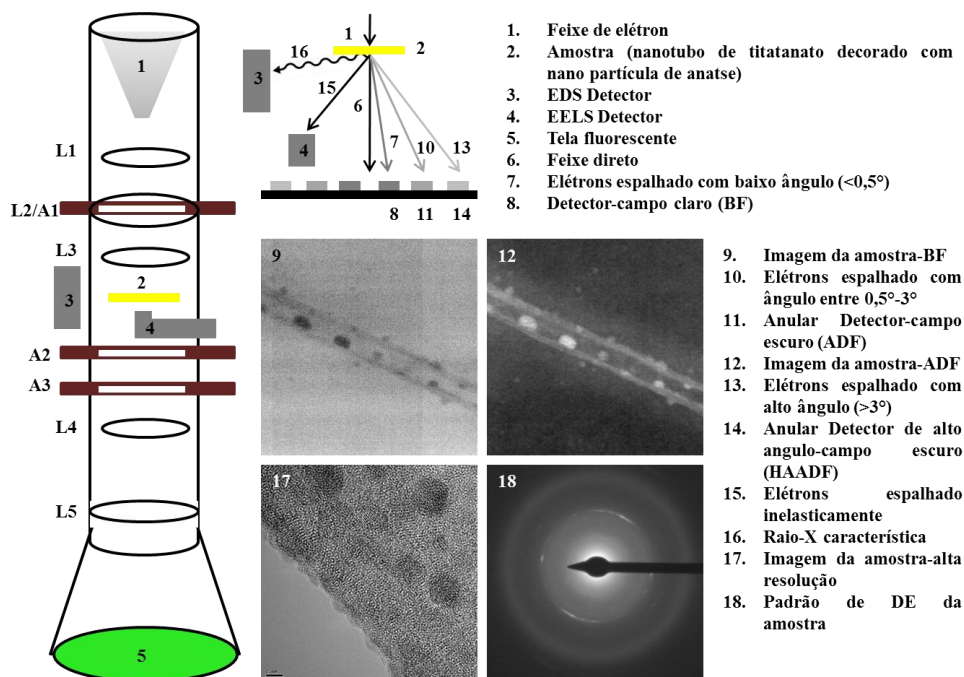
coluna, porque em MET e MEVT o que nos interessa são os elétrons transmitidos; (2) Antes da amostra, um conjunto de abertura e de lentes condensadoras é usado para produzir o feixe em duas formas: paralelo e convergente; (3) Depois da amostra, um outro conjunto objetivo de aberturas e de lentes é usado para fazer ajustes necessários quanto ao uso do MET, tanto no modo de difração quanto no modo de imagem. Em caso do MEVT, uma unidade de varredura está adicionada na coluna para o feixe (geralmente convergente) poder varrer em cima da amostra. Lentes e espelhos adicionais são utilizados em alta complexidade para melhorar as aberrações esféricas, cromáticas e astigmatismo.

Ao contrário do MEV, o critério da amostra é ser fina; este é atingido pelos vários ajustes. No caso das amostras em pó, como nanopartículas, são dispersas em solvente e suspensas em uma grade de cobre revestida com polímero. No caso de amostras biológicas, métodos especiais como ultramicrotomia são usados. Quanto aos outros materiais compósitos, como a manta feita de nanotubos de carbono, uma fatia fina é cortada usando MEV acoplado a feixe de íons focado. A meta principal do MET é obter imagem e padrão de DE, ambas são distribuições bidimensionais de densidade de elétrons. Em um MET convencional, ambas as imagens e padrão de DE são estáticos, pois o feixe incidente é fixo. Anteriormente eles eram projetados em uma tela fluorescente como uma imagem analógica, hoje eles são digitalizados.

Para um MEVT, a imagem não é estática, porque o feixe é variável igual ao MEV e a digitalização é necessária. Ao invés da tela fluorescente, alternativas de detectores dos elétrons são utilizadas. Os detectores primários em MET e MEVT são: (1) detector de campo claro (BF), que capta os elétrons transmitidos e espalhados com ângulo baixo ( $<0,5^\circ$ ), (2) detector anular de campo escuro (ADF), que capta os elétrons transmitidos e espalhados com ângulo médio (de  $0,5^\circ$  até  $3^\circ$ ) e (3) detector anular de campo escuro anular com alto ângulo (HAADF), que capta os elétrons transmitidos e espalhados com alto ângulo  $>3^\circ$ . A coluna de elétrons precisa ser mantida em um vácuo bem alto ( $10^{-5}$  Pa), para não atrapalhar os processos de transmissão.

Na imagem a seguir (Figura 1), um diagrama esquemático básico da coluna eletrônica de MET está ilustrado. Os processos de espalhamento com os respectivos detectores estão elaborados. Uma amostra de nanotubo de titanato decorado com nanopartículas de titânio (anatase) está sendo usada como exemplo. As imagens feitas pelos detectores BF e ADF estão sendo mostradas em alta resolução, revelando estruturas nanométricas semelhantes a um galho de jabuticaba, e o padrão de ED mostrando círculos concêntricos com raios específicos, indicando a natureza policristalina da amostra.

**Figura 1 - Coluna eletrônica MET e os processos de espalhamento com os respectivos detectores. Imagens representativas de campo claro, campo escuro, alta resolução e padrão de difração de elétrons de uma amostra (nanotubos de titanato decorados com nanopartículas de anatase)**



L: lente, A: Abertura (L1, 2, 3 e A1 são usado para ajustar o feixe, paralelo ou convergente; A2, 3 e L4, 5 são usado para ajustar o modo: ou gerar imagem ou padrão de difração de elétrons (DE))

Fonte: Elaboração dos autores.



## ONDE SERÁ FEITO?

Diferentes tipos de tecido, seja animal ou vegetal, podem ser analisados através da técnica MET. Além disso, as células que passaram por diferentes tratamentos podem sofrer alteração na dinâmica celular e importantes organelas como mitocôndria, complexo de golgi e vacúolos podem ser analisadas de forma coerente (CHAKRABORTY et al., 2020; PEDRAZZOLI et al., 2021).

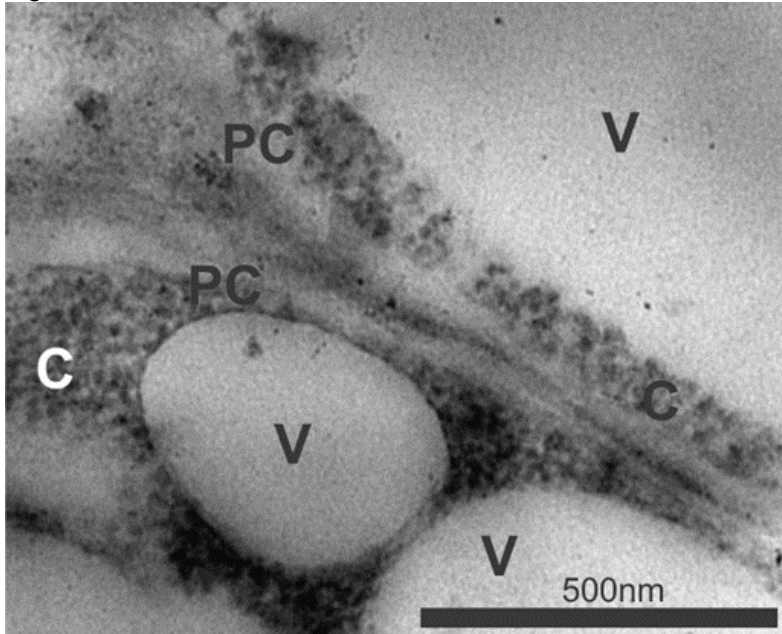
Para uma melhor preservação do conteúdo celular, o tecido deve ser processado de acordo com o protocolo para microscopia eletrônica de transmissão e cortes ultrafinos da região de interesse devem ser realizados em equipamento apropriado.



## QUANDO SERÁ FEITO?

A análise por MET poderá ser realizada para observar o acúmulo de NP dentro da célula. A Figura 2 apresenta a ultraestrutura de células de raízes em material vegetal.

**Figura 2 – Ultraestrutura em células de raízes de *Lactuca sativa* L.**



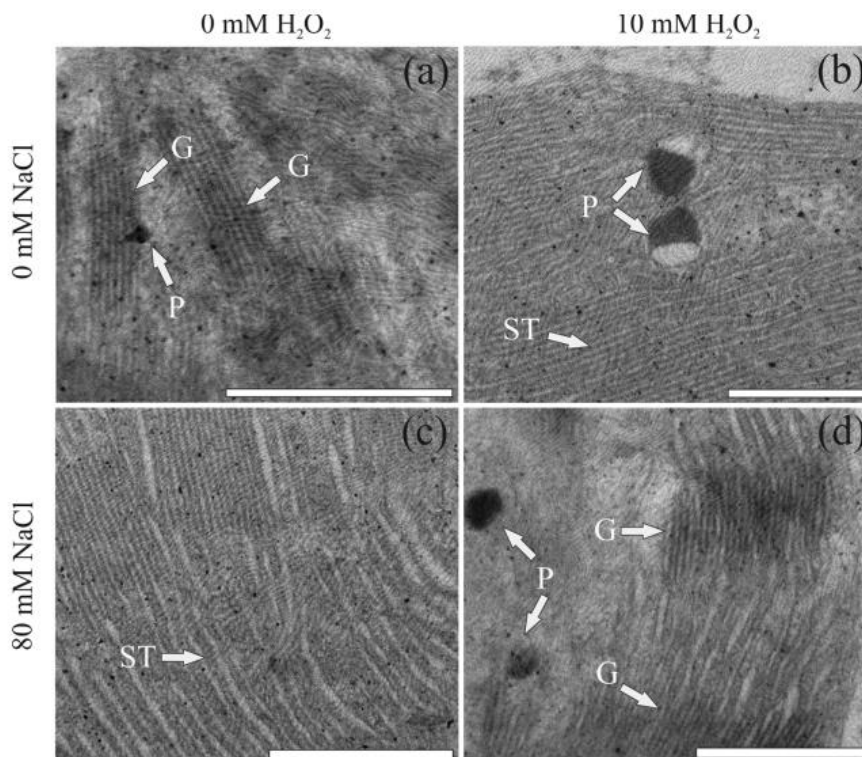
**Fonte:** Acervo dos autores.

**Nota:** (V): Vacúolo. (C): Citoplasma. (PC): Parede celular.

Na imagem, o conteúdo celular foi preservado mantendo a integridade ultraestrutural. Observe a organização dos vacúolos e citoplasma, sem extravasamento do material celular. A parede celular não apresenta rupturas e o espaço intercelular está bem delimitado. Outro aspecto observado está relacionado à boa contrastação do fragmento sem buracos e marcas que poderiam ser introduzidas durante a etapa de corte do material.

Outro estudo avaliou a tolerância do cloroplasto ao sal do milho através da análise ultraestrutural celular. A Figura 3 representa a proteção do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> frente ao estresse salino.

**Figura 3 - Ultraestrutura do cloroplasto em células do mesofilo do milho. Células submetidas ao tratamento de NaCl e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (A – D)**



**Fonte:** Araújo et al. (2021).

**Nota:** (G): Grana. (P): Plastoglobulo. (ST): Estroma dos tilacoides.



## POR QUEM/COM O QUE SERÁ FEITO?

Para o processamento e inclusão de amostra vegetal para MET, devem ser seguidas as etapas descritas abaixo:

- 1ª) Fixação do material em solução fixadora contendo glutaraldeído 2,5%, paraformaldeído 4% e tampão cacodilato de sódio 0,05 mol L<sup>-1</sup> à temperatura ambiente. A fixação deve durar, no mínimo, 4 horas.
- 2ª) Pós-fixação com tetróxido de ósmio (Agente contrastante).
- 3ª) Lavagem com solução tampão cacodilato de sódio 0,05 mol L<sup>-1</sup> por 40 minutos.
- 4ª) Lavagem com solução tampão cacodilato de sódio 0,05 mol L<sup>-1</sup> por 40 minutos.
- 5ª) Lavagem com solução tampão cacodilato de sódio 0,05 mol L<sup>-1</sup> por 40 minutos.
- 6ª) Desidratação em série crescente de etanol:

- a. Acetona 50% - 45 minutos
- b. Acetona 70% - 45 minutos
- c. Acetona 90% - 45 minutos
- d. Acetona 100% - 45 minutos
- e. Acetona 100% - 45 minutos
- f. Acetona 100% - 45 minutos

7<sup>a</sup>) Inclusão do material em resina epóxi (Embed 802).

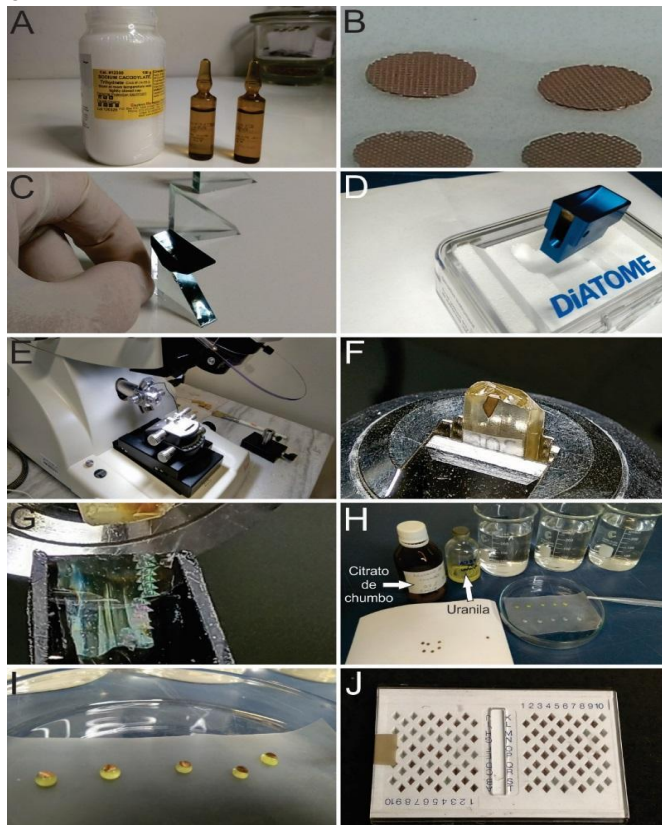
8<sup>a</sup>) Polimerização.

9<sup>a</sup>) Cortes ultrafinos.

10<sup>a</sup>) Constratação

11<sup>a</sup>) Análise MET.

**Foto 1 - Materiais utilizados para o processamento, corte e montagem de amostras para análise em MET**



**Fonte:** Acervo dos autores.

**Nota:** (A): Fixador. (B): Grades de cobre para coleta de material. (C): Faca de vidro. (D): Faca de diamante. (E): Ultramicrótomo. (F): Amostra fixa em suporte no ultramicrótomo. (G): Material sendo cortado. (H): Contratação das amostras com citrato de chumbo e acetato de uranila. (I): Detalhe da amostra em citrato de uranila. (J): Porta *grids* com amostras contrastadas.



### Cálculo para o preparo da solução fixadora

Utilizar essa fórmula  $C_1V_1 = C_2V_2$  onde:

- $C_1$  – Concentração inicial
- $V_1$  – Volume inicial
- $C_2$  – Concentração inicial
- $V_2$  – Volume inicial

### Concentração inicial dos reagentes

Glutaraldeído 50%

Paraformaldeído 16%

Tampão cacodilato de sódio  $0,2 \text{ mol L}^{-1}$

### Cálculo para 50 mL de solução fixadora

Glutaraldeído	Paraformaldeído	Tampão cacodilato de sódio
$50\% \times V_1 = 2,5\% \times 50 \text{ mL}$	$16\% \times V_1 = 4\% \times 50 \text{ mL}$	$0,2 \text{ mol L}^{-1} \times V_1 = 0,05 \text{ mol L}^{-1} \times 50 \text{ mL}$
$V_1 = 2,5 \text{ mL}$	$V_1 = 12,5 \text{ mL}$	$V_1 = 12,5 \text{ mL}$

Soma de todas as soluções =  $2,5 \text{ mL} + 12,5 \text{ mL} + 12,5 \text{ mL}$

Total =  $27,5 \text{ mL}$ , avolumar com água destilada até  $50 \text{ mL}$

Para o preparo da solução de desidratação (acetona), seguir os cálculos descritos anteriormente. A solução fixadora é preparada utilizando glutaraldeído 2,5%, paraformaldeído 4% e solução tampão cacodilato de sódio  $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ . O tampão cacodilato de sódio pode ser substituído por tampão fosfato sódico.

A solução de tetróxido de ósmio deve ser preparada em capela e utilizar frasco âmbar para o preparo. Utilizar água deionizada para diluição da solução de tetróxido de ósmio. Acondicionar a solução preparada ao abrigo da luz.

Deve-se utilizar acetona no processo de desidratação, pois essa solução é miscível em resina epóxi e auxilia no processo de polimerização da resina. Optamos por fazer a contração pós-bloco, pois se ocorrer erro durante a contração, novos cortes poderão ser feitos.

**Segue abaixo o link para o vídeo referente ao processamento das amostras para MET:**

**Ultramicrotomia:** [https://youtu.be/wn33UI\\_WrJs](https://youtu.be/wn33UI_WrJs) (MICROSCOPIA..., 2021).

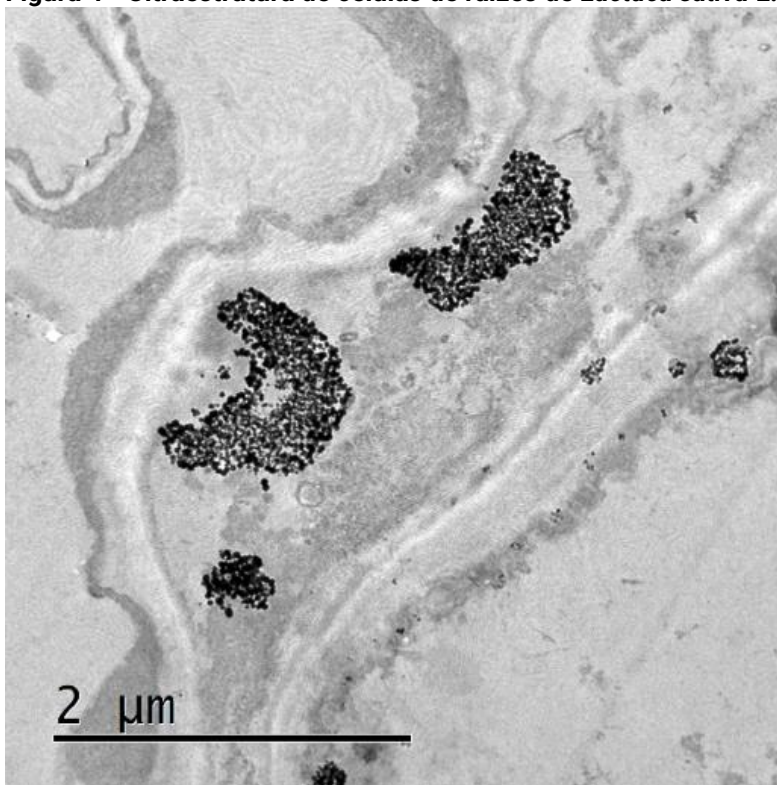


## COMO SERÁ FEITO?

A análise ultraestrutural deve ser realizada em diferentes pontos da amostra, utilizando três fragmentos de um mesmo bloco. No caso em que se deseja observar o acúmulo de NP na célula, deve-se procurar regiões mais elétron-densas e observar em qual organela ocorre maior acúmulo desse material.

Na imagem abaixo podemos observar nanopartículas de prata de tamanhos variados ocupando maior parte do citoplasma da célula (Figura 4).

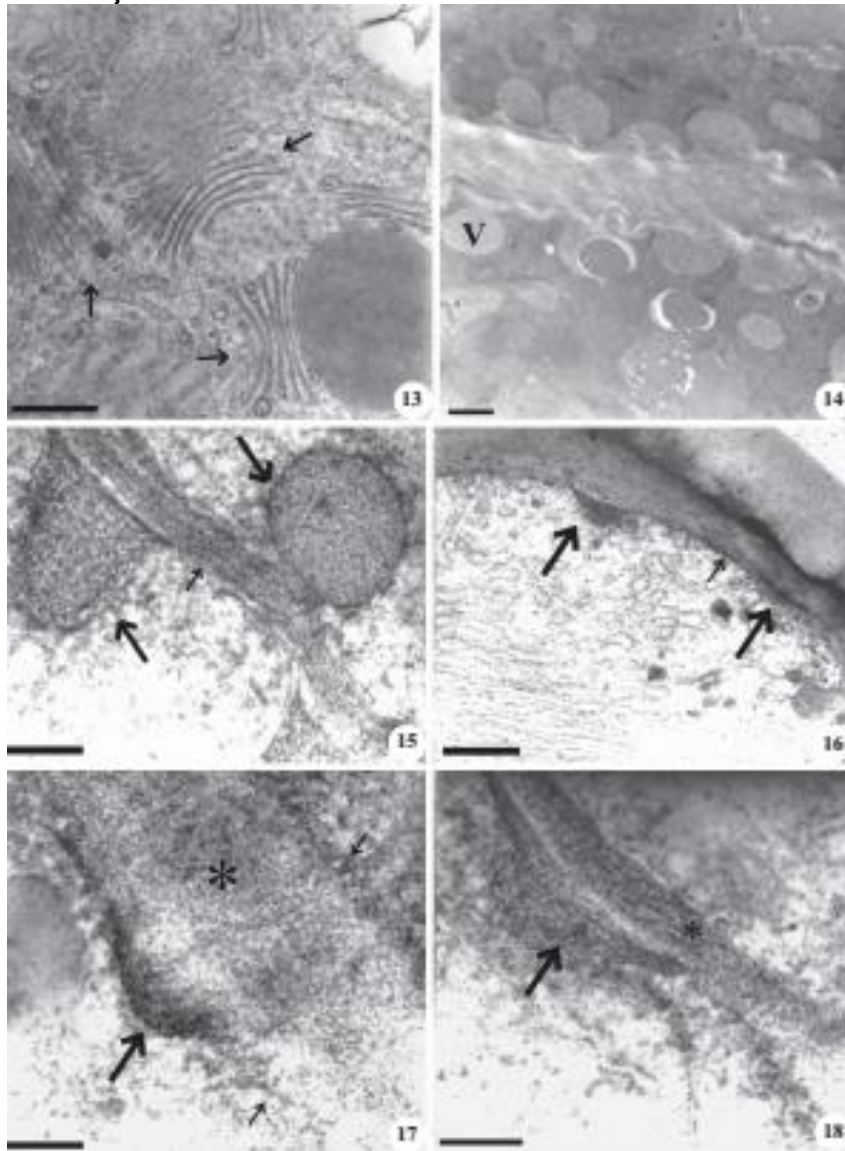
**Figura 4 - Ultraestrutura de células de raízes de *Lactuca sativa* L. com acúmulo de NPsAg**



Fonte: Acervo dos autores.

Quando se deseja observar o processo de secreção em estruturas secretoras é indicado avaliar diferentes etapas do processo. Através da análise ultraestrutural de coléteres de *Bathysa gymnocarpa* e *B. stipulata* (*Rubiaceae*), Miguel et al. (2010) observaram todas essas etapas. A Figura 5 apresenta a ultraestrutura das células secretoras.

**Figura 5 - Ultraestrutura de células secretoras (coléter) mostrando as espadas da externalização da secreção**



**Fonte:** Miguel et al. (2010).

**Nota:** (V): Vesículas lipídicas. Seta maior: Vesículas. Asterisco (\*): Parede celular.

Na imagem podemos observar a fusão das vesículas com a parede celular. Essa fusão possibilita a passagem de secreção através da parede celular.



## QUANTO TEM SIDO USADO NA PESQUISA?

Além do estudo de estruturas secretoras, outros tecidos podem ser observados através de MET. Em estudo utilizando MET foi possível observar estruturas reprodutivas, óvulos, megagametófitos de *Rhynchospora puberao* e acompanhar o desenvolvimento dessas estruturas (NOGUEIRA et al., 2021).

Em outro estudo, foi avaliada a regulação do cloroplasto utilizando diferentes comprimentos de luz. Foram utilizados 4 tipos de luzes: branca (B), monocromática vermelha, azul (VA), vermelha (V) e monocromática azul (A).

Neste estudo observou-se que o aumento da ultraestrutura do cloroplasto, a alteração das características fotossintéticas e a remoção do acúmulo excessivo de nutriente foram induzidos pela luz vermelha na planta do pepino (MIAO et al., 2019).

A técnica TEM provou ser uma ferramenta valiosa quanto à análise ultraestrutural com a obtenção de imagens de alta resolução. Além disso, essa técnica pode ser empregada com outras técnicas de microscopia para melhor análise da amostra.

## REFERÊNCIAS

- ARAÚJO, Gyedre dos Santos *et al.* H2O2 priming promotes salt tolerance in maize by protecting chloroplasts ultrastructure and primary metabolites modulation. **Plant Science**, v. 303, 1-11, Feb. 2021.
- CHAKRABORTY, Joy *et al.* Investigating mitochondrial autophagy by routine transmission electron microscopy: seeing is believing? **Pharmacological Research**, v. 160, p. 1-7, Oct. 2020.
- MIAO, Yanxiu *et al.* Blue light alleviates 'red light syndrome' by regulating chloroplast ultrastructure, photosynthetic traits and nutrient accumulation in cucumber plants. **Scientia Horticulturae**, v. 257, n. 27, p. 1-9, Dec. 2018.
- MICROSCOPIA eletrônica de transmissão: ultramicrotomia. Fortaleza: Universidade Federal do Ceará, 2021. 1 vídeo (6min39s). Publicado pela Coordenação da Central Analítica da Universidade Federal do Ceará. O vídeo é parte do capítulo Microscopia eletrônica de transmissão do e-book intitulado Técnicas e métodos de estudo em tecidos, organizado pela Professora Virgínia Cláudia Carneiro Girão Carmona do Departamento de Morfologia da Universidade Federal do Ceará. Disponível em: [https://www.youtube.com/watch?v=wn33UI\\_WrJs](https://www.youtube.com/watch?v=wn33UI_WrJs). Acesso em: 27 maio 2021.
- MIGUEL, Emilio de Castro *et al.* Ultrastructure of secretory and senescence phase in colleters of *Bathysa gymnocarpa* and *B. stipulata* (Rubiaceae). **Revista Brasileira de Botânica**, v. 33, n. 3, p. 425-436, Sept. 2010.
- NOGUEIRA, Fernanda M. *et al.* Ultrastructural analysis of *Rhynchospora* ovules: the first record of Cyperaceae megagametophyte on transmission electron microscope. **Micron**, v. 140, p. 1-5, Jan. 2021.
- PAIVA, E. A. S.; MACHADO, S. R. Colleters in *Caryocar brasiliense* (Caryocaraceae) ontogenesis, ultrastructure and secretion. **Brazilian Journal of Biology**, v. 66, n. 1B, p. 301-308, Feb. 2006. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/bjb/a/nbvhp5HxhnVLjzt467rFTjR/?lang=en#>. Acesso em: 27 maio 2021.
- PEDRAZZOLI, Matteo *et al.* Neurochemistry international: an improved and simplified protocol to combine Golgi-Cox staining with immunofluorescence and transmission electron microscopy techniques. **Neurochemistry International**, v. 142, p. 1-8, Jan. 2021.
- PINHEIRO, Sergimar K. de Paiva *et al.* Toxic effects of silver nanoparticles on the germination and root development of lettuce (*Lactuca sativa*). **Australian Journal of Botany**, v. 68, n. 2, p. 127-136, May 2020.
- WILLIAMS, David B.; CARTER, C. Barry. **Electron microscopy: a textbook for materials science**. Boston: Springer, 2009.

## SUGESTÕES DE LEITURAS

MIGUEL, E. C. *et al.* Ontogenesis secretion and senescence of *Tocoyena bullata* (Vell.) Mart. (Rubiaceae) colleters. **Plant Biology**, v. 18, n. 5, p. 851-858, 2016.

PAIVA, E. A. S.; MACHADO, S. R. Colleters in *Caryocar brasiliense* (Caryocaraceae) ontogenesis, ultrastructure and secretion. **Brazilian Journal of Biology**, v. 66, n. 1B, p. 301-308, Feb. 2006. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/bjb/a/nbvHP5HxhnVLjzt467rFTjR/?lang=en#>. Acesso em: 27 maio 2021.

PINHEIRO, Sergimar K. de Paiva *et al.* Toxic effects of silver nanoparticles on the germination and root development of lettuce (*Lactuca sativa*). **Australian Journal of Botany**, v. 68, n. 2, p. 127-136, May 2020.

## 6 A IMUNO-HISTOQUÍMICA NA PESQUISA EM ONCOLOGIA: DETECÇÃO DE BIOMARCADORES TUMORAIS

Paulo Roberto Carvalho de Almeida  
Susana Moreira de Souza



### O QUE SERÁ FEITO?

À medida que a ciência e a tecnologia avançam, nos remetem de volta à famosa (e eu acrescentaria, em parte polêmica) frase de Albert Einstein: “Toda a nossa ciência, comparada com a realidade, é primitiva e infantil – e, no entanto, é a coisa mais preciosa que temos!” (SAGAN, 1997). A técnica, filha da ciência, abordada neste capítulo, sem dúvida, representa preciosa ferramenta na compreensão da complexa biologia do câncer e na viabilização de meios para sua detecção e utilização de condutas terapêuticas.

A imuno-histoquímica é uma técnica desenvolvida para detectar moléculas proteicas. Em geral, elas estão presentes na membrana, citoplasma ou núcleo de células. Essas proteínas podem ser utilizadas como biomarcadores moleculares na caracterização de tecidos normais ou histologicamente alterados. Na prática biomédica, a referida técnica representa uma ponte entre as patologias cirúrgica e molecular, ciência básica e medicina clínica, cirurgia e radiologia, e pode ser compreendida como a ferramenta do patologista para visualizar moléculas em seções de tecido (TERUYA-FELDSTEIN, 2010).

Consiste na utilização de anticorpos de dois tipos: monoclonais, que se ligam a um determinante antigênico único denominado epítipo, sendo muito específicos, de grande reprodutibilidade na coloração e com menos marcação de fundo na lâmina, embora com menor sensibilidade, ou policlonais, que se ligam a múltiplos epítipos do mesmo antígeno, sendo mais sensíveis que os monoclonais, porém deixam mais coloração de fundo, tendendo a menor especificidade e a resultados menos reprodutíveis (KIM; ROH; PARK, 2016).



## POR QUE SERÁ FEITO?

Tem grande utilização em diversos tipos de situações, pois traz informações específicas de microrganismos e de células eucarióticas normais ou transformadas (neoplásicas). Ao longo de seu desenvolvimento, essa técnica desempenhou um progressivo papel, muitas vezes decisivo no momento de auxiliar o patologista em seu diagnóstico histopatológico (KIM; ROH; PARK, 2016), sobretudo do câncer, representando até os dias atuais ferramenta indispensável, principalmente na caracterização de tumores. Paralelamente, o crescente e farto material do acervo de tecidos humanos nos arquivos de patologia diagnóstica forneceu uma das raízes para a utilização da imuno-histoquímica em pesquisa justamente na patologia humana, área de nossa atuação, que servirá de base para este capítulo, fazendo par com sua utilização também prolífica na investigação científica experimental em animais de laboratório (JANARDHAN et al., 2018).

Por meio da pesquisa por imuno-histoquímica em patologia oncológica humana, são obtidos preciosos elementos para investigação das vias moleculares oncogênicas (e em especial carcinogênicas), procura-se, de forma incessante, por biomarcadores moleculares característicos de neoplasias específicas; busca-se a descoberta de marcadores de células-tronco tumorais, tudo isso com repercussões importantes tanto nas áreas básicas da biologia dos tumores quanto na utilização cotidiana para a prática médica oncológica, ao serem reveladas moléculas relacionadas ao câncer, passo fundamental no desenvolvimento de drogas para terapia-alvo, dentro do moderno conceito de medicina personalizada para o tratamento oncológico (MCCOURT et al., 2013; HARDING et al., 2019; CATENACCI et al., 2021; ZHENG et al., 2021).



## ONDE SERÁ FEITO?

A imuno-histoquímica permite estabelecer em amostras de tecido normal dos mais diversos órgãos, a sua linhagem (ou natureza) e de seus tipos celulares (por exemplo: tecido epitelial, nervoso, muscular, mesenquimal) ou de seus subtipos (tecido epitelial de revestimento ou glandular; tecidos mesenquimais: conjuntivo, muscular liso, muscular estriado, adiposo, cartilaginoso, linfócitos T e B e dezenas de outros tipos celulares). Tecidos neoplásicos que surgem nestes órgãos, mesmo cancerosos, podem manter algumas ou muitas das características moleculares de seus tecidos normais de origem,



além de outras novas. Assim, através da imuno-histoquímica, pode ser esclarecida a linhagem celular de um tumor primário ou de suas metástases (WANG et al., 2017; MARWAH et al., 2021), com as implicações citadas, não só diagnósticas, mas terapêuticas, prognósticas e de acompanhamento da evolução do paciente (ZHU; TSAO, 2014; BĂRBĂLAN et al., 2018; VAN BOCKSTAL et al., 2018; BOCCHI et al., 2020).

## QUANDO SERÁ FEITO?

Sua utilização em oncologia pode fornecer informações precisas, principalmente em neoplasias primárias pouco diferenciadas, quando a técnica rotineira pela hematoxilina e eosina, ou mesmo algumas técnicas histoquímicas especiais forem insuficientes para caracterizar aquele tipo celular específico. A partir dessa caracterização do tumor, pode ser realizado um tratamento mais efetivo contra ele, a “terapia-alvo”, já citada. Outras vezes, a imuno-histoquímica em amostras de tumores metastáticos permite descobrir a sede de um tumor primário assintomático e ainda não diagnosticado (CARRETERO, 2015).



## POR QUEM E COM QUAIS EQUIPAMENTOS SERÁ FEITA?

A imuno-histoquímica precisa ser realizada por um técnico qualificado que domine seus fundamentos teóricos e tenha prática em sua realização. Pode ser feita toda manualmente, que é o que ocorre na maioria das vezes, mas atualmente existem diversos equipamentos que podem auxiliar o processo de coloração, inclusive, o sistema pode ser automatizado em todas as suas etapas, tanto de recuperação antigênica quanto na detecção do(s) antígeno(s), por meio de máquinas sofisticadas de sistemas digitais fabricados por diferentes empresas da área de tecnologia científica e utilizadas por grupos de pesquisa espalhados pelo mundo (TAKADA et al., 2018; REMES et al., 2020; ELLA-TOGWIIS et al., 2021). É sempre conveniente lembrar da necessidade da *expertise* do técnico em imuno-histoquímica para o controle e utilização de tais equipamentos.



## COMO SERÁ FEITO?

A técnica de imuno-histoquímica consiste em detectar um antígeno ou partes dele (epítomos = determinantes antigênicos) por meio de sua ligação com anticorpos específicos, que serão marcados com uma cor através de uma substância denominada cromógeno, a qual poderá ser visualizada pelo microscópio óptico (COONS; CRECH; JONES, 1941; COONS; KAPLAN; 1950).

Nos primórdios da imuno-histoquímica, utilizava-se uma **Reação Direta** por meio da marcação de um anticorpo primário fluorescente que se ligava diretamente ao antígeno, sem intermediários. A marcação não era muito evidente.

Em seguida, se desenvolveu uma **Reação Indireta** através de anticorpos secundários, que reagem contra o anticorpo primário, estando conjugados com a enzima peroxidase, obtida do rábano silvestre (água-forte), utilizando-se corantes (cromógenos) mais duradouros, não fluorescentes, como diaminobenzidina (DAB). Assim foi possível ampliar a intensidade de coloração das células-alvo (STERNBERGER et al., 1970). Em algumas situações, a fosfatase alcalina também representou outra opção enzimática, quando se quis evitar a peroxidase, produzindo-se complexos fosfatase alcalina/antifosfatase alcalina (APAAP), geralmente marcados com um corante vermelho como o vermelho rápido - *fast red* (CORDELL et al., 1984).

A utilização de amostras fixadas em formalina e impregnadas por parafina foi outro passo importante (TAYLOR; BURNS, 1974).

Ao longo de um processo evolutivo do mais simples ao mais complexo, foram sendo também incorporadas à reação outras moléculas que mostravam grande afinidade com anticorpos, por exemplo, a avidina, uma glicoproteína encontrada na clara de ovos de aves e a biotina, uma vitamina (HSU; RAINE; FANGER; 1981).

Ao final do século passado, foi desenvolvida a tecnologia dos polímeros, que consiste resumidamente na utilização de um esqueleto polimérico (e.g. polissacarídeos como os dextranos), no qual é inserido grande número de unidades de anticorpos secundários e de enzimas (e.g. peroxidase) igualmente indispensáveis à reação, o que aumentou tremendamente a sensibilização na detecção, mesmo de ínfimas quantidades do antígeno (SABATTINI et al., 1998).

Na lista de leitura sugerida ao final do capítulo podem ser encontradas excelentes publicações sobre a evolução da imuno-histoquímica desde os seus primórdios.

Em cortes histológicos de tecidos previamente fixados em formalina a 10% e incluídos em parafina, são as seguintes as etapas, em geral, da técnica:

1. Desparafinização.
2. Recuperação antigênica.
3. Eliminação da peroxidase endógena pela adição exógena de peróxido de hidrogênio (no caso de utilização da peroxidase e não da fosfatase alcalina na etapa seguinte).

### **Detecção do Antígeno**

A desparafinização dos cortes histológicos é universalmente realizada através de xilol. Na maioria das vezes, a recuperação antigênica é feita à base de calor, cuja ação expõe antígenos que foram ocultados por pontes de formalina durante a fixação do tecido. A quebra dessas pontes por meio térmico pode ser realizada em vários dispositivos. Inicialmente de modo mais simples e em grande parte pelo controle manual, como banhos de água morna (banho-maria), placas de aquecimento, panelas de pressão, chegando-se às autoclaves e fornos de micro-ondas (SHI; KEY; KALRA, 1991; KIM; ROH; PARK, 2016; MAGAKI et al., 2019).

Mais recentemente, aparelhos com aplicativos digitais computadorizados e controle mais sutil da temperatura têm sido utilizados, apresentando vantagens e desvantagens (MAGAKI et al., 2019). Para algumas exceções, no tocante a antígenos muito sensíveis ao calor, pode ser realizada uma recuperação antigênica por meio enzimático, neste caso, pela ação de tripsina, proteinases e outras enzimas, durante alguns minutos (KIM; ROH; PARK, 2016).

A eliminação da peroxidase endógena por meio da adição de peróxido de hidrogênio é etapa essencial nas técnicas em que esta enzima participa da ativação do cromógeno para se evitar coloração difusa de fundo.

São vários os sistemas de detecção antigênica em IHQ indireta. Podem ser processados manualmente com grande eficácia (KIM; ROH; PARK, 2016; MAGAKI et al., 2019) ou por equipamentos automatizados, programados e completamente controlados por computador (TAKADA et al., 2018).

Existem textos no item sugestões de leituras, ao final deste capítulo, que fornecem detalhes sobre as diversas variantes da técnica.

Ilustrando com a opção dos polímeros, a mais utilizada hoje, são as seguintes as etapas de detecção do antígeno:

- 1) Reação do anticorpo primário com o(s) epítipo(s) antigénico(s).
- 2) Amplificação da reação: acréscimo de um polímero, geralmente dextrano contendo anticorpos secundários (anticorpos contra os anticorpos primários, com os quais reagem) e moléculas de peroxidase.
- 3) Acréscimo de um cromógeno à reação (e.g. Diaminobenzidina-DAB), que é incolor e adquire coloração marrom acastanhada ao reagir com a peroxidase que estará acoplada ao complexo polímero-anticorpos secundários-anticorpo primário-antígeno.
- 4) Adição opcional de hematoxilina para contracoloração (contraste) das cores, exceto, claro, na pesquisa por marcadores nucleares.
- 5) Montagem da lâmina com bálsamo do Canadá (ou análogo) para sua observação por meio de microscópio.

Apresentamos uma animação original que mostra resumidamente as etapas e componentes desse tipo de reação, contendo algumas variações da técnica:

<https://drive.google.com/file/d/17tJrTA-sqPZNLqBaQdqJX3yzv-G6too0/view>

**Fonte da música tocada no vídeo:**

BRANDENBURG Concerto No. 4 in G: Movement I: Allegro: BWV 1049. Música: Kevin MacLeod. Compositor: Johann Sebastian Bach. [S.l.]: Icompetch, 2018. MP3 (7min17s). Disponível em: <https://incompetech.com/music/royalty-free/index.html?isrc=USUAN1100303>. Acesso em: 20 set. 2021.

**Obs:** A música tocada no vídeo está sob licença **Creative Commons CC BY**. Mais informações sobre a licença, acesse: <http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>

Como visto na animação, algumas das proteínas marcadas estão localizadas na membrana celular, outras no citoplasma, existindo também aquelas de localização nuclear.

Em pesquisa com imuno-histoquímica, o microscopista, que é geralmente um patologista, deverá avaliar a marcação, usualmente amarronzada (ou avermelhada) do

cromógeno em sua positividade/negatividade e estabelecer um escore de marcação. Desde há alguns anos e atualmente com mais intensidade devido ao surgimento de tecnologias avançadas, existem aplicativos que avaliam digitalmente por meio de computadores a coloração total de uma determinada área da amostra examinada.

Na prática laboratorial de pesquisa (e também nas rotinas de diagnóstico) são utilizadas mais frequentemente pelo pesquisador, as avaliações semiquantitativa e subjetiva, o qual usa escores, tendo em vista a intensidade da marcação e o número de células coradas por campo microscópico expresso em números absolutos ou em percentagem. Ambos os métodos são reprodutíveis e têm vantagens e desvantagens. A máquina apresenta maior reprodutibilidade, aprimora a confiabilidade, traz acurácia superior na quantificação em pesquisa, enquanto a avaliação do pesquisador sem o computador permite otimização e flexibilização mais sutil do uso de reagentes (MATOS et al., 2010; KIM; ROH; PARK, 2016). Existem vários esquemas de escores envolvendo um ou ambos os sistemas de quantificação em imuno-histoquímica.

No caso da avaliação de escores pelo pesquisador, utiliza-se frequentemente o escore combinado, tendo em vista o grau de marcação (nulo, discreto, moderado ou acentuado) e o número de células coradas por campo microscópico. Alguns autores somam o escore atribuído à intensidade com aquele conferido ao grau de celularidade (RAJNAKOVA et al., 2001). Outros multiplicam os 2 parâmetros (SUN et al., 2005), o que dá, a nosso ver, uma medida mais representativa do conjunto da amostra, como ilustrado na Tabela 1 a seguir.

**Tabela 1 - Escores para imuno-histoquímica**

Intensidade	Nº de células coradas				
	0	1	2	3	4
0	0	0	0	0	0
1	0	1	2	3	4
2	0	2	4	6	8
3	0	3	6	9	12

**Fonte:** Elaboração dos autores.

**Nota:** Intensidade → escores: 0 = ausência de coloração. 1 = marcação discreta na maioria das células. 2 = coloração moderada em > 50% das células. 3 = expressão acentuada em > 50% das células. Nº de células coradas (%) → Escore 1: < 25%; 2: 25 - 50%; 3: > 50 - 75%; 4: > 75 - 100%.

Uma possível conclusão da imunomarcação do caso escolhido por estes autores como exemplo, entre outros possíveis, pode ser:

### IMUNOMARCAÇÃO

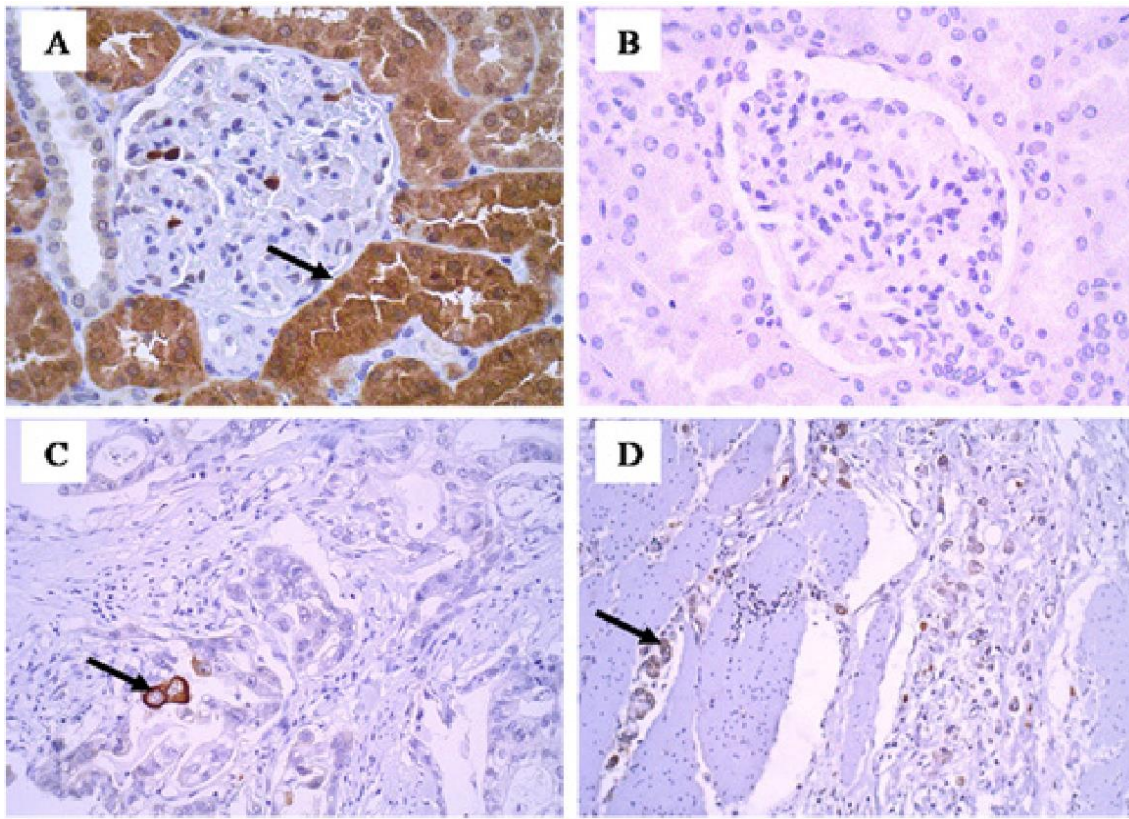
Discreta: 1 a 4
Moderada: 6
Acentuada: > 6

ou

Baixa expressão: < 6
Alta expressão: ≥ 6

Adiante, mostraremos fotografias de tecidos corados por diversos biomarcadores (anticorpos monoclonais) que foram utilizados em artigos de pesquisa sobre câncer e em que participamos, na maioria deles, como autores ou coautores. Podem ser vistas células de tecidos tumorais coradas na membrana, citoplasma ou núcleo, dependendo da localização do epítipo (imuno-histoquímica positiva) em vários graus, de discreto a acentuado, bem como controles em que foi suprimido o anticorpo primário e assim o tecido não foi corado (imuno-histoquímica negativa), como nesta primeira amostra:

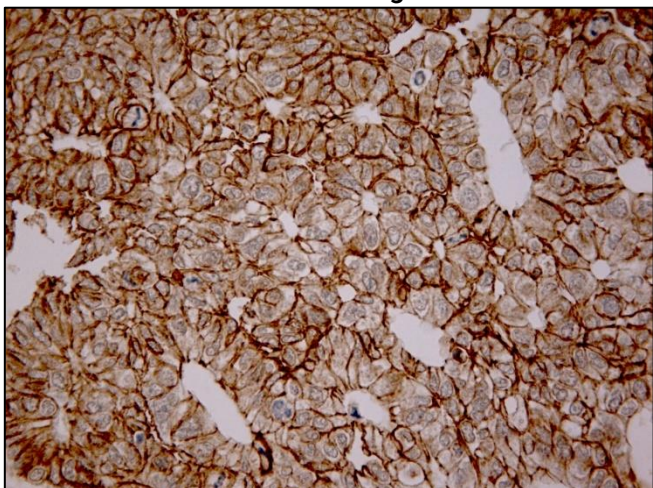
**Figura 1 - Imunomarcacão para LGR4 em controles positivos e negativos e em amostras de carcinomas gástricos**



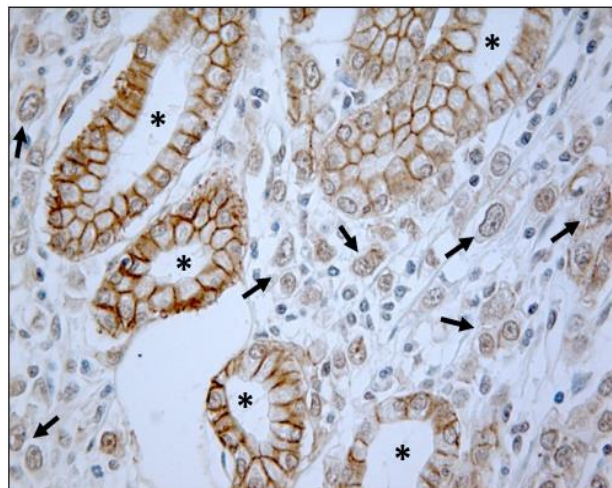
**Fonte:** Souza et al. (2019).

**Nota:** (A): Controle positivo: coloração citoplasmática em células tubulares renais - 400x. (B): Controle negativo: retirado o anticorpo primário da reação - 400x. (C): Carcinoma gástrico tipo intestinal primário. Raras células marcadas para LGR4; importante biomarcador de células-tronco tumorais (seta) - 200x. (D): Células tumorais de carcinoma gástrico difuso positivas para LGR4 (seta) - 200x.

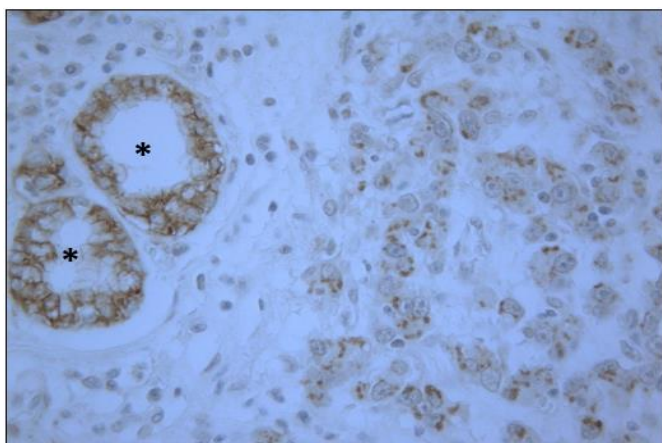
**Figura 2 - Marcação membranar: imunexpressão de Caderina-E em carcinomas gástricos dos tipos intestinal e difuso e na mucosa gástrica normal**



Expressão membranar conspícua de Caderina-E em amostra de carcinoma gástrico do tipo intestinal (classificação de Lauren), na maioria das células cancerosas dispostas em arranjos glanduliformes. Não há coloração citoplasmática e os núcleos apresentam tênue marcação pela hematoxilina - 400x.



Nesta amostra de carcinoma difuso (Lauren), as células malignas infiltrantes não mostram expressão de Caderina-E (setas), contrastando com a expressão membranar normal dessa molécula de adesão intercelular nas glândulas da mucosa gástrica adjacente \* - 400x.

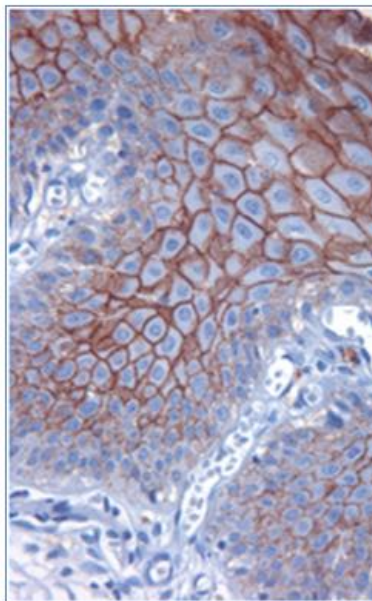


Carcinoma gástrico do histotipo difuso. Células isoladas invadindo o tecido conjuntivo, à esquerda da figura. Observar grânulos amarronzados que representam moléculas protéicas de Caderina-E, acumuladas no citoplasma das células tumorais, onde não exercem nenhuma função de adesão intercelular, resultado de alguma mutação ou alteração epigenética. À direita, duas glândulas gástricas normais com marcação intercelular de Caderina-E \* - 400x.

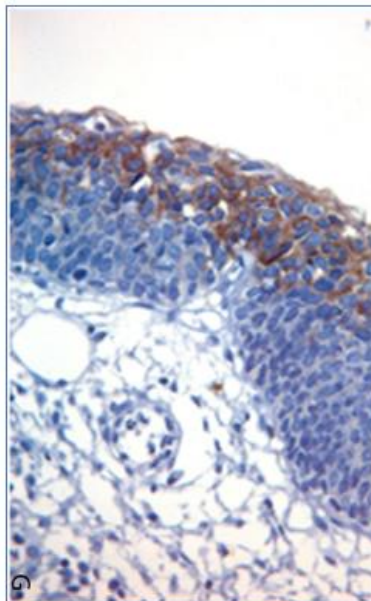
**Fonte:** Almeida et al. (2010).



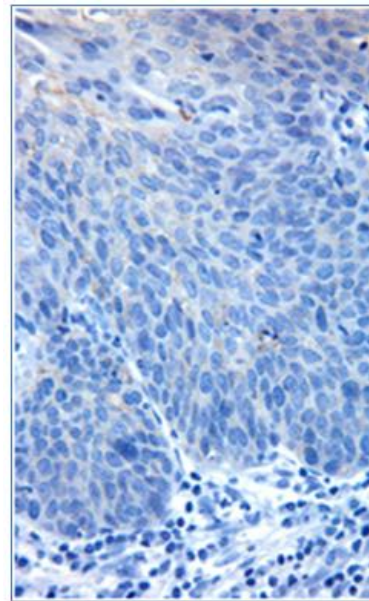
**Figura 3 - Marcação membranar: expressão decrescente de Caderina-E ao longo da carcinogênese que ocorre no colo uterino - carcinoma de células escamosas**



Epitélio estratificado pavimentoso normal. Expressão de Caderina-E em toda a espessura epitelial, exceto nas camadas basal e parabasal - 400x.



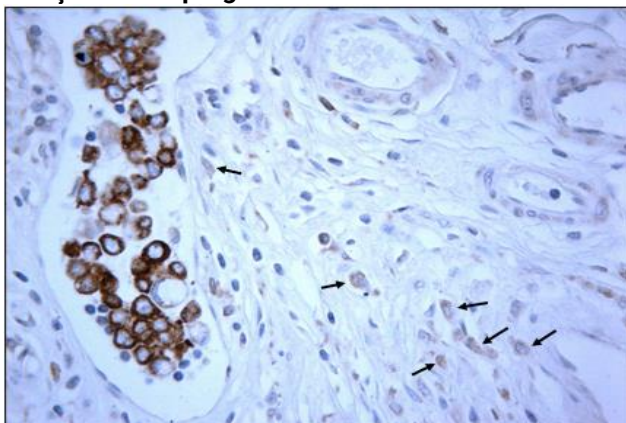
Lesão intraepitelial escamosa de alto grau (antiga NIC-II e displasia moderada). Perda de expressão de Caderina-E na metade inferior (menos diferenciada) do epitélio - 400x.



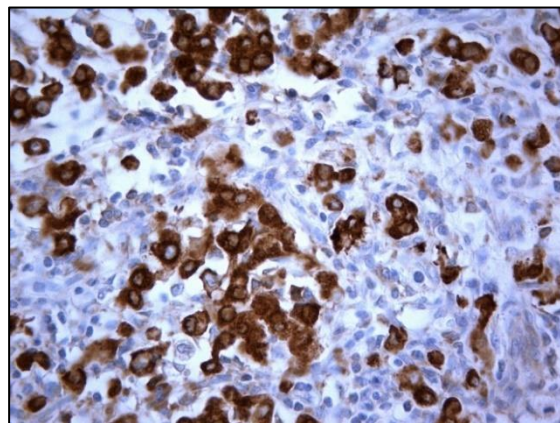
Carcinoma invasor de células escamosas. Perda completa de Caderina-E nas células cancerosas que invadem a lâmina própria - 400x.

Fonte: Cavalcante JR et al. (2014).

**Figura 4 - Marcação citoplasmática: expressão de ciclooxygenase-2 no câncer gástrico e sua relação com a progressão tumoral/linfonodal**



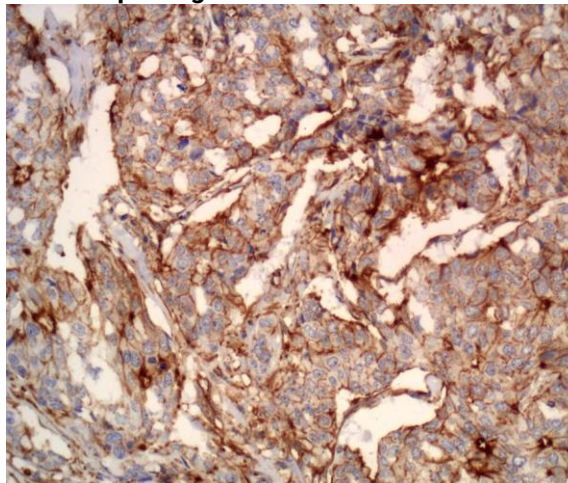
Estômago - Tumor primário: Expressão discreta de COX-2 em células malignas invasivas perivasculares (setas). À esquerda, êmbolo tumoral com células neoplásicas fortemente coradas para essa enzima. 400x.



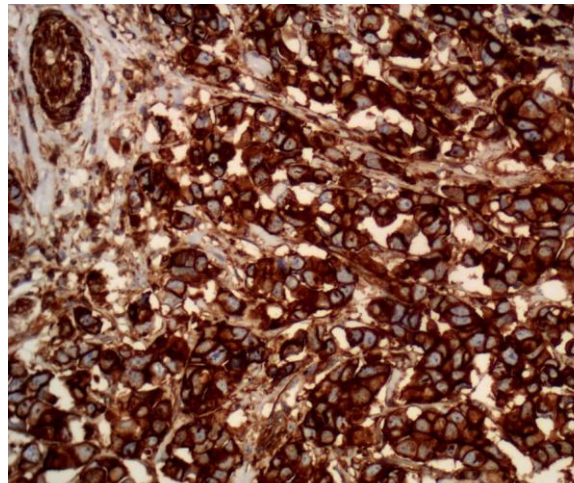
Linfonodo perigástrico: metástase do mesmo tumor primário mostrado à esquerda, com forte marcação (ainda mais intensa) para COX-2 em células de carcinoma gástrico do tipo difuso. A intensidade progressiva da expressão de COX-2 se relaciona diretamente com a progressão tumoral linfonodal. 400x.

Fonte: Almeida et al. (2012).

**Figura 5 - Biomarcadores de membrana e citoplasma. Imunoexpressão de CCR7 em câncer de mama triplo negativo**

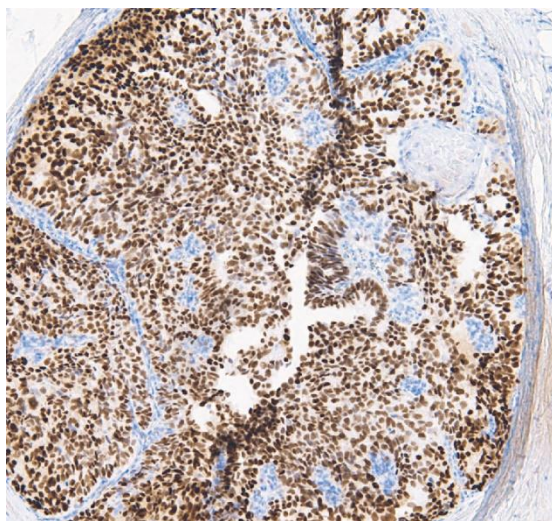


Mama: marcação membranar evidente para CCR7. Citoplasma com escassa positividade. Núcleos negativos para este receptor de quimiocina, corados pela hematoxilina, em carcinoma de mama triplo negativo. 200X.  
**Fonte:** Gurgel et al. (2020).

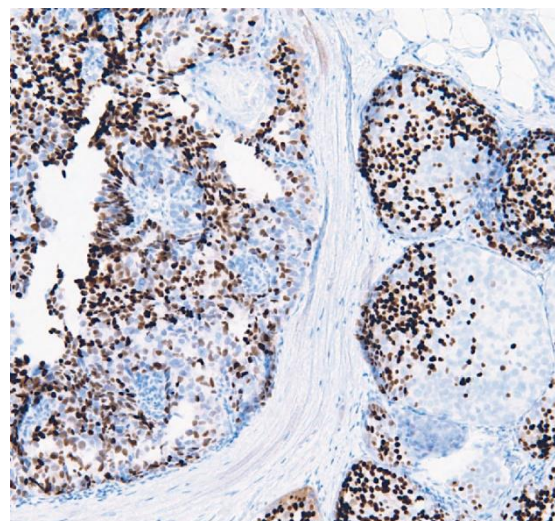


Mama: carcinoma de mama triplo negativo com marcação membranar e citoplasmática intensas para CCR7. Núcleos fracamente corados pela hematoxilina. 200X.

**Figura 6 - Marcação nuclear: imunomarcação para receptores de estrógeno e de progesterona em amostras de arquivo provenientes de mastectomias terapêuticas ou preventivas**



Mama: estudo em material de arquivo de mastectomias terapêuticas ou preventivas com o objetivo de avaliar a qualidade da técnica em imuno-histoquímica. Nesta amostra a quase totalidade dos núcleos está corada para o receptor de estrógeno (RE) com boa qualidade técnica. 100x.  
**Fonte:** Bulte et al. (2020).



Mama: mesmo estudo, mostrando marcação nuclear para receptor de progesterona (RP), classificado como de boa qualidade. Muitos núcleos são positivos para esse receptor (cor marrom) mas outros negativos estão corados pela hematoxilina de coloração azulada. 100x.

A associação de novas moléculas ao anticorpo secundário, na IHQ indireta, tende a aumentar a sensibilidade e reduzir a especificidade da reação (SABATTINI, 1998; BUTLER; BARHAM; HEIDENREICH, 2019). Com exceção do método direto, pouco sensível, todas essas variações na técnica continuam em uso atualmente (LIANG; ZHAO, 2018; BUTLER; BARHAM; HEIDENREICH, 2019; QAHTANI; EL-DEEB; METWALY, 2020; REMES et al., 2020; ZHOU et al., 2021). Cada grupo de pesquisa utilizando uma ou outra variação da técnica, avaliando as suas vantagens e desvantagens de acordo com sua melhor performance ou objetivos a serem alcançados com uma ou mais delas, levando-se também em conta, entre outros fatores, o custo-benefício.



## QUANTO TEM SIDO USADO NA PESQUISA?

Uma pesquisa realizada no PubMed<sup>2</sup>, no mês de dezembro de 2021, principal banco de dados de pesquisa em biomedicina, com mais de 30 milhões de referências bibliográficas atualmente, revelou a grande frequência de publicações relativas à técnica estudada no presente capítulo. Com a palavra-chave *Immunohistochemistry* foram encontrados, a partir de 1940, primórdios da técnica, até dezembro de 2021, um total de 730.000 artigos, com crescimento anual significativo de publicações, principalmente a partir da década de 1980. Desses artigos, cerca de 240.000 estão relacionados com câncer (33%), o que mostra a grande relevância dessa técnica para a Oncologia.

Na última década, a imuno-histoquímica teve seu espectro ampliado na chamada imuno-histoquímica *multiplex* (mIHC), que consiste na utilização de diversos cromógenos sobre uma mesma célula ou conjunto de células de um único corte histológico (não em cortes sequenciais de um mesmo bloco), mas em amostras parafinadas fixadas em formalina, o que torna possível a detecção simultânea de várias proteínas em uma mesma célula. Após a marcação por um cromógeno utilizando-se IHQ indireta convencional à base de peroxidase, segue seu apagamento e nova marcação associada a outro anticorpo, cuja alternância pode ser repetida. As imagens são gravadas em computador e feita uma reconstrução digital dos diversos marcadores, sobrepondo-se cores artificiais distintas para cada anticorpo específico (HOFMAN et al., 2019; TAN et al., 2020). Certamente é uma técnica de vanguarda, ainda pouco utilizada em laboratórios de

<sup>2</sup> Disponível em:

[https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/?term=immunohistochemistry&sort=pubdate&sort\\_order=asc&size=200](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/?term=immunohistochemistry&sort=pubdate&sort_order=asc&size=200)

imuno-histoquímica atualmente, e assim não há, também, muitas citações em artigos científicos sobre ela. As novas perspectivas, o futuro da imuno-histoquímica em pesquisa, tanto na oncologia básica experimental quanto em sua aplicação na investigação científica sobre câncer em seres humanos, é promissor. Existem várias tentativas de se associarem plataformas distintas como IHQ *multiplex*, microscopia intravital, citometria de fluxo, citometria de massa, sequenciamento de RNA de célula única e transcriptômica espacial, entre outras (MAIQUES; GEORGOULI; SANZ-MORENO, 2019; WU et al., 2020).

E assim chegamos ao final deste capítulo. Desejamos a vocês uma excelente leitura deste livro!

## REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, Paulo R. C. *et al.* Immunoexpression of cyclooxygenase-2 in primary gastric carcinomas and lymph node metastases. **World Journal of Gastroenterology**, v. 28, n. 18, p. 778-784, Feb. 2012. Disponível em: <https://www.wjnet.com/1007-9327/full/v18/i8/778.htm>. Acesso em: 12 mar. 2021.
- ALMEIDA, P. R. *et al.* E-cadherin immunoexpression patterns in the characterisation of gastric carcinoma histotypes. **Journal of Clinical Pathology**, v. 63, n. 7, p. 635-639, July 2010.
- BĂRBĂLAN, Alexandru *et al.* Immunohistochemistry predictive markers for primary colorectal cancer tumors: where are we and where are we going? **Romanian Journal of Morphology & Embryology**, v. 59, n. 1, p. 29-42, 2018. Disponível em: <https://rjme.ro/RJME/resources/files/590118029042.pdf>. Acesso em: 2 abr. 2021.
- BOCCHI, Mayara *et al.* Expression of Ki67 and p53 proteins: breast cancer aggressivity markers in Brazilian young patients. **Journal of Adolescent and Young Adult Oncology**, p. 1-10, July 2020.
- BULTE, Joris P. *et al.* Accelerated tissue processing with minimal formalin fixation time for 9-gauge vacuum-assisted breast biopsy specimens. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 1, n. 153, p. 58-65, Jan. 2020. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6910876/>. Acesso em: 12 mar. 2021.
- BUTLER, Jae L.; BARHAM, Beverly J.; HEIDENREICH, Byron A. Comparison of indirect peroxidase and avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) immunohistochemical staining procedures for c-fos in rat brain. **Journal of Anatomy**, v. 234, n. 6, p. 936-942, June 2019.
- CARRETERO, Rafael García *et al.* Primary bone metastasis as first manifestation of an unknown primary tumour. **BMJ Case Reports**, p. 1-3, Sept. 2015. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4567768/>. Acesso em: 2 abr. 2021.
- CATENACCI, Daniel V. T. *et al.* Personalized antibodies for gastroesophageal adenocarcinoma (PANGEA): a phase II study evaluating an individualized treatment strategy for metastatic disease. **Cancer Discovery**, v. 11, n. 2, p. 308-325, Feb. 2021. Disponível em: <https://cancerdiscovery.aacrjournals.org/content/11/2/308.long>. Acesso em: 2 abr. 2021.
- CAVALCANTE, José Roosevelt *et al.* Progressive loss of E-cadherin immunoexpression during cervical carcinogenesis. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 29, n. 10, p. 667-674, Oct. 2014. Disponível em: [https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0102-86502014001000667&lng=en&nrm=iso&tIng=en](https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-86502014001000667&lng=en&nrm=iso&tIng=en). Acesso em: 13 mar. 2021.
- COONS, Albert H.; CREECH, Hugh J.; JONES, R. Norman. Immunological properties of an antibody containing a fluorescent group. **Experimental Biology and Medicine**, v. 47, n. 2, p. 200-202, June 1941.

COONS, Albert H.; KAPLAN, Melvin H. Localization of antigen in tissue cells; improvements in a method for the detection of antigen by means of fluorescent antibody. **Journal of Experimental Medicine**, v. 91, n. 1, p. 1-13, Jan. 1950.

Disponível em: <https://rupress.org/jem/article/91/1/1/5329/LOCALIZATION-OF-ANTIGEN-IN-TISSUE-CELLS-II>. Acesso em: 13 mar. 2021.

CORDELL, J. L. et al. Immunoenzymatic labeling of monoclonal antibodies using immune complexes of alkaline phosphatase and monoclonal anti-alkaline phosphatase (APAAP complexes). **Journal of Histochemistry Cytochemistry**, v. 32, n. 2, p. 219-229, Feb. 1984.

Disponível em:

[https://journals.sagepub.com/doi/10.1177/32.2.6198355?url\\_ver=Z39.88-2003&rfr\\_id=ori:rid:crossref.org&rfr\\_dat=cr\\_pub%20%20pubmed](https://journals.sagepub.com/doi/10.1177/32.2.6198355?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori:rid:crossref.org&rfr_dat=cr_pub%20%20pubmed). Acesso em: 2 abr. 2021.

ELLA-TONGWIIS, Peter et al. Optimisation and validation of immunohistochemistry protocols for cancer research. **Histology and Histopathology**, p. 1-31, Feb. 2021.

Disponível em: [https://www.hh.um.es/Abstracts/Vol\\_//\\_18317.htm](https://www.hh.um.es/Abstracts/Vol_//_18317.htm). Acesso em: 2 abr. 2021.

GURGEL, Daniel Cordeiro et al. Cytoplasmic CCR7 (CCR7c) immunoeexpression is associated with local tumor recurrence in triple-negative breast cancer. **Pathology Research and Practice**, v. 216, n. 12, p. 1-7, Dec. 2020.

HARDING, James J. et al. A phase Ib/II study of ramucirumab in combination with emibetuzumab in patients with advanced cancer. **Clinical Cancer Research**, v. 25, n. 17, p. 5202-5211, Sept. 2019. Disponível em:

<https://clincancerres.aacrjournals.org/content/clincanres/25/17/5202.full.pdf>. Acesso em: 2 abr. 2021.

HOFMAN, Paul et al. Multiplexed immunohistochemistry for molecular and immune profiling in lung cancer-just about ready for prime-time? **Cancers (Basel)**, v. 11, n. 3, p. 1-22, Feb. 2019. Disponível em:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6468415/>. Acesso em: 2 abr. 2021.

HSU, Su-Ming; RAINE, L; FANGER, H .Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. **The Journal and Histochemistry Cytochemistry**, v. 29, n. 4, p. 577-580, Apr. 1981. Disponível em:

[https://journals.sagepub.com/doi/10.1177/29.4.6166661?url\\_ver=Z39.88-2003&rfr\\_id=ori:rid:crossref.org&rfr\\_dat=cr\\_pub%20%20pubmed](https://journals.sagepub.com/doi/10.1177/29.4.6166661?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori:rid:crossref.org&rfr_dat=cr_pub%20%20pubmed). Acesso em: 13 mar. 2021.

JANARDHAN, Kyathanahalli S. et al. Immunohistochemistry in investigative and toxicologic pathology. **Toxicologic Pathology**, v. 46, n. 5, p. 488-510, July 2018. Disponível em:

[https://journals.sagepub.com/doi/10.1177/0192623318776907?url\\_ver=Z39.88-2003&rfr\\_id=ori:rid:crossref.org&rfr\\_dat=cr\\_pub%20%20pubmed](https://journals.sagepub.com/doi/10.1177/0192623318776907?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori:rid:crossref.org&rfr_dat=cr_pub%20%20pubmed). Acesso em: 2 abr. 2021.

KIM, So-Woon; ROH, Jin; PARK, Chan-Sik. Immunohistochemistry for pathologists: protocols, pitfalls, and tips. **Journal of Pathology and Translational Medicine**, v. 50, n. 6, p. 411-418, Nov. 2016. Disponível em:

[https://journals.sagepub.com/doi/10.1177/0192623318776907?url\\_ver=Z39.88-2003&rfr\\_id=ori:rid:crossref.org&rfr\\_dat=cr\\_pub%20%20pubmed](https://journals.sagepub.com/doi/10.1177/0192623318776907?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori:rid:crossref.org&rfr_dat=cr_pub%20%20pubmed). Acesso em: 2 abr. 2021.

LIANG, M.; ZHAO, J. Protein expressions of AIB1, p53 and Bcl-2 in epithelial ovarian cancer and their correlations with the clinical pathological features and prognosis.

**European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, v. 22, n. 16, p. 5134-5139, Aug. 2018. Disponível em: <https://www.europeanreview.org/article/15708>. Acesso em: 25 mar. 2021.

MAGAKI, Shino *et al.* An introduction to the performance of immunohistochemistry.

**Methods in Molecular Biology**, v. 1897, p. 289-298, 2019. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6749998/>. Acesso em: 2 abr. 2021.

MAIQUES, Oscar; GEORGOULI, Mirella; SANZ-MORENO, Victoria. Recent advances in tissue imaging for cancer research. **F1000 Research**, v. 8, p. 1-12, Nov. 2019. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6880269/>. Acesso em: 2 abr. 2021.

MARWAH, Nisha *et al.* Optimal panel of immunohistochemistry for the diagnosis of B-cell non-Hodgkin lymphoma using bone marrow biopsy: a tertiary care center study. **Blood Research**, v. 31, n. 56, p. 26-30, Mar. 2021. Disponível em:

<https://www.bloodresearch.or.kr/journal/view.html?volume=56&number=1&spage=26>. Acesso: 29 mar 2021.

MATOS, Leandro Luongo de *et al.* Immunohistochemistry as an important tool in biomarkers detection and clinical practice. **Biomarker Insights**, v. 5, p. 9-20, Feb. 2010.

Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2832341/>. Acesso em: 2 abr. 2021.

MCCOURT, Clara Margaret *et al.* Immunohistochemistry in the era of personalised medicine. **Journal of Clinical Pathology**, v. 66, n. 1, p. 58-61, Jan. 2013.

QAHTANI, Mashael S.; EL-DEEB Amal M.; METWALY, Hamdy A. M. Evaluation of immunohistochemical expression of TWIST in oral epithelial dysplasia and squamous cell carcinoma. **International Journal of Health Sciences**, v. 14, n. 2, p. 33-39, Mar./Apr. 2020.

Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7069664/>. Acesso em: 13 mar. 2021.

RAJNAKOVA, Andrea *et al.* Expression of nitric oxide synthase, cyclooxygenase, and p53 in different stages of human gastric cancer. **Cancer Letters**, v. 172, n. 30, p. 177-185, Oct. 2001.

REMES, Satu Maria *et al.* PCSK2 expression in neuroendocrine tumors points to a midgut, pulmonary, or pheochromocytoma-paraganglioma origin. **APMIS**, v. 128, n. 11, p. 563-572, Nov. 2020. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7702075/>.

Acesso em: 13 mar. 2021.

SABATTINI, E *et al.* The EnVision++ system: a new immunohistochemical method for diagnostics and research: critical comparison with the APAAP, ChemMate, CSA, LABC, and SABC techniques. **Journal of Clin Pathology**, v. 51, n. 7, p. 506-511, Jul. 1998.

Disponível em:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC500802/pdf/jclinpath00268-0018.pdf>.

Acesso em: 13 mar. 2021.

SAGAN, Carl. **O mundo assombrado pelos demônios**: a ciência vista como uma vela no escuro. Tradução de Rosaura Eichemberg. 3. reimp. [S.l.]: Cia das Letras, 1997.

SHI, Shan-Rong; KEY, Marc E.; KALRA, Krishan L. Antigen retrieval in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: an enhancement method for immunohistochemical staining based on microwave oven heating of tissue sections. **The Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v. 39, n. 6, p. 741-748, June 1991. Disponível em:

<https://journals.sagepub.com/doi/pdf/10.1177/39.6.1709656>. Acesso em: 2 abr. 2021.

SOUZA, Susana Moreira de *et al.* Immunoexpression of LGR4 and B-Catenin in gastric cancer and normal gastric mucosa. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 20, n. 2, p. 519-527, Feb. 2019. Disponível em:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6897001/>. Acesso em: 13 mar. 2021.

STERNBERGER, Ludwig A. *et al.* The unlabeled antibody-enzyme method of immunohistochemistry: preparation and properties of soluble antigen-antibody complex (horseradish peroxidase-antihorse-radish peroxidase) and its use in identification of spirochetes. **Journal of Histochemistry Cytochemistry**, v. 18, n. 5, p. 315-333, 1970.

Disponível em: [https://journals.sagepub.com/doi/10.1177/18.5.315?url\\_ver=Z39.88-2003&rfr\\_id=ori:rid:crossref.org&rfr\\_dat=cr\\_pub%20%20pubmed](https://journals.sagepub.com/doi/10.1177/18.5.315?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori:rid:crossref.org&rfr_dat=cr_pub%20%20pubmed).

Acesso em: 13 mar. 2021.

SUN, Wei Hao *et al.* Expression of cyclooxygenase-2 and matrix metalloproteinase-9 in gastric carcinoma and its correlation with angiogenesis. **Japanese Journal of Clinical Oncology**, v. 35, n. 12, p. 707-713, Dec. 2005. Disponível em:

<https://academic.oup.com/jjco/article/35/12/707/813232>. Acesso em: 13 mar. 2021.

TAKADA, Nami *et al.* Re-evaluation of MIB-1 immunostaining for diagnosing hyalinizing trabecular tumour of the thyroid: semi-automated techniques with manual antigen retrieval are more accurate than fully automated techniques. **Endocrine Journal**, v. 65, n. 2, p. 239-244, Feb. 2018. Disponível em:

[https://www.jstage.jst.go.jp/article/endocrj/65/2/65\\_EJ17-0413/\\_article](https://www.jstage.jst.go.jp/article/endocrj/65/2/65_EJ17-0413/_article). Acesso em: 2 abr. 2021.

TAN, Wei Chang Colin *et al.* Overview of multiplex immunohistochemistry/immunofluorescence techniques in the era of cancer immunotherapy. **Cancer Communications**, v. 40, n. 4, p. 135-153, Apr. 2020. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7170662/>. Acesso em: 2 abr. 2021.

TAYLOR, C. R.; BURSANS, J. The demonstration of plasma cells and other immunoglobulin-containing cells in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues using peroxidase-labelled antibody. **Journal of Clinical Pathology**, v. 27, n. 1, p. 14-20, Jan. 1974. Disponível em:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC477979/>. Acesso em: 13 mar. 2021.



TERUYA-FELDSTEIN, Julie. The immunohistochemistry laboratory: looking at molecules and preparing for tomorrow. **Archives of Pathology & Laboratory Medicine**, v. 134, n. 11, p. 1659-1665, Nov. 2010.

VAN BOCKSTAL, Mieke *et al.* A plea for appraisal and appreciation of immunohistochemistry in the assessment of prognostic and predictive markers in invasive breast cancer. **The Breast**, v. 37, p. 52-55, Feb. 2018.

WANG, Hanlin L. *et al.* Practical immunohistochemistry in neoplastic pathology of the gastrointestinal tract, liver, biliary tract, and pancreas. **Archives of Pathology Laboratory Medicine**, v. 141, n. 9, p. 1155-1180, Sept. 2017. Disponível em: <https://meridian.allenpress.com/aplm/article/141/9/1155/172747/Practical-Immunohistochemistry-in-Neoplastic>. Acesso em: 2 abr. 2021.

WU, Kaiyue *et al.* Redefining tumor-associated macrophage subpopulations and functions in the tumor microenvironment. **Frontiers in Immunology**, v. 11, p. 1-14, Aug. 2020. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2020.01731/full>. Acesso em: 2 abr. 2021.

ZHENG, Hong *et al.* A phase I clinical trial of avelumab in combination with decitabine as first line treatment of unfit patients with acute myeloid leukemia. **American Journal of Hematology**, v. 96, n. 2, p. E48-E51, Feb. 2021. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7894154/pdf/AJH-96-E46.pdf>. Acesso em: 2 abr. 2021.

ZHOU, Sitong *et al.* UTRN inhibits melanoma growth by suppressing p38 and JNK/c-Jun signaling pathways. **Cancer Cell International**, v. 21, n. 88, p. 1-11, Feb. 2021. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33632212/>. Acesso em: 13 mar. 2021.

ZHU, Chang-Qi; TSAO, Ming-Sound. Prognostic markers in lung cancer: is it ready for prime time? **Translational Lung Cancer Research**, v. 3, n. 3, p. 149-158, June 2014. Disponível em: <https://tlcr.amegroups.com/article/view/2729/3280>. Acesso em: 2 abr. 2021.

## SUGESTÕES DE LEITURAS

CHILDS, Gwen V. History of Immunohistochemistry. *In*: MCMANUS, Linda M.; MITCHELL, Richard N. (ed.). **Pathobiology of human disease**. San Diego: Elsevier, 2014. p. 3775-3796. Disponível em: [https://www.researchgate.net/publication/267751939\\_History\\_of\\_Immunohistochemistry](https://www.researchgate.net/publication/267751939_History_of_Immunohistochemistry). Acesso em: 25 mar. 2021.

FERRO, Amadeu Borges. **Imunohistoquímica**. Lisboa: Instituto Politécnico de Lisboa: Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa, 2014. 159 p. Disponível em: <https://amadeuferro.webs.com/documentos/texto%20total%20v2.4a.pdf>. Acesso em: 12 mar. 2021.

LAURÉN, Pekka. The two histological main types of gastric carcinoma: diffuse and so-called intestinal-type carcinoma: an attempt at a histo-clinical classification. **Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica**, v. 64, p. 31-49, 1965.

WENZEL, Carina *et al.* Routine molecular pathology diagnostics in precision oncology. **Archive of Dtsches Ärzteblatt International**, v. 118, p. 255-261, Apr. 2021.

## 7 IMUNOFLORESCÊNCIA PARA O ESTUDO DO SISTEMA NERVOSO

Mariana Lima Vale  
Anamaria Falcão Pereira  
Cristiane Maria Pereira da Silva  
Rosemayre Souza Freire  
Afonso Luiz Dantas Moura



### O QUE SERÁ FEITO?

Este capítulo destina-se a descrever o estudo do tecido nervoso por meio da imunofluorescência. Veremos adiante o uso dessa técnica quando o tecido nervoso é o principal alvo de pesquisa, evidenciando as vantagens e os motivos de se optar por ela, bem como será explicado o passo a passo para obter os melhores resultados.

Coons; Creech e Jones (1941) descreveram a conjugação entre um anticorpo e o isocianato, um componente químico fluorescente. Ao se ligarem quimicamente a antígenos de tecidos de mamíferos poderiam expô-los opticamente por meio de luz ultravioleta (UV). A partir desse feito, originou-se o conceito base para o funcionamento da imunofluorescência.

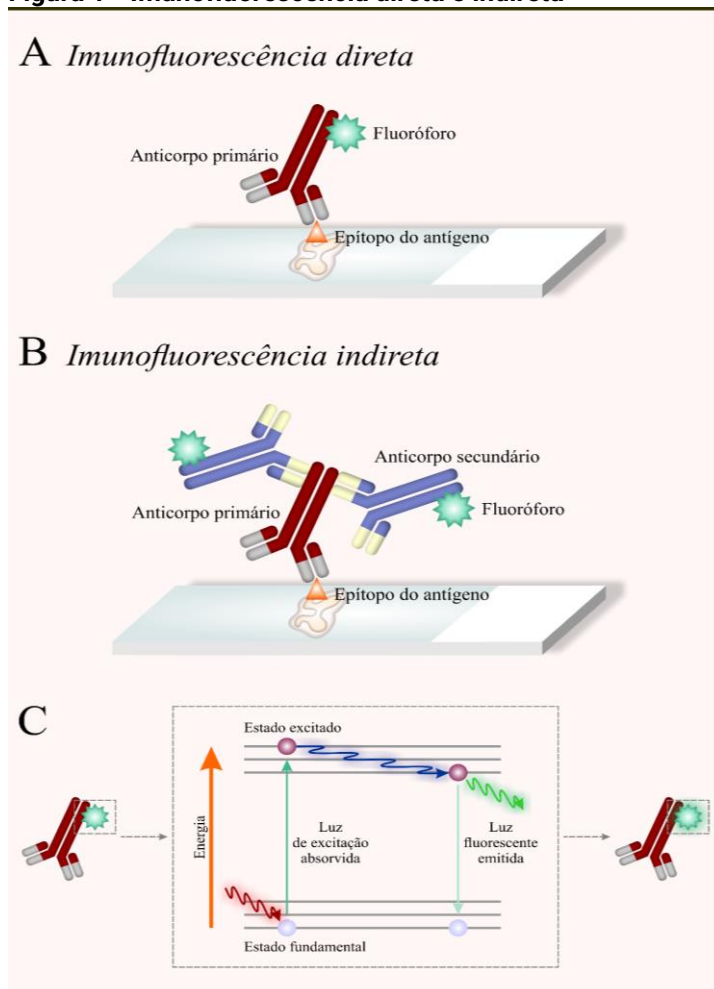
Assim, as técnicas de imunofluorescência seguem o princípio definido pela reação entre um conjugado fluoróforo-anticorpo ao seu antígeno específico, permitindo sua detecção e visualização por microscopia de fluorescência e microscopia confocal de varredura a *laser* (JOSHI; YU, 2017). O antígeno, para os fins de pesquisa, geralmente é a proteína de interesse, molécula e/ou estrutura biológica que se deseja investigar. Já os fluoróforos são substâncias químicas capazes de reemitir luz em um determinado comprimento de onda após excitação, como pode ser visualizado na Figura 1C (SANDERSON et al., 2014).

Os métodos de imunofluorescência podem ser divididos entre imunofluorescência direta e imunofluorescência indireta. Na imunofluorescência direta apenas um anticorpo primário é acoplado diretamente a um fluoróforo formando o conjugado fluoróforo-anticorpo que se liga ao antígeno (Figura 1A). Os protocolos de imunofluorescência direta possuem a vantagem de ser mais simples e mais rápidos, além de permitir uma boa marcação quando o protocolo de pesquisa exige a utilização de vários anticorpos. Entretanto, não há condição de uma ampliação da marcação, podendo resultar

em uma marcação de menor visibilidade caso a expressão do antígeno seja baixa. Adicionalmente, tais protocolos possuem também um custo mais elevado devido ao valor dos anticorpos, além do uso em maior quantidade destes. Portanto, custos e uso são maiores em protocolos do método direto quando comparados aos protocolos do método indireto (IM et al., 2019; JOSHI; YU, 2017).

Já os métodos de imunofluorescência indireta envolvem a ligação de um anticorpo secundário conjugado a um fluoróforo com um anticorpo primário que, por sua vez, reconhecerá o antígeno (Figura 1B). Esses protocolos possuem a vantagem de ampliar a marcação e possibilitam uma boa visualização de moléculas alvos que estão pouco expressas, além de serem mais flexíveis que os protocolos de imunofluorescência direta. Entretanto, são necessários conhecimento e planejamento para evitar a ocorrência de reações cruzadas quando diferentes anticorpos forem utilizados (IM et al., 2019; JOSHI; YU, 2017; ODELL; COOK, 2013).

**Figura 1 - Imunofluorescência direta e indireta**



**Fonte:** Elaboração dos autores.



## POR QUE SERÁ FEITO?

O sistema nervoso possui como função principal a capacidade de controlar um grande número de mecanismos fisiológicos pelo constante funcionamento de transmissão de sinais químicos, mediada por moléculas específicas, como exemplo, os neurotransmissores (HALL, 2017; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013). Portanto, seguindo os avanços da neurociência, é cada vez mais presente a necessidade de analisar as células nervosas não apenas quanto à sua morfologia, mas também em nível molecular, para poder compreender a complexidade dos mecanismos bioquímicos e elucidar a dinâmica entre neurotransmissores, seus respectivos receptores e as consequentes respostas fisiológicas e fisiopatológicas. Para isso, é importante que o método de análise histológica permita uma maior qualidade de imagem, especificidade e até a possibilidade de quantificar componentes celulares específicos, como proteínas, transportadores, canais iônicos e neurotransmissores.

Nesse contexto, métodos clássicos histológicos como a coloração por hematoxilina e eosina (HE) e os métodos que utilizam a afinidade dos tecidos nervosos com a prata, apesar de fornecerem detalhes morfológicos e estruturais, bem como a visualização de componentes celulares, se limitam a oferecer uma visualização menos específica em nível molecular do tecido nervoso quando comparados aos métodos de imunofluorescência.

A coloração HE pode apresentar algumas limitações, como a dificuldade de diferenciar estruturas devido à similaridade de densidade óptica (LARSON et al., 2011). Além disso, células da micróglia, que possuem papel fundamental na fisiologia do sistema nervoso, por exemplo, são pouco exploradas por causa da visualização apenas do núcleo quando coradas com HE (MONTANARI, 2016). Adicionalmente, a grande quantidade de lipídios presentes em tecidos nervosos por conta da sua mielinização, dificulta o uso de protocolos que utilizam processamento por parafina ocasionado pela dissolução da bainha de mielina em solventes orgânicos comumente usados nesses protocolos (CARRIEL et al., 2017).

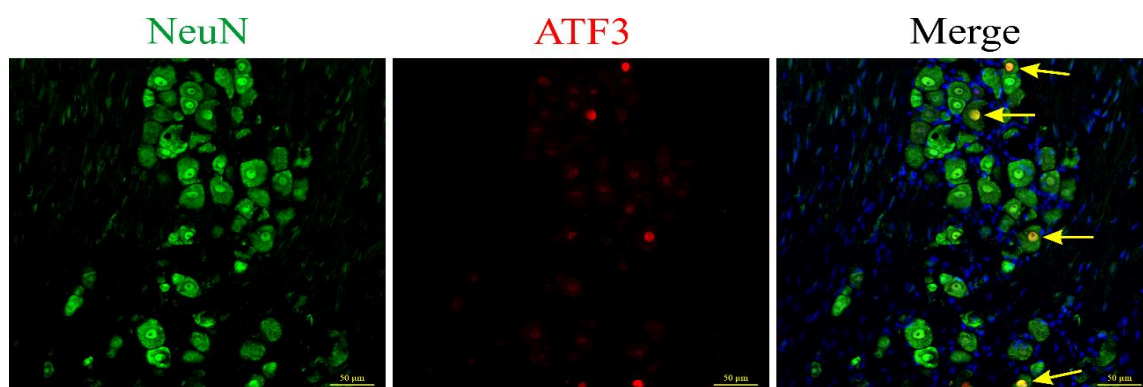
Com relação às técnicas que consideram a afinidade de tecidos nervosos, a prata como os protocolos de Gallyas, Bielschowsky e Bodian, apesar de serem bastante úteis para visualizar a morfologia de células neurais, bem como suas organelas e perfis de regeneração e degeneração, tais protocolos dependem do tamanho do tipo de lesão, pois

são baseados no princípio de que tecidos lesionados se tornam argirofílicos (UCHIHARA, 2007; SWITZER, 2000; RITTER; DINH, 1992; GALLYAS, 1971; BODIAN, 1936; BIELSCHOWSKY, 1908).

Já os protocolos imunohistoquímicos devido à alta especificidade e à sensibilidade, podem oferecer detalhes não só estruturais e morfológicos das células nervosas, mas também moleculares, respondendo a perguntas direcionadas a mecanismos fisiológicos ou fisiopatológicos. A técnica de imunohistoquímica se baseia na interação de anticorpos de detecção de antígenos específicos em membrana, citoplasma e núcleo de células, determinando sua distribuição em cortes de tecido (DURAIYAN et al., 2012).

Em relação aos protocolos de imunohistoquímica convencionais, a imunofluorescência possui a vantagem de possibilitar a marcação concomitante de diferentes alvos moleculares a partir da utilização de anticorpos conjugados a diferentes fluoróforos (MORI; CARDIFF, 2016). Além disso, por meio da marcação de proteínas e outros compostos celulares é possível identificar sua localização celular e subcelular, bem como seu nível de expressão (IM et al., 2019; JOSHI; YU, 2017). Adicionalmente, permite evidenciar estágios de ativação ou repouso de neurônios e glia, proliferação, degeneração e morte celular. Uma outra vantagem é que a marcação simultânea de vários alvos na mesma amostra permite visualizar a existência de co-localização entre dois antígenos ou mais (Figura 2). Esse fato faz com que a técnica de imunofluorescência seja uma ferramenta poderosa na pesquisa básica e clínica, além de ser uma técnica sensível, direta e precisa de diagnóstico (RYU, 2016; ODELL; COOK, 2013; COONS, 1960).

**Figura 2 - Fotomicrografia confocal de gânglio trigeminal de camundongo**



**Fonte:** Arquivo dos autores.

**Legenda:** A fotomicrografia mostra um gânglio trigeminal de camundongo marcado com NeuN (verde; marcador neuronal) e ATF3 (vermelho; marcador de dano neuronal) e DAPI (azul; marcador de núcleo celular). A colocalização de NeuN e ATF3 está evidenciada em amarelo (setas). Aumento: 200x. Escala: 50 µm.

Por fim, a possibilidade do uso do microscópio confocal para obter fotomicrografias também é uma grande vantagem dos protocolos de imunofluorescência. Nesse sentido, além de melhorar a resolução óptica, a microscopia confocal também permite a obtenção de imagens em vários planos focais e sua capacidade de excluir informações desfocadas possibilita a construção de uma imagem em 3D (**Ver o capítulo intitulado Método de Análise de Microscopia Confocal em Tecidos Animal e Vegetal, neste e-book**). Dessa forma, permite ainda a análise da estrutura biológica de interesse de forma mais preservada e com melhora da visualização temporal e espacial (BACALLAO; SOHRAB; PHILLIPS, 2006; JOSHI; YU, 2017).



### ONDE SERÁ FEITO?

Especificamente na análise histológica e molecular do sistema nervoso, a técnica de imunofluorescência pode ser realizada em células como neurônios, microglia, astrócitos, oligodendrócitos e células satélites gliais em cultura, assim como também em cortes de tecido. Para tecidos do sistema nervoso, é possível estudar estruturas como gânglios nervosos, nervos periféricos, estruturas do diencefalo, telencefalo, cerebelo, tronco encefálico, entre outros (GASSER et al., 2006; CHUGANI; KEDERSHA; ROME, 1991; RAVICH et al., 1998; BIGNAMI et al., 1972).

Considerando a grande relevância da utilização da técnica de imunofluorescência na pesquisa, este capítulo é destinado a fornecer informações para embasamento e apresentação de um protocolo bem estabelecido aos estudantes de pós-graduação que desejam estudar tecidos, estruturas e células do sistema nervoso central e periférico pela técnica de imunofluorescência. Entretanto, é importante ressaltar que, haja vista a cautela necessária para manipulação e preparo de tecidos do sistema nervoso, o protocolo que será descrito também poderá ser aplicado em outros tecidos de acordo com o objetivo do estudo.



## QUANDO SERÁ FEITO?

A imunofluorescência poderá ser utilizada por pesquisadores que têm como objetivo tanto a observação das mudanças na morfologia de células nervosas em situações fisiopatológicas ou em respostas a tratamentos farmacológicos como para a interpretação da dinâmica e sinalização celular, tendo como o intuito compreender e mapear mecanismos fisiológicos ou fisiopatológicos em situações específicas. Conseqüentemente, a técnica é uma ferramenta importante para a busca de alvos farmacológicos para a identificação de possíveis estratégias terapêuticas. A imunofluorescência é uma facilitadora desse processo por ser capaz de marcar e localizar biomoléculas, como fatores de transcrição, receptores, transportadores celulares, neuropeptídeos, mediadores, entre outros componentes celulares pela combinação de anticorpos de detecção dos marcadores específicos. Também é capaz de mostrar detalhes estruturais por meio da sua ligação em marcadores específicos que permitiram sua visualização ao microscópio (IM et al., 2019). Além disso, poderá ser utilizada na realização de diagnósticos devido à alta especificidade dos anticorpos com relação aos antígenos, sendo possível a identificação de microrganismos patogênicos como bactérias, protozoários e antígenos virais (COONS, 1960).

No caso de doenças neurológicas e psiquiátricas, a compreensão da fisiopatologia de cada doença envolve o conhecimento da localização e a identificação de transportadores, neurotransmissores, receptores e canais iônicos que estão envolvidos na dinâmica do distúrbio em questão. Loup et al. (1998), por exemplo, reconhecendo a importância e eficácia da imunofluorescência na detecção de componentes celulares, se empenharam em desenvolver um protocolo mais sensível para detectar receptores GABA<sub>A</sub> no cérebro humano, com o objetivo de, posteriormente, utilizá-lo para investigar o envolvimento desse receptor na fisiopatologia da epilepsia.

O mesmo raciocínio também rege, por exemplo, os estudos para a compreensão da fisiopatologia da dor. Nesse contexto, Hokfelt et al. (1977) estudaram o envolvimento de vias peptídicas envolvidas nos mecanismos de analgesia e dor. Por meio de um protocolo de imunofluorescência indireta, identificaram nervos imunorreativos à encefalina e à substância P localizados na substância cinzenta periaquedutal, núcleo magno da rafe, substância gelatinosa do corno dorsal da medula espinal e no núcleo espinal do trigêmeo.





## POR QUEM/COM O QUE SERÁ FEITO?

A técnica de imunofluorescência pode ser feita em células ou em tecidos frescos, congelados ou parafinizados. Para o estudo do tecido nervoso, cortes congelados e em tecidos frescos oferecem vantagens sobre os tecidos parafinizados. Devido à grande quantidade de gordura no tecido nervoso, o processamento para a obtenção de blocos de parafina leva a um dano, prejudicando a morfologia do tecido. Ademais, esse tipo de processamento aumenta a autofluorescência, levando a *backgrounds* indesejáveis e resultando em perda da nitidez de marcação. Essas interferências são minimizadas quando o corte é feito em tecido congelado. Dessa forma, a técnica que descreveremos a seguir envolve o processamento de tecido nervoso por cortes congelados.

### Lista de materiais e reagentes para a preparação de tecido nervoso e corte congelado em criostato:

- ✓ Solução de paraformaldeído 4%.
- ✓ Solução de sacarose 30%.
- ✓ Composto O.C.T.
- ✓ Blister de alumínio para inclusão.
- ✓ Navalha de alto perfil para criostato.
- ✓ Criostato.
- ✓ Lâminas para imunofluorescência.

### Lista de materiais e reagentes para imunofluorescência em tecido nervoso:

- ✓ Cesta para lâminas.
- ✓ Cubas para banho de lâminas.
- ✓ Banho-maria.
- ✓ Filme de parafina plástica.
- ✓ Bandeja de incubação.
- ✓ Lamínulas.
- ✓ Álcool metílico PA.

- ✓ Solução salina tamponada (PBS).
- ✓ Tampão citrato de sódio 0,1M (pH 6,0).
- ✓ Triton X-100.
- ✓ Glicina.
- ✓ Albumina sérica bovina (BSA).
- ✓ Anticorpos primários.
- ✓ Anticorpos secundários.
- ✓ Meio de montagem para lâminas.
- ✓ Esmalte incolor.



## COMO SERÁ FEITO?

### Cortes de tecido nervoso em criostato

Antes da realização dos cortes, o tecido nervoso precisa ser processado de acordo com as seguintes etapas e com os materiais citados no item “Lista de materiais e reagentes para a preparação de tecido nervoso e corte congelado em criostato”.

- 1) Fixação em solução de paraformaldeído (PFA) 4% por 2 horas.
- 2) Crioproteção em solução de sacarose 30% por 48 horas com troca dessa solução a cada 24 horas.
- 3) Inclusão em composto O.C.T. Normalmente usamos blisters de alumínio para acomodar o tecido durante a etapa de inclusão e congelamento.

Para a realização dos cortes, é necessário utilizar um criostato, equipamento que possibilita o corte do tecido congelado. A seguir, mostraremos o procedimento de corte congelado em uma amostra de tronco encefálico de camundongo (Foto 1).

Foto 1 - Criostato

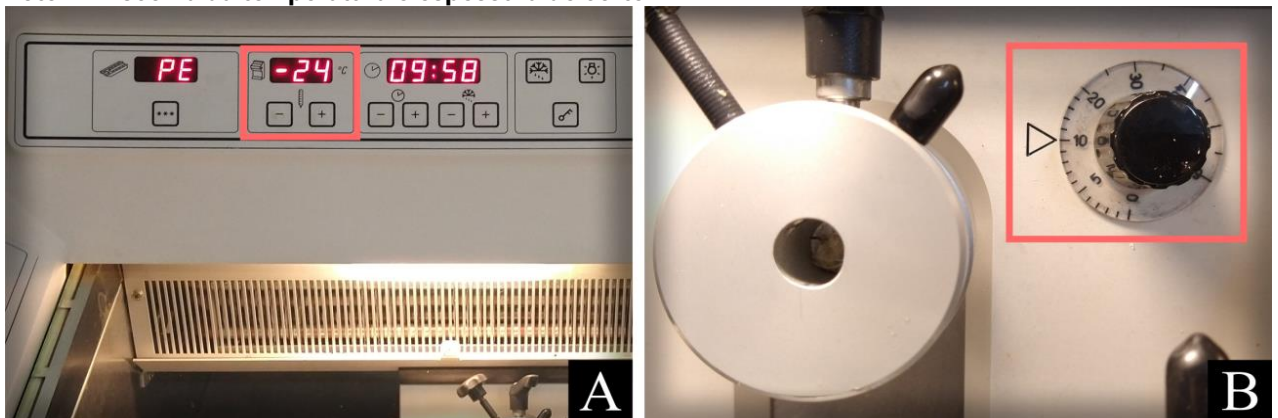


Fonte: Acervo dos autores.

Para a realização dos cortes no criostato, devem ser seguidas as etapas:

1) Selecionar no equipamento a temperatura de corte (A) entre  $-22\text{ }^{\circ}\text{C}$  e  $-24\text{ }^{\circ}\text{C}$  e em seguida a espessura do corte (B) (Foto 2).

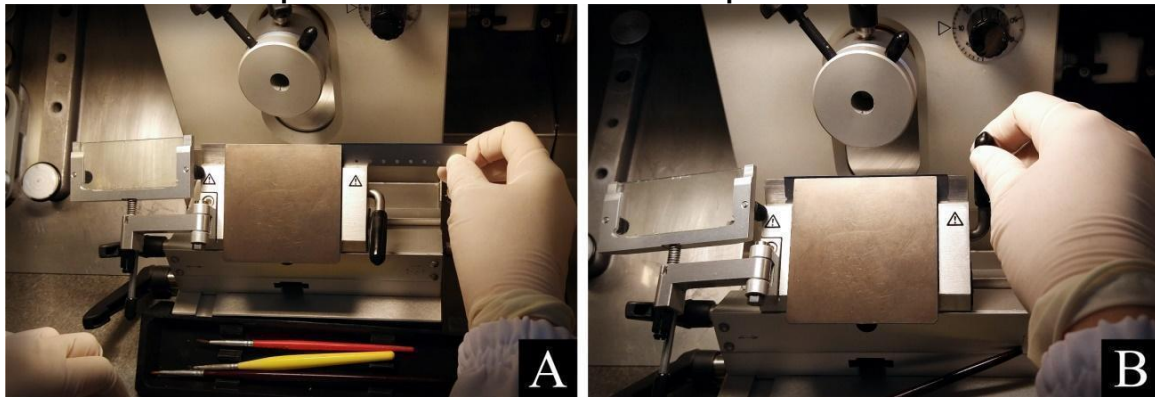
Foto 2 - Escolha da temperatura e espessura de corte



Fonte: Acervo dos autores.

2) Colocar a navalha de alto perfil no suporte para navalha (A) e fixar (B) (Foto 3).

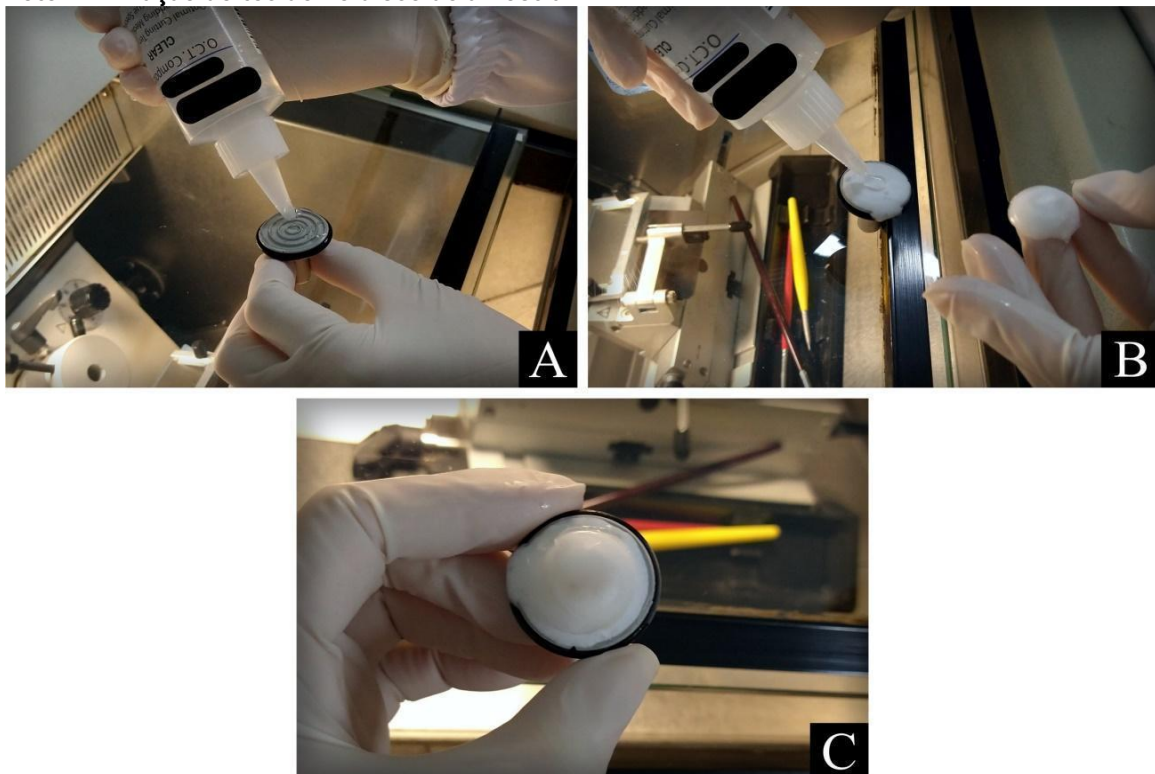
**Foto 3 - Procedimento para colocar e fixar a navalha de alto perfil**



Fonte: Acervo dos autores.

3) Fixar a amostra de tecido no disco de amostra. Para isso, primeiramente cobrir o disco de amostra com o composto O.C.T. (A) colocar dentro do criostato, esperar congelar e em seguida colar o tecido com esse mesmo meio de inclusão (B) e novamente esperar congelar (C) (Foto 4).

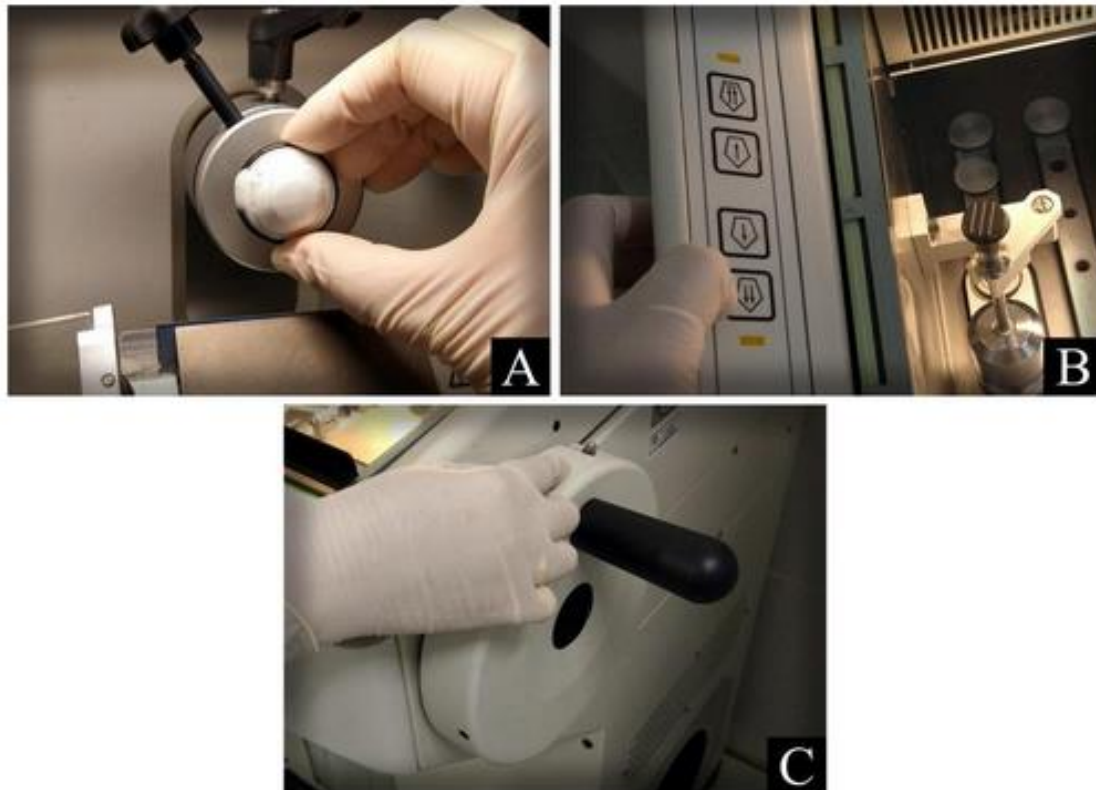
**Foto 4 - Fixação do tecido no disco de amostra**



Fonte: Acervo dos autores.

4) Fixar o disco com a amostra no “cabeçote de amostra” (A) e desbastar o excesso de composto O.C.T. até aparecer a região de interesse com o auxílio dos botões para aproximação ou recuo (B) e do volante (C) (Foto 5).

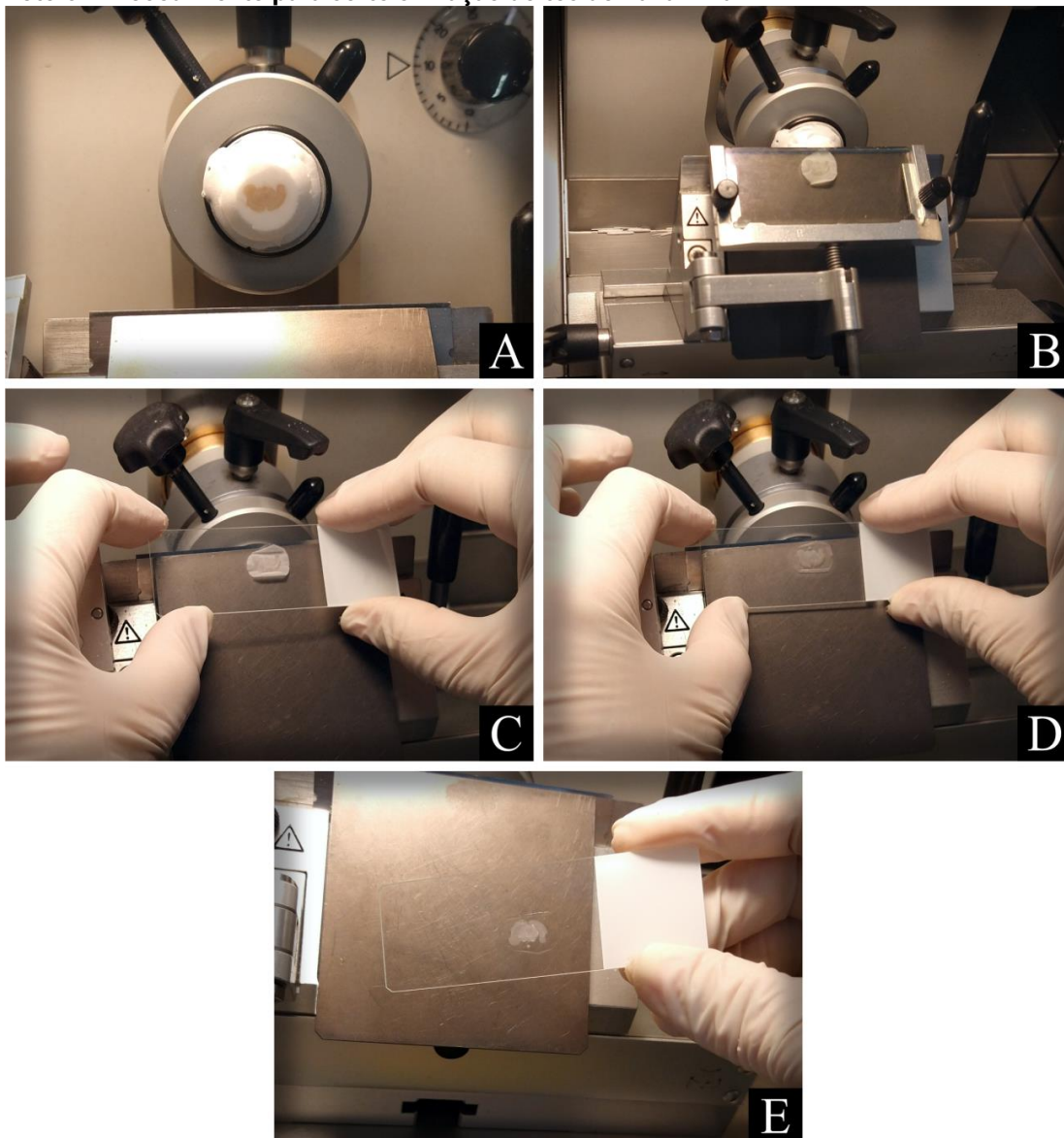
**Foto 5 - Procedimento para desbastar o excesso de composto O.C.T.**



**Fonte:** Acervo dos autores.

5) Quando aparecer a região de interesse para o corte (A), dobrar o guia de vidro anti-roll para pescar o corte (B). Para fixar o corte do tecido na lâmina, é necessário aproximá-la ao corte do tecido (C). A diferença de temperatura entre a lâmina (temperatura ambiente) e a secção congelada do tecido promoverá essa fixação (D e E) (Foto 6).

Foto 6 - Procedimento para corte e fixação do tecido na lâmina



Fonte: Acervo dos autores.

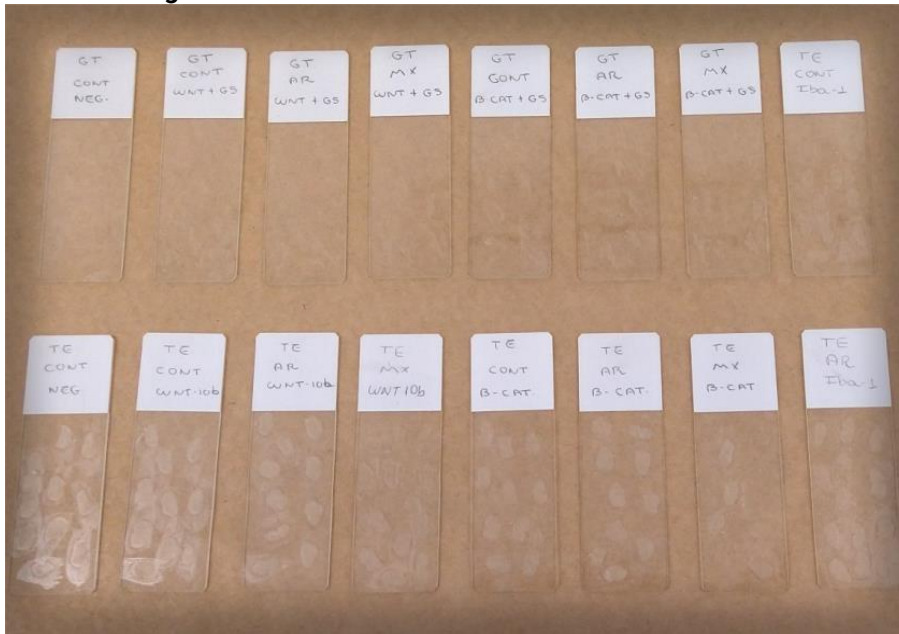
6) As lâminas podem ser armazenadas em *freezer* – 20 °C caso a imunofluorescência não seja realizada no mesmo dia dos cortes, entretanto o prazo de armazenamento é limitado.

### Imunofluorescência

Mostraremos as etapas da técnica de imunofluorescência em tecido nervoso em cortes congelados. Os materiais e reagentes necessários estão dispostos acima na “Lista de materiais e reagentes para imunofluorescência em tecido nervoso”.

- 1) **Secagem dos cortes:** deixar as lâminas na temperatura ambiente por 60 minutos (Foto 7).

**Foto 7 - Secagem dos cortes**



**Fonte:** Acervo dos autores.

- 2) **Fixação:** o procedimento de fixação é utilizado para interromper processos degenerativos, preservando, assim, a morfologia dos tecidos. Os fixadores mais utilizados nesse procedimento são: álcool metílico (metanol), acetona, paraformaldeído e formaldeído (IM et al., 2019; JOSHI; YU, 2017). Em tecidos congelados, comumente utiliza-se o álcool metílico PA em banho por 2 minutos (PONTES et al., 2019; PEREIRA et al., 2018) (Foto 8).

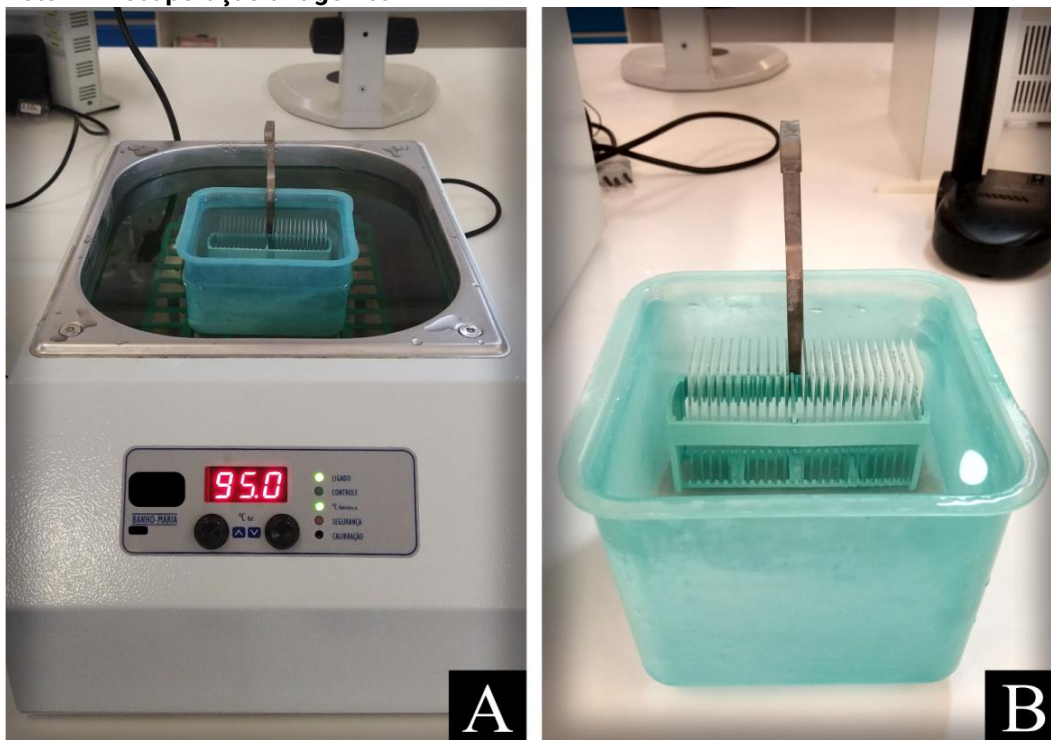
**Foto 8 - Fixação das lâminas em banho**



**Fonte:** Acervo dos autores.

3) **Recuperação antigênica:** o processo de fixação pode mascarar os epítomos alvos. Assim, a recuperação antigênica é realizada com a finalidade de restaurar a reatividade entre o epítomo do antígeno e o anticorpo. A recuperação antigênica pode ser induzida por proteases, como proteinase K, tripsina, pepsina e pronase ou calor em solução tampão (IM et al., 2019). Normalmente nós realizamos a recuperação antigênica induzida por calor em tampão citrato de sódio 0,1M, pH 6,0 em banho-maria, temperatura de 95 °C, por 18 minutos (A). Isso porque se trata de um método que preserva melhor a morfologia do tecido. Após a recuperação antigênica, resfriar as lâminas na temperatura ambiente (B) por 20 minutos (PONTES et al., 2019; PEREIRA et al., 2018) (Foto 9).

Foto 9 - Recuperação antigênica



Fonte: Acervo dos autores.

4) **Permeabilização:** a permeabilização tem a finalidade de promover o acesso dos anticorpos de detecção às estruturas intracelulares. Detergentes como triton X-100, Tween 20 e saponina são utilizados para a realização desse procedimento (JOSHI; YU, 2017). Para a permeabilização, normalmente mergulhamos as lâminas em uma solução contendo PBS, BSA e triton X-100 0,1% por 10 minutos (PONTES et al., 2019; PEREIRA et al., 2018).



5) **Bloqueio de ligações inespecíficas:** essa etapa é realizada com a finalidade de impedir a ligação inespecífica do anticorpo a epítomos não alvos. Os agentes bloqueadores comumente utilizados são BSA, leite e soro. Ao utilizar soro, escolha um que não seja da mesma espécie oriunda do anticorpo primário (IM et al., 2019; JOSHI; YU, 2017). Para o bloqueio de ligações inespecíficas, nós incubamos as lâminas com uma solução de BSA 5% adicionada de glicina 0,3M por 30 minutos (PONTES et al., 2019; PEREIRA et al., 2018) (Foto 10).

**Observação importante!**

Entre todas as etapas deve-se fazer a lavagem das lâminas em banhos de PBS por 5 minutos e com 3 trocas, exceção da etapa de bloqueio. Sendo assim, não devemos lavar as lâminas entre a etapa de bloqueio e incubação com o anticorpo primário, e sim, apenas escorrer o excesso de solução das lâminas.

6) **Incubação com anticorpo primário:** antes da realização da imunofluorescência, um passo muito importante é o planejamento desse procedimento incluindo a escolha dos anticorpos. Para a escolha do anticorpo primário, deve-se levar em conta a espécie onde o anticorpo foi produzido, a espécie a qual ele é reativo e também se é um anticorpo conjugado com o fluoróforo ou não. Caso o anticorpo primário seja conjugado com o fluoróforo, a etapa de incubação com o anticorpo secundário não será necessária - imunofluorescência direta (Figura 1A). A escolha da diluição do anticorpo e em que esse anticorpo será diluído tornam-se fundamentais. Para tanto, as informações disponíveis no *datasheet* devem ser averiguadas e, se necessário, também investigadas na literatura científica. Além disso, é importante saber se a proteína alvo é citoplasmática, nuclear ou de membrana para definir as etapas de permeabilização e diluição do anticorpo (BSA ou soro de bloqueio com ou sem triton X-100) (Foto 10).

**Observação importante!**

O anticorpo primário deve ser produzido em uma espécie diferente da espécie do tecido a ser utilizado.

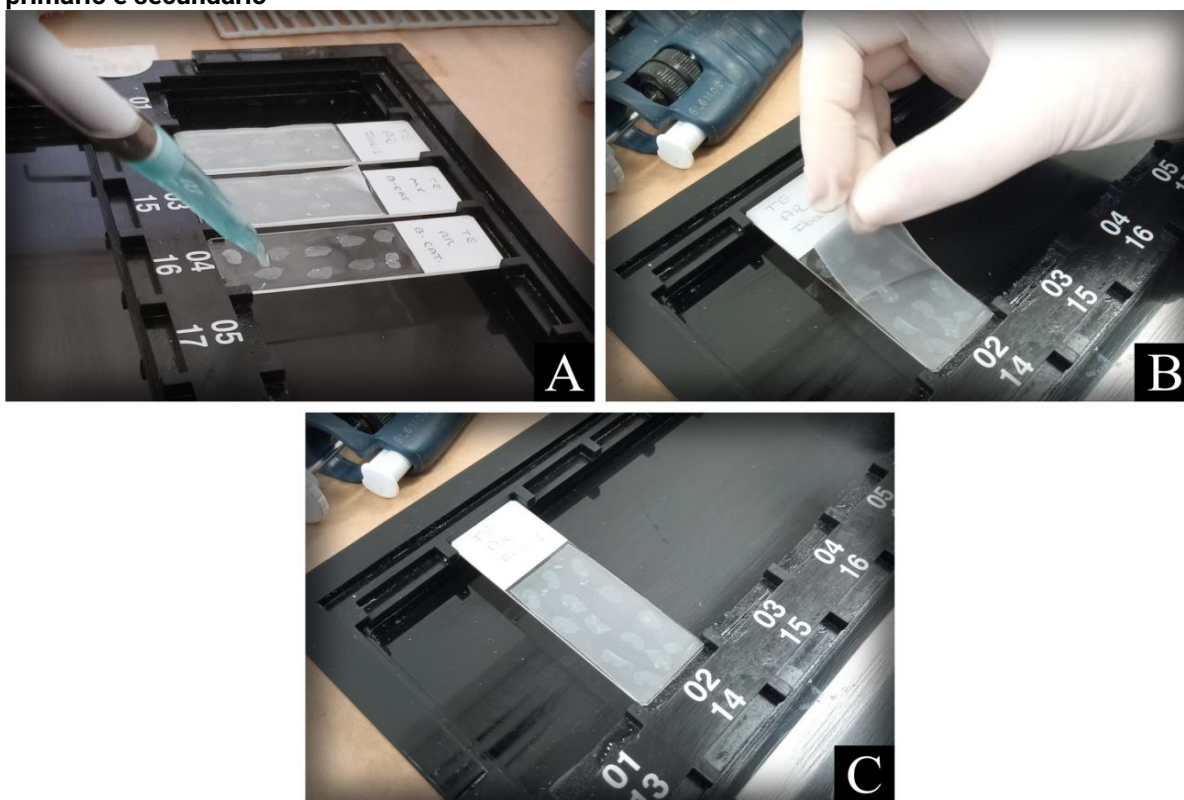
7) **Incubação com anticorpo secundário:** a escolha do anticorpo secundário deve ser realizada após a escolha do anticorpo primário. Assim, é necessário saber a espécie na qual o anticorpo primário foi produzido e se serão realizadas uma ou mais marcações de proteínas alvos e também a diluição do anticorpo. O anticorpo secundário é conjugado com um fluoróforo, de modo que a escolha do fluoróforo depende também do

equipamento onde serão realizadas a leitura e a aquisição das fotomicrografias, tendo em vista que alguns equipamentos podem não possuir os filtros e *lasers* necessários para a excitação e a captação da emissão do fluoróforo. Além disso, o anticorpo secundário escolhido deve ser direcionado para a espécie do anticorpo primário (Foto 10).

**Observação importante!**

Com a finalidade de averiguar a ocorrência de ligações inespecíficas, é feita uma lâmina de controle negativo. Esta é incubada apenas com o anticorpo secundário.

**Foto 10 - Procedimento para bloqueio de ligações inespecíficas, incubação com anticorpos primário e secundário**



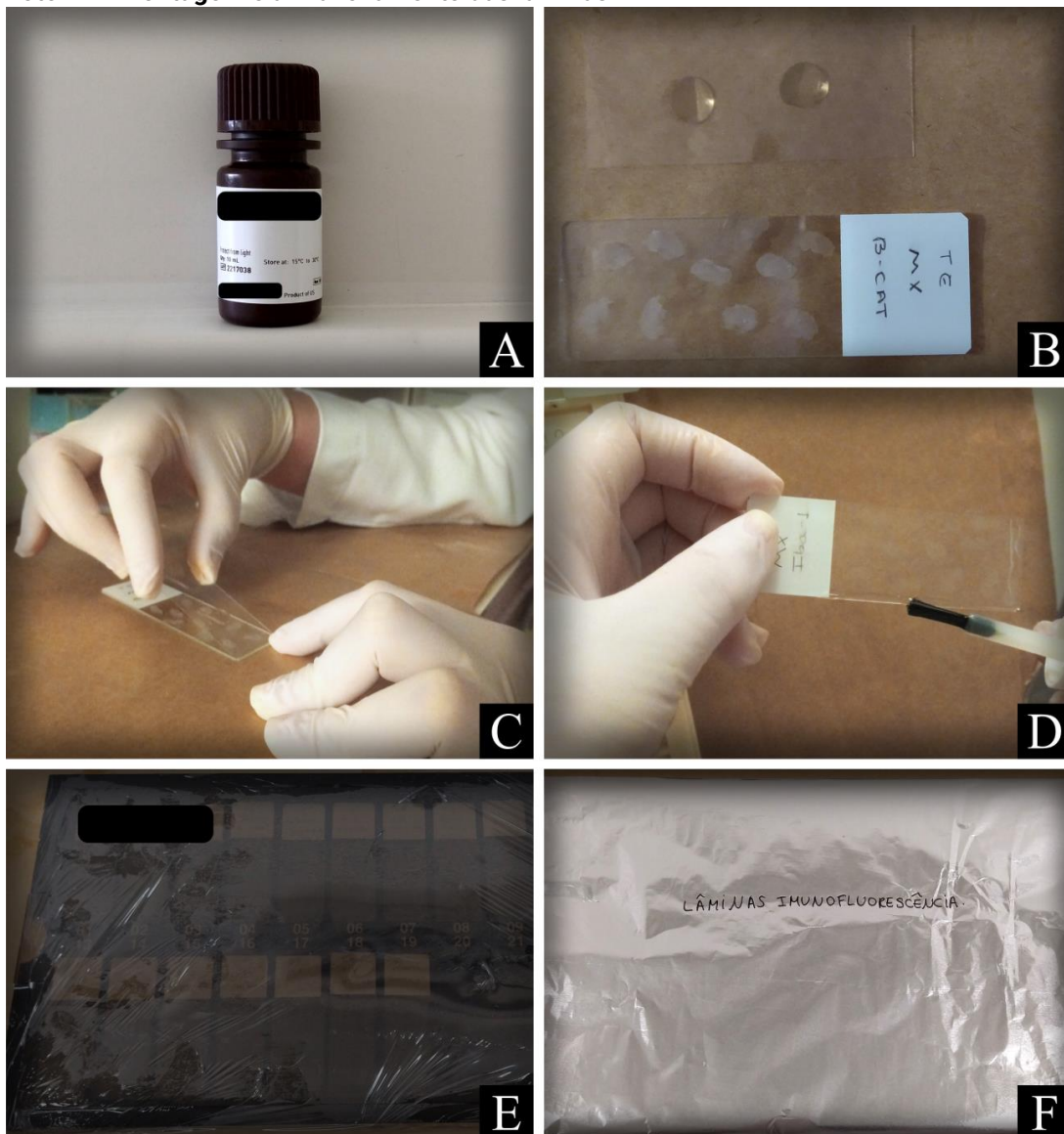
**Fonte:** Acervo dos autores.

(A) Aplicação da solução de bloqueio ou anticorpo (B) cobertura da lâmina com o filme de parafina plástica e (C) lâmina após aplicação e cobertura.

8) **Marcação do núcleo (opcional):** Hoechst e DAPI são comumente utilizados para a marcação dos núcleos celulares (DUNST; TOMANCAK, 2019). Para isso, nós utilizamos 4  $\mu$ L de DAPI em 200 mL de PBS em banho durante 30 minutos. Em seguida, devemos lavar as lâminas com água destilada antes da montagem e do armazenamento.

9) **Montagem e armazenamento das lâminas:** essa etapa protege a lâmina e permite que seja visualizada pelo microscópio, assim como preserva o tecido por mais tempo. O meio de montagem (Foto 11A) mais apropriado é aquele que se propõe a diminuir o *photobleaching* e, conseqüentemente, preservar a fluorescência. Para isso, pingar o meio de montagem na lamínula (Foto 11B) e cobrir a lâmina com a lamínula contendo o meio (Foto 11C). Depois selar a lâmina com esmalte incolor para evitar o ressecamento do meio (Foto 11D). Após a montagem das lâminas, cobrir a bandeja de incubação contendo as lâminas com plástico filme para evitar o ressecamento do meio de montagem e papel alumínio para proteger as lâminas da luz (Foto 11E e F).

**Foto 11 - Montagem e armazenamento das lâminas**



Fonte: Acervo dos autores.

## Análise da fluorescência e quantificação

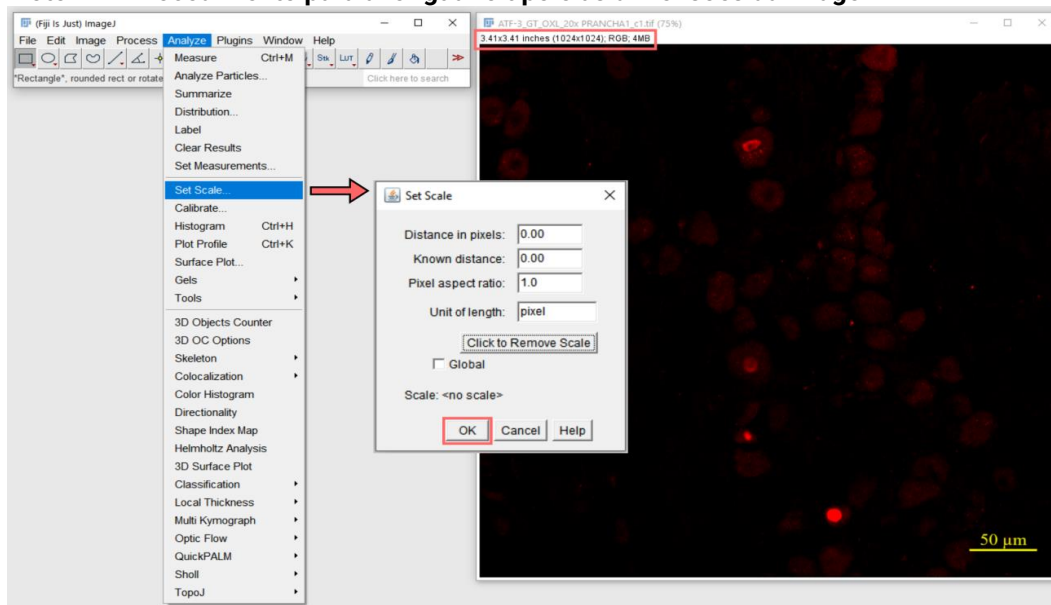
A leitura das lâminas de imunofluorescência e a aquisição das fotomicrografias podem ser realizadas em microscópio de fluorescência, em microscópio confocal de varredura a laser ou em sistema de imagem multiespectral *in vitro*. A obtenção das fotomicrografias é realizada com a padronização dos parâmetros utilizados para a aquisição e posterior análise.

A seguir, o procedimento de quantificação da área fluorescente será mostrado em gânglio trigeminal marcado com o fator de transcrição de ativação 3 (ATF3), um marcador de dano neuronal. Para isso, utilizaremos um software de imagem *Fiji Image J* da *National Institutes of Health* de Washington, DC, EUA.

1º) Inicialmente, ao abrir a fotografia, é necessário verificar se o tipo e as dimensões da imagem estão em RGB e *pixels*, respectivamente (Foto 12).

2º) Para deixar a imagem com as dimensões em pixels, siga o procedimento abaixo:

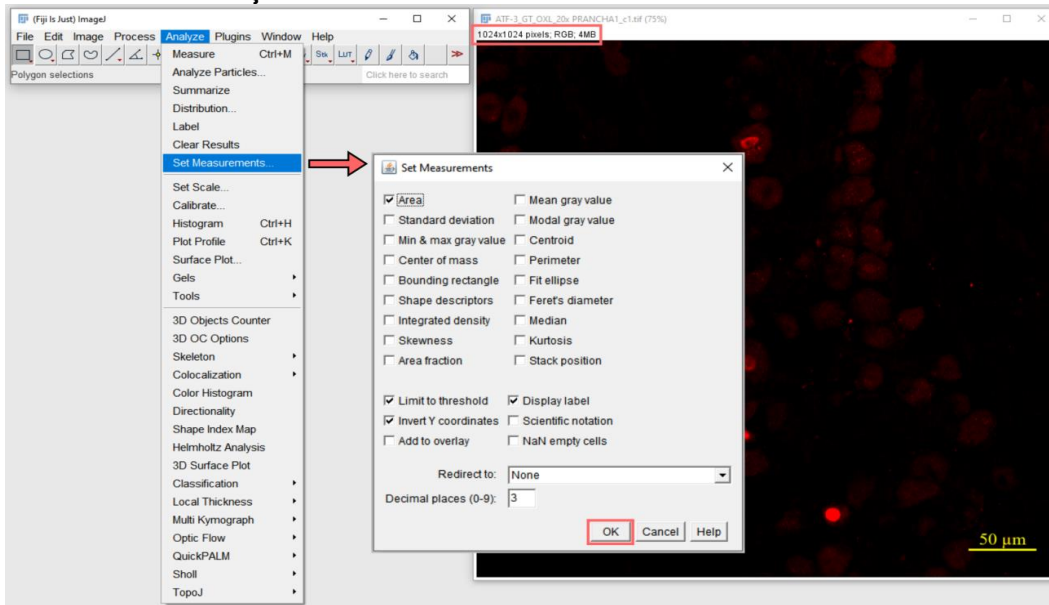
**Foto 12 - Procedimento para averiguar o tipo e as dimensões da imagem**



**Fonte:** Acervo dos autores.

3) Em seguida, é necessário padronizar as medidas a serem realizadas (Foto 13).

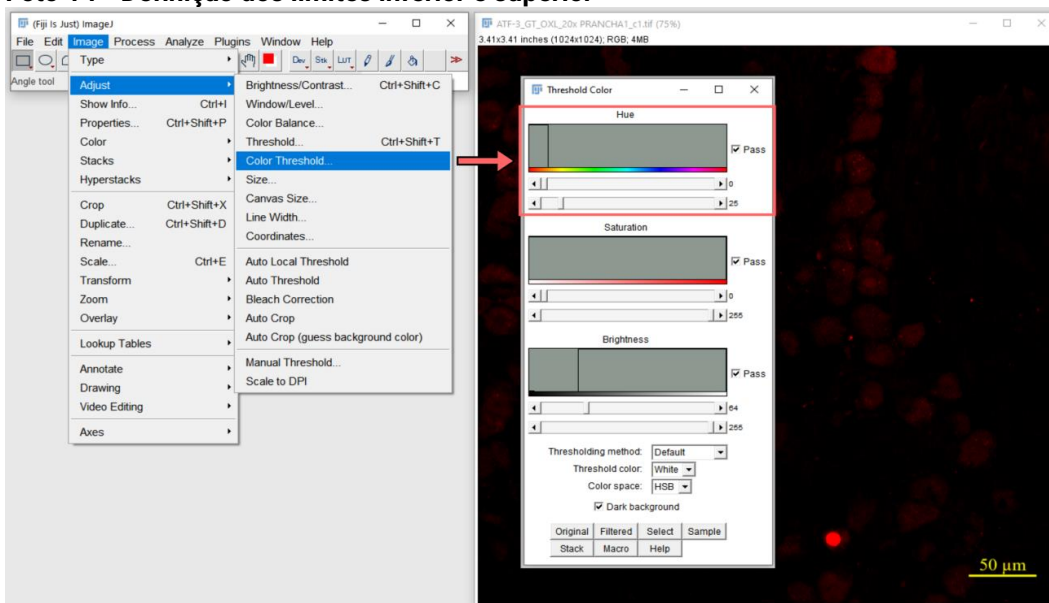
Foto 13 - Padronização das medidas a serem realizadas



Fonte: Acervo dos autores.

4) Previamente à quantificação da área fluorescente, os limites inferior e superior devem ser padronizados pelo limiar de cor para definir os *pixels* selecionados e não selecionados (Foto 14).

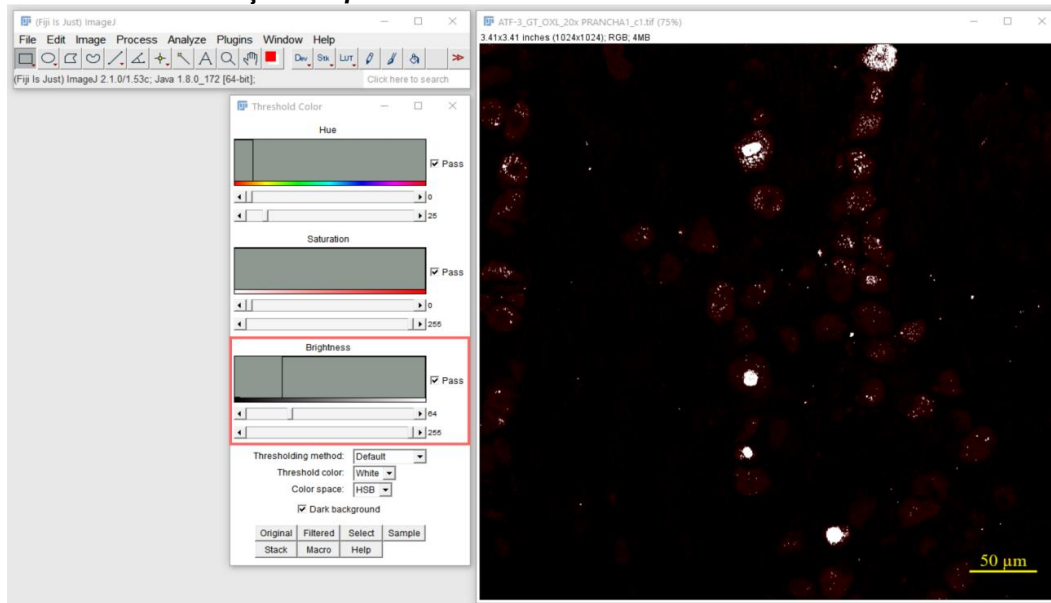
Foto 14 - Definição dos limites inferior e superior



Fonte: Acervo dos autores.

5) Em seguida, é necessário fazer a diferenciação dos *pixels* fluorescentes por meio da maior saturação de cor associada à fluorescência (Foto 15).

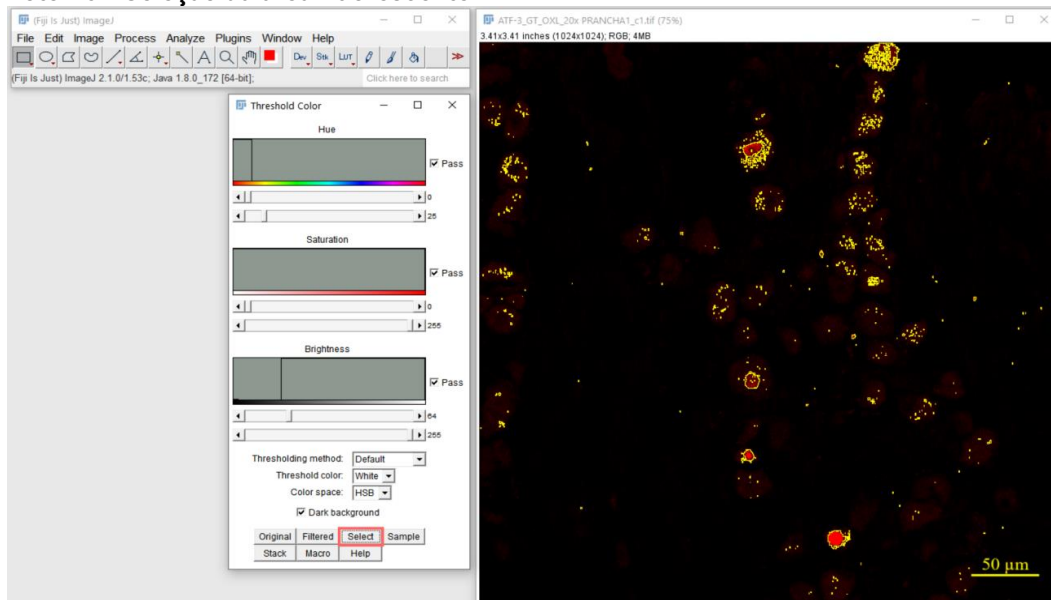
Foto 15 - Diferenciação dos *pixels* fluorescentes



Fonte: Acervo dos autores.

6) Após a diferenciação dos *pixels* fluorescentes, é necessário selecionar a área fluorescente que será medida (Foto 16).

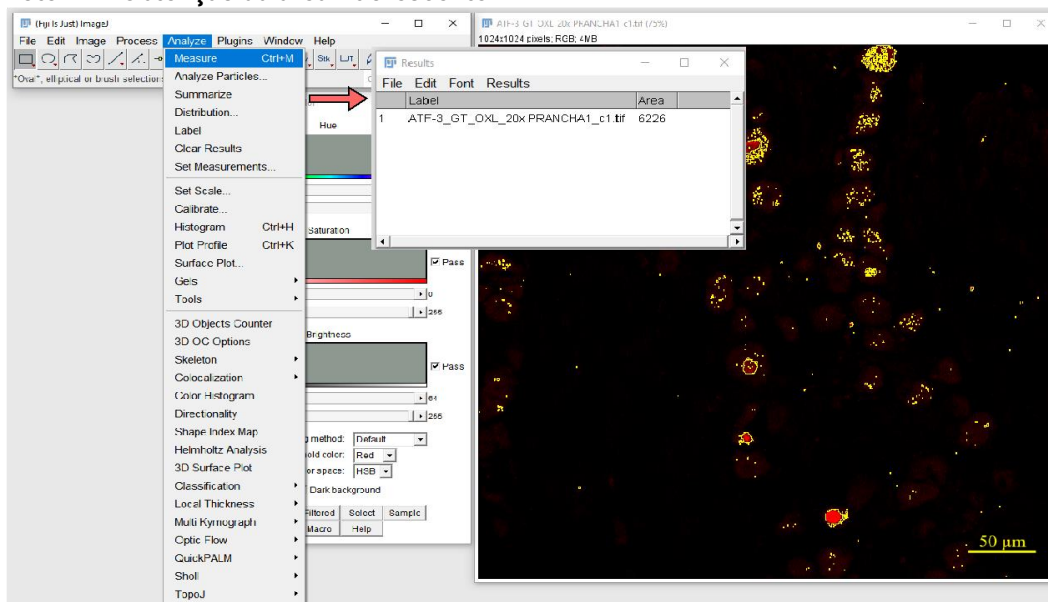
Foto 16 - Seleção da área fluorescente



Fonte: Acervo dos autores.

6) Após selecionar a área fluorescente, clicar nas opções *analyze* e *measure* para obter o valor da área (Foto 17).

Foto 17 - Obtenção da área fluorescente



Fonte: Acervo dos autores.



## QUANTO TEM SIDO USADO NA PESQUISA?

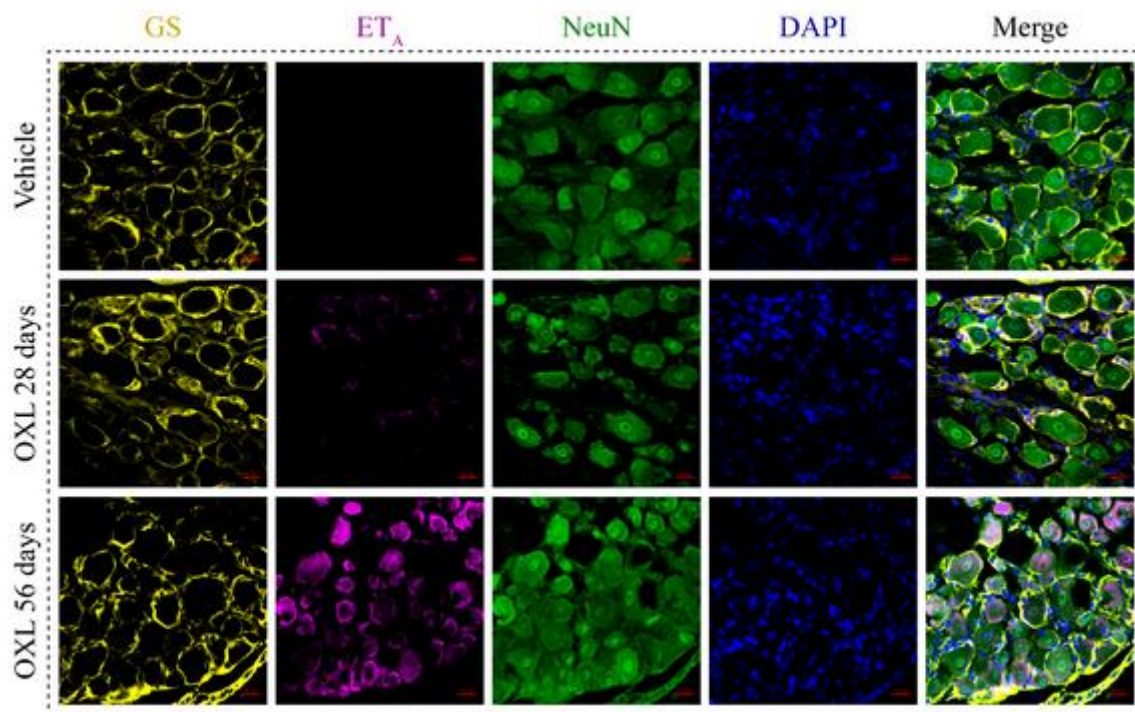
São incontáveis os benefícios dos protocolos de imunofluorescência para as pesquisas básica e clínica. Nathke et al. (1996), por exemplo, identificaram, por imunofluorescência, proteínas expressas por genes relacionados a doenças como câncer. Nesse estudo, através da imunofluorescência, foi possível demonstrar a localização celular de tais proteínas, bem como sua interação com outros componentes celulares, dando aos pesquisadores a oportunidade de formar hipóteses sobre sua função fisiológica.

A técnica é imprescindível na neurociência, bem como na farmacologia do sistema nervoso englobando estudos de dor, transtornos mentais, inflamação e câncer. Por meio dos estudos realizados pelo grupo do Laboratório de Farmacologia e Inflamação do Câncer (LAFICA-NPDM), é possível enxergar a importância do uso da técnica de imunofluorescência no entendimento da neurotoxicidade causada pela quimioterapia antineoplásica por oxaliplatina.

O estudo em modelo experimental permitiu a análise da expressão de marcadores importantes de ativação e dano neuronal como c-Fos e ATF3, respectivamente, assim como a expressão de receptores envolvidos na sinalização de dor que podem fornecer respostas de mecanismos fisiopatológicos. Pereira et al. (2018) observaram o aumento da expressão de c-Fos nos primeiros estágios do tratamento com

o quimioterápico oxaliplatina em células satélites gliais, mostrando a participação dessas células no desenvolvimento da neuropatia ocasionada pelo referido tratamento.

**Figura 3 - Expressão do receptor de endotelina ET<sub>A</sub> induzida por OXL em células satélite gliais no DRG de camundongos**



**Fonte:** Adaptado de Pontes et al. (2019).

**Legenda:** Amarelo: glutamina sintetase (marcador de célula glial satélite); magenta: receptor de endotelina ET<sub>A</sub>; verde: NeuN (marcador neuronal); azul: DAPI (marcador nuclear). Ampliação de 400 x. ET<sub>A</sub>; receptor de endotelina ET<sub>A</sub>; GS, glutamina sintetase; OXL, oxaliplatina.

Além disso, Pereira et al. (2019) investigaram os efeitos protetores da metformina nessa mesma condição, onde os resultados obtidos por imunofluorescência demonstraram que o tratamento com o fármaco diminuiu os níveis de expressão c-FOS e ATF-3 no gânglio da raiz dorsal. Pontes et al. (2019) mostraram a participação da endotelina na fisiopatologia da neurotoxicidade associada à oxaliplatina pela quantificação da expressão de seus receptores na cinética de desenvolvimento dessa condição, assim como o tipo celular envolvido em nível periférico e central. Neste trabalho, a imunofluorescência contribuiu ao demonstrar o grau de expressão do receptor ET<sub>A</sub> e em quais células este receptor estava sendo expresso no decorrer de 56 dias de protocolo experimental. Na Figura 3, é possível observar que, com 28 dias, a marcação de ET<sub>A</sub> coincide com a marcação de células satélites gliais (Glutamina sintetase, GS) e com 56 dias coincide com a marcação de neurônios (NeuN). Essa conclusão só foi possível devido



à técnica de imunofluorescência que permite a marcação de vários antígenos de forma concomitante na mesma célula e ainda a verificação da co-localização entre dois antígenos ou mais (**Ver o capítulo intitulado Método de Análise de Microscopia Confocal em Tecidos Animal e Vegetal, neste e-book**).

Finalmente, como já foi citado, são inúmeras as vantagens e aplicações da imunofluorescência que, de certa forma, revolucionaram os estudos histológicos e histopatológicos em neurociência, possibilitando uma análise mais específica, com obtenção de imagens de melhor qualidade e, por consequência, mais esclarecedoras sobre a dinâmica do sistema nervoso. Adicionalmente, é importante citar que também é possível a união da imunofluorescência com técnicas computacionais de análise de imagem que trazem aos estudos um caráter mais quantitativo, tornando-os cada vez mais distintos. Uma das técnicas que possui bastante relevância é a análise fractal e já é bem estabelecida entre neurocientistas. Através da análise fractal é possível quantificar padrões nas imagens obtidas por microscopia e classificá-las de acordo com sua complexidade, sendo possível a classificação quantitativa de células com base em mudanças no aspecto morfológico como, por exemplo, a micróglia que assume diversas formas de acordo com o seu estado de ativação. Para mais informações sobre análise fractal em neurociência, sugerimos a leitura de Karperien; Ahammer e Jelinek (2013).

## REFERÊNCIAS

BACALLAO, R.; SOHRAB S.; PHILLIPS, C. Guiding principles of specimen preservation for confocal fluorescence microscopy. *In*: PAWLEY, J. (ed.). **Handbook of biological confocal microscopy**. Boston: Springer, 2006.

BIELSCHOWSKY, M. Eine Modifikation meines Silverimprägnationsverfahrens zur Darstellung der Neurofibrillen. **Journal für Psychologie Neurologie**, v. 12, p. 135-137, 1908.

BIGNAMI, A. *et al.* Localization of the glial fibrillary acidic protein in astrocytes by immunofluorescence. **Brain research**, v. 43, n. 2, p. 429-435, Aug. 1972.

BODIAN, David. A new method for staining nerve fibers and nerve endings in mounted paraffin sections. **The Anatomical Record**, v. 65, n. 1, p. 89-97, 1936.

CARRIEL, Víctor *et al.* Staining methods for normal and regenerative myelin in the nervous system. *In*: PELLICCIARI, Carlo; BIGGIOGERA, Marco. **Histochemistry of single molecules**. New York: Humana Press, 2017. p. 207-218.

CHUGANI, D. C.; KEDERSHA, N. L.; ROME, L. H. Vault immunofluorescence in the brain: new insights regarding the origin of microglia. **Journal of Neuroscience**, v. 11, n. 1, p. 256-268, 1991.

COONS, Albert H.; CREECH, Hugh J.; JONES, R. Norman: immunological properties of an antibody containing a fluorescent group. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 47, n. 2, p. 200-202, 1941.

COONS, Albert H. Immunofluorescence: the RE Dyer lecture. **Public Health Reports**, v. 75, n. 10, p. 937, 1960.

DUNST, Sebastian; TOMANCAK, Pavel. Imaging flies by fluorescence microscopy: principles, technologies, and applications. **Genetics**, v. 211, n. 1, p. 15-34, 2019.

DURAIYAN, Jeyapradha *et al.* Applications of immunohistochemistry. **Journal of pharmacy & Bioallied Sciences**, v. 4, p. S307, 2012. Supplement 2.

GALLYAS, F. Silver staining of Alzheimer's neurofibrillary changes by means of physical development. **Acta Morphol Acad Sci Hung**, v. 19, p. 1-8, 1971.

GASSER, Edith M. Schneider *et al.* Immunofluorescence in brain sections: simultaneous detection of presynaptic and postsynaptic proteins in identified neurons. **Nature protocols**, v. 1, n. 4, p. 1887, 2006.

HALL, John E. **Guyton & Hall: fundamentos de fisiologia**. Rio de Janeiro: Elsevier Brasil, 2017.

HÖKFELT, T. *et al.* Immunohistochemical analysis of peptide pathways possibly related to pain and analgesia: enkephalin and substance P. **Proceedings of the National Academy Sciences of the United States of America**, v. 74, n. 7, p. 3981-3085, July 1977.

IM, Kyuseok *et al.* An introduction to performing immunofluorescence staining. *In*: YONG, William H. (ed.). **Biobanking**: methods and protocols. New York: Springer, 2019. p. 299-311.

JOSHI, Sonali; YU, Dihua. Immunofluorescence. *In*: JALALI, Morteza; SALDANHA, Francesca; JALALI, Mehdi. **Basic science methods for clinical researchers**. Boston: Academic Press, 2017. p. 135-150.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, José. **Histologia básica**: texto e atlas. 12. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013.

KARPERIEN, Audrey; AHAMMER, Helmut; JELINEK, Herbert. Quantitating the subtleties of microglial morphology with fractal analysis. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 7, p. 1-18, Jan. 2013.

LARSON, Cassandra *et al.* Hematoxylin and eosin tissue stain in Mohs micrographic surgery: a review. **Dermatologic surgery**, v. 37, n. 8, p. 1089-1099, Aug. 2011.

LOUP, Fabienne *et al.* A highly sensitive immunofluorescence procedure for analyzing the subcellular distribution of GABAA receptor subunits in the human brain. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, v. 46, n. 10, p. 1129-1139, 1998.

MONTANARI, Tatiana. **Histologia**: texto, atlas e roteiro de aulas práticas. 3. ed. Porto Alegre: Edição da Autora, 2016.

MORI, Hidetoshi; CARDIFF, Robert D. Methods of immunohistochemistry and immunofluorescence: converting invisible to visible. *In*: BAGLEY, Rebecca G. **The tumor microenvironment**. New York: Humana Press, 2016. p. 1-12.

NÄTHKE, Inke S. *et al.* The adenomatous polyposis coli tumor suppressor protein localizes to plasma membrane sites involved in active cell migration. **The Journal of Cell Biology**, v. 134, n. 1, p. 165-179, 1996.

ODELL, Ian D.; COOK, Deborah. Immunofluorescence techniques. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 133, n. 1, p. 1-14, Jan. 2013.

PEREIRA, Anamaria Falcão *et al.* Metformin reduces c-Fos and ATF3 expression in the dorsal root ganglia and protects against oxaliplatin-induced peripheral sensory neuropathy in mice. **Neuroscience Letters**, v. 709, n. 14, p. 134-378, 2019.

PEREIRA, Anamaria Falcão *et al.* Neurotoxic effect of oxaliplatin: comparison with its oxalate-free analogue cis-[PtII (1R, 2R-DACH)(3-acetoxy-1, 1-cyclobutanedicarboxylato)] (LLC-1402) in mice. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 340, p. 77-84, Feb. 2018.

PONTES, Renata Bessa *et al.* Involvement of endothelin receptors in peripheral sensory neuropathy induced by oxaliplatin in mice. **Neurotoxicity Research**, v. 36, n. 4, p. 688-699, Nov. 2019.

RAIVICH, Gennadij *et al.* Regulation of MSCF receptors on microglia in the normal and injured mouse central nervous system: a quantitative immunofluorescence study using confocal laser microscopy. **Journal of Comparative Neurology**, v. 395, n. 3, p. 342-358, Jun. 1998.

RITTER, Sue; DINH, Thu T. Capsaicin: a probe for studying specific neuronal populations in brain and retina. *In*: CONN, P. Michael. **Methods in neurosciences**. [S.l.]: Academic Press, 1992. p. 118-136.

RYU, Wang-Shick. **Molecular virology of human pathogenic viruses**. London: Academic Press, 2016.

SANDERSON, Michael J. *et al.* Fluorescence microscopy. **Cold Spring Harbor Protocols**, v. 2014, n. 10, p. 1044-1065, 2014.

SWITZER, Robert C. Application of silver degeneration stains for neurotoxicity testing. **Toxicologic pathology**, v. 28, n. 1, p. 70-83, 2000.

UCHIHARA, Toshiki. Silver diagnosis in neuropathology: principles, practice and revised interpretation. **Acta Neuropathologica**, v. 113, n. 5, p. 483-499, 2007.

## 8 MÉTODO DE ANÁLISE DE MICROSCOPIA CONFOCAL EM TECIDOS ANIMAL E VEGETAL

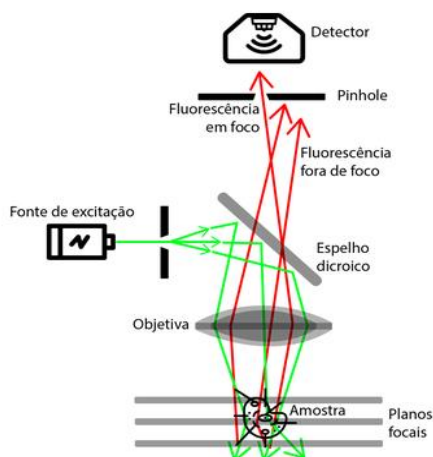
Rosemayre Souza Freire  
Mariana Lima Vale  
Afonso Luiz Dantas Moura  
Anamaria Falcão Pereira  
Cristiane Maria Pereira da Silva

### O QUE SERÁ FEITO?

A microscopia confocal é uma técnica de microscopia óptica que permite fazer imagens de alta resolução usando as propriedades fluorescentes de sondas e compostos químicos existentes na natureza. Em contraste com a microscopia convencional de campo amplo, a microscopia confocal oferece vantagens, tais como: o controle da profundidade de campo, eliminação de pontos fora de foco, realização de análises de amostras animal e vegetal espessas e de culturas de células vivas ou fixadas.

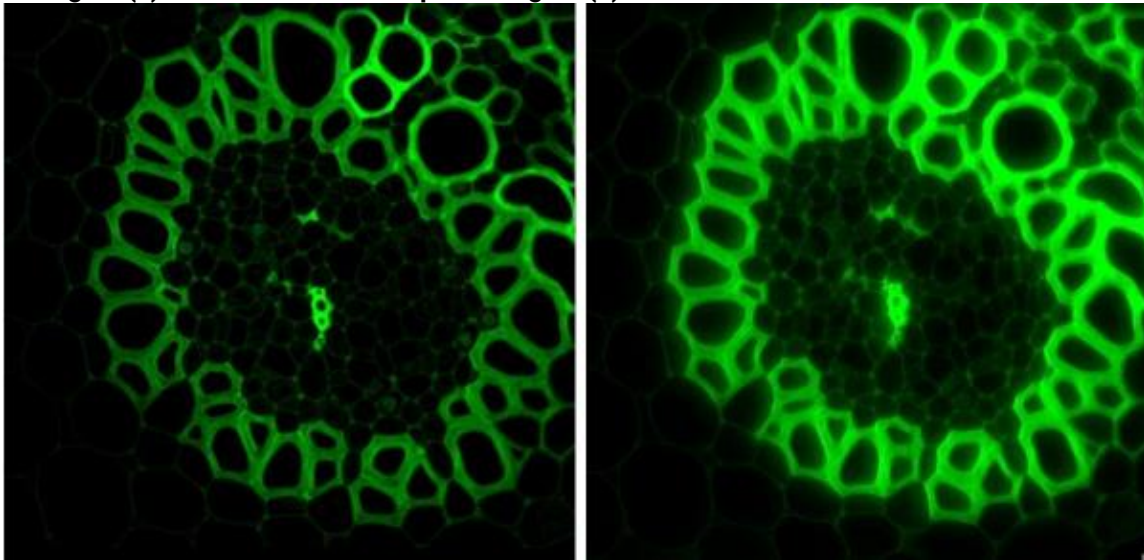
A Figura 1 demonstra o esquema convencional do microscópio confocal moderno, explicitando o caminho óptico e os principais componentes deste. Nela fica evidente que todas as propriedades dessa técnica previamente descritas vêm da pequena abertura posicionada em frente ao detector, o pinhole, cuja função é eliminar a luz proveniente de pontos fora do foco da objetiva, criando imagens mais nítidas do plano focal da objetiva de amostras espessas. Na Figura 2 temos um contraste entre a nitidez de imagens tiradas com microscopia confocal e microscopia de campo amplo.

**Figura 1 – Esquema de um microscópio confocal moderno com seus principais componentes**



**Fonte:** Elaboração dos autores.

**Figura 2 –** Imagens obtidas por microscopia confocal para explicitar a diferença entre microscopia confocal (a) e microscopia de campo amplo (b) de uma mesma amostra tridimensional. Note como a imagem (a) é menos borrada do que a imagem (b)



**Fonte:** Acervo dos autores.

O desenvolvimento do microscópio confocal surgiu a partir da necessidade de se ter um instrumento que fosse capaz de analisar amostras vivas e espessas, cuja tridimensionalidade seria muito importante para o estudo desses espécimes. A invenção do microscópio confocal foi atribuída a Marvin Minsky, no ano de 1955, e patenteada em 1957, sendo seu princípio utilizado até hoje nos mais modernos microscópios confocais do mercado (FELLERS; DAVIDSON, 2007).

Em 1973, M. David Egger desenvolveu o primeiro microscópio confocal a *laser* mecanicamente digitalizado e publicou as primeiras imagens reconhecíveis de células. Na década de 1980, os avanços da informática e da tecnologia do *laser* em conjunto com os novos algoritmos para manipulação digital de imagens levaram ao aumento do interesse pela microscopia confocal.

Concomitantemente na década de 1980, Tony Wilson, Brad Amos e John White demonstraram a utilidade da imagem confocal latente no exame de amostras biológicas fluorescentes, sendo nos anos seguintes a propriedade mais utilizada dos microscópios confocais a *laser* (EGGER, 1967).

Os microscópios confocais modernos podem ser considerados como sistemas eletrônicos integrados e avançados, capazes de armazenar e processar grande quantidade de imagens, vários sistemas de *lasers* combinados que analisam diversas sondas (fluoróforos) ao mesmo tempo, dispositivos de seleção nos quais são possíveis as ações: demarcar área, varrer grandes áreas de tecido e fazer imagens tridimensionais.

Atualmente, a microscopia confocal é considerada uma técnica de rotina de investigações sobre moléculas, células e tecidos vivos (PAWLEY, 2006).

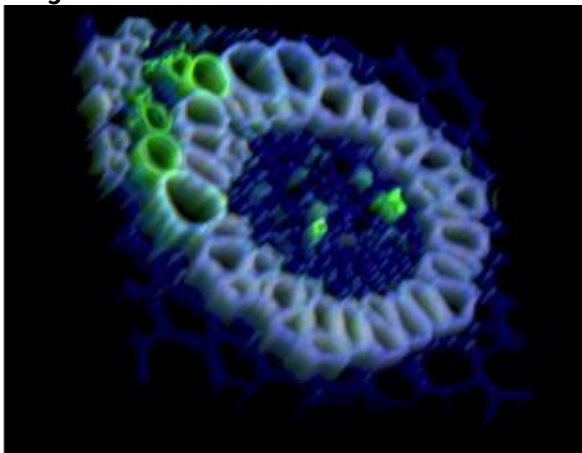


## POR QUE SERÁ FEITO?

Em 1987, os pesquisadores britânicos Brad Amos e John White construíram o primeiro protótipo do microscópio confocal que incorporava essas tecnologias e conseguiram, finalmente, obter imagens com melhor focagem dos embriões de *C. elegans*, que até então não era possível usando a técnica de imunofluorescência disponível, eliminando assim as imagens borradas e fora de foco realizadas na época.

A referida característica da microscopia confocal é sua grande vantagem devido à capacidade de fazer imagens sem perder o foco, além da potência referente aos *lasers* e suas especificidades para excitar as moléculas fluorescentes da amostra, tornando possível realizar imagens de alta resolução de amostras espessas, onde essas imagens de alta resolução podem ser renderizadas para construir um modelo tridimensional do corpo analisado, como demonstrado na Figura 3. Na microscopia óptica tradicional só podemos analisar amostras muito finas (5 micrômetros). Isso é possível por conta da capacidade de armazenamento computacional. É possível fazer imagens de vários pontos da amostra (0.5 até 1.5 micrômetros) e renderizar tais imagens para compor uma imagem tridimensional.

**Figura 3 - Imagens obtidas pelo microscópio confocal e depois renderizada para obter uma imagem 3D**



Fonte: Acervo dos autores.

O microscópio confocal, capaz de obter imagens de alta resolução de um único plano focal de espessura variável de amostras espessas translúcidas, apenas variando parâmetros mecânicos do microscópio, como a potência do laser e, principalmente, o tamanho da abertura do detector ou pinhole. Isso elimina possíveis artefatos causados por cortes físicos, facilitando a análise de peças fixadas e vivas.

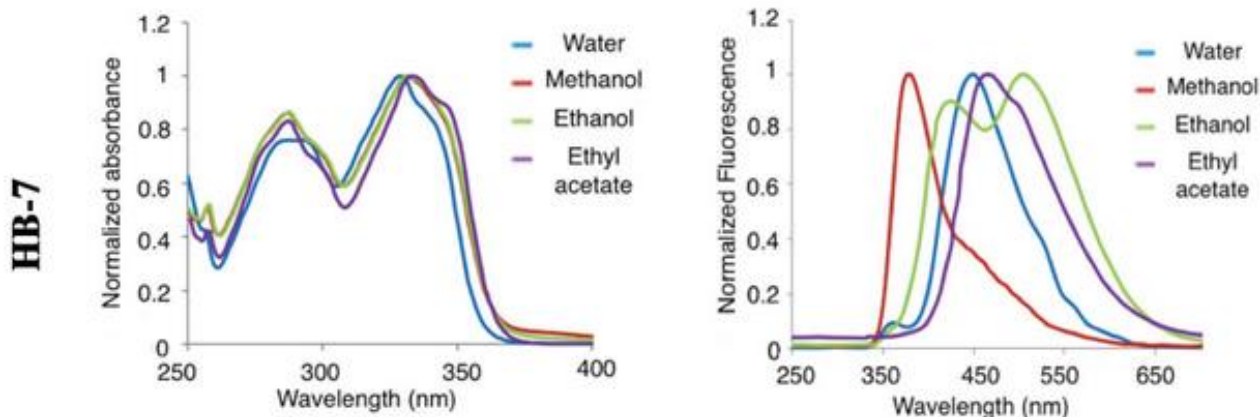
Os equipamentos confocais modernos são acompanhados de *softwares* capazes de compor imagens multidimensionais, vídeos rotacionais que aumentam visualmente a capacidade de estudo referente à qualidade e à beleza das imagens. O aumento da capacidade computacional também torna possível o ajuste de magnificação eletrônica do objeto em estudo, diminuindo a área escaneada (fator *zoom*), sem perder a resolução espacial, além de o melhoramento de detectores e fotomultiplicadores aumentarem a captação de sinal fluorescente, aumentando, assim, a qualidade do sinal obtido e, conseqüentemente, a qualidade do sinal na imagem.

A qualidade dos fluoróforos utilizados é de grande importância para a obtenção de uma imagem ótima, e, conseqüentemente, um estudo preciso da amostra. A partir do cálculo do coeficiente de extinção, torna-se possível relacionar intensidade e concentração da molécula estudada. A eficiência de emissão de fluorescência de um fluoróforo depende da natureza do fluoróforo e é produzida pela razão do comprimento de onda de excitação e do comprimento de onda de emissão desse fluoróforo.

Um fator que devemos observar sempre na escolha de um fluoróforo é sua estabilidade, pois dependendo da estabilidade do marcador utilizado, outros procedimentos devem ser empregados para que este não se “gaste” ou, *photobleaching*, que é o processo de deterioração do fluoróforo, este causado usualmente pelo *laser* em alta potência sobre a amostra. Caso seja usado mais de um fluoróforo na amostra, é necessário evitar *overlap* nas curvas de emissão da molécula (diagrama de Stokes), como ilustrado no Gráfico 1.



**Gráfico 1 - Diagrama de Stokes demonstrando a especificidade de comprimentos de onda de excitação e emissão de quatro substâncias distintas. Note como apesar delas apresentarem espectro de absorção praticamente idêntico, elas podem ser diferenciadas pelo seu espectro de emissão**



**Fonte:** Barros; Marques e Stefani (2019, p. 513).

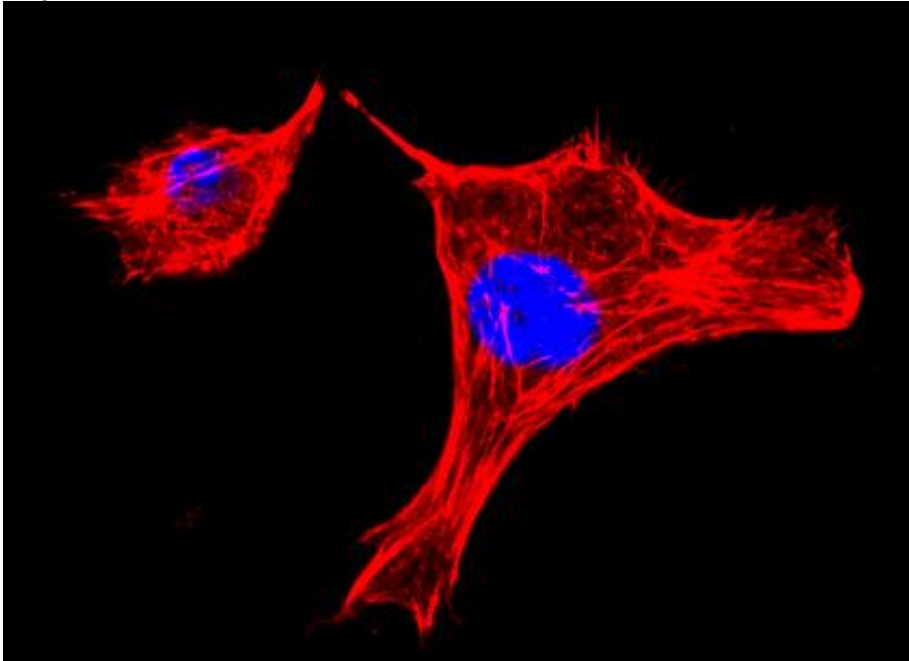
O conjunto de boas escolhas depende do equipamento utilizado como filtro de emissão, seleção de objetivas, detectores, abertura do *pinhole*, estes são cruciais para a obtenção de imagens representativas. Contudo, ainda que todos esses parâmetros sejam bem selecionados, a escolha de um bom fluoróforo e um bom preparo de amostra são importantíssimos para o sucesso de um experimento utilizando essa técnica.



## ONDE SERÁ FEITO?

Diferentes modelos experimentais têm utilizado a microscopia confocal como método de estudo e obtenção de imagens. A imunofluorescência é a técnica mais usada para marcar tecidos e células (Ver capítulo de imunofluorescência em tecido nervoso). Iremos utilizar lâminas contendo células de tecido intestinal marcadas com Phalloidin (marcador de citoesqueleto) e Dapi (Marcador de Núcleo) e tecido vegetal fresco (folhas de peão roxo). O tecido vegetal é um ótimo exemplo de autofluorescência intrínseca do tecido vegetal, no qual, na maioria das vezes apresenta Clorofila e Lignina, dois constituintes autofluorescentes das plantas. Na Figura 4, temos uma imagem capturada em microscópio confocal de um fibroblasto com dois fluoróforos diferentes, a Phalloidin para o citoesqueleto de actina e o DAPI para o núcleo, onde estes marcadores específicos foram utilizados, pois reagem com as proteínas dessas estruturas celulares específicas, e porque seus espectros de emissão são diferenciáveis, evitando interferência.

**Figura 4 – Imagem obtida utilizando microscopia confocal de fluorescência de fibroblasto de rato L929. As estruturas celulares marcadas são a rede de actina filamentosa do citoesqueleto (vermelho) e o núcleo celular (azul), marcados com os fluoróforos Phalloidin e DAPI, respectivamente**



Fonte: Acervo dos autores.



## QUANDO SERÁ FEITO?

A microscopia confocal é amplamente utilizada nas Ciências Biológicas, tanto na pesquisa em biologia celular quanto na genética; na microbiologia e nos processos celulares em geral. Não podemos excluir a contribuição para o estudo da óptica quântica e imagem de não cristais e espectroscopia em geral (STOCKERT; BLÁZQUEZ-CASTRO, 2017). Nesta sessão serão listados métodos de utilização da microscopia confocal.

Colocalização de um ou mais marcadores celulares (fluoróforos) a partir da captação de sinais de espécies fluorescentes que podem aparecer sobrepostas devido à proximidade da região marcada. A partir de cálculos computacionais é possível calcular a proporção de fluoróforo colocalizado ou não em uma imagem a partir de captação de *pixel* sobreposto na imagem (CROIX; SHAND; WATKINS, 2005).

## Classificação e aplicação de fluoróforos

A microscopia confocal é uma ferramenta muito utilizada na detecção de faixa de fluorescência de substâncias candidatas a fluoróforo, bem como a determinação de aplicação e componente celular animal ou vegetal à substância, podendo ser utilizados como marcadores.

## Estudo de marcadores de íons

Esses marcadores são uma nova classe de fluoróforo usada como marcadores de cálcio em células vivas que operam por meio de mudanças conformacionais que resultam em transferência energética captada em forma de fluorescência na presença de íons cálcio.

## Marcação de epítipo

O epítipo é uma pequena sequência de proteína ou carboidrato que pode ser reconhecida por um anticorpo. É possível adicionar uma sequência de fluorescente que emite um sinal quando ativado.

## *Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy (FLIM)*

Para compreender melhor o funcionamento dessa técnica, é necessário entender como funciona o fenômeno da fluorescência. Uma molécula incidida por radiação eletromagnética de um comprimento de onda específico pode energizar os elétrons dessa molécula, fazendo com que eles subam de nível energético; este fenômeno é a **absorção**. Após um tempo, o elétron retornará ao seu estado fundamental, emitindo um fóton de energia menor comparada à da radiação absorvida; este é o fenômeno da **emissão** e esse fóton emitido pela molécula é chamado de **fluorescência**. O tempo que o elétron permanece no estado excitado antes de decair de volta ao estado fundamental é chamado de **tempo de vida de fluorescência**, onde este parâmetro é intrinsecamente ligado ao meio que a molécula em questão está imersa, mais especificamente à concentração dessa molécula, à acidez do meio, temperatura, etc. Medir esse parâmetro é interessante no estudo de como moléculas reagem em meios diferentes. Também pode ser usado na

diferenciação de compostos em um único meio, já que este parâmetro é único de cada molécula (GOMES; SOUSA JR. 2010).

Como esta técnica é resolvida com tempo, é necessária uma fonte de excitação mais sofisticada, capaz de enviar fótons numa frequência específica e controlada, e um detector ultrasensível; estes são os *lasers* pulsados, e as contadoras de fótons, que também podem ser acoplados a microscópios confocais e que são amplamente utilizados.

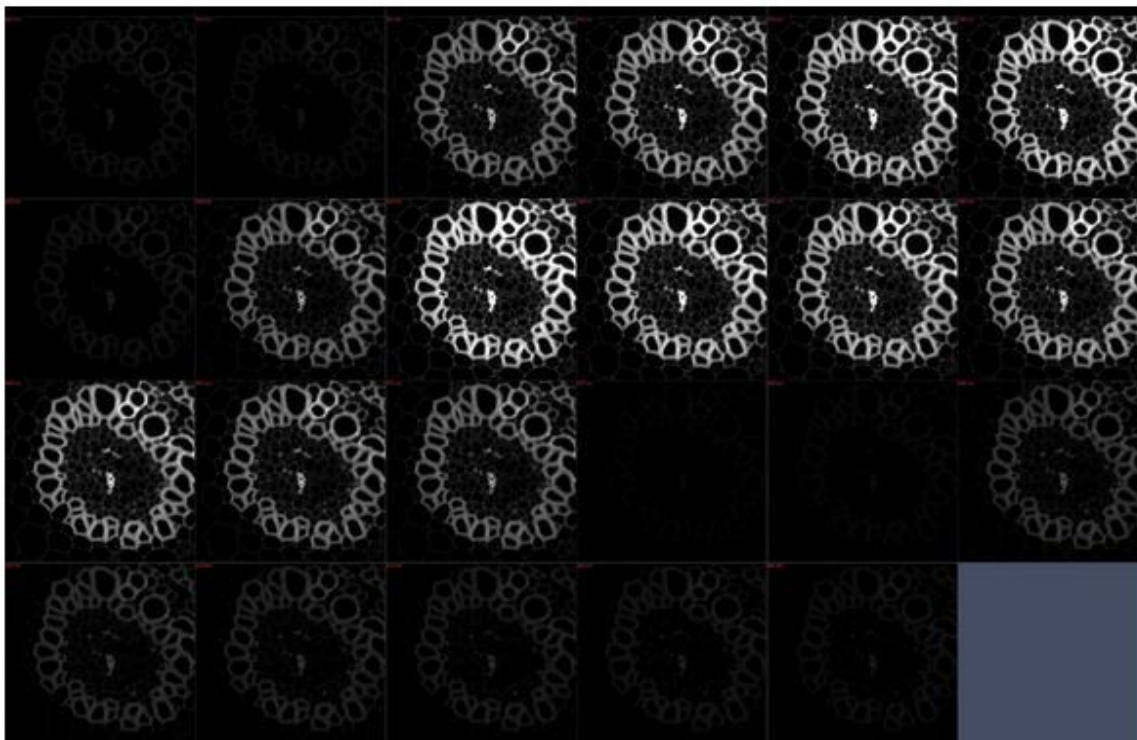
### **Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET)**

Esta técnica é aplicada comumente para determinar aproximação entre duas moléculas. A referida aproximação é difícil de ser observada devido ao limite de resolução óptica de 200nm entre dois pontos. FRET é um tipo de técnica onde a ressonância de transferência de energia permite estudar a interação entre duas proteínas em que a mínima distância entre elas é capaz de permitir uma interação suficiente de transferência de energia, podendo gerar fluorescência na interação, e assim de forma indireta determinar interação e proximidade (PERIASAMY et al., 2008).

### **Método Spectral**

A microscopia confocal é constituída de um aparato massivo de análise espacial xyz e espectral  $\lambda$ , onde por este, é possível distinguir duas ou mais amostras pelos seus perfis de excitação e emissão, ou seja, seus diagramas de Stokes. Estes perfis espectrais podem também ser utilizados para melhor escolher as linhas de excitação e os comprimentos de onda de emissão melhores para um corpo que possui autofluorescência e assim obter imagens mais nítidas de amostras desconhecidas (CROIX; SHAND; WATKINS, 2005). A Figura 5 mostra uma captura de tela do modo espectral do microscópio confocal Zeiss LSM 710, mostrando o modo espectral de uma amostra orgânica que possui autofluorescência, onde as imagens mais nítidas correspondem aos comprimentos de onda com maior intensidade de emissão.

Figura 5 – Modo espectral (*Lambda Mode*) de uma amostra vegetal irradiada por uma fonte de excitação de 488nm. Cada imagem corresponde a um dos detectores presentes dentro do equipamento, onde nos detectores com maior definição da imagem, corresponde aos comprimentos de onda que a amostra emite com maior intensidade. A figura mostra o espectro fluorescente por intensidade no espectro absorção de 488nm a 700nm



Fonte: Acervo dos autores.



## POR QUEM/COM O QUE SERÁ FEITO?

O microscópio confocal que utilizaremos será o LSM 710 da Zeiss (Foto 1), que é constituído por 6 linhas de *laser* correspondendo à fonte de luz projetada na amostra e tem comprimentos de onda específicos (405nm, 456nm, 488nm, 514nm, 546m, 633nm); um *scanner* que é um digitalizador por unidade, ou seja, move o *laser* de modo a focalizar a amostra linha por linha; o *Z control*, que permite a focagem da amostra e a aquisição da imagem em secções nos eixos X, Y e Z; (4) os fotomultiplicadores (*photomultipliers* - PMT), que detectarão os fótons emitidos e/ou refletidos pela amostra; o *pinhole*, responsável pela discriminação profunda e pela posição nos eixos X e Y; o *Beam Splitter* ou via de fluorescência, que é definida pela combinação dos espelhos dicróicos (principal e secundário) e filtros de emissão; as objetivas, responsáveis pela formação óptica da imagem, que determinam as propriedades de qualidade da imagem, assim como as resoluções nos eixos X, Y e Z, e caracterizadas pela abertura numérica que determina o tamanho da imagem no local.

Foto 1 - Confocal LSM 710 localizado na Central Analítica da UFC



Fonte: Acervo dos autores.



## COMO SERÁ FEITO?

Seguiremos o passo a passo contido no Manual do usuário do microscópio confocal da Central Analítica da Universidade Federal do Ceará ([Disponível aqui!](#)), cujo princípio básico de uso é o mesmo para a maioria dos microscópios comerciais existentes (UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ, 2015). Lembrando que todo microscópio confocal sempre vai apresentar linhas de lasers, filtros de excitação e absorção, comando de abertura do pinhole, comandos de configuração do fotomultiplicador e do sistema de captação de imagem.



## QUANTO TEM SIDO USADO NA PESQUISA?

Fica muito difícil especificar a utilização da microscopia confocal devido às inúmeras aplicações e ao grande número de publicações usando a técnica. Listaremos, a seguir, alguns trabalhos de acesso aberto (*open access*) como sugestões de leituras. Estes tratam sobre a análise de material vivo e não vivo.

## REFERÊNCIAS

- BARROS, Hélio L.; MARQUES, Sandra M. T.; STEFANI, Valter. Water-soluble benzazole dyes fluorescent by ES IPT: structural characterization, photophysical properties and its application as a probe for direct staining of helminths. **Journal Brazilian Chemical Society**, v. 30, n. 3, p. 509-521, 2019.
- BRAIN RESEARCH INSTITUTE. **The confocal microscope**. Los Angeles: Brain Research Institute, [20-]. Disponível em: [https://www.gonda.ucla.edu/bri\\_core/confocal.htm](https://www.gonda.ucla.edu/bri_core/confocal.htm). Acesso em: 20 abr. 2021.
- CLAXTON, Nathan S.; FELLERS, Thomas J.; DAVIDSON, Michael W. **Laser scanning confocal microscopy**. [Tallahassee]: [s.n.], [20-]. Disponível em: <https://www.ucc.ie/en/media/academic/anatomy/imagingcentre/imagegallery/confocalgallery/Laser-Scanning-Confocal-Microscopy-Introduction.pdf>. Acesso em: 30 abr. 2021.
- CROIX, Claudette M. St.; SHAND, Stuart H.; WATKINS, Simon C. Confocal microscopy: comparisons, applications, and problems. **Biotechniques**, v. 39, p. S2-S5, Dec. 2005.
- EGGER, M. David; PETRĀN, Mojmir. New reflected-light microscope for viewing unstained brain and ganglion cells. **Science**, v. 157, n. 3786, p. 305-307, July 1967.
- FELLERS, Thomas J.; DAVIDSON, Michael W. **Introduction to confocal microscopy**. [S.l.]: Olympus Corporation, [20-]. Disponível em <http://www.olympusconfocal.com/theory/confocalintro.html>. Acesso em: 30 abr. 2021.
- GOMES, Andre Marcos de Oliveira; SOUSA JR, Ivanildo Pedro de. Espectroscopia através do microscópio: FRAP, FRET, FLIM e FCS. In: FONTES, Adriana *et al.* **Microscopia óptica: fundamentos e aplicações às ciências biomédicas**. Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Microscopia e Microanálise, 2010. p. 137-142.
- HERMAN, B. **Fluorescence microscopy**. 2nd. ed. [S.l.]: Paperback, 1998.
- HISTÓRIA do microscópio. [S.l.]: Portal São Francisco, [2021]. Disponível em: <https://www.portalsaofrancisco.com.br/historia-geral/historia-do-microscopio>. Acesso em: 30 abr. 2021.
- HOW STUFF WORKS. **Physical science: light**. [S.l.]: How Stuff Works, [20-]. Disponível em: <http://videos.howstuffworks.com/hsw/19666-physical-science-light-video.htm>. Acesso em: 30 abr. 2021.
- MINSKY, Marvin Lee. **Microscopy apparatus**. Patent n. US695107A. Concession: Dec. 19, 1961. Disponível em: <https://patents.google.com/patent/US3013467A/en>. Acesso em: 29 set. 2021.
- PADDOCK, S.; CLAXTON, N.; DARZYNKIEWICZ, Z. **Cytometry**. 3th ed. [S.l.]: Elsevier, 2009. V. 63.
- PADDOCK, S. **Methods in molecular biology: confocal microscopy methods and protocols**. New Jersey: Human Press, 1998. v. 122.

PAWLEY, James B. (ed.). **Handbook of biological confocal microscopy**. 3th ed. Berlin: Springer, 2006.

PERIASAMY, Ammasi *et al.* Quantitation of protein-protein interactions: confocal fret microscopy. **Methods in Cell Biology**, v. 89, p. 569-598, 2008. Chap. 2.

STOCKERT, Juan Carlos; BLÁZQUEZ-CASTRO, Alfonso. Fluorescence instrumental and techniques. *In*: STOCKERT, Juan Carlos; BLÁZQUEZ-CASTRO, Alfonso. **Fluorescence microscopy in life sciences**. [S.l.]: Bentham Science Publishers, 2017. p. 180-184.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ. **Microscópio confocal LSM710 ZEISS**®: confocal LSM710: manual para operação. Fortaleza: Universidade Federal do Ceará, 2015. Disponível em: [http://www.centralanalitica.ufc.br/images/Manual\\_-\\_Confocal\\_LSM\\_710.pdf](http://www.centralanalitica.ufc.br/images/Manual_-_Confocal_LSM_710.pdf). Acesso em: 30 abr. 2021.

VIKSTROM, K. L. *et al.* Steady state dynamics of intermediate filament networks. **Journal of Cell Biology**, v. 118, p. 121-129, 1992.

ZEISS. **We make it visible**: confocal principle. [S.l.]: Zeiss, [2021]. Disponível em: <https://www.zeiss.de/mikroskopie/home.html?vaURL=www.zeiss.de/microscopy>. Acesso em: 30 abr. 2021.



## SUGESTÕES DE LEITURAS

DIJGRAAF, Feline E. *et al.* Labeling and tracking of immune cells in ex vivo human skin. **Nature Protocols**, v. 16, p. 791-811, 2021.

FANESI, A. *et al.* Shear stress affects the architecture and cohesion of *Chlorella vulgaris* biofilms. **Scientific Reports**, v. 11, n. 4002, p. 1-11, 2021. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41598-021-83523-3>. Acesso em: 30 abr. 2021.

MISTRICK, Martin *et al.* Microthermal-induced subcellular-targeted protein damage in cells on plasmonic nanosilver-modified surfaces evokes a two-phase HSP-p97/VCP response. **Nature Communications**, v. 12, n. 713, p. 1-11, 2021. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41467-021-20989-9>. Acesso em: 30 abr. 2021.

TCHERNIJ, S. *et al.* Fluorine-based color centers in diamond. **Scientific Reports**, v. 10, n. 21537, p. 1-7, 2020. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41598-020-78436-6>. Acesso em: 30 abr. 2021.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ. **Microscópio confocal LSM710 ZEISS**®: confocal LSM710: manual para operação. Fortaleza: Universidade Federal do Ceará, 2015. Disponível em: [http://www.centralanalitica.ufc.br/images/Manual\\_-\\_Confocal\\_LSM\\_710.pdf](http://www.centralanalitica.ufc.br/images/Manual_-_Confocal_LSM_710.pdf). Acesso em: 30 abr. 2021.

WU, Yichen *et al.* Three-dimensional virtual refocusing of fluorescence microscopy images using deep learning. **Nature Methods**, v. 16, p. 1323-1331, 2019.

## 9 PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO DA PELE DE CAMUNDONGO *HAIRLESS* PARA AVALIAÇÃO DE MICROSCOPIA ÓPTICA DE ROTINA E MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO

Bryan Hudson Hossy  
Nadia Campos de Oliveira Miguel



### O QUE SERÁ FEITO?

Neste capítulo descreveremos a utilização da pele do camundongo *hairless* como alternativa de modelo experimental para a área de pesquisa de insumos e formulações para tópicos. Também teremos como objetivo pontuar as características morfológicas da pele desse modelo experimental evidenciadas por meio do microscópio óptico por técnica de rotina à hematoxilina e eosina (H&E). Além de descrever a rotina de microscopia eletrônica de transmissão que mostrará detalhes da ultraestrutura do tegumento dos referidos animais. O camundongo da cepa *Skh-hairless-1* é muito utilizado em vários ensaios de segurança, como testes de substâncias com potencial de tratamento e/ou prevenção do fotoenvelhecimento e processo de reparação tecidual (BENAVIDES et al., 2009; KLIGMAN, 1996; HOSSY, 2012; HOSSY et al., 2013). A denominação de camundongo *hairless* vem do fato do mesmo possuir o gene *hairless* (Hr), que resulta na principal característica fenotípica desse animal, a qual é a ausência de pelos terminais em todo o corpo, possuindo somente as vibrissas e alguns pelos vestigiais observados no animal ao longo de sua vida (HOSSY et al., 2012; CHORILLI; MICHELIN; SALGADO, 2007; BENAVIDES et al., 2009).



### POR QUE SERÁ FEITO?

O uso da pele do camundongo *hairless* é conhecido como padrão ouro para estudos de substâncias e dispositivos (sejam eles formulações ou equipamentos) que tenham seu uso orientado sobre a pele. Este animal pode fornecer resultados substanciais nas áreas de Fotobiologia, Dermatologia, Cosmetologia, Farmácia, Física e Engenharia por

ser um modelo de estudo de pequeno porte, de fácil manuseio e com possibilidades de correlações histológicas e moleculares com a pele humana (HOSSY, 2017; HOSSY, 2012; CHORILLI; MICHELIN; SALGADO, 2007; BENAVIDES et al., 2009).



## ONDE SERÁ FEITO?

Para avaliar o padrão histológico normal e/ou com possíveis alterações morfológicas e moleculares provenientes do uso de formulações de uso tópico ou agentes físicos como a luz solar simulada foi utilizada a pele da região dorsal de camundongos (*hairless* Skh-1) adulto jovem (6 semanas de vida) (HOSSY, 2017; HOSSY, 2012).

A pele desse animal *hairless*, quando observada a olho nu é rosada, apresenta aspecto enrugado, e a microscopia óptica mostra que é composta por epiderme com duas a três camadas de células e a derme apresenta matriz extracelular com abundante quantidade de fibras colágenas evidenciada pela técnica de rotina H&E. Ainda podemos constatar a presença de glândulas sebáceas associadas aos poucos folículos pilosos e ainda sendo possível distinguir pequenas estruturas com aspecto de cistos revestidos por células epiteliais com pequeno grau de queratinização e conteúdo de aspecto sebáceo. Tanto a pele do macho quanto da fêmea possui aspectos macroscopicamente e microscopicamente semelhantes, porém, o macho possui epiderme aparentemente mais espessa e hipoderme mais fina (MONTAGNA; CHASE; BROWN, 1954; HOSSY, 2012).

A observação da pele desse modelo experimental ao microscópio eletrônico de transmissão mostra camadas basal, espinhosa e granular; as mesmas com núcleos variando de alongados na maior altura da célula (cilíndricos) até um formato alongado na largura (pavimentosos). Núcleos de aspecto eucromático são verificados e apresentam heterocromatina localizada periféricamente. E ainda, a camada córnea anucleada e com aspecto eletrondenso à microscopia eletrônica de transmissão. Podemos visualizar desmossomos e tonofilamentos na maioria das células da epiderme, e na derme a presença de matriz extracelular com padrão de organização denso não modelado e células como fibroblasto e mastócito. Os folículos pilosos vestigiais mostrando células-tronco em sua camada germinativa e diferenciação celular com grânulos de queratohialina nas outras camadas das bainhas epidérmicas e conjuntivas. Também podemos observar acúmulo de secreção nas células secretoras das glândulas sebáceas (ZELICKSON, 1967; LENTZ, 1971; OVALLE; NAHIRNEY, 2020).

## QUANDO SERÁ FEITO?

Podemos lançar mão dessa técnica quando for desejado determinar o perfil de atividade de um novo candidato a ingrediente farmacologicamente ativo, seja ele para uso cosmético ou farmacêutico associado ou não a técnicas que usem *lasers* ou radiação ultravioleta, as quais sejam passíveis de atividade biológica sobre a pele e que modelos alternativos (cultura de células procarióticas, eucarióticas, teciduais, etc.) não consigam satisfazer com suficiência de dados a eficácia e/ou segurança de tais substâncias, carecendo de avaliações em modelo *in vivo* de um indivíduo mamífero, tendo em vista a sua complexidade fisiológica superior quando comparado a modelos *in silico*, *in vitro* e *in vivo* utilizando não mamíferos.



## POR QUEM/COM O QUE SERÁ FEITO?

Protocolos de processamento de material biológico para microscopia óptica de rotina (MO) e microscopia eletrônica de transmissão (MET).

### Microscopia Óptica de Rotina (MO)

Em qualquer estudo experimental com animais é sempre obrigatória a aprovação por Comitê de Ética em Experimentação Animal da instituição na qual a pesquisa está sendo realizada. Observar e cumprir as normas vigentes é de extrema importância para a condução, respeito e credibilidade aos achados do referido estudo. Quando no projeto de determinado estudo é definido o modelo experimental, passamos para a etapa de obtenção do material biológico. De posse dos fragmentos da pele, no caso do nosso estudo, será necessário estirar e prender com alfinetes sobre suporte de cera dentária.

**Foto 1 - Pele da região dorsal de um camundongo *hairless* adulto jovem (6 semanas de vida) estendida com auxílio de cera dentária e alfinetes para etapa de fixação com paraformaldeído conforme metodologia de Hossy et al. (2013)**



**Fonte:** Acervo pessoal dos autores.

Esse procedimento deixará o material biológico plano e facilitará a realização dos cortes (microtomia) e as subseqüentes etapas do protocolo. Os fragmentos serão fixados em solução de paraformaldeído 4,0%, pH 7,4 por 24 horas. Em seguida, eles serão submetidos a crio proteção em soluções com crescentes concentrações de sacarose (10%, 20% e 30%) por 24 a 72 horas cada. Após os fragmentos são colocados em moldes contendo *Optimal Cutting Temperature Compound* (OCT) e cortados com espessura 10 $\mu$ m em criostato a -27°C (HOSSY, 2012; HOSSY et al., 2013; HOSSY, 2017).

### **Protocolo MO**

- Fixação em solução de paraformaldeído 4,0%, pH 7,4 por 24 horas.
- Crio proteção em soluções com crescentes concentrações de sacarose (10%, 20% e 30%) por 24 a 72 horas cada.
- Fragmentos serão colocados em moldes contendo OCT.
- Cortados com espessura 10 $\mu$ m em criostato Leica CM1850 UV a -27°C.

## Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

Para a obtenção do material biológico de estudo que será processado para análise em microscópio eletrônico de transmissão, devemos proceder como descrito na seção anterior (MO). O material deverá ser mantido durante 10 minutos em solução de paraformaldeído a 4% em pH 7,4. Depois desse procedimento, os fragmentos de pele serão pós-fixados em solução de glutaraldeído 2,5% tamponada com cacodilato de sódio (CaCo) 0,1M em pH 7,4 a -4°C durante a noite acondicionados em frascos do tipo eppendorf® (HOSSY, 2017; PORTES, 2010).

No dia seguinte, a solução de pós-fixação utilizada será descartada, e na sequência, lavar o material em tampão CaCo, três vezes durante cinco minutos em cada banho. Em seguida às três lavagens, proceder a etapa de osmificação. Nessa etapa, o material entrará em contato com uma mistura de Tetróxido de Ósmio 1% tamponado em CaCo, Ferrocianeto e Cloreto de Cálcio (1:1:1) durante 1h:30 protegido da luz com auxílio de papel laminado para impedir a precipitação do ósmio (HOSSY, 2017; PORTES, 2010).

A seguir, lavar mais três vezes o material com tampão CaCo durante 5 minutos para cada banho. Prosseguir com a lavagem do material biológico em água destilada e posteriormente submeter à solução aquosa de acetato de uranila a 1% durante a noite (HOSSY, 2017; PORTES, 2010).

Depois, proceder a desidratação do material em série crescente de concentrações de acetona a 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% e 100%. Em seguida a desidratação, proceder a infiltração do material em acetona e resina (epon) (1:1) durante a noite sob leve agitação. Na manhã do dia seguinte, a mistura de resina e acetona será substituída por outra com resina pura, a qual servirá para infiltrar os fragmentos biológicos. Nessa etapa, deixar sob leve agitação por 2 dias sob refrigeração. Em seguida, será realizada confecção de blocos com auxílio de forma molde. Nesta etapa, depositar um fragmento de tecido em cada poço do molde previamente identificado e cobrir cada um deles com resina pura e manter em estufa a 60°C por 48 horas. Uma vez confeccionados os blocos, proceder a etapa de trimagem, a fim de produzir as pirâmides e, posteriormente, fazer cortes em ultramicrótomos (HOSSY, 2017; PORTES, 2010).

Durante o processo de ultramicrotomia são obtidos, inicialmente, cortes semifinos com aproximadamente 500 nm de cor verde e rosa. Após, eles serão corados, com solução de azul de toluidina a 1%. Além desses, serão obtidos também cortes ultrafinos que possuem espessura de aproximadamente 70nm de cor prata, os quais são

coletados em grades de cobre contrastado e posterior observação ao microscópio eletrônico transmissão (HOSSY, 2017; PORTES, 2010).

Para contrastar material biológico serão colocadas gotas de acetato de uranila a 5%, permanecendo 30 minutos em placa de Petri forrada com alumínio e abrigada da luz. Após, as grades serão lavadas em água destilada e, em sequência, para secagem, depositadas em papel filtro. Depois disso, será repetido o mesmo procedimento durante cinco minutos com o citrato de chumbo. Para evitar a precipitação do chumbo em presença de CO<sub>2</sub>, pastilhas de NaOH serão colocadas (HOSSY, 2017; PORTES, 2010).

As imagens realizadas a partir dos cortes semifinos que foram corados com solução de azul de toluidina a 1% serão obtidas por intermédio de microscópio óptico. Em contrapartida, as imagens provenientes dos cortes ultrafinos contrastadas com chumbo e uranila serão adquiridas por meio de microscópio eletrônico de transmissão (HOSSY, 2017; PORTES, 2010).

### Protocolo MET

- Fixação durante 10 minutos em solução de paraformaldeído a 4% em pH 7,4.
- Pós-fixação em solução de glutaraldeído 2,5% tamponada com cacodilato de sódio (CaCo) 0,1M em pH 7,4 a -4°C durante a noite acondicionados em frascos do tipo eppendorf®.
- Lavagem do material em tampão CaCo três vezes durante cinco minutos em cada banho.
- Osmificação nessa etapa: o material entrará em contato com uma mistura de Tetróxido de Ósmio 1% tamponado em CaCo, Ferrocianeto e Cloreto de Cálcio (1:1:1) durante 1h:30 protegido da luz com auxílio de papel laminado para impedir a precipitação do ósmio.
- Lavar três vezes o material com tampão CaCo durante 5 minutos para cada banho.
- Prosseguir com a lavagem do material biológico em água destilada e posteriormente submeter à solução aquosa de acetato de uranila a 1% durante a noite.
- Desidratação em série crescente de concentrações de acetona a 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% e 100%.
- Infiltração do material em acetona e resina (epon) (1:1) durante a noite sob leve agitação.
- Infiltrar os fragmentos biológicos sob leve agitação por 2 dias a -4° C.

- Confeccionar os blocos com auxílio de forma molde. Nessa etapa, depositar um fragmento de tecido em cada poço do molde previamente identificado e cobrir cada um deles com resina pura e manter em estufa a 60°C por 48 horas.
- Proceder a etapa de trimagem a fim de produzir as pirâmides.
- No processo de ultramicrotomia serão obtidos, inicialmente, cortes semifinos com aproximadamente 500 nm de cor verde e rosa. Após, eles serão corados com solução de azul de toluidina a 1%. Além desses, serão obtidos também cortes ultrafinos que possuem espessura de aproximadamente 70nm de cor prata, os quais são coletados em grades de cobre contrastado e posterior observação ao microscópio eletrônico transmissão (HOSSY, 2017; PORTES, 2010).
- Contrastação de material biológico com acetato de uranila a 5% durante 30 minutos em placa de Petri forrada com alumínio e abrigada da luz.
- As grades serão lavadas em água destilada e, em sequência, para secagem, depositadas em papel filtro.
- Repetir o mesmo procedimento durante cinco minutos com o citrato de chumbo (para evitar a precipitação do chumbo em presença de CO<sub>2</sub>; pastilhas de NaOH serão colocadas) (HOSSY, 2017; PORTES, 2010).
- As imagens realizadas a partir dos cortes semifinos que foram corados com solução de azul de toluidina a 1% serão obtidas por intermédio de microscópio óptico.
- As imagens provenientes dos cortes ultrafinos contrastadas com citrato de chumbo e acetato de uranila serão adquiridas através de microscópio eletrônico de transmissão (HOSSY, 2017; PORTES, 2010).



## COMO SERÁ FEITO?

Aspectos histológicos fundamentais para o estudo microscópico da pele.  
Observação ao microscópio óptico. Epiderme (Figuras 1 e 2).



**Quadro 1 - Características estruturais e de afinidades tintoriais dos queratinócitos à microscopia de luz - HE (Figuras 1 e 2)**

Células da Camada Basal		Células da Camada Espinhosa		Células da Camada Granulosa		Células da Camada Lúcida – Pele Espessa		Células da Camada Córnea	
Núcleo	Citoplasma	Núcleo	Citoplasma	Núcleo	Citoplasma	Núcleo	Citoplasma	Núcleo	Citoplasma
Formato esférico ou oval de coloração roxa e nucléolo evidente	Coloração rósea uniforme. Célula com formato prismático	Formato pavimentoso com coloração roxa	Formato elíptico com coloração rósea. Devido à retração do material biológico na região periférica das células, há presença de projeções em forma de espinhos, locais de desmossomos	Formato pavimentoso (alongado no maior eixo da célula com coloração roxa)	O citoplasma fica arroxeadado devido à alta afinidade pela hematoxilina dos grânulos de querato-hialina	Camada anucleada	Com baixa afinidade pela eosina de corado róseo. Células dispostas em monocamada	Camada anucleada	Com forte afinidade pela eosina, o citoplasma revela-se fortemente corado em róseo à magenta

**Fonte:** Elaboração dos autores.

**Quadro 2 - Observação à microscopia ótica da derme (Figuras 1, 2 e 3): características estruturais ao microscópio de luz**

Fibroblastos		Matriz Extracelular	
Núcleo	Citoplasma	Fibra Colágena	Fibra Elástica
Formato fusiforme; coloração arroxeada pela hematoxilina	Formato fusiforme e palidamente corado de róseo	Derme papilar: tecido conjuntivo propriamente dito frouxo, feixes delgados e esparsos de fibras colágenas.  Derme reticular: o tecido conjuntivo denso não modelado, feixes de fibras colágenas com trajeto em várias direções	Para evidenciar, há necessidade de coloração com técnica específica para fibras elásticas

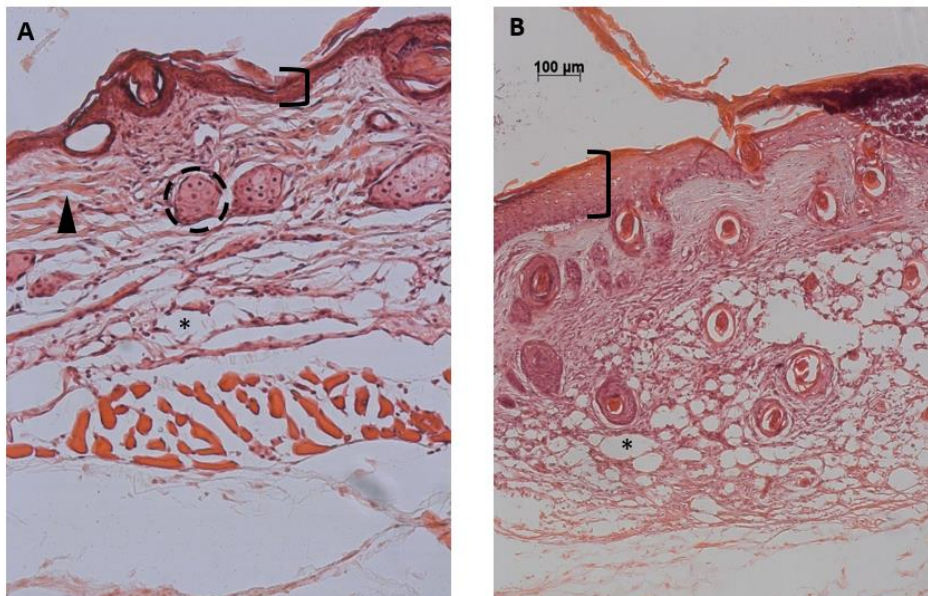
Fonte: Elaboração dos autores.

**Quadro 3 - Observação à microscopia ótica dos anexos cutâneos - Anexos (Figuras 1, 2 e 3): características estruturais ao microscópio de luz**

Folículo piloso		Glândula sebácea	
Folículo	Haste	Ducto	Porção Secretora
Células com formato cúbico; núcleo esférico central e citoplasma de coloração rósea localizados na derme	Estrutura de formato tubular; não há presença de núcleos nas células, exceto na zona queratogênica. É possível observar bainhas epiteliais e conjuntivas	Estrutura formada por células epiteliais com citoplasma de coloração rósea e núcleo central ducto associado ao aparelho pilossebáceo	Células organizadas em alvéolos ou ácinos; localizadas na região basal; apresentam núcleo achatado e citoplasma palidamente corado. Podemos ainda observar outros tipos celulares com núcleo central e citoplasma descolorado em razão da presença de lipídeos, os quais não são evidenciados pelo HE. Também podem ser encontradas células com núcleo picnótico

Fonte: Elaboração dos autores.

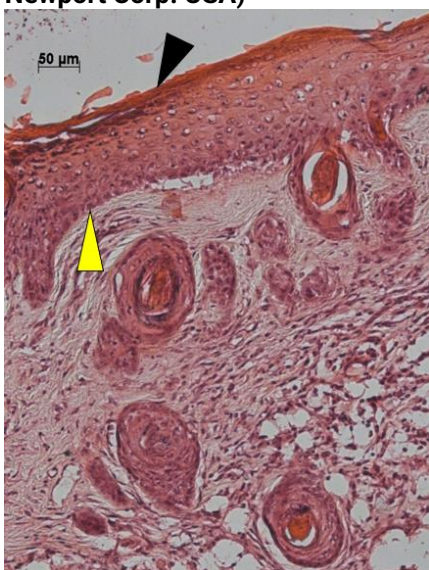
**Figura 1 -** Imagens representativas do padrão histológico normal (A) e pós-exposição à luz solar simulada (B) de camundongos *hairless* Skh1



**Fonte:** Acervo pessoal dos autores.

**Nota:** (A) Fotomicrografia da pele de um camundongo *hairless* adulto jovem (6 semanas de vida). O colchete indica espessura da epiderme contendo até três camadas de células. A cabeça de seta indica fibras colágenas. O asterisco indica adipócito da hipoderme. O círculo tracejado demonstra organização alveolar da glândula sebácea. (B) Fotomicrografia da pele de um camundongo *hairless* adulto jovem submetido a 30 minutos de luz solar simulada proveniente de um simulador solar (Modelo Oriel 91,192,1000 W; Newport Corp. USA). O colchete indica aspecto aumentado da espessura da epiderme.

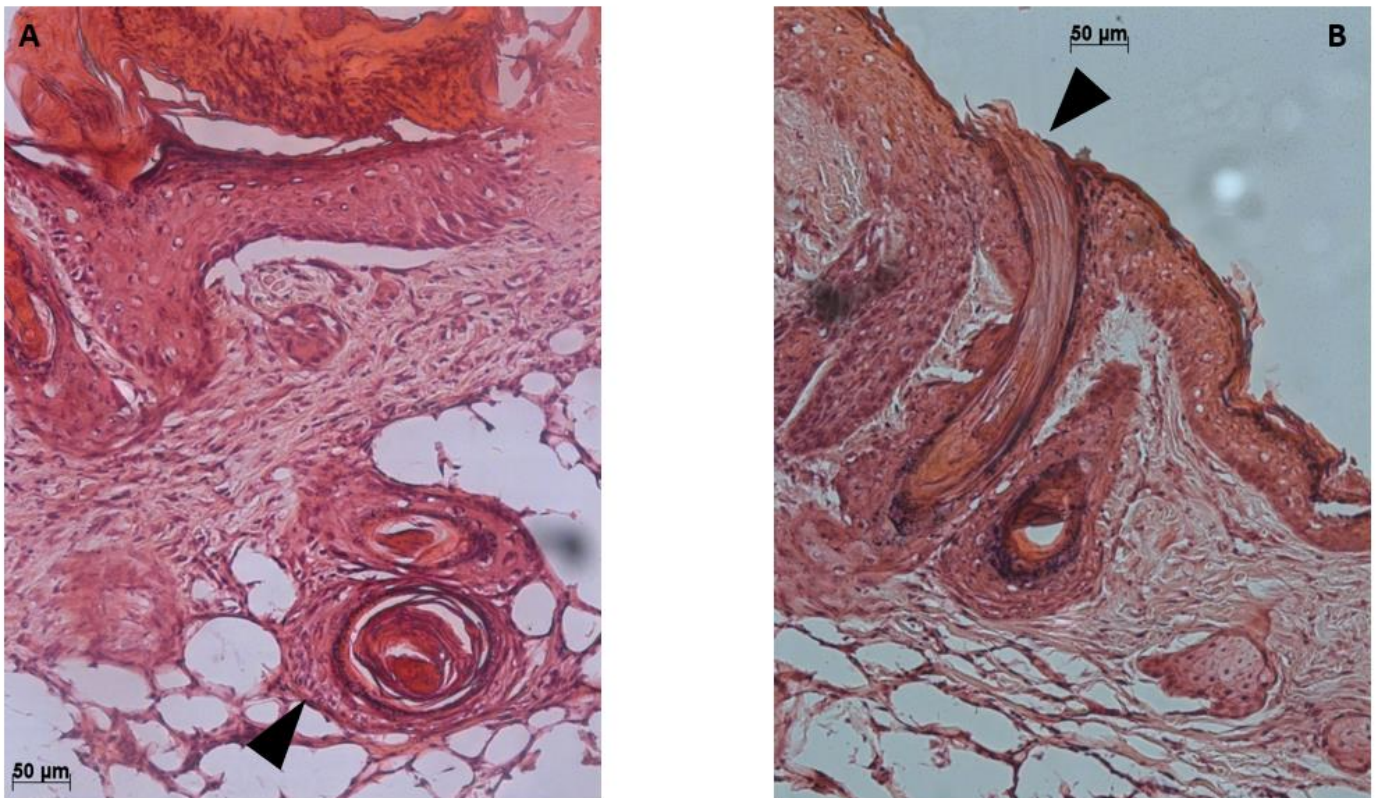
**Figura 2 -** Fotomicrografia da pele de um camundongo *hairless* adulto jovem (6 semanas de vida) submetido à luz solar simulada proveniente de um simulador solar (Modelo Oriel 91,192, 1000 W; Newport Corp. USA)



**Fonte:** Acervo pessoal dos autores.

**Nota:** A cabeça de seta preta aponta para células do estrato córneo, nível celular mais superficial da epiderme, apresentando células anucleadas. A cabeça de seta amarela indica célula da camada basal com núcleo esférico ocupando volume substancial do citoplasma.

**Figura 3 - Fotomicrografias da pele de um camundongo *hairless* adulto jovem (6 semanas de vida) submetida a 30 minutos de luz solar simulada proveniente de um simulador solar (referido acima)**



**Fonte:** Acervo pessoal dos autores.

**Nota:** (A) A cabeça de seta indica folículo piloso em corte transversal com bainhas epiteliais circundando a haste do pelo que se apresenta com aspecto de lâminas concêntricas de células queratinizadas e anucleadas. (B) A cabeça de seta orientada para um folículo piloso em corte longitudinal com haste do pelo em posição central apresentando lâminas de células queratinizadas paralelas e anucleadas.

**Quadro 4 - Observação à microscopia eletrônica de transmissão da epiderme (Figura 4): características estruturais dos queratinócitos à microscopia eletrônica de transmissão**

Células da Camada Basal		Células da Camada Espinhosa		Células da Camada Granulosa		Células da Camada Córnea	
Núcleo	Citoplasma	Núcleo	Citoplasma	Núcleo	Citoplasma	Núcleo	Citoplasma
Esférico evidente e com aspecto eucromático	Presença de tonofilamento. Poucas mitocondriais; presença de desmossomos e hemidesmossomo no polo basal.	Perfil alongado, em posição central; nucléolo evidente.	Tonofilamentos em maior quantidade e eletrodensidade. Há presença de grânulos de formato esférico a ovoide de conteúdo lamelar. Superfície celular irregular com projeções lembrando espinhos, locais de desmossomo	Perfil alongado proeminente e em posição central e nucléolo evidente.	Perfil celular alongado. Grande concentração de grânulos eletrondensos de queratohialina	Camada anucleada.	Perfil alongado, ausência de organelas e vesículas. Presença de material citoplasmático (tonofilamentos de queratina) eletrondenso. Os desmossomos estão bem evidentes em vários pontos das superfícies laterais dessas células.

**Fonte:** Elaboração dos autores.

**Quadro 5 - Observação à microscopia eletrônica de transmissão da derme (Figura 5A): características estruturais dos queratinócitos à microscopia eletrônica de transmissão**

Fibroblastos		Mastócitos	
Núcleo	Citoplasma	Núcleo	Citoplasma
Perfil alongado no maior comprimento da célula; heterocromatina periférica; nucléolo evidente	Perfil de centríolos (par) evidente; pequeno complexo de Golgi; inúmeros vacúolos com material floculento e cisternas de retículo endoplasmático rugoso	Perfil central e alongado, podendo ser observado em formato circular, dependendo da incidência do corte, eucromático e nucléolo evidente	Filopódios (projeções citoplasmáticas). Grânulos proeminentes e eletrondensos

Fonte: Elaboração dos autores.

**Quadro 6 - Observação à microscopia eletrônica de transmissão da matriz extracelular (Figura 5B): características estruturais à microscopia eletrônica de transmissão**

Fibra Colágena	Fibra Elástica
Em corte longitudinal da fibra colágena apresenta estriações (bandas) claras e escuras com periodicidade de 64 nm Em corte transversal perfil circular com diâmetro uniforme	Região central com aparência amorfa e eletrondensa apresentando microfibrilas periféricamente localizadas

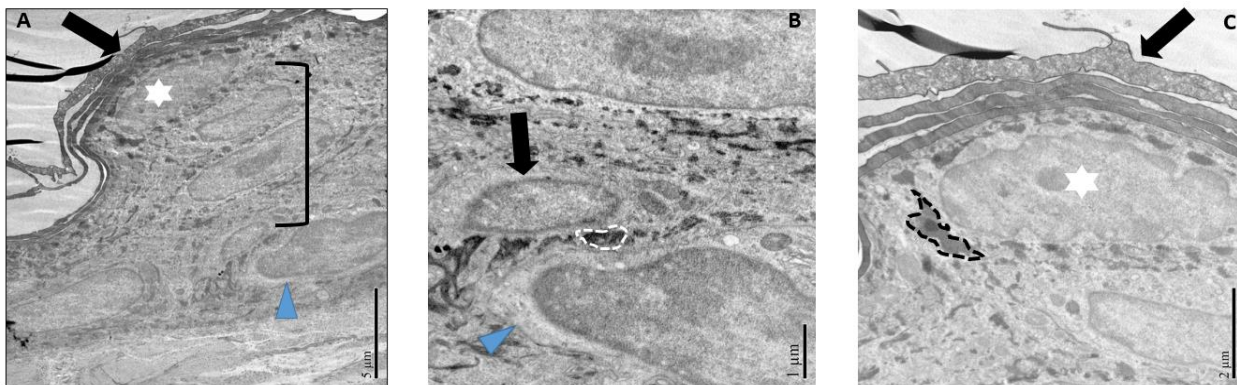
Fonte: Elaboração dos autores.

**Quadro 7 - Anexos (Figura 6)**

Folículo piloso	Glândula sebácea	
Folículo	Porção Secretora	
Célula basal com núcleo proeminente centralmente localizado; citoplasma com grânulos de queratohialina	Núcleo	Citoplasma
	Proeminente eucromático com heterocromática periférica	Preenchido com gotículas lipídicas com diferentes intensidades de eletrondensidade. Presença de retículo endoplasmático liso e perfis mitocondriais

Fonte: Elaboração dos autores.

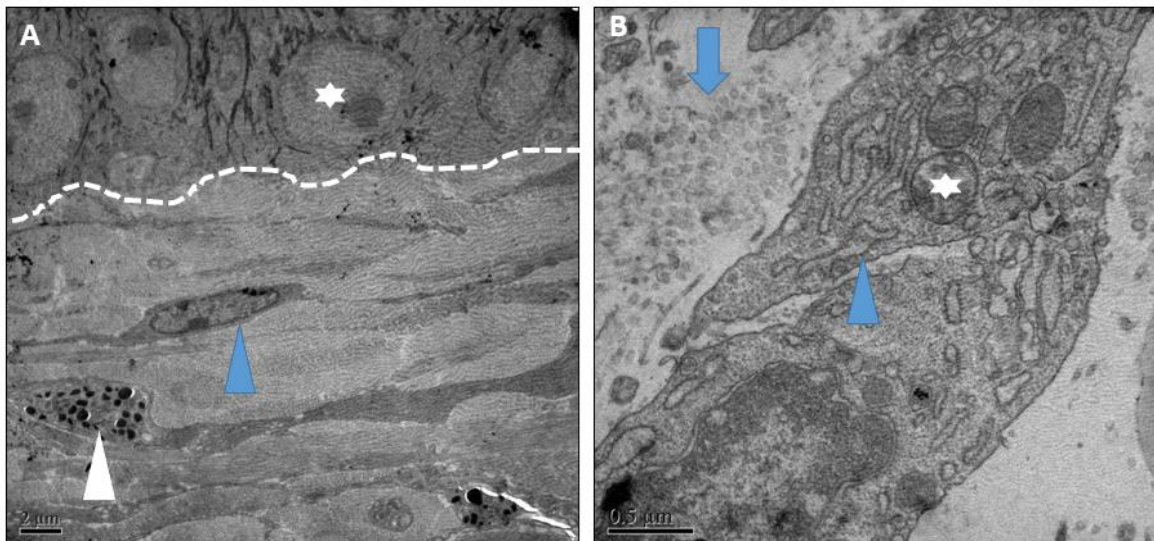
**Figura 4 - Eletromicrografias de transmissão da pele de um camundongo *hairless* adulto jovem**



Fonte: Acervo pessoal dos autores.

**Nota:** (A) Perfil de todas as camadas da epiderme. Cabeça de seta (azul) aponta para célula da camada basal. O colchete delimita células do estrato espinhoso. A estrela indica célula da camada granulosa e a seta aponta células da camada córnea. (B) A cabeça de seta (azul) evidencia queratinócito da camada basal, apontando núcleo bem volumoso e ocupando substancialmente o citoplasma da célula. A seta aponta para compactação do núcleo de queratinócito da camada espinhosa e redução de sua participação no microambiente celular. A linha tracejada delimita grânulos de queratohialina. (C) Maior aumento das camadas granulosa e espinhosa. A estrela aponta para a célula da camada granulosa, destacando núcleo pavimentoso com perfil irregular, nucléolo evidente e grânulos eletrondensos de queratohialina (área tracejada). A seta aponta para a célula da camada córnea anucleada e com conteúdo eletrondenso.

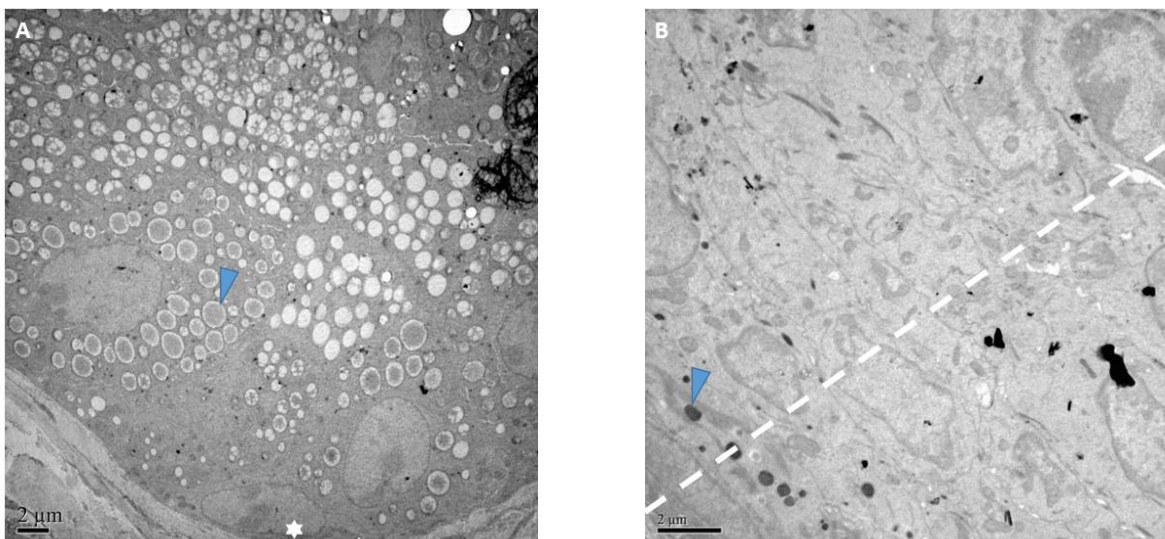
**Figura 5 - Eletromicrografias de transmissão da pele de um camundongo *hairless* adulto jovem**



**Fonte:** Acervo pessoal dos autores.

**Nota:** (A) Perfil de celularidade da camada basal (acima da área tracejada) e derme abaixo da área tracejada. A estrela indica célula da camada basal com núcleo volumoso, eucromático em posição central. Há presença de material eletrondenso no citoplasma. A cabeça de seta azul aponta para fibroblasto em corte longitudinal. A cabeça de seta branca indica célula com grânulos eletrondensos na derme indicativos de um mastócito. (B) Presença de dois fibroblastos em corte longitudinal. A cabeça de seta indica a presença de retículo endoplasmático rugoso. A estrela aponta vesícula com material de aspecto floculento ao lado de perfis de? mitocondriais. A seta apontando fibras colágenas em corte transversal apresentando pequena eletrondensidade.

**Figura 6 - Eletromicrografias de transmissão da pele de um camundongo *hairless* adulto jovem**



**Fonte:** Acervo pessoal dos autores.

**Nota:** (A) Perfil de celularidade de uma glândula sebácea. A estrela indica para a célula da camada germinativa da glândula sebácea responsável pela renovação do parênquima glandular. A cabeça de seta aponta gotícula lipídica parcialmente eletrondensa e representa conteúdo de secreção (sebo) da glândula. (B) A cabeça de seta mostra grânulo de queratohialina (eletrondenso) indicando processo de queratinização do pelo. A linha tracejada orienta para diferentes níveis de celularidade da região.



## QUANTO TEM SIDO USADO NA PESQUISA?

A pesquisa utilizando o camundongo *hairless* tem sido documentada desde a metade do século passado (MONTAGNA; CHASE; BROWN, 1954). Esta pesquisa, conforme descrito neste capítulo, tem como objetivo avaliar a segurança e a eficácia de formulações de uso tópico, bem como efeitos da radiação solar sobre a pele.

Para avaliar alterações histológicas desse modelo, a técnica de coloração de rotina HE tem sido explorada amplamente para elucidar características clássicas de indução do envelhecimento e tumoral, como também para a prevenção e correção dos dados por agentes farmacologicamente ativos como os filtros solares.

As alterações histológicas clássicas observadas pelo nosso grupo nesse modelo corroboram com os dados da literatura e foram descritas em publicação no periódico *Burns*, publicado em 2018 (HOSSY et. al., 2018).

O Quadro 8 a seguir resume os eventos observados quanto à indução de alterações da pele do modelo por microscopia óptica.

**Quadro 8 – Resumo das principais alterações do padrão histológico da pele de camundongos *hairless* frente à Luz Solar Simulada (SSL) conforme estudos de Hossy e colaboradores**

Estudo	Epiderme	Derme
Hossy et. al. (2013)	<ul style="list-style-type: none"><li>- Aumento da espessura da epiderme</li><li>- Hiperqueratinização</li><li>- Tampão folicular</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>- Aumento da celularidade dérmica</li></ul>
Hossy (2017)	<ul style="list-style-type: none"><li>- Aumento da espessura da epiderme</li><li>- Hiperqueratinização</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>- Aumento da celularidade dérmica</li></ul>
Hossy et. al. (2018)	<ul style="list-style-type: none"><li>- Aumento da espessura da epiderme</li><li>- Hiperqueratinização</li><li>- Necrose epidérmica</li><li>- Separação da epiderme da derme</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>- Aumento da celularidade dérmica</li><li>- Formação de cicatriz hialina de colágeno</li><li>- Necrose de coagulação e trombose vascular</li></ul>

**Fonte:** Elaboração dos Autores.

## REFERÊNCIAS

BENAVIDES, Fernando *et al.* The hairless mouse in skin research. **Journal of Dermatological Science**, v. 53, n. 1, p. 10-18, Jan. 2009.

CHORILLI, M.; MICHELIN, D. C.; SALGADO, H. R. N. Animais de laboratório: o camundongo. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 28, n. 1, p. 11-23, 2007.

HOSSY, Bryan Hudson. **Desenvolvimento de metodologia de avaliação de filtros solares**: uma abordagem morfológica e molecular em camundongos hairless. 130 f. 2012. Mestrado (Dissertação em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2012.

HOSSY, Bryan Hudson *et al.* Effects of a sunscreen formulation on albino hairless mice: a morphological approach. **Archives of Dermatological Research**, v. 305, n. 6, p. 535-544, Aug. 2013.

HOSSY, Bryan Hudson *et al.* Histological observation of hairless mice skin after exposure to simulated solar light: comparison between the histological findings with different methodologies and 3R principle correlations. **Burns**, v. 44, n. 2, p. 359-369, Mar. 2018.

HOSSY, Bryan Hudson. **Fototoxicidade de uma formulação solar e seus excipientes**: uma abordagem morfológica e molecular em modelos in vivo e in vitro. 2017. 163 f. Tese (Doutorado em Ciências), Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2017.

KLIGMAN, Lorraine H. The hairless mouse model for photoaging. **Clinics in Dermatology**, v. 14, n. 2, p. 183-195, Mar./Apr. 1996.

LENTZ, Thomas L. **Cell fine structure**: an atlas of drawings of whole cell structure. Philadelphia: W. B. Saunders, 1971.

LUNDBERG, George D. Cell fine structure: an atlas of drawings of whole-cell structure. **Archives of Internal Medicine**, v. 131, n. 2, p. 310-311, 1973.

MONTAGNA, William; CHASE, Herman B.; BROWN, Patricia J. The skin of hairless mice: II. ageing changes and the action of 20-methylcholanthrene. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 23, n. 4, p. 259-269, 1954.

OVALLE, William K.; NAHIRNEY, Patrick C. **Netter's essential histology**: with correlated histopathology. Philadelphia: Elsevier Health Sciences, 2020.

PORTES, André Luís F. *et al.* Trypan blue staining for capsulorhexis: ultrastructural effect on lens epithelial cells and capsules. **Journal of Cataract & Refractive Surgery**, v. 36, n. 4, p. 582-587, Apr. 2010.

ZELICKSON, Alvin S. **Ultrastructure of normal and abnormal skin**. Philadelphia: Lea & Febiger, 1967.



## 10 WESTERN BLOTTING APLICADO À PESQUISA PRÉ-CLÍNICA: PRINCÍPIOS BÁSICOS

Deiziane Viana da Silva Costa  
Renata Ferreira de Carvalho Leitão  
Andrea Viana Loureiro  
Conceição da Silva Martins  
Gerly Anne de Castro Brito



### O QUE SERÁ FEITO?

A técnica de *Western Blotting* (WB), que foi introduzida em 1979, tornou-se uma das ferramentas mais utilizadas na biologia molecular para a análise de proteínas em pesquisas pré-clínicas e clínicas.

Esse método baseia-se na separação de proteínas presentes em uma determinada amostra de acordo com o seu tamanho através de uma eletroforese, seguindo-se da transferência para uma membrana e a detecção da proteína de interesse por meio de anticorpos específicos (SANDERS; KIM; DUNN, 2016). Os anticorpos funcionam como uma sonda e são selecionados especificamente para a proteína alvo.

A eletroforese em gel é uma técnica na qual moléculas carregadas, como são as proteínas, são separadas de acordo com suas propriedades físicas e peso molecular à medida que passam por uma corrente elétrica.



### POR QUE SERÁ FEITO?

Dentre suas aplicações, destacam-se:

- A detecção de anticorpos contra vírus ou bactérias no soro, permitindo a confirmação de diagnóstico de doenças, por exemplo, o HIV.
- A detecção de proteínas defeituosas, por exemplo, na doença de Prions.
- O diagnóstico de várias doenças, como Creutzfeld, doença de Lyme, hepatite B e herpes.
- A investigação da fisiopatologia de várias doenças que acometem humanos e animais.
- A validação de anticorpos como uma forma de verificar a sua especificidade.
- A investigação de interações entre diversas proteínas.



## ONDE SERÁ FEITO?

Amostras biológicas, como tecidos, culturas celulares e fluidos corporais (soro, plasma sanguíneo ou líquido cefalorraquidiano) são fontes de proteínas e podem ser processadas para a realização de WB.



## QUANDO SERÁ FEITO?

- É uma técnica de alta sensibilidade (permite a detecção de proteínas, mesmo em baixas concentrações) e especificidade por utilizar anticorpos específicos.
- É possível fazer múltiplas réplicas do gel, permitindo variadas análises sucessivas.
- As proteínas imobilizadas na membrana são acessíveis a diferentes ligantes, o que permite a investigação de diferentes proteínas presentes em uma mesma amostra.
- O armazenamento da membrana contendo as proteínas transferidas pode ser prolongado (até um mês quando armazenado a 4 °C em tampão de lavagem sem a adição de *Tween 20*).
- A vantagem do WB com relação à imuno-histoquímica é a detecção da proteína e sua caracterização de acordo com o seu peso molecular, diminuindo a reação cruzada dos anticorpos com outras proteínas contendo epítopos semelhantes.



## COM O QUE SERÁ FEITO?

Todos os reagentes necessários para a realização da técnica de WB encontram-se detalhados na próxima seção.



## COMO SERÁ FEITO?

O protocolo de WB pode ser resumido nos seguintes passos:

- 1) coleta e preparação das amostras com extração;
- 2) quantificação das proteínas;
- 3) eletroforese em gel;

- 4) transferência de proteínas do gel para uma membrana adsorvente;
- 5) bloqueio de ligações inespecíficas;
- 6) incubação da membrana com um anticorpo específico para a proteína de interesse e
- 7) revelação da membrana para a análise dos dados.

Por se tratar de uma técnica constituída por várias etapas, recomenda-se a preparação de todos os tampões que serão utilizados antes do início do processo.

As etapas para a realização do *WB* serão descritas a seguir.

### **Coleta e processamento das amostras**

#### **Coleta, condicionamento e extração de proteína das amostras**

A coleta da amostra é um fator crítico para a qualidade das proteínas a serem extraídas e, conseqüentemente, para alcançar um bom resultado.

Considerando a importância de se obter um lisado com alta concentração de proteína, recomenda-se coletar uma quantidade de tecidos, células ou fluidos que permita a corrida de pelo menos 30-50 µg de proteína em cada amostra, aumentando, assim, a sensibilidade do ensaio para proteínas alvo pouco expressas na amostra.

O tampão de lise radioimunoensaio (RIPA) utilizado para promover a lise das proteínas pode ser encontrado comercialmente ou ainda ser preparado de acordo com a lista a seguir.

#### **Preparação do tampão de lise RIPA**

- 0,88g NaCl
- 0,60g Tris base
- Completar com 80ml de água destilada
- Ajustar pH para 7,5
- 1g NP40
- 0,5g Nadeoxicolato
- 0,1g SDS
- Completar volume para 100ml com água destilada
- Adicionar os inibidores de fosfatase e protease conforme recomendação do fabricante
- \*Estoque a -20°C.

Os diversos componentes desempenham diferentes funções, como desnaturação de proteínas (sulfato de dodecil de sódio), rompimento da interação proteína-proteína (desoxicolato de sódio) e lise celular, promovendo a partição das proteínas em fração solúvel e insolúvel (pellet) após a centrifugação (NP40) (JANES, 2015). Os inibidores de proteases e fosfatases devem ser adicionados ao tampão (de acordo com as recomendações do fabricante) para prevenir a degradação e desfosforilação protéica durante a preparação.

A quantidade aproximada de tecidos e células para a extração de uma quantidade adequada de proteína para WB encontra-se na Tabela 1.

**Tabela 1 - Coleta de amostras**

Tipo de amostra	Quantidade de amostra	Quantidade de RIPA	Observações
Tecidos de animais	~30-50 mg	100-200 µL	Não é necessário mensurar o peso dos tecidos. Apenas ter uma estimativa.
Células eucarióticas	600.000 células/poço	50-100 µL	Caso o número de células plaqueadas seja inferior a 600.000 células/poços, recomenda-se juntar dois poços para formar uma amostra <i>n</i> , inserindo de 30-40 µL de RIPA em cada poço.

Fonte: Elaboração das autoras.

### Coleta de tecidos

A fim de evitar a degradação das proteínas e manter sua pureza e estabilidade, a remoção rápida do tecido e o seu congelamento (em nitrogênio líquido ou a -80) são cruciais.

### Homogeneização de tecidos utilizando homogeneizador

- Armazene as amostras no freezer -80 ou proceda para a etapa b.
- Adicione a quantidade de RIPA (contendo os inibidores de proteases e fosfatases) em cada amostra  
(**ver Tabela 1**).
- Homogeneíze os tecidos até que nenhuma partícula de tecido seja visualizada.
- Agite cada amostra por 40s utilizando um vórtex.
- Posicione os tubos com as amostras no gelo por 10 minutos.
- Repita duas vezes a etapa **d** e **e**.

- G. Centrifugue as amostras a 13000-14000 rpm por 20 minutos a 4°C.
- H. Transfira o sobrenadante (equivalente à proteína) para um novo microtubo.
- I. Armazene as amostras no *freezer* -80 ou proceda para a etapa 2 (quantificação da proteína).

### Homogeneização de tecidos utilizando cadinho e pistilo

- A. Congele o tecido em nitrogênio líquido imediatamente após a coleta e o fragmente utilizando cadinho e pistilo.
- B. Transfira os fragmentos obtidos para um microtubo com o tampão RIPA contendo os inibidores de protease e fosfatase (**ver Tabela 1**).
- C. Armazene as amostras no *freezer* -80 ou proceda para a etapa seguinte.
- D. Agite cada amostra por 40s utilizando um vórtex.
- E. Posicione os tubos com as amostras no gelo por 10 minutos.
- F. Repita duas vezes a etapa **d** e **e**.
- G. Centrifugue as amostras a 13000-14000 rpm por 20 min a 4°C.
- H. Transfira o sobrenadante (equivalente à proteína) para um novo microtubo.
- I. Armazene as amostras no *freezer* -80 ou proceda para a etapa 2 (quantificação da proteína).

### Homogeneização de tecidos utilizando *Bead-beater*

- A. Armazene as amostras no *freezer* -80 ou proceda para a etapa b.
- B. Adicione a quantidade de RIPA (contendo os inibidores de proteases e fosfatases) em cada amostra (**ver Tabela 1**).
- C. Transfira as amostras para um microtubo apropriado para uso em *bead-beater*.
- D. Adicione *beads* de zircônia nas amostras preparadas no **item c**.
- E. Homogeneíze as amostras no *bead-beater* por 30s.
- F. Aguarde de 5 a 10s.
- G. Repita o **item e**.
- H. Centrifugue as amostras a 13000-14000 rpm por 20 minutos a 4°C.
- I. Transfira o sobrenadante (equivalente à proteína) para um novo microtubo.
- J. Armazene as amostras no *freezer* -80 ou proceda para a etapa 2 (quantificação da proteína).

## Coleta de células

Antes de coletar as células é importante observá-las ao microscópio para garantir que estejam crescendo saudáveis.

A coleta de células deve ser feita em capela de fluxo laminar com a placa de cultivo posicionada sobre um recipiente contendo gelo para evitar a degradação das proteínas. Os passos abaixo devem ser seguidos:

- A. Lave as células com PBS gelado.
- B. **Obs.:** evite lavar as células caso tenham sido incubadas com alguma substância que possa porventura interferir na adesão dessas células à placa de cultivo. No entanto, garanta a remoção completa do meio de cultivo dos poços e proceda para o **item c**.
- C. Aspiração do PBS.
- D. Adicione tampão RIPA 1X gelado (50-100µL por poço), considerando uma placa de 6 poços).
- E. Coloque as placas no *freezer* -20 °C por 20 minutos. Esta etapa tem como objetivo favorecer o rompimento das membranas celulares.
- F. Agite as placas no agitador de placas por 5 minutos.
- G. Raspe as células aderidas (com a ponteira de 1000 µL ou *scraper*) e transfira a suspensão de células para um tubo de microcentrífuga.
- H. Alternativamente, as células podem ser tripsinizadas e lavadas com PBS gelado antes da ressuspensão em tampão de lise.
- I. Agite os microtubos com as células por 40s no vórtex.
- J. Posicione os microtubos com as amostras no gelo por 10 minutos.
- K. Repita duas vezes as etapas descritas nos **itens g e h**.
- L. Centrifugue os lisados a 13000-14000 rpm por 20 minutos a 4°C.
- M. Transfira o sobrenadante para um novo tubo. O lisado deve ser armazenado no *freezer* -80°C.

## Quantificação da proteína

Diversos métodos espectroscópicos são utilizados para quantificar proteínas em uma solução. No Quadro 2 são mencionados os métodos mais utilizados e seus respectivos princípios. Todos eles baseiam-se na formação de compostos coloridos devido às reações de determinados grupos ou radicais da molécula de proteína com reagentes químicos específicos. A sensibilidade entre os métodos varia de acordo com a amostra de proteínas, e este fator deve ser determinante para a escolha do método a ser utilizado.

**Quadro 2 - Métodos de quantificação de proteína**

Método	Princípio
Método do BCA (ácido bicinonínico) (REICHELTL et al., 2016)	Tem como base a reação de Biuret, na qual a proteína presente nas amostras reduz o íon cúprico ( $\text{Cu}^{+2}$ ) em íon cuproso ( $\text{Cu}^{+1}$ ) em um meio alcalino. Por sua vez, $\text{Cu}^{+1}$ é ligado a duas moléculas de ácido bicinonínico, resultando em uma reação de cor púrpura mensurada em 562nm.
Método de Bradford (Coomassie) (ERNST; ZOR, 2010)	Consiste na ligação do <i>Coomassie dye</i> com a proteína presente na amostra em meio ácido, resultando na mudança de cor da reação de marrom para azul, mensurando em 595 nm.
Método de Lowry (LU et al., 2010).	É baseado na reação da proteína com o sulfato de cobre e tartarato em solução alcalina, resultando na formação do complexo proteína-cobre tetradentado. Por sua vez, esse complexo é reduzido pelo reagente de Folin-Ciocalteu, gerando complexos de cobre quelado, resultando em um produto solúvel em água, de cor azul, mensurando em 750 nm.

**Fonte:** Elaboração das autoras.

O ensaio de Bradford é o mais utilizado e apresenta algumas vantagens no tocante aos demais, como rapidez, maior sensibilidade e por não exigir aquecimento das amostras.

Para quantificar a concentração de proteínas na amostra, independente do método selecionado, deve-se fazer uma curva de padronização com concentrações conhecidas de uma proteína (comumente é usada soroalbumina bovina (BSA), utilizando o comprimento de onda que o complexo proteína-corante absorve). A partir dessa curva, obtém-se a equação de ajuste linear, na qual se torna possível substituir os valores médios de absorbâncias das amostras, obtendo-se, assim, os valores da concentração de proteínas. Para uma maior confiabilidade dos resultados, o coeficiente de correlação linear deve ser maior que 0,98.

Para garantir a adição de quantidades equivalentes da proteína controle (que será utilizada para normalizar a proteína de interesse) é extremamente relevante a utilização de pipetas calibradas e a habilidade do operador durante o manuseio das pipetas.

## Preparação da amostra para eletroforese

Antes da aplicação no gel, as proteínas devem ser adicionadas a um tampão de amostra. Existe uma variedade de tampões de amostra disponível comercialmente (*2x Laemmli sample buffer, BioRad; 4x LDS sample buffer, Thermo Fisher; 4x protein sample loading buffer, Licor*). Esse tampão contém glicerol para aumentar a densidade da amostra, permitindo sua deposição no fundo do poço; SDS para conferir carga negativa às proteínas, permitindo a sua migração através do gel, e corantes como o azul de bromofenol para visualizar a migração das proteínas que estão sendo corridas no gel e, dessa forma, monitorizar todo o processo de separação. Os agentes redutores DTT ou  $\beta$ -mercaptoetanol podem ser adicionados aos tampões de amostra para romper as pontes de dissulfeto e desnaturar as proteínas, facilitando a exposição dos epítomos. Tampões de amostra contendo azul de bromofenol devem ser evitados quando se pretende detectar as bandas de WB por fluorescência.

Um fator crucial nessa fase é a quantidade de proteína a ser inserida no poço do gel. Os fatores que devem ser considerados são a concentração da proteína total obtida e a maior ou menor expressão da proteína de interesse no tecido a ser investigado. Recomenda-se utilizar de 20-50  $\mu$ g por poço, podendo exceder os 50  $\mu$ g para proteínas pouco expressas no tecido a ser investigado.

Após a adição do tampão da amostra e agentes redutores/desnaturantes, as proteínas devem ser desnaturadas pela ação do calor em banho-maria ou termociclador a 95-100°C por 5 minutos. Após a desnaturação, recomenda-se manter as amostras em temperatura ambiente por pelo menos 10-20 minutos antes de aplicar as amostras no gel.

## Fracionamento de proteínas

Para separar as proteínas em uma amostra homogênea, a técnica mais utilizada é a eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE), isso porque tem a capacidade de separar todos os tipos de proteínas, mesmo proteínas insolúveis em água.

Apesar dos géis de poli(acrilamida e agarose serem os mais utilizados, a porcentagem do gel e o tipo de tampão de corrida devem ser definidos conforme o tamanho da proteína de interesse a ser investigada. A Figura 1 correlaciona a porcentagem do gel com o peso da proteína alvo.



**Figura 1- Determinação da porcentagem do gel a ser utilizado**



**Fonte:** Elaboração das autoras.

O gel de *WB*, que funciona como uma matriz inerte através da qual as proteínas poderão migrar, se adquire comercialmente ou o próprio pesquisador o prepara. O gel de SDS-poliacrilamida é preparado pela polimerização de monômeros de acrilamida. O tamanho dos poros do gel pode ser ajustado variando a concentração da acrilamida adicionada para retardar a migração da proteína de interesse. Como as proteínas podem possuir cargas positivas ou negativas, dependendo das cargas dos aminoácidos que as compõem, é utilizado, então, o SDS, um detergente carregado negativamente, que se liga nas regiões hidrofóbicas das moléculas de proteínas, mascarando a carga intrínseca e permitindo que as proteínas migrem em direção ao polo positivo em um campo elétrico.

Além disso, o SDS quebra as ligações não covalentes das proteínas, fazendo com que elas voltem à sua estrutura primária, liberadas da associação com outros monômeros ou outras proteínas. Utiliza-se, ainda, um agente redutor, como o  $\beta$ -mercaptoetanol, o qual quebra as ligações dissulfeto (S-S) dos resíduos de cisteína que promovam a ligação de proteínas a outros monômeros, outras proteínas, ou mesmo à estrutura terciária da própria proteína, mantendo, assim, as proteínas separadas e linearizadas. Essas condições permitem que proteínas de um mesmo tamanho possam correr em um gel de poliacrilamida na presença de um campo elétrico com as mesmas velocidades.

Quando preparado no laboratório de pesquisa, o gel, de modo geral, forma-se a partir de duas fases: o gel de concentração (ou *stacking*) e o gel de resolução (ou corrida/separação). Como foi mencionado anteriormente, o gel é composto de bis-acrilamida (determina a porcentagem do gel), SDS (carrega o gel negativamente), água, tampão do gel de separação (estabelece o pH do gel) ou tampão do gel *stacking*, persulfato de amônio (APS) e tetrametiletilenodiamina (TEMED). Estes dois devem ser inseridos por último e, após homogeneização com os outros componentes, devem ser transferidos imediatamente para o aparato de formação do gel. Géis de poliacrilamida são formados pela copolimerização da acrilamida e bis-acrilamida com o APS e TEMED, ambos funcionando como iniciadores e catalisadores desse processo. A polimerização do gel ocorre em três etapas:

1. **Formação de radicais livres** que são gerados a partir do APS, sendo essa reação intensificada pelo TEMED.
2. **Alongamento da cadeia de polímeros** que ocorre pela conversão dos monômeros de acrilamida em radicais livres pelos radicais livres resultantes da etapa 1. Concomitantemente, essa cadeia de polímeros alongada se liga de forma cruzada com a bis-acrilamida, resultando na formação de poros.
3. **Terminação da cascata de polimerização** que ocorre à medida que a acrilamida disponível for completamente consumida. Para que o TEMED e APS funcionem de forma eficiente para os géis de separação é necessário garantir que o pH esteja entre 8 e 9 (ZHANG et al., 2016).

Como o pH do gel *stacking* é <8, o tempo de polimerização pode levar até uma hora. No vídeo a seguir é possível ver de forma sucinta o passo a passo para a eletroforese vertical das proteínas.

- <https://youtu.be/5PKASIA25G8> (1)
- <https://youtu.be/XAOzJfx-Hqk> (2)
- [https://youtu.be/rR5fE8wEg\\_A](https://youtu.be/rR5fE8wEg_A) (3)
- <https://youtu.be/4Ojy4UcxLIM> (4)

- (1) **Fonte:** COMO preparar gel para Western blotting 1. [S.l.: s.n.], 2021. 1 vídeo (3min54s). Publicado pelo canal Deiziane Viana da Silva Costa. Disponível em: <https://www.youtube.com/watch?v=5PKASIA25G8>. Acesso em: 4 dez. 2021.
- (2) **Fonte:** COMO preparar gel para Western blotting 2. [S.l.: s.n.], 2021. 1 vídeo (3min10s). Publicado pelo canal Deiziane Viana da Silva Costa. Disponível em: <https://www.youtube.com/watch?v=XAOzJfx-Hqk>. Acesso em: 4 dez. 2021.
- (3) **Fonte:** COMO preparar gel para Western blotting 3. [S.l.: s.n.], 2021. 1 vídeo (4min34s). Publicado pelo canal Deiziane Viana da Silva Costa. Disponível em: [https://www.youtube.com/watch?v=rR5fE8wEg\\_A](https://www.youtube.com/watch?v=rR5fE8wEg_A). Acesso em: 4 dez. 2021.
- (4) COMO preparar gel para Western blotting 4. [S.l.: s.n.], 2021. 1 vídeo (23s). Publicado pelo canal Deiziane Viana da Silva Costa. Disponível em: <https://www.youtube.com/watch?v=4Ojy4UcxLIM>. Acesso em: 4 dez. 2021.

Após a colocação do gel no aparato de eletroforese e o preenchimento do aparato com tampão de corrida (Quadro 3), 10-25 µL de cada amostra deve ser inserido em cada canaleta do gel. A primeira canaleta deve ser carregada com o marcador de peso molecular (*protein*

*ladder*). Sempre que possível, deverão ser inseridas as amostras a partir da terceira coluna/canaleta, conforme os vídeos a seguir.

- <https://youtu.be/4i-dkZ6KxC8> (5)
- <https://youtu.be/mcBuNbZJZxk> (6)

(5) **Fonte:** WESTERN blotting: preparação das placas para a corrida. [S.l.: s.n.], [2021]. 1 vídeo (3min4s). Publicado pelo canal Deiziane Viana da Silva Costa. Disponível em: <https://www.youtube.com/watch?v=4i-dkZ6KxC8>. Acesso em: 4 dez. 2021.

(6) **Fonte:** WESTERN blotting: inserindo a amostra or ladder no gel. [S.l.: s.n.], [2021]. 1 vídeo (28s). Publicado pelo canal Deiziane Viana da Silva Costa. Disponível em: <https://www.youtube.com/watch?v=mcBuNbZJZxk>. Acesso em: 4 dez. 2021.

### Preparação do Tampão de Corrida

- 30,3g Tris base
- 144g Glicina
- 10g SDS
- 500ml de água destilada
- Completar volume para 1000ml com água destilada

#### Tampão de corrida 1x

- 100ml de tampão de corrida 10x
- 900ml de água destilada

Para a separação eletroforética das proteínas, o gel deve correr a uma voltagem de 60V por 15 minutos e, em seguida, 100-120V até a amostra percorrer todo o gel. O tempo de migração é relativo, podendo variar de acordo com a concentração do gel. A voltagem utilizada também pode ser ajustada de acordo com os tipos de gel e de amostra. Veja o vídeo a seguir referente à observação da frente de corrida durante essa etapa.

- <https://youtu.be/L50nOchvk7U> (7)
- <https://youtu.be/ZoYN5n68Ya4> (8)
- <https://youtu.be/COWwDFYWZqU> (9)

(7) **Fonte:** WESTERN blotting: corrida 1. [S.l.: s.n.], [2021]. 1 vídeo (24s). Publicado pelo canal Deiziane Viana da Silva Costa. Disponível em: <https://www.youtube.com/watch?v=L50nOchvk7U>. Acesso em: 4 dez. 2021.

- (8) **Fonte:** WESTERN blotting: corrida 2. [S.l.: s.n.], [2021]. 1 vídeo (17s). Publicado pelo canal Deiziane Viana da Silva Costa. Disponível em: <https://www.youtube.com/watch?v=ZoYN5n68Ya4>. Acesso em: 4 dez. 2021.
- (9) **Fonte:** WESTERN blotting: corrida 3. [S.l.: s.n.], [2021]. 1 vídeo (11s). Publicado pelo canal Deiziane Viana da Silva Costa. Disponível em: <https://www.youtube.com/watch?v=COWwDFYWZqU>. Acesso em: 4 dez. 2021.

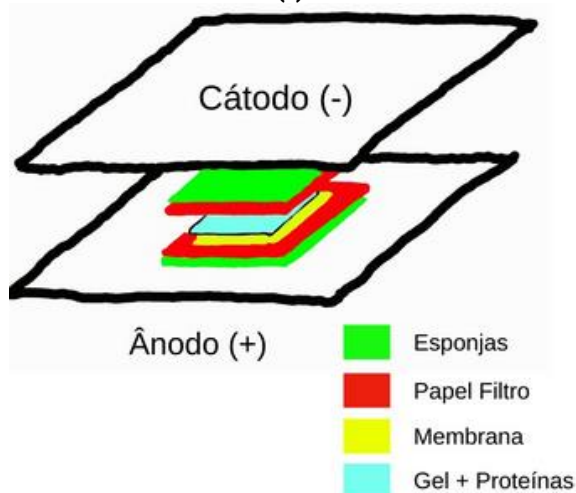
Após a eletroforese, essas proteínas podem ser visualizadas diretamente no SDS-PAGE por coloração direta do gel por corantes como o *Comassie Blue* ou por tratamentos com nitrato de prata para confirmar a transferência das proteínas para a membrana, e verificar se esta transferência ocorreu de modo uniforme em todas as amostras. O nitrato de prata é um dos métodos mais sensíveis de detecção que permite a visualização de proteínas de até 10ng.

### Transferência das proteínas para a membrana

Para a análise das proteínas de interesse, faz-se necessária a utilização de anticorpos específicos para a proteína alvo. Para isso, é preciso que essas proteínas estejam em um suporte sólido, como membranas de nitrocelulose ou *polyvinylidene fluoride* (PVDF) ou fluoreto de polivinilideno. A eletroforese é a forma mais rápida e eficaz para transferir as proteínas do gel à membrana, seguindo o mesmo princípio utilizado para a migração das proteínas através do gel.

O método úmido é o mais utilizado para a transferência das proteínas. Baseia-se na montagem de um “sanduíche”, de forma que o gel e a membrana são prensados entre esponja e papel filtro (esponja/papel-filtro/gel/membrana/papel-filtro/esponja) e todos são apertados em conjunto, após garantir a ausência de bolhas de ar formadas entre o gel e a membrana (Figura 2). Esse sanduíche é, então, submerso em tampão de transferência para que um campo elétrico seja aplicado. As proteínas de carga negativa migram para o eletrodo com carga positiva, mas a membrana as impede de prosseguir por estabelecer com as proteínas interações hidrofóbicas. As ligações entre as proteínas e as membranas de nitrocelulose ou PVDF são bem similares, no entanto, a membrana de PVDF tem maior capacidade de ligação e é mais rígida do que as membranas de nitrocelulose. Uma das vantagens da membrana de nitrocelulose, por outro lado, é que não necessita do uso de metanol para ativá-la. Essa membrana é preferível para proteínas de alto peso molecular e tem menor risco de apresentar *background* (manchas inespecíficas).

Figura 2 - O sanduíche é montado sobre o ânodo (+) onde é colocada uma esponja, um papel filtro, a membrana de nitrocelulose e em seguida o gel; depois outro papel-filtro e outra esponja que entrará em contato com o cátodo (-).



Fonte: Elaboração das autoras.

### Procedimento para transferência úmida

- Incube as membranas de PVDF em metanol por 10 minutos. Caso use membrana de nitrocelulose (que não precisa ser ativada em metanol), proceda para o item b.
- Retire os géis dos aparatos, descole as placas, remova o gel *stacking* e insira o gel de separação em tampão de transferência.
- Mergulhe as esponjas no tampão de transferência.
- Insira um papel-filtro no tampão de transferência (consultar lista de **Preparação do Tampão de Transferência**), em seguida, utilize-o para coletar o gel do item **b**, e, após isso, o posicione em uma das esponjas já inserida no cassete de transferência (face que será conectada ao polo negativo).

### Preparação do Tampão de Transferência

- 30,3g Tris base
- 144g Glicina
- 500ml de água destilada. Completar volume para 1000ml com água destilada.

#### Tampão de Transferência 1x

- 100ml de tampão de transferência 10x
- 700ml de água destilada
- 200ml de Metanol

- A. Mergulhe a membrana mencionada no item 1 em tampão de transferência e coloque em contato com o gel.
- B. Insira um papel-filtro no tampão de transferência e coloque sobre a membrana.
- C. Insira a esponja sobre o papel-filtro e passe um rodo de transferência para remover as bolhas e feche o cassete. Caso as esponjas sejam finas, utilize um papel-filtro extra, conforme especificado nos **itens d e f** para fortalecer o contato entre o gel e a membrana.
- D. Insira o cassete na cuba de transferência, preencha com tampão de transferência gelado e adicione blocos de gelo reutilizáveis dentro da cuba para evitar o superaquecimento do tampão durante a transferência.
- E. Coloque as cubas em um isopor e preencha com gelo.
- F. Acione o aparato de transferência 100V. O tempo para a transferência das proteínas é cerca de 2h. O tempo de transferência varia com o peso molecular da proteína de interesse (proteínas pesadas requerem um maior tempo de transferência).

No vídeo a seguir é possível ver de forma sucinta o passo a passo para a transferência úmida das proteínas.

- <https://youtu.be/QqfUbi9F5XY> (10)
- <https://youtu.be/uWuDQbBkyFw> (11)
- <https://youtu.be/JYXhuUwhYKc> (12)

(10) **Fonte:** WESTERN blotting: transferência 1. [S.l.: s.n.], [2021]. 1 vídeo (7min14s). Publicado pelo canal Deiziane Viana da Silva Costa. Disponível em: <https://www.youtube.com/watch?v=QqfUbi9F5XY>. Acesso em: 4 dez. 2021

(11) **Fonte:** WESTERN blotting: transferência 2. [S.l.: s.n.], [2021]. 1 vídeo (22s). Publicado pelo canal Deiziane Viana da Silva Costa. Disponível em: <https://www.youtube.com/watch?v=uWuDQbBkyFw>. Acesso em: 4 dez. 2021.

(12) **Fonte:** WESTERN blotting: transferência 3. [S.l.: s.n.], [2021]. 1 vídeo (1min). Publicado pelo canal Deiziane Viana da Silva Costa. Disponível em: <https://www.youtube.com/watch?v=JYXhuUwhYKc>. Acesso em: 4 dez. 2021.

### Detecção da proteína específica

#### Bloqueio da membrana

Como foi mencionado anteriormente, na técnica de WB, anticorpos específicos são utilizados como sondas para a detecção da proteína alvo. Para garantir essa especificidade, o próximo passo após a transferência das proteínas tem como objetivo impedir as interações não

específicas entre a membrana e o anticorpo (bloqueio da membrana). Após a transferência, a maior parte da membrana não está ligada a proteínas, podendo ser alvo de ligações inespecíficas do anticorpo, o que comprometeria a especificidade da técnica. O bloqueio de ligações não específicas é alcançado colocando-se a membrana em uma solução diluída de BSA 5% ou leite desnatado 5% em TBST1x (Quadro 5). O leite desnatado a 5% é um dos mais utilizados por ser mais barato e gerar menos *background* ao resultado final. No entanto, deve-se checar na literatura se a proteína a ser investigada interage com algum componente do leite.

### Preparação do Tampão de lavagem (TBST)

- 80g NaCl
- 24,2g Tris base
- 500ml de água destilada
- Ajuste o pH para 7,6
- Completar volume para 1000ml com água destilada

#### Tampão de Lavagem 1x (TBST)

- 100ml de Tampão de lavagem 10x (TBS)
- 900ml de água destilada
- Adicione 1ml de *Tween* 20

### Procedimento para o bloqueio

- A. Retire as membranas do cassete de transferência.
- B. Incube as membranas em BSA a 5% ou leite desnatado 5% (em TBST1x) por 1h na câmara fria sob agitação.

No vídeo a seguir é possível ver de forma sucinta o passo a passo para o bloqueio da membrana.

- <https://youtu.be/vlxFO8PSqTQ> (13)
- [https://youtu.be/IQEDw\\_yB9ko](https://youtu.be/IQEDw_yB9ko) (14)

(13) **Fonte:** WESTERN blotting: bloqueio 1. [S.l.: s.n.], 2021. 1 vídeo (1min24s). Publicado pelo canal Deiziane Viana da Silva Costa. Disponível em: <https://www.youtube.com/watch?v=vlxFO8PSqTQ>. Acesso em: 4 dez. 2021.

(14) **Fonte:** WESTERN blotting: bloqueio 2. [S.l.: s.n.], 2021. 1 vídeo (7s). Publicado pelo canal Deiziane Viana da Silva Costa. Disponível em: [https://www.youtube.com/watch?v=IQEDw\\_yB9ko](https://www.youtube.com/watch?v=IQEDw_yB9ko). Acesso em: 4 dez. 2021.

### Incubação com os anticorpos (primários e secundários)

Para ter sucesso em qualquer ensaio envolvendo anticorpos, a escolha do anticorpo é uma das etapas cruciais. É essencial que o anticorpo tenha especificidade e alta afinidade com a proteína alvo.

De forma geral, recomenda-se confirmar os seguintes dados do anticorpo:

- A. O anticorpo funciona para a técnica de WB.
- B. A espécie animal na qual o anticorpo foi desenvolvido.
- C. A diluição do anticorpo indicada para a técnica.
- D. O volume que está sendo vendido, para que se possa calcular o número de ensaios que podem ser realizados.

Essas informações estão disponíveis na ficha técnica do anticorpo (*datasheet*) disponibilizada pelo fabricante. A consulta de um banco de dados que faz uma análise comparativa de anticorpos apresentada pelo fornecedor ou em artigos publicados na literatura é essencial.

Para determinar a concentração do anticorpo, recomenda-se fazer um estudo piloto com pelo menos três concentrações diferentes para determinar a mais adequada ao estudo.

Os anticorpos primários são específicos para a proteína de interesse. Esses anticorpos podem ser policlonais (reconhecem mais de um epítipo) ou monoclonais (reconhecem apenas um epítipo da proteína de interesse). A maioria dos anticorpos primários não possui nenhum tipo de radiomarcagem ou conjugação com alguma enzima. Pelo referido motivo, a incubação com o anticorpo primário deve ser seguida da incubação com um anticorpo secundário que pode ser conjugado com uma enzima, como peroxidase ou fosfatase alcalina (detecção por quimioluminescência) ou com fluoróforos, como *Alexa fluor*, cianina, dentre outros (detecção por fluorescência).

O anticorpo secundário, portanto, é um anticorpo que reconhece um anticorpo (primário) e deve ser escolhido de acordo com a espécie que produziu o anticorpo primário. Por exemplo: se foi utilizado um determinado anticorpo primário antiproteína X produzido em camundongo, deverá ser utilizado um anticorpo secundário anticamundongo. O anticorpo secundário reconhecerá qualquer anticorpo produzido em camundongo.

A revelação de proteínas através de fluorescência tem sido amplamente utilizada por melhor permitir a detecção de diferentes proteínas ao mesmo tempo. Ademais, esse tipo de



detecção reduz o tempo de trabalho e custo, pois dispensa o uso de reagentes que seriam utilizados para a(s) detecção(ões) extra(s).

### Procedimento para a incubação com o anticorpo primário

- A. Prepare o anticorpo primário em BSA 1% ou leite desnatado 1% (utilizar o mesmo que foi utilizado no bloqueio).
- B. Incube as membranas com o anticorpo primário preparado, conforme descrito no item a, *overnight* a 4 °C sob agitação.
- C. Remova o anticorpo primário e lave as membranas com tampão de lavagem por 10 minutos.
- D. Repita duas vezes o que foi descrito no **item c**.

### Procedimentos para a incubação com o anticorpo secundário

Todas as etapas devem ser realizadas sem exposição direta à luz:

- A. Prepare o anticorpo secundário em BSA 1% ou leite desnatado 1% (utilizar o mesmo que foi usado no bloqueio).
- B. Incube as membranas com o anticorpo secundário preparado, conforme descrito no item **a**, por 2 horas em temperatura ambiente sob agitação.
- C. Remova o anticorpo secundário e lave as membranas com tampão de lavagem por 10 minutos.
- D. Repita três vezes o **item c**.

No vídeo a seguir é possível ver de forma sucinta o passo a passo para a incubação das membranas com o anticorpo primário e secundário.

- [https://youtu.be/tfcljN4d\\_fk](https://youtu.be/tfcljN4d_fk) (15)
- <https://youtu.be/pkwDEUJYIOc> (16)
- <https://youtu.be/yZORSdY20Cc> (17)

(15) **Fonte:** WESTERN blotting: incubação com o anticorpo primário 1. [S.l.: s.n.], 2021. 1 vídeo (20s). Publicado pelo canal Deiziane Viana da Silva Costa. Disponível em: [https://www.youtube.com/watch?v=tfcljN4d\\_fk](https://www.youtube.com/watch?v=tfcljN4d_fk). Acesso em: 4 dez. 2021.

(16) **Fonte:** WESTERN blotting: incubação com o anticorpo secundário 1. [S.l.: s.n.], 2021. 1 vídeo (38s). Publicado pelo canal Deiziane Viana da Silva Costa. Disponível em: <https://www.youtube.com/watch?v=pkWDEUUYIOc>. Acesso em: 4 dez. 2021.

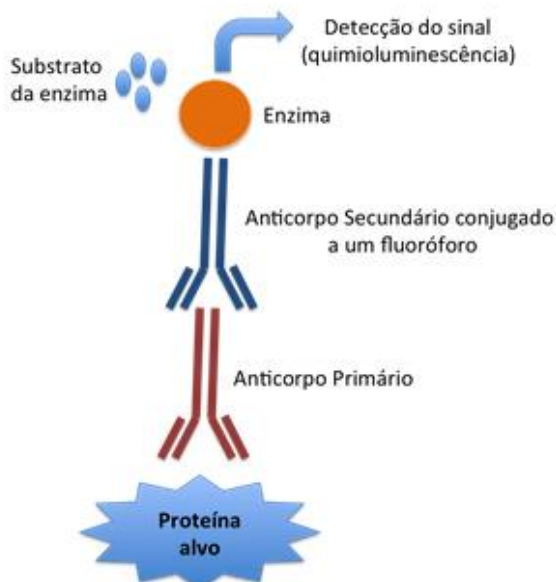
(17) **Fonte:** WESTERN blotting: incubação com o anticorpo secundário 2. [S.l.: s.n.], 2021. 1 vídeo (35s). Publicado pelo canal Deiziane Viana da Silva Costa. Disponível em: <https://www.youtube.com/watch?v=yZORSdY20Cc>. Acesso em: 4 dez. 2021.

### Detecção da proteína: revelação da membrana

A proteína de interesse pode ser detectada por meio de duas formas:

- A. Por quimioluminescência: o anticorpo secundário é conjugado com uma enzima. No momento da revelação da membrana, adiciona-se o substrato da enzima. Nos locais em que a enzima está presente (apenas onde tem anticorpo primário ligado à proteína de interesse) uma reação e a formação do produto dessa reação ocorrerão. É utilizado um filme e aparecerá a marcação nas regiões nas quais ocorreu a reação, permitindo localizar a proteína de interesse (Figura 3).

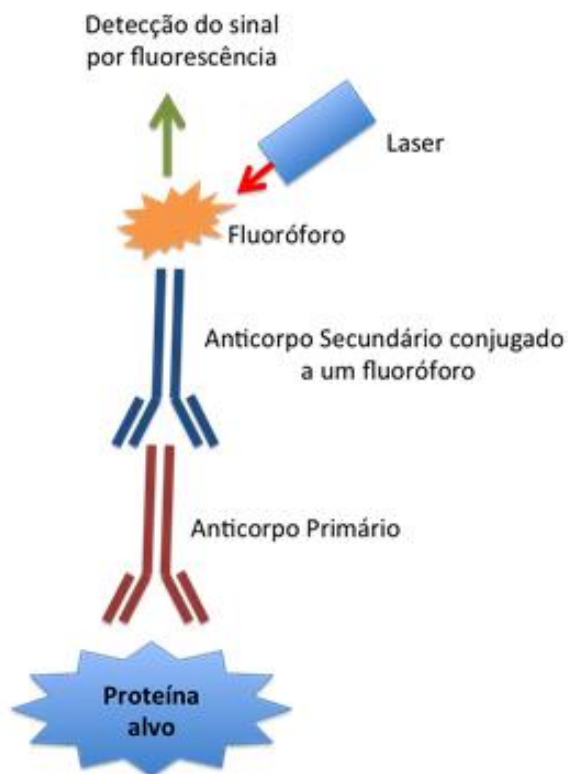
**Figura 3 - Detecção da proteína através da conjugação do anticorpo secundário com uma enzima**



**Fonte:** Elaboração das autoras.

- B. Fluorescência: o anticorpo secundário é conjugado com um fluoróforo que será posteriormente excitado com um *laser* de comprimento de onda específico para esse fluoróforo, permitindo a visualização da proteína (Figura 4).

**Figura 4 - Detecção da proteína através da associação do anticorpo com fluoróforo**



**Fonte:** Elaboração das autoras.

### Procedimentos para detecção por quimioluminescência

- A. Prepare o reagente de detecção conforme recomendado pelo fabricante.
- B. Incube as membranas com o reagente de detecção.
- C. Proceda para a detecção das bandas em aparelho específico (por exemplo, *ChemiDoc* da *BioRad*).

### Procedimento para detecção por fluorescência

Proceda para a detecção das bandas em aparelho específico com o *ChemiDoc* (*BioRad*).

Independente do método de detecção selecionado, ao obter as bandas de *WB*, devem ser verificados os procedimentos:

- A. Se a faixa de bandas marcadas corresponde ao peso esperado da proteína que está sendo investigada.

B. Se a proteína controle utilizada como normalizadora da densidade da proteína de interesse apresenta expressão similar entre as amostras. Diferenças bruscas na expressão da proteína controle normalmente estão associadas à quantificação inacurada da proteína total e/ou falha na técnica de pipetagem, ou ainda com a seleção inadequada da proteína controle.

A análise da densidade das bandas de *WB* pode ser realizada por meio do *ImageJ*, ou outros programas disponibilizados pela empresa do equipamento utilizado para a detecção das bandas.

No vídeo a seguir será fornecido o passo a passo de como realizar a análise das bandas de interesse utilizando o *ImageJ*.

(18) QUANTIFICAÇÃO Western blotting. [S.l.: s.n.], 2021. 1 vídeo (8min7s). Publicado pelo canal Andréa Viana. Disponível em: [https://www.youtube.com/watch?v=f6\\_d6xwWo7k](https://www.youtube.com/watch?v=f6_d6xwWo7k). Acesso em: 4 dez. 2021.

### **Stripping das membranas**

Caso seja necessário detectar outras proteínas na membrana, pode-se armazenar as membranas em água destilada ou TBST1x por 1-4 semanas a 4 graus Celsius.

Para a realização do *stripping*, siga as etapas:

- 1ª) Incube as membranas em solução *stripping* por 5-10 minutos sob agitação em temperatura ambiente.
- 2ª) Lave as membranas com TBST1x 3 vezes em temperatura ambiente por 5 minutos cada sob agitação.
- 3ª) Proceda para a etapa 6.1.

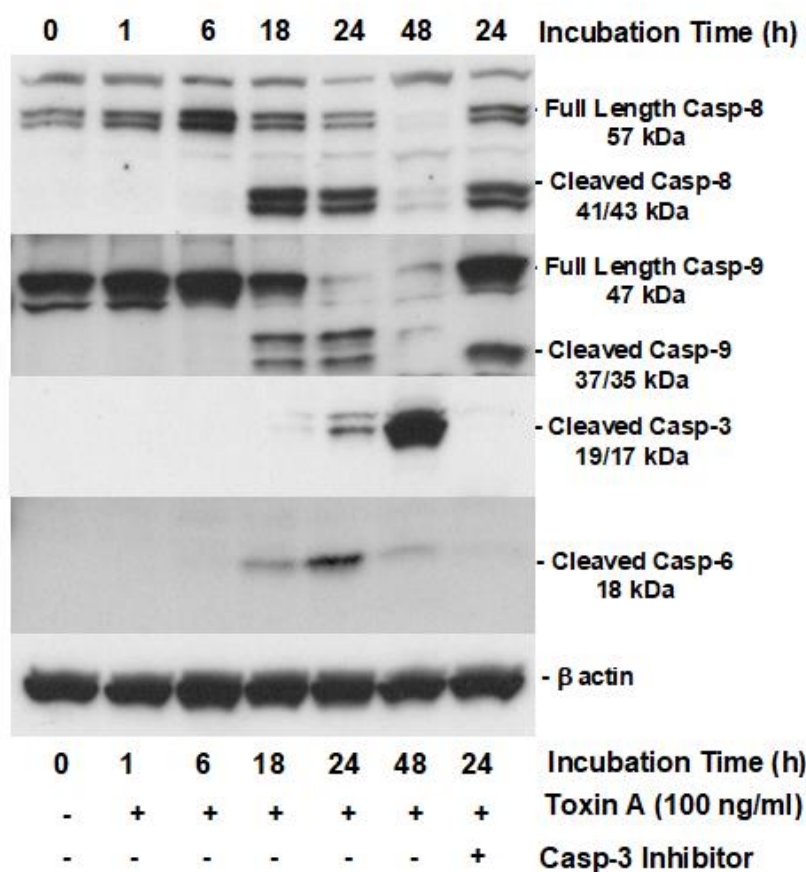


### **QUANTO TEM SIDO USADO NA PESQUISA?**

A técnica de *WB* tem como vantagem a detecção da proteína e sua caracterização de acordo com o peso molecular, superando, assim, o difícil problema da reação cruzada dos anticorpos com outras proteínas contendo epítopes semelhantes, como ocorre frequentemente no ensaio de imuno-histoquímica.

Por meio do WB é possível detectar múltiplas proteínas em uma mesma amostra. Como exemplo, podemos citar a detecção de pró-caspase e caspase ativada em linhagem celular de adenocarcinoma de cólon humano (células T84) utilizando anticorpos primários específicos para cada proteína e anticorpos secundários apropriados em uma única membrana. A diferença de peso molecular entre pró-caspases e caspases ativadas torna possível sua identificação em bandas diversas. O achado da Figura 5 mostra que a toxina A do *Clostridioides difficile* induz clivagem de duas caspases iniciadoras (caspases 8 e 9) e efetoras (caspases 3 e 6) do processo de apoptose (CARNEIRO et al., 2006).

**Figura 5 - Cinética da ativação de caspases iniciadoras 8 e 9 e caspases efetoras 3 e 6 por toxina A do *C. difficile* em linhagem celular de adenocarcinoma de cólon humano**

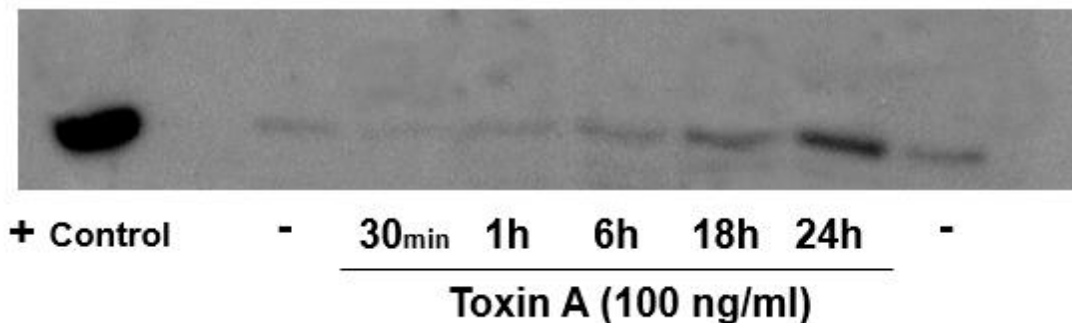


Fonte: Adaptado de Carneiro et al. (2006).

Em um outro estudo do mesmo grupo, utilizou-se o WB para demonstrar que a toxina A induz liberação de citocromo c da mitocôndria para o citoplasma. Com essa finalidade, foram incubadas as células com digitonina, um detergente que em pequenas concentrações deixa a membrana plasmática permeável, liberando os componentes citosólicos, deixando, porém, as organelas intactas. Assim, demonstrou-se que a toxina A do *C. difficile* induz liberação de

citocromo c da mitocôndria de células T84 com cinética semelhante à ativação de caspase 9 (18 e 24h), o que está de acordo com o seu papel na ativação de caspase 9 (Figura 6). Tais dados sugerem que a toxina A do *C. difficile* induz estresse mitocondrial com consequente liberação de citocromo c da mitocôndria para o citosol, induzindo então, a ativação de caspase 9 e apoptose.

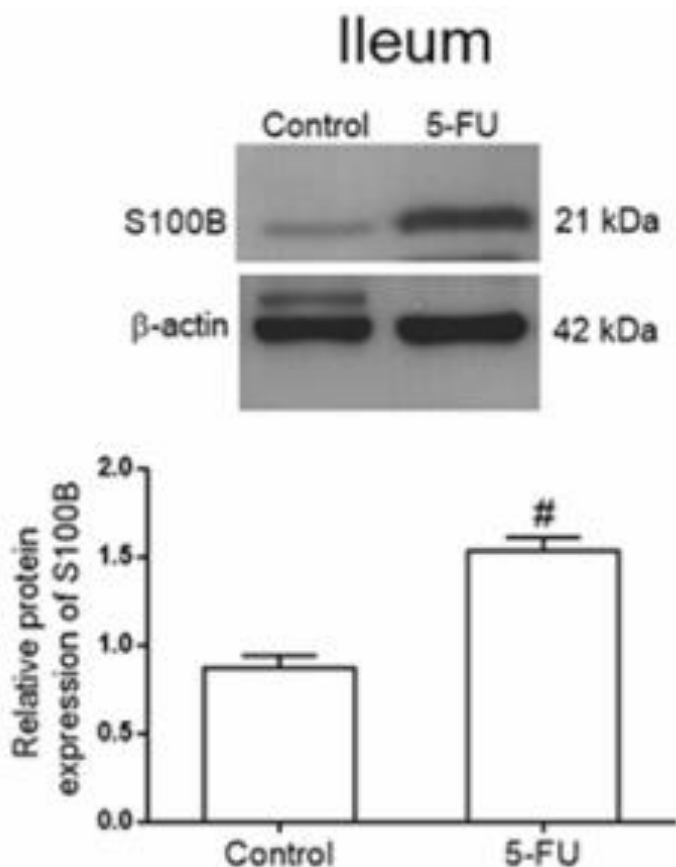
**Figure 6 - Imagem representativa da cinética da liberação de citocromo c para o citosol da célula T84 (linhagem de adenocarcinoma de cólon humano) induzida pela toxina A do *C. difficile***



**Fonte:** Brito et al. (2002).

WB pode ser usado em células em cultura, como demonstrado anteriormente, ou em tecido, permitindo a quantificação da expressão de uma determinada proteína e a comparação entre diversos grupos. Por exemplo, o Gráfico 1 mostra que o 5-fluorouracil (5-FU), fármaco usado no tratamento do câncer, aumenta a expressão de S100B em tecido de intestino de camundongo. O S100B é uma proteína produzida por astrócitos e pelas células gliais entéricas e está envolvida na sobrevivência dos neurônios entéricos. Utilizando o software *ImageJ* é possível fazer a quantificação das bandas por densitometria e comparação entre os grupos. Este dado sugere que o S100B pode estar envolvido com a mucosite intestinal e diarreia, efeitos colaterais relativamente comuns, atribuídos à quimioterapia com 5-FU.

Gráfico 1 - Imagem representativa do WB mostrando que o 5-fluorouracil (5-FU) induz aumento da expressão de S100B em tecido do íleo de camundongos. Visualiza-se também o controle de carregamento com b-actina. O gráfico representa a quantificação das bandas por densitometria com *ImageJ*.



Fonte: Costa et al. (2019).

Nota: Este gráfico foi extraído do artigo de autoria de COSTA, Deiziane V. S. *et al.*, tendo como título: 5-Fluorouracil induces enteric neuron death and glial activation during intestinal mucositis via a S100B-RAGE-NF $\kappa$ B-dependent pathway, cuja referência encontra-se completa na lista de referências ao final deste capítulo. O artigo mencionado está sob a licença Creative Commons 4.0 CC BY. Mais informações sobre a licença, acesse o site: <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

Conclui-se que o WB é uma técnica útil para a detecção de proteínas em células e tecidos, pois tem a vantagem de separar as proteínas por peso molecular, superando, assim, o problema da reação cruzada enfrentado na imuno-histoquímica, e possibilita a quantificação e comparação entre grupos. A escolha da técnica requer não somente conhecimento dela, mas raciocínio científico para escolha e interpretação de resultados. Além disso, sempre que possível, deve-se utilizar mais de uma técnica, considerando suas vantagens e desvantagens, para comprovação de resultados e descarte de erros.

## REFERÊNCIAS

BRITO, Gerly A. C. *et al.* Mechanism of clostridium difficile toxin A-induced apoptosis in T84 cells. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 186, n. 10, p. 1438-1447, Nov. 2002.

CARNEIRO, Benedito A. *et al.* Caspase and bid involvement in clostridium difficile toxin A-induced apoptosis and modulation of toxin A effects by glutamine and alanyl-glutamine in vivo and in vitro. **Infection and Immunity**, v. 74, n. 1, p. 81-7, Jan. 2006.

COMO preparar gel para western blotting 1. [S.l.: s.n.], 2021. 1 vídeo (3min54s). Publicado pelo canal Deiziane Viana da Silva Costa. Disponível em: [https://www.youtube.com/watch?v=rR5fE8wEg\\_A](https://www.youtube.com/watch?v=rR5fE8wEg_A). Acesso em: 28 nov. 2021.

COMO preparar gel para Western blotting 2. [S.l.: s.n.], 2021. 1 vídeo (3min10s). Publicado pelo canal Deiziane Viana da Silva Costa. Disponível em: <https://www.youtube.com/watch?v=XA0zJfx-Hqk>. Acesso em: 4 dez. 2021.

COMO preparar gel para western blotting 3. [S.l.: s.n.], 2021. 1 vídeo (4min34s). Publicado pelo canal Deiziane Viana da Silva Costa. Disponível em: [https://www.youtube.com/watch?v=rR5fE8wEg\\_A](https://www.youtube.com/watch?v=rR5fE8wEg_A). Acesso em: 28 nov. 2021.

COMO preparar gel para Western blotting 4. [S.l.: s.n.], 2021. 1 vídeo (23s). Publicado pelo canal Deiziane Viana da Silva Costa. Disponível em: <https://www.youtube.com/watch?v=4Ojy4UcxLIM>. Acesso em: 4 dez. 2021.

COSTA, Deiziane V. S. *et al.* 5-Fluorouracil induces enteric neuron death and glial activation during intestinal mucositis via a S100B-RAGE-NFκB-dependent pathway. **Scientific Reports**, v. 9, n. 665, p. 1-14, Jan. 2019.

ERNST, O.; ZOR, T. Linearization of the Bradford protein assay. **Journal of visualized experiments: JoVE**, v. 12, n. 38, p. 1-6, 2010.

JANES, Kevin A. An analysis of critical factors for quantitative immunoblotting. **Science Signaling**, v. 8, n. 371, p. 1-11, Apr. 2015.

LU, Tzong-Shi *et al.* Interpretation of biological and mechanical variations between the Lowry versus Bradford method for protein quantification. **North American Journal of Medical Sciences**, v. 2, n. 7, p. 325-328, July 2010.

QUANTIFICAÇÃO western blotting. [S.l.: s.n.], 2021. 1 vídeo (8min7s). Publicado pelo canal Andréa Viana. Disponível em: [https://www.youtube.com/watch?v=f6\\_d6xwWo7k](https://www.youtube.com/watch?v=f6_d6xwWo7k). Acesso em: 29 abr. 2021.

REICHEL, Wieland N. *et al.* Bioprocess monitoring: minimizing sample matrix effects for total protein quantification with bicinchoninic acid assay. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 43, p. 1271-1280, 2016.

SANDERS, Brittany J.; KIM, Daniel C.; DUNN, Robert C. Recent advances in microscale western blotting. **Analytical Methods: Advancing Methods and Applications**, v. 8, n. 39, p. 7002-7013, 2016.



WESTERN blotting: bloqueio 1. [S.l.: s.n.], 2021. 1 vídeo (1min24s). Publicado pelo canal Deiziane Viana da Silva Costa. Disponível em: <https://www.youtube.com/watch?v=vixF08PSqTQ>. Acesso em: 4 dez. 2021.

WESTERN blotting: bloqueio 2. [S.l.: s.n.], 2021. 1 vídeo (7s). Publicado pelo canal Deiziane Viana da Silva Costa. Disponível em: [https://www.youtube.com/watch?v=IQEDw\\_yB9ko](https://www.youtube.com/watch?v=IQEDw_yB9ko). Acesso em: 4 dez. 2021.

WESTERN blotting: corrida 1. [S.l.: s.n.], [2021]. 1 vídeo (24s). Publicado pelo canal Deiziane Viana da Silva Costa. Disponível em: <https://www.youtube.com/watch?v=L50nOchvk7U>. Acesso em: 4 dez. 2021.

WESTERN blotting: corrida 2. [S.l.: s.n.], [2021]. 1 vídeo (17s). Publicado pelo canal Deiziane Viana da Silva Costa. Disponível em: <https://www.youtube.com/watch?v=ZoYN5n68Ya4>. Acesso em: 4 dez. 2021.

WESTERN blotting: corrida 3. [S.l.: s.n.], [2021]. 1 vídeo (11s). Publicado pelo canal Deiziane Viana da Silva Costa. Disponível em: <https://www.youtube.com/watch?v=COWwDFYWZqU>. Acesso em: 4 dez. 2021.

WESTERN blotting: incubação com o anticorpo primário 1. [S.l.: s.n.], 2021. 1 vídeo (20s). Publicado pelo canal Deiziane Viana da Silva Costa. Disponível em: [https://www.youtube.com/watch?v=tfcljN4d\\_fk](https://www.youtube.com/watch?v=tfcljN4d_fk). Acesso em: 4 dez. 2021.

WESTERN blotting: incubação com o anticorpo secundário 1. [S.l.: s.n.], 2021. 1 vídeo (38s). Publicado pelo canal Deiziane Viana da Silva Costa. Disponível em: <https://www.youtube.com/watch?v=pkWDEUJYIOc>. Acesso em: 4 dez. 2021.

WESTERN blotting: incubação com o anticorpo secundário 2. [S.l.: s.n.], 2021. 1 vídeo (35s). Publicado pelo canal Deiziane Viana da Silva Costa. Disponível em: <https://www.youtube.com/watch?v=yZORSdY20Cc>. Acesso em: 4 dez. 2021.

WESTERN blotting: inserindo a amostra or ladder no gel. [S.l.: s.n.], [2021]. 1 vídeo (28s). Publicado pelo canal Deiziane Viana da Silva Costa. Disponível em: <https://www.youtube.com/watch?v=mcBuNbZJZxk>. Acesso em: 4 dez. 2021.

WESTERN blotting: preparação das placas para a corrida. [S.l.: s.n.], [2021]. 1 vídeo (3min4s). Publicado pelo canal Deiziane Viana da Silva Costa. Disponível em: <https://www.youtube.com/watch?v=4i-dkZ6KxC8>. Acesso em: 4 dez. 2021.

WESTERN blotting: transferência 1. [S.l.: s.n.], [2021]. 1 vídeo (7min14s). Publicado pelo canal Deiziane Viana da Silva Costa. Disponível em: <https://www.youtube.com/watch?v=QqfUbi9F5XY>. Acesso em: 4 dez. 2021

WESTERN blotting: transferência 2. [S.l.: s.n.], [2021]. 1 vídeo (22s). Publicado pelo canal Deiziane Viana da Silva Costa. Disponível em: <https://www.youtube.com/watch?v=uWuDQbBkyFw>. Acesso em: 4 dez. 2021.

WESTERN blotting: transferência 3. [S.l.: s.n.], [2021]. 1 vídeo (1min). Publicado pelo canal Deiziane Viana da Silva Costa. Disponível em:

<https://www.youtube.com/watch?v=JYXhuUwhYKc>. Acesso em: 4 dez. 2021.

ZHANG, Wenyang *et al.* Titanium dioxide photocatalytic polymerization of acrylamide for gel electrophoresis (TIPPAGE) of proteins and structural identification by mass spectrometry.

**Scientific Reports**, v. 11, n. 20981, p. 1-7, Feb. 2016.

# 11 IMUNO-HISTOQUÍMICA VOLTADA PARA A PESQUISA PRÉ-CLÍNICA

Conceição da Silva Martins  
Maria Luana Gaudencio dos Santos Moraes  
Renata Ferreira de Carvalho Leitão  
Deiziane Viana da Silva Costa  
Gerly Anne de Castro Brito



## O QUE SERÁ FEITO?

A imunolocalização é um método que tem como objetivo detectar a localização de um antígeno em tecidos ou em células (neste caso, recebe a denominação de imunocitoquímica) por meio de anticorpos específicos fluorocromos ou enzimas que produzirão produtos através de reações que podem ser visualizados através de cromógenos (VIZECHI et al., 2016).

A técnica é utilizada como um estudo complementar do diagnóstico anatomopatológico ou para fins de investigação científica, contribuindo com dados mais precisos, principalmente quando os patógenos não podem ser visualizados pela coloração HE. Além disso, a técnica permite a investigação da localização de substâncias (nuclear, citoplasmática, análise morfológica convencional e na membrana plasmática) do antígeno de interesse em tecidos ou células, sendo a intensidade de sua presença investigada através de coloração, ao contrário da técnica de Western Blot, que também é utilizada para a investigação de proteínas alvo (em tecidos e em células) por meio de imunomarcagem (interação de antígeno-anticorpo). Por outro lado, o forte componente subjetivo na quantificação dos resultados obtidos pela imuno-histoquímica e/ou imunofluorescência pode comprometer a análise estatística, sendo necessário o delineamento de protocolos acurados para a análise dos dados, que deve ser desenvolvido por pessoas experientes (preferencialmente mais de um observador) e seguindo um protocolo duplo-cego.



## POR QUE É UTILIZADA?

Dentre suas principais aplicações destacam-se:

### Pesquisa básica

- Investigação da fisiopatologia de várias doenças que afetam humanos e animais, elucidando as vias de sinalização envolvidas por intermédio da expressão da investigação de proteínas alvo.

### Diagnóstico clínico

- Diagnóstico e subtipagens de neoplasias, além de outras doenças, como nefrite lúpica, dentre outras.
- Diferenciação de natureza benigna ou maligna de determinadas proliferações celulares.
- Diagnóstico histogenético de neoplasias morfológicamente não diferenciadas.
- Caracterização da localização primária de neoplasias malignas.
- Pesquisa de fatores prognósticos e indicações terapêuticas de algumas doenças.
- Auxiliar na classificação de doenças de várias áreas, como na neuropatologia, auxiliando na identificação de tumores do sistema nervoso central (JAISWAL, 2016) e na hematopatologia, contribuindo para o diagnóstico e subtipagem de linfomas e leucemias (LANDRY et al., 2020; FUERTES et al., 2013).
- Detecção de agentes infecciosos.

### Estudo genético

- Determinar o papel de produtos de genes específicos, elucidando sua função em processos biológicos vitais (SWANSON, 2015).
- Avaliação de mutações específicas.

## Vantagens e Indicações da Técnica de Imuno-histoquímica (IHQ)

A técnica permite:

- a análise semiquantitativa de proteínas de interesse, permitindo avaliar a sua expressão, distribuição e localização, configurando uma importante vantagem com relação ao Western Blotting;
- a análise de tecidos de uma forma mais efetiva;
- múltiplas análises a partir de uma única amostra;
- a utilização de métodos automatizados, melhorando o fluxo de trabalho, a padronização das reações (independente de habilidades individuais), alta reprodutibilidade dos testes e monitoramento constante do processo.

## Amostras que podem ser processadas para a realização dessa técnica

Amostras biológicas, como tecidos e culturas celulares fixadas em soluções fixantes (como formaldeído e paraformaldeído) podem ser processadas para a realização de IHQ.

## Equipamentos e materiais necessários

O protocolo de IHQ para tecidos incluídos em parafina pode ser resumido nas seguintes etapas:

- (1) obtenção e preservação do tecido (fixação);
- (2) processamento para inclusão dos tecidos em parafina;
- (3) desparafinização e reidratação das amostras;
- (4) recuperação antigênica;
- (5) permeabilização e bloqueio de ligações não específicas;
- (6) incubação com o anticorpo primário;
- (7) incubação com o anticorpo secundário ou polímero; e
- (8) sistema de revelação.

Os passos, assim como os reagentes necessários para a realização da imunohistoquímica a partir de tecidos biológicos parafinizados serão descritos a seguir:

### Obtenção, fixação e processamento das amostras

#### Obtenção e fixação das amostras para IHC

As amostras devem ser coletadas, inseridas em cassete histológico e, imediatamente imergidas em solução fixadora (Tabela 1) por 18-24h.

**Tabela 1- Preparação de soluções fixantes**

Formalina Neutra tamponada 10%	
Formalina 37-40%.	100mL
Água destilada	900mL
Fosfato de sódio monobásico	4,0gr
Fosfato de sódio dibásico	6,5gr
Paraformaldeído 4%	
Paraformaldeído	12g
Água destilada	150 mL
PBS 0,2 M	150mL
Hidróxido de sódio (1N)	3 gotas

**Fonte:** Elaboração das autoras.

A etapa de fixação tem como objetivo assegurar a preservação e a estabilização do material biológico, mantendo-o mais próximo das suas características naturais e garantindo a integridade dos seus antígenos alvo. Para prevenir modificações ou degradação dos antígenos, recomenda-se que as amostras sejam fixadas o mais rápido possível para que não ocorra uma diminuição da afinidade de ligação dos anticorpos ou comprometimento da sua detecção. O tempo de fixação irá depender do fixador utilizado. Após o tempo de fixação, as amostras devem ser transferidas para álcool 70% até o processamento para a inclusão em parafina.

Para amostras que serão submetidas à IHQ, o fixador mais utilizado para este método é a solução fixadora de formalina neutra tamponada 10%. A formalina é um fixador que forma grupos hidroximetil nas cadeias laterais de aminoácidos e, subsequentemente, retículas de aminoácidos via pontes de metileno (WEBSTER et al., 2010). Os tecidos coletados devem ser acondicionados em cassetes histológicos devidamente identificados. Os cassetes devem ser colocados em um recipiente com o fixador. Após isso, devem ser seguidos os passos para a inclusão em parafina.

## Inclusão dos tecidos em parafina

O processo de inclusão em parafina para a preparação dos cortes no micrótomo e a confecção de lâminas histológicas são precedidos de várias etapas, conforme ilustra a Figura 1.

**Figura 1 - Etapas de desidratação e diafanização**



**Fonte:** Elaboração das autoras.

Esse processo pode ser realizado manualmente ou de forma automática, utilizando o histotécnico automático (Foto 1A) e máquina de inclusão em parafina (Foto 1B). O Quadro 2 descreve um dos protocolos utilizados para processamento de tecidos.

**Foto 1 - Equipamentos para a realização da desidratação, diafanização, impregnação e inclusão das amostras de forma automática. Em A, um processador do tipo carrossel, no qual os cassetes contendo os fragmentos são colocados em uma cesta que é transportada mecanicamente de forma a imergir os cassetes em cada reagente. Em B um aparelho de inclusão em parafina**



**Fonte:** Acervo das autoras.

Como a parafina é imiscível com a água, que constitui 70% dos tecidos animais, o primeiro passo é retirar totalmente a água da peça fixada para permitir a penetração da parafina de forma efetiva. Para que as células e os tecidos mantenham a sua forma original, a substituição da água por álcool 100% deve ocorrer de forma gradual, conforme a Tabela 2.

O passo seguinte visa remover completamente o álcool do interior dos tecidos. A remoção completa do álcool é fundamental para que a parafina possa penetrar completamente no tecido. Utiliza-se nessa etapa o xilol (Tabela 2). Conforme o xilol penetra no tecido, em

substituição ao álcool, os tecidos se tornam claros. Por tal razão, essa etapa é denominada clarificação.

Após a clarificação (ou clareamento), segue-se para a impregnação do tecido com parafina líquida. Como a parafina em temperatura ambiente é sólida, deve ser aquecida para que possa penetrar completamente no interior dos tecidos. É importante, no entanto, que a parafina não ultrapasse a temperatura de 60°C, já que altas temperaturas podem danificar o material biológico e assim ocorrerem resultados falsos negativos. Não se deve realizar somente uma passagem pela parafina por ser insuficiente para remover todo o xilol dos tecidos. Comumente, duas passagens são utilizadas (Tabela 2). No entanto, os tecidos não devem permanecer na parafina por muito tempo, uma vez que o calor excessivo pode danificar o material, conforme mencionado anteriormente.

O próximo passo, a inclusão, se baseia em posicionar, com o auxílio de uma pinça, os tecidos que foram previamente infiltrados em parafina no interior de um molde que já contém parafina líquida. Os blocos de parafina são obtidos após o resfriamento da parafina. A Foto 1B mostra um aparelho que auxilia no processo de inclusão, com o controle mais preciso da temperatura.

**Tabela 2- Protocolo utilizado para processamento histológico de tecidos**

Estágio	Reagente	Duração
Desidratação	Álcool 70%	1h
Desidratação	Álcool 80%	1h
Desidratação	Álcool 90%	1h
Desidratação	Álcool absoluto	1h
Desidratação	Álcool absoluto	1h
Clarificação	Xilol	1h30min
Clarificação	Xilol	1h30min
Impregnação parafina	Parafina líquida	1h30min
Impregnação parafina	Parafina líquida	1h30min

**Fonte:** Elaboração das autoras.

## Microtomia

Para permitir a análise dos tecidos em microscópio óptico, é fundamental que esses tecidos sejam seccionados em fatias bem finas (4-6 micrômetros) e uniformes com o auxílio de um micrótomo (Foto 2).



**Foto 2 -** Micrótomoto do tipo rotatório, em que o bloco de parafina, posicionado no porta-objeto, vai de encontro à navalha que está imóvel no porta-navalha



**Fonte:** Acervo das autoras.

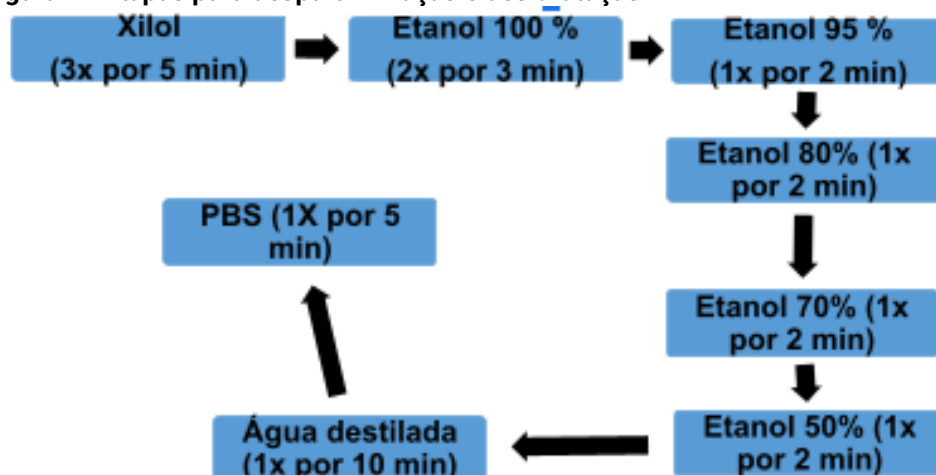
Alguns cuidados devem ser tomados para cortes histológicos a serem utilizados para IHQ:

- Obter cortes de 4  $\mu\text{m}$  de espessura.
- Utilizar lâminas silanizadas, pois permitem maior aderência dos cortes histológicos.
- Monitorar a temperatura da água do banho-maria (40-49 °C) utilizado nessa etapa, para evitar o seu aquecimento excessivo e, conseqüentemente, a abertura das amostras com risco da formação de artefatos que prejudicarão a qualidade das amostras.

### **Desparafinização e reidratação das amostras**

A desparafinização e reidratação facilitam a penetração das soluções, como a solução de recuperação antigênica e anticorpos utilizados nas etapas seguintes, estas, ilustradas na Figura 2, devem ser realizadas após a incubação das lâminas histológicas contendo os tecidos parafinizados em estufa a 60°C por pelo menos 1 hora.

Figura 2 - Etapas para desparafinização e desidratação



Fonte: Acervo das autoras.

É importante considerar que os reagentes utilizados durante a desparafinização e hidratação, como etanol, xilol ou água destilada devem ser trocados dos recipientes, semanalmente, caso esse processo seja feito rotineiramente.

### Recuperação antigênica

A recuperação antigênica consiste na etapa de exposição dos epítomos (sítios exatos de ligação do anticorpo ao antígeno) antes da aplicação do anticorpo primário. Essa etapa é essencial para que a imunorreatividade do antígeno seja restaurada, uma vez que a formalina pode mascarar as estruturas e restringir as ligações antígeno-anticorpo. O mascaramento é o resultado de ligações cruzadas criadas entre os aminoácidos do antígeno e as proteínas que cercam o antígeno alvo. As ligações cruzadas podem impedir que o anticorpo acesse seu epítomo, resultando em um sinal de menor intensidade (SCALIA et al., 2017). Existem várias abordagens para a recuperação dos antígenos, dentre elas o uso de enzimas ou calor. É importante encontrar o método certo para o respectivo anticorpo ou epítomo.

### Recuperação enzimática

Para a recuperação antigênica por meio de recuperação enzimática utilizam-se enzimas, tais como: a protease, tripsina, quimotripsina, pepsina ou proteinase K (Tabela 3). No entanto, a proteinase K é uma das mais utilizadas. Esse tipo de tratamento é útil para amostras com epítomos de difícil recuperação. Porém, é importante que o tempo e a concentração das

enzimas utilizadas sejam otimizados, para que não ocorra a destruição do tecido e antígeno de interesse.

**Tabela 3 - Recuperação antigênica por digestão enzimática**

Enzima	Concentração	Condições
Tripsina	0,05 % a 1,0 %	37°C (10 a 40 min)
Protease XIV	0,05 %	37°C (15 min)
Proteinase K	20 µg/mL	37°C (20 min)
Pepsina	0,4 %	37°C (30 a 180 min)

**Fonte:** Elaboração das autoras.

### Recuperação por calor

As amostras devem ser imersas em solução de recuperação antigênica (Tabela 4) e em seguida da aplicação de calor por meio de micro-ondas, banho-maria ou *Pt-link*. Dentre estes, banho-maria ou *Pt-link* são os mais recomendados. Dentre as soluções de recuperação antigênica, indica-se testar pelo menos duas para verificar a que melhor se adequa às amostras a serem processadas. Geralmente, tampão citrato (pH 6,0) e Tris-EDTA (pH 9,0) são os mais utilizados.

**Tabela 4 - Soluções de recuperação antigênica por calor**

Reagente	Concentração
Tampão citrato pH 6,0	0,01 M
PBS	0,01 M
Tris-EDTA pH 9,0	0,05M
Tris-HCL pH 7,4	0,05M
Fontes de calor	Condições
Micro-ondas	5-20 minutos
Banho-maria	92 ° C por 20-40 minutos
PT-link	99°C por 20-40 minutos

**Fonte:** Elaboração das autoras.

### Preparo de soluções para recuperação antigênica

Tris- HCL (0,05M).....NH<sub>2</sub>C(CH<sub>2</sub>OH)<sub>3</sub>.

HCL.....7,85g/L

Adicionar 1 L de água destilada e ajustar o pH para 7,4.

Tampão citrato (0,01M)

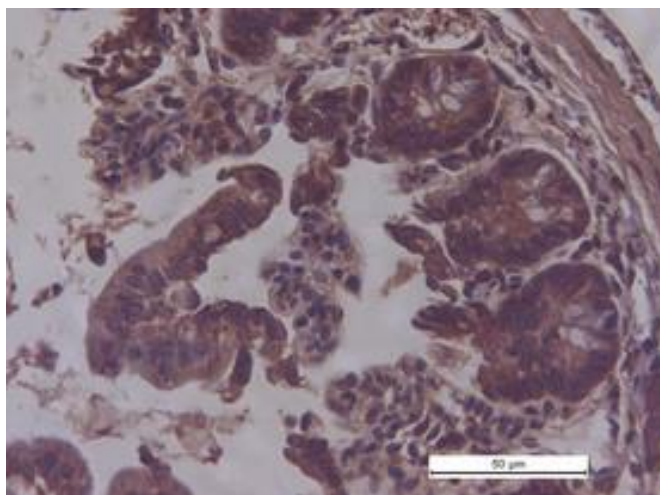
C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>Na<sub>3</sub>O<sub>7</sub>.2H<sub>2</sub>O.....2,58g/L

Adicionar água destilada até 800mL. Ajustar pH até 6,0 com HCL. Completar com água destilada até 1L.

### Permeabilização e bloqueio de ligações não específicas

Normalmente algumas substâncias endógenas continuam ativas, o que pode interferir nos resultados de IHQ por meio da produção de um *background* na reação (como demonstrado na Figura 3).

**Figura 3 - Intestino de camundongo com coloração de fundo difusa e inespecífica. Quase todas as células e tecidos extracelulares são marrons**



**Fonte:** Acervo das autoras.

As peroxidases endógenas, por exemplo, as quais estão presentes em muitas células (tais como: eritrócitos, granulócitos e neurônios) reagem com o cromógeno da etapa de detecção, a diaminobenzidina (DAB), produzindo uma coloração e, conseqüentemente, um resultado falso-positivo (KIM et al., 2016).

A biotina endógena, que é uma coenzima presente no fígado, rim, baço, coração, cérebro, pulmão ou tecidos congelados também pode ser responsável pela produção de resultados com fundo inespecífico, uma vez que esta molécula se liga à avidina, um outro componente da reação. Deste modo, é importante que se proceda a etapa de bloqueio de

ligações não específicas. Algumas soluções de bloqueio incluem a solução de bloqueio da biotina e solução de bloqueio da peroxidase endógena (MILLER et al., 2019).

Um outro aspecto que pode contribuir com o *background* da reação é a ligação não específica de anticorpos, principalmente dos policlonais. Os anticorpos possuem uma carga específica e podem acabar interagindo com outras moléculas da secção. Incluindo interações hidrofóbicas, interações iônicas e ligações de hidrogênio.

#### **Peróxido de Hidrogênio 3 % em Metanol**

H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 30%.....	1mL
CH <sub>3</sub> OH.....	99mL

#### **Permeabilização e bloqueio da biotina utilizando a solução de bloqueio por 20-30 minutos**

Os tampões alcalinos, pré-incubação com avidina e biotina são bastante utilizados nessa etapa, como: BSA, leite desnatado e soluções comerciais. As amostras de tecidos nas lâminas devem ser circundadas com uma caneta hidrofóbica para IHQ antes da aplicação da solução. As propriedades hidrofóbicas delimitam barreiras na lâmina para confinar os reagentes em uma área definida.

#### **Incubação das amostras em solução de bloqueio da peroxidase endógena por 20 minutos**

O peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), diluído em solução a 3%, é um agente comumente usado para bloquear a atividade da peroxidase endógena (RADULESCU; BOENISCH, 2007). Metanol, PBS, água destilada ou solução salina podem ser usados para diluir o peróxido de hidrogênio. Essa etapa não é necessária para imunofluorescência, apenas para imunohistoquímica.

#### **Anticorpo e detecção**

As proteínas alvo podem ser detectadas por meio do método direto e indireto de IHQ (Figura 4).

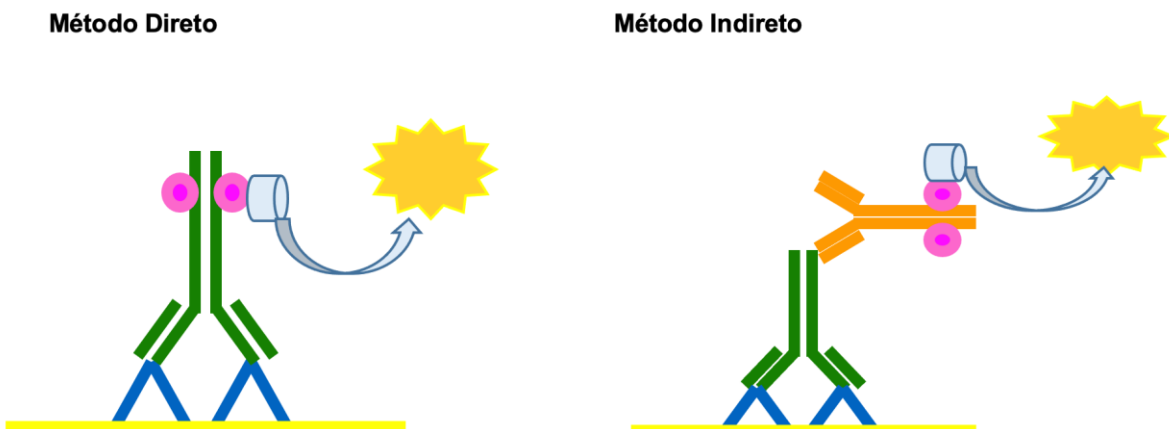
O método direto é um método de coloração de uma etapa que envolve um anticorpo marcado (fluorocromo ou enzima), por exemplo, anticorpo conjugado com HRP reagindo diretamente com o antígeno de interesse. Embora o método direto seja simples, rápido e altamente específico, ele tem baixa sensibilidade e disponibilidade comercial limitada. O método

direto é comumente aplicado para rastrear anticorpos monoclonais antes do processo de fabricação em grande escala.

O método indireto é um processo de duas etapas que envolve um anticorpo primário não conjugado (primeira camada) que se liga ao antígeno alvo aplicado na amostra e um anticorpo secundário conjugado (segunda camada) que reage com o ou ao anticorpo primário. O anticorpo secundário é desenvolvido contra a imunoglobulina G (IgG) da espécie na qual o anticorpo primário foi produzido. Por exemplo, se o anticorpo primário for IgG de coelho anti-humano, o anticorpo secundário deve ser IgG de anticoelho. A detecção pelo método indireto é uma das mais utilizadas por apresentar maior sensibilidade.

A utilização de controles negativos em testes de IHQ é de extrema importância para avaliação da sensibilidade do anticorpo primário *versus* a ocorrência de reações inespecíficas (RAMOS-VARA et al., 2008).

Figura 4 - Método de detecção de IHQ



Fonte: Elaboração das autoras.

### Anticorpo primário

Geralmente, os anticorpos são altamente específicos para as proteínas de interesse. O anticorpo primário reconhece um epítopo específico, mesmo na presença de outros epítopos.

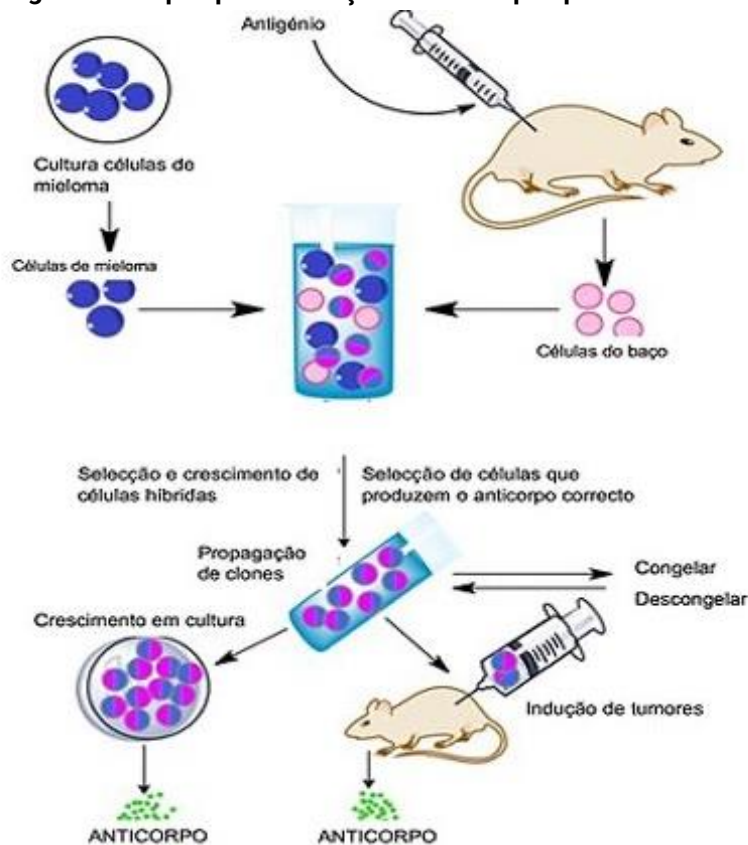
Antes da realização dessa etapa, alguns pontos importantes devem ser considerados com relação ao anticorpo baseado no *datasheet* (folha de informação fornecida pelo fabricante):

- Reatividade do anticorpo para a espécie a qual a amostra pertence (rato, camundongo, humano, hamster, coelho, dentre outros).
- Diluição do anticorpo (testar pelo menos duas concentrações).

- Em que espécie o anticorpo foi produzido (rato, camundongo, humano, coelho, dentre outros).
- Especificidade do anticorpo para IHQ.

Dois tipos de anticorpos são utilizados em imuno-histoquímica, os monoclonais e policlonais (TAYLOR et al., 2014). Os **monoclonais** são sintetizados por uma população de células idênticas (clone) crescidas em meio de cultura celular. Esses são homogêneos; todos eles reconhecem a mesma parte específica da proteína antigênica. Por serem menos sensíveis, porém mais específicos, geram menos *background*. Os **anticorpos policlonais** são aqueles sintetizados por diferentes tipos de células produtoras de anticorpos reagindo, assim, com diversos epítopos de um antígeno. A sequência habitual de produção inicia-se na escolha do antígeno e sua injeção no animal alvo, de forma a se obter uma resposta imune, e termina na obtenção de um soro purificado com vários anticorpos diferentes, dirigidos para os vários epítopos do antígeno, sendo mais propensos a reagir de forma cruzada com antígenos não alvo (Figura 5).

Figura 5 - Etapas para obtenção de anticorpos primários



Fonte: Moreira (2014).

### Etapas de incubação com o anticorpo primário

- A. Lave as lâminas com tampão de lavagem PBS 1x (contendo 0.05% de *Tween 20*) ou algum outro tampão comercial 2x por 5 minutos cada (recomenda-se reduzir o tempo de lavagem para 2 minutos para tecidos que não aderem firmemente durante o processo).
- B. Seque as lâminas com papel absorvente.
- C. Incube as lâminas com o anticorpo primário por 60 minutos ou *overnight*.

**Obs.:** Incube o controle negativo apenas com 1% BSA ou tampão de diluição (*antibody diluent*).

### Anticorpos secundários ou polímeros

Nesta etapa, dois sistemas são amplamente utilizados: o sistema Complexo Avidina-Biotina (ABC) e sistema baseado em polímero. Atualmente, o uso do polímero tem sido amplamente recomendado por melhor amplificação de sinal.

### Protocolo de aplicação de anticorpo secundário ou polímero

- A. Aplicar o anticorpo secundário ou polímero em todas as amostras, incluindo o controle negativo por 30 minutos em temperatura ambiente.

**Obs.:** Caso use polímero, prossiga para o **item d** desta seção.

- B. Lave as lâminas 2x em PBS1x (contendo 0.05% de *Tween 20*) por 5 minutos.
- C. Incube as lâminas com o complexo ABC (prepare de acordo com o fabricante) por 30 minutos.
- D. Lave as lâminas 2x em PBS1x (contendo 0.05% de *Tween 20*) por 5 minutos.

### Sistema de detecção

O sítio de ligação da enzima e a coloração positiva da imunoperoxidase são reveladas pelo cromógeno DAB (diaminobendizine tetrahydrochloride). Os cromógenos utilizados são substâncias que, na sua forma oxidada, são coloridas e estáveis, conferindo cor ao local da reação, que é catalisada pela peroxidase. A intensidade da coloração depende dos



procedimentos de coloração usados, além do conteúdo de proteína em si, as moléculas oxidam e formam um complexo de substância marrom (UMEMURA et al., 2004).

### Protocolo de aplicação do DAB

- A. Lavar 3x em PBS 1x (contendo 0.05% de *Tween* 20) por 2 minutos cada.
- B. Preparar a solução de DAB (conforme recomendações do fabricante).

**Obs.:** A solução de DAB é sensível à luz.

- C. Seque as lâminas e incube-as com a solução de DAB por 30 segundos a 2 minutos. As lâminas deverão ser monitoradas macroscopicamente.
- D. Incube as lâminas em água destilada para cessar a reação.

### Contra coloração do tecido

Após a marcação do antígeno alvo por IHC, uma contracoloração é geralmente aplicada com o objetivo de fornecer contraste. Uma contracoloração bastante utilizada é a contracoloração com hematoxilina. No entanto, como a hematoxilina geralmente cora núcleos, recomenda-se fazer uso de outros corantes, como metil *green*.

### Protocolo de contracoloração

- A. Incubar as lâminas com Hematoxilina de Mayer (5 minutos).
- B. Lavar com água corrente.
- C. Lavar em álcool 95% (2x por 10 segundos).
- D. Lavar em álcool absoluto (3x por 10 segundos).
- E. Lavar em Xilol (3x por 10 segundos).
- F. Monte as lâminas.

## Análise dos dados de IHQ

Após adquirir as imagens por meio de microscópio de luz ou confocal, a análise dos dados pode ser realizada de várias formas, a depender da distribuição da proteína de interesse ao longo da amostra, assim como da qualidade da imunomarcção. A seguir são apresentadas algumas formas:

- Contagem do número de células positivas para a proteína de interesse investigada.
- Para células provenientes de experimentos *in vitro*, esse método de análise deve ser realizado a partir da contagem de 100 células.
- Enquanto para amostras teciduais, a contagem pode ser realizada por campo histológico (<https://www.youtube.com/watch?v=HU09WtMQ9aY>) (1)

(1) **Fonte:** ANÁLISE de imagens de imuno-histoquímica: contagem de células positivas por campo/amostras teciduais. [S.l.: s.n.], 2021. 1 vídeo (5min3s). Publicado pelo canal Deiziane Viana da Silva Costa. Disponível em: <https://www.youtube.com/watch?v=HU09WtMQ9aY>. Acesso em: 22 set. 2021.

- Determinação da área imunomarcada para a proteína de interesse investigada: a área imunomarcada pode ser determinada por meio da utilização dos *softwares* ImageJ ou Photoshop (<https://www.youtube.com/watch?v=FxLeUuVwPyY>) (2) Após a obtenção da área imunomarcada e área total, é aplicada a seguinte fórmula para obter o percentual de área imunomarcada:

$$\% \text{ Área imunomarcada} = \frac{\text{área positiva para a sua proteína de interesse em pixel} \times 100}{\text{Área total em pixel}}$$

(2) **Fonte:** ANÁLISE de imagens de imuno-histoquímica: área com imunomarcção positiva. [S.l.: s.n.], 2021. 1 vídeo (5min59s). Publicado pelo canal Deiziane Viana da Silva Costa. Disponível em: <https://www.youtube.com/watch?v=FxLeUuVwPyY>. Acesso em: 22 set. 2021.

## Estabelecimento de escore de imunomarcção

O escore de imunomarcção é geralmente utilizado quando existe a presença de artefatos nas amostras que prejudicam a quantificação da área imunomarcada ou quando se objetiva determinar a intensidade da imunomarcção em regiões específicas. Esse método é

baseado em um sistema de escore variando de 0 a 3, de acordo com a intensidade da imunomarcação ([https://www.youtube.com/watch?v=FIJG\\_aSLTNE](https://www.youtube.com/watch?v=FIJG_aSLTNE)) (3) (Tabela 5).

(3) **Fonte:** ANÁLISE de imagens de imuno-histoquímica: escore de imunomarcação. [S.l.: s.n.], 2021. 1 vídeo (2min27s). Publicado pelo canal Deiziane Viana da Silva Costa. Disponível em: [https://www.youtube.com/watch?v=FIJG\\_aSLTNE](https://www.youtube.com/watch?v=FIJG_aSLTNE). Acesso em: 22 set. 2021.

**Tabela 5 - Sistema de escores para análise de IHQ**

Escore	Intensidade da imunomarcação
0	Nenhuma imunomarcação
1	Fraca imunomarcação
2	Moderada imunomarcação
3	Intensa ou forte imunomarcação

**Fonte:** Elaboração das autoras.

Para que haja um padrão na análise, recomenda-se que as amostras a comparar sejam processadas em um mesmo experimento para que as diferenças não sejam decorrentes de alterações no processo.

### **Predominância do uso da técnica de imuno-histoquímica**

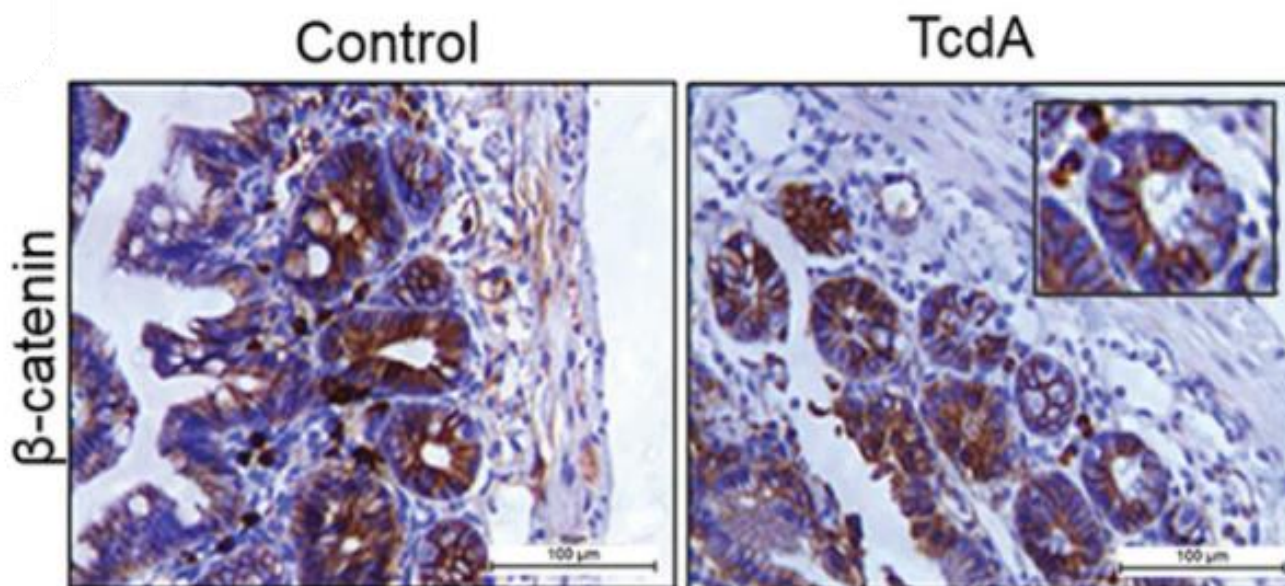
Nos últimos anos, as melhorias na técnica de IHQ, tais como: maior sensibilidade e especificidade fornecidas por técnicas de intensificação e amplificação de sinal possibilitaram progressos significativos, e a técnica tornou-se amplamente utilizada (DURAYAN et al., 2012).

A IHQ se destaca, entre outras técnicas, por detectar uma proteína e adicionalmente permitir sua visualização e, portanto, sua localização no tecido ou na célula. Essa é uma das principais vantagens desse método. Por exemplo, no artigo de Martins et al. (2020), foi demonstrada a expressão de  $\beta$ -catenina nas células epiteliais da cripta intestinal de camundongos (Figura 6). A via Wnt/  $\beta$ -catenina está envolvida na proliferação celular e renovação do epitélio intestinal, sendo ativada predominantemente nas células-tronco da base da cripta que geram novas células para repor as células que descamam para a luz do intestino.

O ensaio de imuno-histoquímica com peroxidase utilizado neste trabalho demonstrou que a toxina A do *C. difficile* reduz a expressão de  $\beta$ -catenina na cripta intestinal de camundongos (redução de coloração marrom). Além disso, essa técnica permitiu verificar que nos animais tratados com toxina A havia redução de marcação para  $\beta$ -catenina no núcleo da célula (núcleo azul corado pela hematoxilina), sugerindo que a toxina A do *C. difficile* inibe sua translocação do citoplasma para o núcleo, inibindo a ativação da via Wnt/  $\beta$ -catenina e, portanto, a proliferação celular (Figura 6). O *C. difficile* é uma bactéria que causa destruição da mucosa,

inflamação e diarreia, e a inibição de proliferação pode fazer parte da patogênese, retardar a recuperação do epitélio intestinal e prolongar a diarreia.

**Figura 6 - Imagens representativas de IHQ com peroxidase utilizando anticorpo para  $\beta$ -catenina**



**Fonte:** Martins et al. (2020).

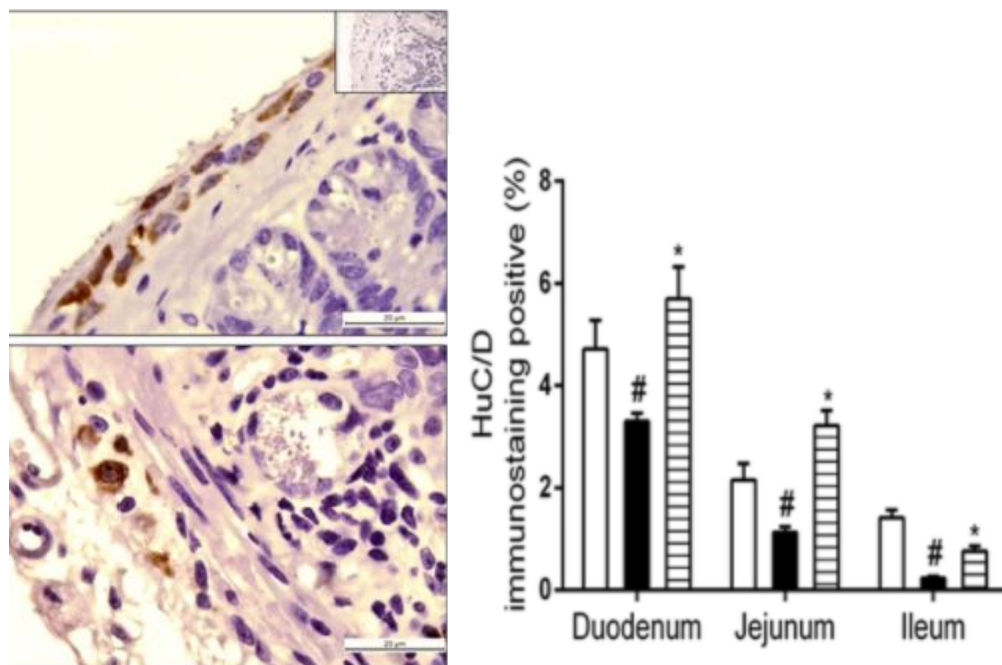
**Nota:** Observa-se que a marcação de coloração marrom predomina nas células estreitas da cripta intestinal de camundongos, onde se encontra maior atividade proliferativa (esquerda). À direita observa-se diminuição da marcação do citoplasma, sugerindo uma menor expressão da  $\beta$ -catenina e diminuição da coloração marrom no núcleo das células da cripta, sugerindo inibição da translocação da  $\beta$ -catenina do citoplasma para o núcleo da célula (ver maior aumento no canto superior direito) e, portanto, diminuição da ativação da via Wnt/ $\beta$ -catenina como consequência da ação da toxina A do *C. difficile*, TcdA (MARTINS et al., 2020).

Outra vantagem da imuno-histoquímica é a identificação de um tipo de célula e sua localização no tecido, de acordo com uma determinada proteína que ela expressa. Como exemplo, podemos citar a imunomarcação do plexo mientérico (Figura 7 - seta) no jejuno de camundongos, utilizando o anticorpo HuC/D como marcador de neurônio. Empregando essa metodologia foi possível demonstrar que o 5-fluorouracil (5-FU), um agente utilizado no tratamento de pacientes com câncer; induz perda de neurônios entéricos (Figura 7B) (COSTA et al., 2019).

Essa perda de neurônios pode estar relacionada com a diarreia e com a alteração de motilidade a longo prazo, que são efeitos colaterais associados ao uso dessa medicação. A imuno-histoquímica permite também uma avaliação semiquantitativa da expressão da proteína marcada, utilizada para comparação entre tratamentos. Essa quantificação é feita utilizando ferramenta eletrônica que permite a estimativa da percentagem de área marcada. Uma avaliação utilizando Photoshop realizada em 10 campos microscópicos por lâmina de 4 camundongos por

grupo revelou que a porcentagem de área marcada com anticorpo HuC/D está reduzida nos animais tratados com 5-FU (Figura 7B), sugerindo morte neuronal.

**Figura 7 - Imagem ilustrativa da imunomarcção de neurônios do plexo mioentérico (seta) com anticorpo HuC/D**



**Fonte:** Costa et al. (2019).

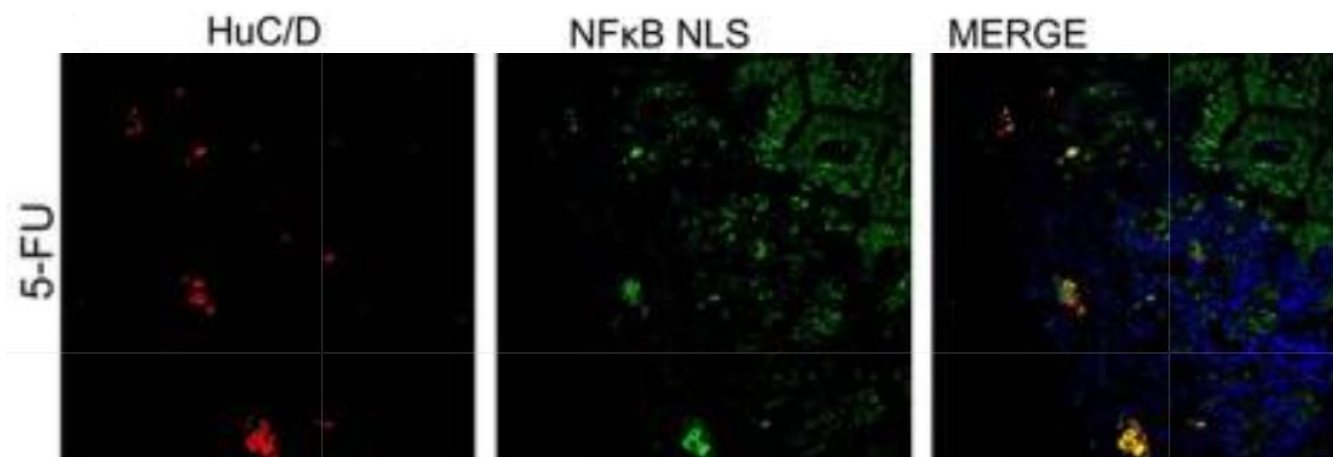
**Nota:** (A) Imagem ilustrativa da imunomarcção de neurônios do plexo mioentérico (seta) com anticorpo HuC/D. Observa-se que o 5-fluorouracil reduziu a quantidade de células marcadas com HuC/D, sugerindo morte neuronal. O destaque no canto superior direito representa o controle negativo onde o tecido não foi incubado com o anticorpo primário (HuC/D), mas passou por todo processo, inclusive incubação com anticorpo secundário. (B) A avaliação de 10 campos em cada lâmina de 4 camundongos por grupo utilizando Photoshop revela que 5-FU reduz a área marcada com HuC/D (COSTA et al., 2019).

A imunofluorescência pode complementar o entendimento da situação biológica, principalmente quando se tem uma proteína em pequena quantidade que pode ser melhor visualizada contra o campo escuro. A imunofluorescência permite a marcação de duas ou mais proteínas desde que se use mais de um anticorpo primário feito em espécies diferentes que permitam a marcação com anticorpos secundários contra diferentes espécies e marcados com fluorocromos de cor diversa. Em cultura de células é possível ter imagens precisas e tridimensionais através de microscopia confocal. No entanto, no tecido, a capacidade de visualização da arquitetura fica reduzida quando se usa imunofluorescência em comparação com a imuno-histoquímica com peroxidase.

No artigo citado acima, utilizou-se imunofluorescência para verificar se o NFkB, um fator de transcrição envolvido na produção de mediadores inflamatórios, encontrava-se ativado em neurônios entéricos. Com essa finalidade, utilizou-se um anticorpo contra a fração

dissociada do NFkB, isto é, a fração que transloca para o núcleo quando a via é ativada. Detectou-se uma marcação positiva para os dois marcadores (HuC/D e NFkB fração nuclear) nos animais tratados com 5-FU. Assim, foi possível concluir que o 5-FU induz ativação do fator de transcrição NFkB em neurônios entéricos (Figura 8) (COSTA et al., 2019).

**Figura 8 -** Imagens de imunofluorescência de jejuno de camundongos



**Fonte:** Costa et al. (2019).

**Nota:** Imagens de imunofluorescência de jejuno de camundongos marcadas para HuC/D (vermelho) e NFkB NLS (verde) e sua colocalização (amarelo). Os núcleos foram corados com DAPI (azul). Nota-se marcação de neurônios entéricos com fluorescência vermelha (seta) e na mesma localização, marcação com anticorpos para a fração nuclear de NFkB em verde (ponta de seta), sugerindo que o 5-FU induz ativação do NFkB em neurônios entéricos (COSTA et al., 2019).

A escolha da técnica e dos anticorpos utilizados pode trazer informações científicas importantes, porém o raciocínio, a análise, a observação e interpretação minuciosa da situação biológica são características essenciais de um bom investigador.

## REFERÊNCIAS

- ANÁLISE de imagens de imuno-histoquímica: área com imunomarcacão positiva. [S.l.: s.n.], 2021. 1 vídeo (5min59s). Publicado pelo canal Deiziane Viana da Silva Costa. Disponível em: <https://www.youtube.com/watch?v=FxLeUuVwPyY>. Acesso em: 22 set. 2021.
- ANÁLISE de imagens de imuno-histoquímica: contagem de células positivas por campo/amostras teciduais. [S.l.: s.n.], 2021. 1 vídeo (5min3s). Publicado pelo canal Deiziane Viana da Silva Costa. Disponível em: <https://www.youtube.com/watch?v=HU09WtMQ9aY>. Acesso em: 22 set. 2021.
- ANÁLISE de imagens de imuno-histoquímica: escore de imunomarcacão. [S.l.: s.n.], 2021. 1 vídeo (2min27s). Publicado pelo canal Deiziane Viana da Silva Costa. Disponível em: [https://www.youtube.com/watch?v=FIJG\\_aSLTNE](https://www.youtube.com/watch?v=FIJG_aSLTNE). Acesso em: 22 set. 2021.
- BAUMAN, Tyler M. *et al.* Quantitation of protein expression and co-localization using multiplexed immuno-histochemical staining and multispectral imaging. **Journal of Visualized Experiments**, v. 110, p. 1-9, 2016. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4913774/>. Acesso em: 6 jul. 2021.
- BURRY, Richard W. Controls for immunocytochemistry: an update. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, v. 59, n. 1, p. 6-12, 2011. Disponível em: <https://journals.sagepub.com/doi/pdf/10.1369/jhc.2010.956920>. Acesso em: 6 jul. 2021.
- COSTA, Deiziane V. S. *et al.* 5-Fluorouracil induces enteric neuron death and glial activation during intestinal mucositis via a S100B-RAGE-NFκB-dependent pathway. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1-14, Jan. 2019.
- DAVID, Dabbs J. **Diagnostic immunohistochemistry**: expert consult reference. 4th ed. Pittsburgh: Saunders, 2014.
- DURAIYAN, Jeyapradha *et al.* Applications of immunohistochemistry. **Journal of Pharmacy & Bioallied Sciences**, v. 4, p. S307-S309, Aug. 2012. Supplement 2. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3467869/>. Acesso em: 6 jun. 2021.
- ELIAS, Jules M.; MARGIOTTA, Michele; GABORC, Diane. Sensitivity and detection efficiency of the peroxidase antiperoxidase (PAP), avidin-biotin peroxidase complex (ABC), and peroxidase-labeled avidin-biotin (LAB) methods. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 92, n. 1, p. 62-67, 1989.
- FUERTE, L. *et al.* Immunohistochemistry in dermatopathology: a review of the most commonly used antibodies (part I). **Actas Dermo-Sifiliográficas**, v. 104, n. 2, p. 99-127, 2013. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23062957/>. Acesso em: 12 jul. 2021.
- JAISSWAL, Sushila. Role of immunohistochemistry in the diagnosis of central nervous system tumors. **Neurology India**, v. 64, p. 502-512, 2016.
- KIM, So-Woon; PARK, Chan-Sik. Immunohistochemistry for pathologists : protocols, pitfalls , and tips. **Journal of Pathology and Translational Medicine**, v. 50, p. 411-418, 2016.

LANDRY, Maude *et al.* Bone marrow immunohistochemistry and flow cytometry in the diagnosis of malignant hematologic diseases with emphasis on lymphomas: a comparative retrospective study. **Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology**, v. 28, n. 7, p. 508-512, 2020.

LIPMAN, Neil S. *et al.* Monoclonal versus polyclonal antibodies: distinguishing characteristics, applications, and information resources. **ILAR Journal Issue Themes**, v. 46, n. 3, p. 258-268, July 2005. Disponível em: <https://academic.oup.com/ilarjournal/article/46/3/258/738903>. Acesso em: 6 jul. 2021.

MAGAKI, Shino *et al.* An introduction to the performance of immunohistochemistry. **Methods in Molecular Biology (Clifton, N. J.)**, v. 1897, p. 289-298, 2019. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6749998/>. Acesso em: 6 jul. 2021.

MARTINS, Conceição S. *et al.* *Clostridioides difficile* toxin a-induced wnt/ $\beta$ -catenin pathway inhibition is mediated by rac1 glucosylation. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, p. 1-12, Aug. 2020. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2020.01998/full>. Acesso em: 6 jul. 2021.

MILLER, Rodney T. Avoiding pitfalls in diagnostic immunohistochemistry-important technical aspects that every pathologist should know. **Seminars in Diagnostic Pathology**, v. 36, n. 5, p. 312-335, Sept. 2019.

MOREIRA, Catarina. Anticorpo monoclonal. **Revista de Ciência Elementar**, v. 2, n. 2, p. 151, 2014.

RADULESCU, Razvan Tudor; BOENISCH, Thomas. Blocking endogenous peroxidases: a cautionary note for immunohistochemistry. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 11, n. 6, p. 1419, 2007. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4401301/>. Acesso em: 7 jul. 2021.

RAMOS-VARA, José A. *et al.* Suggested guidelines for immunohistochemical techniques in veterinary diagnostic laboratories. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 20, n. 4, p. 393-413, 2008.

SCALIA, Carla Rossana *et al.* Antigen Masking During Fixation and Embedding, Dissected. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v. 65, n. 1, p. 5-20, 2017.

SCHACHT, Vivien; KERN, Johannes S. Basics of immunohistochemistry. **The Journal of Investigative Dermatology**, v. 35, n. 3, p. 1-4, Mar. 2015. Disponível em: <https://www.jidonline.org/action/showPdf?pii=S0022-202X%2815%2937149-9>. Acesso em: 6 jul. 2021.

SWANSON, Paul E. Immunohistochemistry as a surrogate for molecular testing: a review. **Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology**, v. 23, n. 2, p. 81-96, 2015.

TAYLOR, Cliver R. Immunohistochemistry in surgical pathology: principles and practice. **Methods in Molecular Biology**, p. 81-109, 2014.

TOLOSA, Erasmo Magalhães Castro de *et al.* **Manual de técnicas para histologia normal e patológica**. Barueri: Manole, 2003.



UMEMURA, Shinobu *et al.* Immunohistochemical evaluation of hormone receptors in breast cancer: which scoring system is suitable for highly sensitive procedures? **Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology**, v. 12, n. 1, p. 8-13, 2004.

VIZECHI, Marcelo Aparecido de Freitas *et al.* A imuno-histoquímica como um auxílio na distinção entre tumores benignos e malignos. **Perspectivas Médicas**, v. 27, n. 1, p. 15-25, 2016. Disponível em: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=243246722003>. Acesso em: 21 set. 2021.

WARD, J. M.; REHG, J. E. Rodent immunohistochemistry: pitfalls and troubleshooting. **Veterinary Pathology**, v. 51, n. 1, p. 88-101, 2014. Disponível em: [https://journals.sagepub.com/doi/10.1177/0300985813503571?url\\_ver=Z39.88-2003&rfr\\_id=ori:rid:crossref.org&rfr\\_dat=cr\\_pub%20%20pubmed](https://journals.sagepub.com/doi/10.1177/0300985813503571?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori:rid:crossref.org&rfr_dat=cr_pub%20%20pubmed). Acesso em: 6 jul. 2021.

WEBSTER, J. D. *et al.* Effects of prolonged formalin fixation on the immunohistochemical detection of infectious agents in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. **Veterinary Pathology**, v. 47, n. 3, p. 529-535, Mar. 2010. Disponível em: [https://journals.sagepub.com/doi/10.1177/0300985809359607?url\\_ver=Z39.88-2003&rfr\\_id=ori:rid:crossref.org&rfr\\_dat=cr\\_pub%20%20pubmed](https://journals.sagepub.com/doi/10.1177/0300985809359607?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori:rid:crossref.org&rfr_dat=cr_pub%20%20pubmed). Acesso em: 6 jul. 2021.

# Temática



## 12 MÉTODOS DE HISTOQUÍMICA PARA AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA DA CARTILAGEM ARTICULAR

Virgínia Cláudia Carneiro Girão-Carmona  
Margarida Maria de Lima Pompeu  
Ana Caroline Rocha de Melo Leite  
Ana Carolina Matias Dinelly Pinto  
Mirna Marques Bezerra Brayner  
Francisco Ailton Castro da Rocha



### O QUE SERÁ FEITO?

A cartilagem articular pode ser analisada por meio de colorações especiais, como a coloração por Safranina O, já que as colorações tradicionais usadas no processamento histológico padrão, como hematoxilina e eosina (HE), permitem apenas o tingimento de detalhes estruturais das células, como o núcleo e o citoplasma.

Por sua vez, a histoquímica, por se referir a métodos especiais de coloração que possibilitam a marcação de componentes e/ou constituintes estruturais presentes em uma amostra de tecido (KIERNAN, 1999), possibilita o estudo dos constituintes químicos de um tecido, por meio de reagentes de coloração (MORIN; AVRIL, 2019).

Nesse contexto, a coloração por Safranina O representa um importante método de marcação de componentes estruturais presentes na matriz da cartilagem, permitindo a avaliação do referido tecido, inclusive por meio de parâmetros quantitativos.



### POR QUE SERÁ FEITO?

O tecido cartilaginoso existe no corpo sob a forma de peças cartilaginosas de tamanhos muito variados. Uma de suas funções principais é estrutural, além de revestir as superfícies articulares. Esse revestimento, por ser liso, possibilita a interação com outra superfície cartilaginosa, quase sem atrito (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013). Ainda nas articulações, além da superfície lisa das cartilagens, há quase sempre líquido sinovial, que contribui para o deslizamento adequado entre as superfícies cartilaginosas. Contudo, a matriz extracelular firme e flexível desse tecido o torna resistente a tensões mecânicas (KIERSSZENBAUM; TRES, 2016).

No entanto, existem importantes doenças osteoarticulares que cursam com o comprometimento da cartilagem, especialmente em regiões como as articulações dos joelhos e das mãos, além de lesões nos meniscos.

A osteoartrite (OA) é, sem dúvida, um dos problemas crônicos de saúde mais importantes em humanos e afeta milhões de pessoas todo ano (CUI et al., 2020). Apesar dos conhecimentos acerca das suas consequências sobre a saúde pública, informações a respeito da patogênese da OA, especialmente quanto ao estabelecimento precoce das lesões que causam dano articular, não são plenamente entendidas. Diante disso, é fundamental o desenvolvimento de ferramentas eficazes e capazes de auxiliar na compreensão do estabelecimento das lesões iniciais que possam ajudar no seu diagnóstico precoce e, inclusive, direcionar opções de tratamento (MCCOY, 2015).

A avaliação da lesão na cartilagem articular se apresenta então como uma importante forma de estudar os mecanismos envolvidos na evolução dessa doença, além de possivelmente sugerir a sua gravidade e extensão.



## ONDE SERÁ FEITO?

Diferentes modelos experimentais têm sido utilizados para estudar OA. Eles podem ser modelos espontâneos, incluindo modelos genéticos e de ocorrência natural da doença, ou induzidos, principalmente por manipulação cirúrgica ou injeção intra-articular de produtos químicos (MCCOY et al., 2015). Independente do modelo experimental utilizado, amostras de tecido cartilaginoso permitem a realização de diferentes métodos de estudo acerca dos componentes da cartilagem.

Assim, a coleta da articulação femorotibial permitirá a preservação de seus componentes anatômicos e da morfologia da cartilagem articular. Após o processamento histológico clássico, amostras das articulações coletadas serão cortadas, com espessura de 3 a 5µm, e coradas por HE, para a análise da sua forma, e por Safranina O, para o estudo detalhado do grau de comprometimento da lesão por AO. Seguirá os critérios preestabelecidos pela Sociedade Internacional de Pesquisa em Osteoartrite (OARSI) (GLASSON et al., 2010; GERWINY et al., 2010).



## QUANDO SERÁ FEITO?

A análise morfométrica da cartilagem tem sido utilizada quando um dos objetivos do estudo diz respeito a avaliar o grau de comprometimento da lesão articular. Diferentes estudos utilizam técnicas histopatológicas como padrão ouro para avaliação de seus resultados, independentemente do modelo animal de OA utilizado.

Collins e McElligott (1960) propuseram o primeiro sistema de graduação para análise macroscópica da cartilagem com OA. Em seguida, Mankin et al. (1971) elaboraram uma análise microscópica, levando em conta a correlação da morfologia com dados bioquímicos e metabólicos, ficando conhecida por Escores de Mankin ou Sistema de Graduação Histológico-Histoquímico. Este método foi baseado na análise microscópica de OA de quadril em estágio final.

No entanto, estudos mais recentes observaram que esse sistema é menos útil para doença em estágio inicial, além de estar sujeito à significativa variabilidade intra e interobservador (PRITZKER et., 2003; PRITZKER et al., 2006). É importante destacar que a variedade de sistemas de pontuação para análise da lesão da cartilagem articular pode comprometer a comparação dos resultados entre os estudos.

Diante dessa problemática, a OARSI desenvolveu um novo sistema de classificação para abordar a gravidade ("classificação") e a extensão ("estadiamento") das lesões de OA (CUSTERS et al., 2007).

Mais recentemente, a OARSI padronizou sistemas de pontuação para as diferentes espécies que são utilizadas como modelo experimental de OA (AIGNER et al., 2010.)



## POR QUEM/COM O QUE SERÁ FEITO?

Para o processamento de amostras da articulação, as etapas abaixo devem ser seguidas:

1. Fixação das amostras em formol tamponado a 10%.
2. Descalcificação das amostras em solução de EDTA 20%.
3. Processamento histológico (Ver Capítulo 10).
4. Inclusão em parafina.
5. Microtomia (3 a 5µm).
6. Coloração para Safranina O.

Para a etapa 6, coloração, as seguintes soluções devem ser previamente preparadas:

### **Cloreto férrico 29%**

2,9 g – Cloreto férrico  
100 mL – água destilada

### **Ácido acético 1%**

1 mL – ácido acético glacial  
99 mL – água destilada

### **Hematoxilina férrica diária**

#### **Solução A**

1 g – Hematoxilina férrica  
100 mL – Álcool absoluto

A solução deve ser dissolvida sob agitação por, aproximadamente, 1 hora. Em seguida, deve ser filtrada e armazenada em frasco âmbar.

#### **Solução B**

4 mL – Cloreto férrico 29%  
95 mL – Água destilada  
1 mL - Ácido clorídrico

Essa solução deve ser agitada com o auxílio de um bastão de vidro.

### **Fast Green 0,001%**

0,1 g – *Fast Green*  
1000 mL – Água destilada

A solução deve ser dissolvida sob agitação por, aproximadamente, 1 hora. Em seguida, deve ser filtrada e armazenada em frasco âmbar.

### **Safranina O 0,01%**

0,1g – Safranina O  
100 mL – Água destilada

A solução deve ser dissolvida sob agitação por, aproximadamente, 1 hora. Em seguida, deve ser filtrada e armazenada em frasco âmbar.

Para que as lâminas sejam coradas por Safranina O, as etapas aqui apresentadas devem ser seguidas:

1. Xilol I - 10 passagens
2. Xilol II - 10 passagens
3. Xilol + álcool absoluto (1:1) - 10 passagens
4. Álcool absoluto I - 10 passagens
5. Álcool absoluto II - 10 passagens
6. Álcool 95% - 10 passagens
7. Álcool 70% - 10 passagens
8. Água destilada - 10 passagens
9. Solução diária de Hematoxilina férrica 2% - 4 minutos
10. Escorrer a lâmina
11. Lavar em água corrente - 10 minutos
12. *Fast Green* - 3 minutos
13. Ácido acético 1% - passagem rápida - 10 a 15 segundos
14. Safranina O - 5 minutos
15. Álcool 70% - 10 passagens
16. Álcool 95% - 10 passagens
17. Álcool absoluto I - 10 passagens
18. Álcool absoluto II - 10 passagens
19. Xilol + álcool absoluto (1:1) - 10 passagens
20. Xilol - 10 passagens
21. Montar a lâmina com bálsamo de Fischer

Após a conclusão da coloração, as lâminas devem ser submetidas à análise sob microscopia óptica, segundo os critérios estabelecidos por Glasson et al. (2010), quando for uma amostra de articulação de camundongo, ou por Gerwiny et al. (2010), quando se tratar de uma amostra de articulação de rato.



## COMO SERÁ FEITO?

A análise morfológica da articulação do joelho deve ser realizada em amostra dessa articulação, previamente cortada em duas metades aproximadamente iguais, uma anterior e outra posterior, ao longo do ligamento colateral medial, no plano frontal.

As duas metades (anterior e posterior) devem ser incluídas, se possível, em um mesmo bloco de parafina, com os planos de corte voltados para baixo. As seções histológicas resultantes incluirão ambos os côndilos femorais, planaltos tibiais e meniscos (GERWIN et al; 2010).

Os métodos de pontuação para os parâmetros que serão avaliados poderão ser utilizados para analisar o platô tibial medial (PTM) e/ou o no côndilo femoral medial (CFM). A decisão de avaliar ou não o côndilo femoral lateral e o platô tibial lateral dependem do modelo utilizado para indução da OA.

Considerando a metodologia sugerida pela OARSI e descrita por Gerwin et al. (2010), os seguintes parâmetros são avaliados:

1. Largura de perda da matriz da cartilagem.
2. Pontuação de degeneração da cartilagem.
3. Largura total da degeneração da cartilagem.
4. Largura significativa da degeneração da cartilagem.
5. Razão de profundidade zonal de lesões.
6. Osteófitos.
7. Pontuação de cartilagem calcificada e dano ósseo subcondral.
8. Reação sinovial.
9. Reparação da cápsula da articulação medial.
10. Espessura da placa de crescimento.

Esses parâmetros devem ser analisados de forma “cega” por dois pesquisadores diferentes, os quais irão atribuir graus de 0 a 4 ou de 0 a 5, a depender do parâmetro para cada um dos itens observados na amostra estudada. Se três seções por articulação são analisadas, o erro padrão médio (SE) para cada parâmetro ou medição é determinado a fim de obter uma pontuação total da articulação. A análise estatística é realizada usando ANOVA. Os parâmetros medidos, como a largura da degeneração da cartilagem, são analisados usando métodos ANOVA



paramétricos. Quando vários grupos de tratamento são comparados, diversos procedimentos de comparação, como correção de Bonferroni ou Tukey, são usados. O teste de Dunnett é aplicado quando apenas as comparações com o veículo são de interesse. Os parâmetros pontuados são analisados usando um teste de Kruskal-Wallis com o pós-teste de Dunn (GERWIN et al., 2010).

Em estudos utilizando camundongos em modelo experimental de OA, uma pontuação histológica simples pode ser utilizada. Um sistema de pontuação subjetivo com atribuição de escores de 0 e 6 pode ser aplicado a todos os quatro quadrantes da articulação. A gravidade da OA é expressa como pontuações somadas e/ou máximas que podem ser combinadas para toda a articulação ou divididas para platô tibial medial (PTM), côndilo femoral medial (CFM), platô tibial lateral (PLT) e côndilo femoral lateral (CLF). Essa análise deve seguir sistema de pontuação semiquantitativo segundo (GLASSON et al., 2010).



## QUANTO TEM SIDO USADO NA PESQUISA?

A iniciativa da OARSI em definir parâmetros específicos para as diferentes espécies animais que são utilizadas nos estudos experimentais de OA, bem como em sugerir e incentivar seu uso, foi fundamental para permitir uma padronização na análise morfológica da lesão que se estabelece na cartilagem articular acometida, dessa forma, favorecendo a comparação entre os estudos.

As metodologias de análise empregadas descrevem um esquema reprodutível e preciso para a avaliação histológica de lesões de OA em diferentes espécies e podem ser usadas de forma reprodutível por indivíduos com experiência variável na avaliação histopatológica da OA.

Além disso, é importante destacar que o estudo da morfologia da cartilagem articular, como descrita neste capítulo, foi usado efetivamente em vários estudos experimentais de OA em ratos para avaliação da eficácia de tratamentos da doença (MOORE et al., 2005; BARAGI et al., 2009; FLANNERY et al., 2009; GEEWIN et al., 2010).

De fato, o sistema de pontuação semiquantitativa proposto por Glasson et al. (2010) é relativamente fácil de aplicar, inclusive por avaliadores inexperientes. A reprodutibilidade nas pontuações para uma implantação costuma ser excelente, permitindo uma avaliação rápida e completa das alterações histológicas, por meio de uma articulação de joelho OA murina.

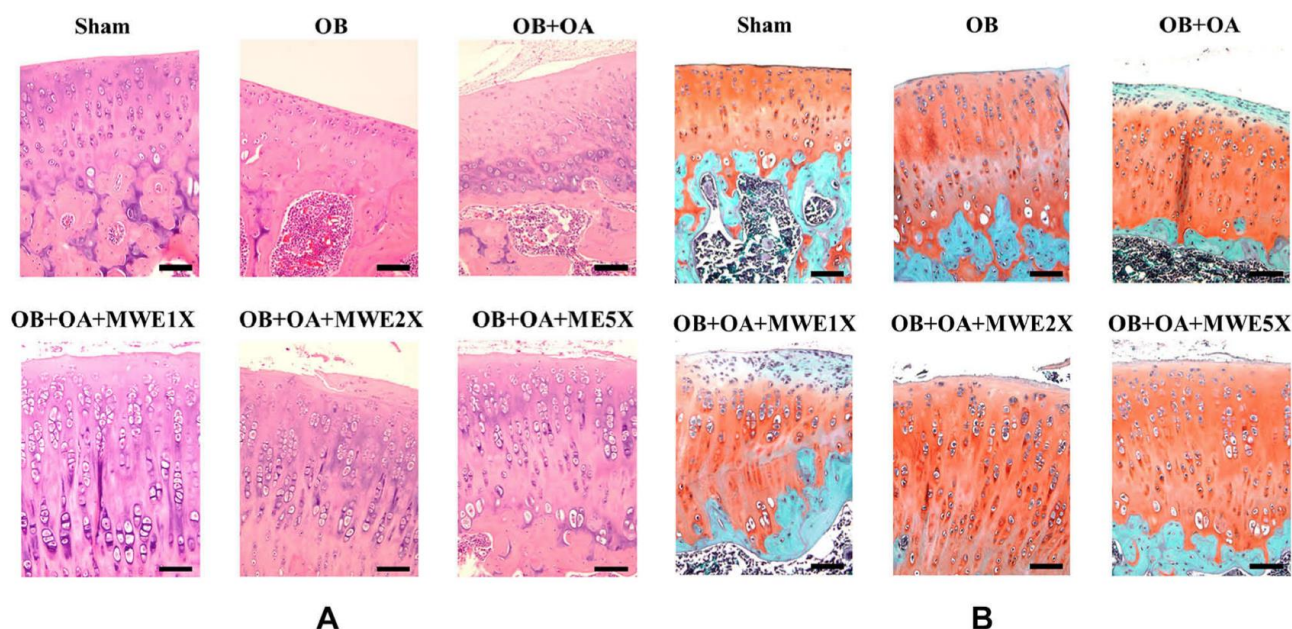
Nesse contexto, alguns resultados mostram-se bastante importantes para a compreensão dos eventos que ocorrem na OA experimental.

Em um estudo proposto por Leite et al. (2014), mostrou-se que a transecção meniscal, em vez da excisão, aumenta o comportamento da dor e os danos estruturais na OA experimental em camundongos.

Por meio da análise da lesão da cartilagem articular, foi demonstrado que a combinação de glucosamina e sulfato de condroitina fornece benefício funcional e estrutural no modelo de transecção do ligamento cruzado anterior (SILBA JÚNIOR et al., 2009) e as características estruturais são cruciais para os benefícios da goma guar no tratamento da osteoartrite experimental (CASTRO et al., 2016).

Estudos recentes em ratos obesos mostraram que o extrato de água de mexilhão azul (*Mytilus edulis*) melhora a resposta inflamatória e o estresse oxidativo na osteoartrite naqueles animais. As imagens da articulação dos animais revelam claramente os efeitos do tratamento e consolidam os resultados obtidos (CHANG et al., 2020).

**Figura 1 - Fotomicrografia da articulação do joelho**



**Fonte:** Chang et al. (2020).

**Obs.:** (A) Hematoxilina e eosina (H&E) e (B) Coloração de Safranina O após tratamento com extrato de água de *Mytilus edulis* por 6 semanas.

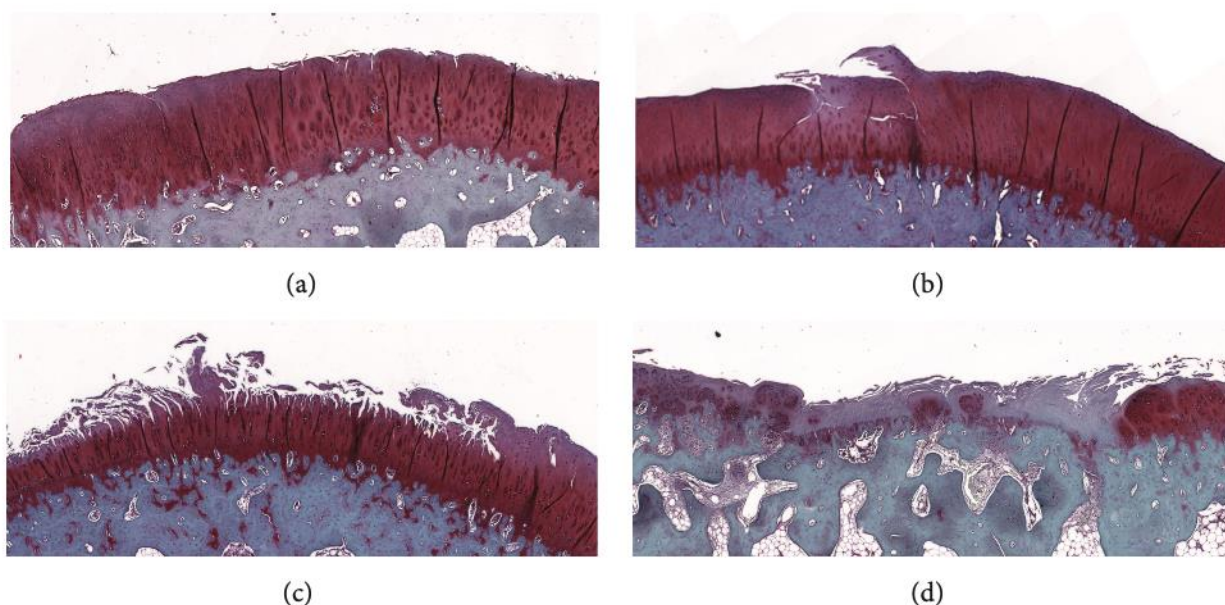
**Notas:** A interpretação da Safranina O: cartilagem (laranja a vermelho), citoplasma (azulado ou verde acinzentado) e núcleos (preto). A escala negra representa 5  $\mu$ m.

**Abreviaturas:** MWE: extrato de água *Mytilus edulis*; OA: osteoartrite e OB: obeso.

Em outro estudo envolvendo animais obesos, a análise da lesão da cartilagem articular também foi importante para mostrar que carnosina previne osteoartrite induzida por diabetes tipo 2, por meio da via ROS/NF- $\kappa$ B (YANG et al., 2018).

Os danos da cartilagem em cada sub-região foram classificados e pontuados de acordo com a metodologia sugerida pela OARS para coelhos, com o intuito de avaliar o efeito da renovação da cartilagem relacionada com a idade no soro C-telopeptídeo de colágeno tipo II e níveis de osteocalcina em coelhos em crescimento com e sem osteoartrite induzida cirurgicamente (HUANG et al., 2014). Neste estudo, as imagens destacam, de forma inequívoca, o comprometimento da cartilagem articular e podem ser observadas abaixo (Figura 2).

**Figura 2 - Fotomicrografia da articulação do joelho de coelhos corados com Safranina O**



**Fonte:** Huang et al. (2014).

**Notas:** a) Grau 3: fissura simples na cartilagem com abrasão da superfície e perda da matriz na zona superficial; (b) Grau 3.5: fissura ramificada que se estende até a zona profunda da cartilagem; (c) Grau 4.5: erosão da cartilagem com superfícies fibriladas e escavação da zona média; (d) Grau 5.5: desnudação da cartilagem com tecido de fibrocartilagem reparador na superfície óssea.

Esse método de análise proposto pela OARSI costuma ser suficientemente sensível para a seleção dos modelos ou alvos de drogas mais promissoras e quaisquer articulações de interesse podem ser submetidas a análises histológicas detalhadas.

Dado que o campo OA é relativamente pequeno e a distribuição de modelos experimentais, camundongos “knockout” e drogas modificadoras da doença para OA são limitados, é muito importante que obtenhamos um paradigma comum para quantificar a magnitude da mudança observada em qualquer um deles. Isso permitirá que a comunidade científica avalie os fatores que impulsionam as mudanças maiores e menores associadas à progressão da OA em modelos experimentais.

## REFERÊNCIAS

AIGNER, T. *et al.* Histopathology atlas of animal model systems: overview of guiding principles. **Osteoarthritis Cartilage**, v. 18, p. S2-S6, Oct. 2010. Supplement 3. Disponível em: [https://www.oarsijournal.com/article/S1063-4584\(10\)00250-5/fulltext](https://www.oarsijournal.com/article/S1063-4584(10)00250-5/fulltext). Acesso em: 18 fev. 2021.

BARAGI, Vijaykumar M. *et al.* A new class of potent matrix metalloproteinase 13 inhibitors for potential treatment of osteoarthritis: evidence of histologic and clinical efficacy without musculoskeletal toxicity in rat models. **Arthritis & Rheumatology**, v. 60, n. 7, p. 2008-2018, July 2009. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19565489/>. Acesso em: 18 fev. 2021.

BRODY, David Eliot. **As sete maiores descobertas científicas da história e seus autores.** Tradução Laura Teixeira Motta. São Paulo: Companhia das Letras, 1999. Título original: The science class you wish you had.

CHANG, Heng-Wei *et al.* Blue Mussel (*Mytilus edulis*) water extract Ameliorates inflammatory responses and oxidative stress on osteoarthritis in obese rats. **Journal of Pain Research**, v. 13, p. 1109-1119, 2020. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7293401/>. Acesso em: 18 fev. 2021.

COLLINS, D. H.; MCELLIGOTT, T. F. Sulphate ( $^{35}\text{S}\text{O}_4$ ) uptake by chondrocytes in relation to histological changes in osteoarthritic human articular cartilage. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 19, p. 318-330, 1960. Disponível em: <https://ard.bmj.com/content/19/4/318>. Acesso em: 18 fev. 2021.

CREEMERS, L. B.; RUTGERS, M.; SARIS, D. B. Evaluation of histological scoring systems for tissue-engineered, repaired and osteoarthritic cartilage. **Osteoarthritis Cartilage**, v. 18, n. 7, p. 1002, July 2010. Disponível em: [https://www.oarsijournal.com/article/S1063-4584\(10\)00077-4/fulltext](https://www.oarsijournal.com/article/S1063-4584(10)00077-4/fulltext). Acesso em: 18 fev. 2021.

CUI, Aiyong *et al.* Global, regional prevalence, incidence and risk factors of knee osteoarthritis in population-based studies. **EClinicalMedicine**, v. 29, p. 29-30, Dec. 2020.

CUSTERS, R. J. *et al.* Reliability, reproducibility and variability of the traditional histologic/histochemical grading system vs the new OARSI osteoarthritis cartilage histopathology assessment system. **Osteoarthritis Cartilage**, v. 15, n. 11, p. 1241-1248, Nov. 2007. Disponível em: [https://www.oarsijournal.com/article/S1063-4584\(07\)00163-X/abstract](https://www.oarsijournal.com/article/S1063-4584(07)00163-X/abstract). Acesso em: 18 fev. 2021.

FLANNERY, Carl R. *et al.* Prevention of cartilage degeneration in a rat model of osteoarthritis by intraarticular treatment with recombinant lubricin. **Arthritis & Rheumatology**, v. 60, n. 3, p. 840-847, Mar. 2009. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19248108/>. Acesso em: 18 fev. 2021.

GERWIN, N. *et al.* The OARSI histopathology initiative: recommendations for histological assessments of osteoarthritis in the rat. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 18, p. S24-S34, 2010. Supplement 3.

GLASSON, S. *et al.* The OARSI histopathology initiative: recommendations for histological assessments of osteoarthritis in the mouse. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 18, p. S17-S23, Oct. 2010. Supplement 3. Disponível em: [https://www.oarsijournal.com/article/S1063-4584\(10\)00238-4/fulltext](https://www.oarsijournal.com/article/S1063-4584(10)00238-4/fulltext). Acesso em: 18 fev. 2021.

HUANG, Chung-Cheng *et al.* Effect of age-related cartilage turnover on serum c-telopeptide of collagen type ii and osteocalcin levels in growing rabbits with and without surgically induced osteoarthritis. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 1-9, Mar. 2014. Disponível em: <https://www.hindawi.com/journals/bmri/2014/284784/>. Acesso em: 18 fev. 2021.

KIERNAN, J. A. **Histological and histochemical methods: theory and practice**. 3th ed. [S.l.]: Arnold, 1999.

MANKIN, Henry J. *et al.* Biochemical and metabolic abnormalities in articular cartilage from osteo-arthritic human hips: II: correlation of morphology with biochemical and metabolic data. **Journal of Bone Joint Surgery**, v. 53, n. 3, p. 523-537, Apr. 1971.

MCCOY, A. M. Animal models of osteoarthritis: comparisons and key considerations. **Veterinary Pathology**, v. 52, n. 5, p. 803-818, 2015. Disponível em: <https://journals.sagepub.com/doi/10.1177/0300985815588611>. Acesso em: 18 fev. 2021.

MOORE, E. E. *et al.* Fibroblast growth factor-18 stimulates chondrogenesis and cartilage repair in a rat model of injury-induced osteoarthritis. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 13, n. 7, p. 623-631, 2005. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1063458405000762>. Acesso em: 18 fev. 2021.

MORIN, Claire; AVRIL, Stéphane. Volume fraction of fibers at the macroscopic scale. *In*: NARAYAN, Roger. **Encyclopedia of biomedical engineering**. [S.l.]: Elsevier, 2019.

OYEJIDE, L.; MIKAELIAN, I. Molecular pathology. *In*: FAQI, Ali Said. **A comprehensive guide to toxicology in nonclinical drug development**. 2nd. ed. [S.l.]: Academic Press, 2017.

PRITZKER, K. P. *et al.* Osteoarthritis cartilage histopathology: grading and staging. **Osteoarthritis Cartilage**, v. 14, n. 1, p. 13-29, Jan. 2006. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1063458405001974>. Acesso em: 18 fev. 2021.

PRITZKER, K. P. H.; LAVERTY, S. P.; MENDES, M. G. Histopathologic grading of osteoarthritis. **Osteoarthritis Cartilage**, v. 11, p. S9, 2003. Supplement 9.

STOOP, Reinout *et al.* Differences in type II collagen degradation between peripheral and central cartilage of rat stifle joints after cranial cruciate ligament transection. **Arthritis & Rheumatology**, v. 43, n. 9, p. 2121-2131, Sept. 2000. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11014364/>. Acesso em: 18 fev. 2021.

SILVA JR., Francisco Saraiva *et al.* Combined glucosamine and chondroitin sulfate provides functional and structural benefit in the anterior cruciate ligament transection model. **Clinical Rheumatology**, v. 28, p. 109-117, 2009.

YANG, Yue *et al.* Carnosine prevents type 2 diabetes-induced osteoarthritis through the ROS/NF- $\kappa$ B pathway. **Frontiers in Pharmacology**, v. 9, p. 1-13, June 2018. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5997783/>. Acesso em: 18 fev. 2021.

## SUGESTÕES DE LEITURAS

COOK, J. L. *et al.* The OARSI histopathology initiative: recommendations for histological assessments of osteoarthritis in the dog. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 18, p. S66-S79, Oct. 2010. Supplement 3. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1063458410002372>. Acesso em: 18 fev. 2021.

KRAUSY, V. B. *et al.* The OARSI histopathology initiative: recommendations for histological assessments of osteoarthritis in the guinea pig. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 18, p. S35-S52, Oct. 2010. Supplement 3. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1063458410002347>. Acesso em: 18 fev. 2021.

KWOK, J. *et al.* Histopathological analyses of murine menisci: implications for joint aging and osteoarthritis. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 24, n. 4, p. 709-718, Apr. 2016. Disponível em: [https://www.oarsijournal.com/article/S1063-4584\(15\)01387-4/abstract](https://www.oarsijournal.com/article/S1063-4584(15)01387-4/abstract). Acesso em: 18 fev. 2021.

LAVERTYY, S. *et al.* The OARSI histopathology initiative e recommendations for histological assessments of osteoarthritis in the rabbit. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 18, p. S53-S65, Oct. 2010. Supplement 3. Disponível em: [https://www.oarsijournal.com/article/S1063-4584\(10\)00244-X/abstract](https://www.oarsijournal.com/article/S1063-4584(10)00244-X/abstract). Acesso em: 18 fev. 2021.

LITTLE, C. B. *et al.* The OARSI histopathology initiative: recommendations for histological assessments of osteoarthritis in sheep and goats. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 18, p. S80-S92, Oct. 2010. Supplement 3. Disponível em: [https://www.oarsijournal.com/article/S1063-4584\(10\)00235-9/abstract](https://www.oarsijournal.com/article/S1063-4584(10)00235-9/abstract). Acesso em: 18 fev. 2021.

MCILWRAITH, C. W. *et al.* The OARSI histopathology initiative: recommendations for histological assessments of osteoarthritis in the horse. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 18, p. S93-S105, Oct. 2010. Supplement 3. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1063458410002517>. Acesso em: 18 fev. 2021.

NAGIRA, Keita *et al.* Histological scoring system for subchondral bone changes in murine models of joint aging and osteoarthritis. **Scientific Reports**, v. 10, p. 1-14, 2020. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41598-020-66979-7>. Acesso em: 18 fev. 2021.

WALDSTEIN, Wenzel *et al.* OARSI osteoarthritis cartilage histopathology assessment system: a biomechanical evaluation in the human knee. **Journal Of Orthopaedic Research**, p. 135-140, Jan. 2016. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/jor.23010>. Acesso em: 18 fev. 2021.

## 13 AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA DE ANOMALIAS CONGÊNITAS ESTRUTURAIS EM FETOS DE ROEDORES

José Eduardo Baroneza  
Giulliano Rezende Silva  
Lívia Thais Gontijo Miranda  
Shirley Aline da Costa Arteaga da Silva  
Aline Pic-Taylor



### O QUE SERÁ FEITO?

As anomalias congênitas estruturais que acometem o esqueleto e os órgãos moles podem ser analisadas em fetos de roedores utilizando técnicas variadas. Nos laboratórios de pesquisa em toxicologia do desenvolvimento, defeitos grosseiros na forma corpórea fetal podem ser observados a olho nu ou com auxílio de estereomicroscópios. Entretanto, para realizar a análise de anomalias internas é necessário o emprego de métodos distintos que permitam visualizar os constituintes do esqueleto em fetos não seccionados e os órgãos moles em fetos seccionados (ORGANISATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT, 2004; COOK; FAIRWEATHER, 1968).

Para a avaliação de anomalias esqueléticas, o feto deve ser preparado de modo que parte de suas vísceras sejam retiradas e os órgãos moles remanescentes se tornem translúcidos, ao mesmo tempo que os ossos e/ou as cartilagens sejam corados. A investigação de anomalias nos órgãos moles, por sua vez, é realizada a partir de técnica na qual o feto fixado é submetido a secções em regiões estratégicas por meio das quais são obtidos segmentos corporais que serão analisados. O uso de estereomicroscópios é fundamental para as análises.

É recomendável que o pesquisador possua conhecimento prévio de anatomia fetal do modelo biológico que será utilizado no estudo, uma vez que cada constituinte corado do esqueleto é avaliado individualmente quanto à possibilidade de alterações em relação ao normal. Além disso, o pesquisador deve conhecer a constituição, a forma, o volume, a posição e as relações anatômicas esperadas dos órgãos moles, tais como: rins, fígado, coração, cérebro, timo, intestino, pulmão, olhos, bexiga urinária e gônadas. Para classificar e denominar as distintas malformações, sugerimos seguir como guia de referência a Classificação Internacional de Doenças (CID) (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2016), atentando para as diferenças anatômicas entre modelos experimentais e humanos.





## POR QUE SERÁ FEITO?

A **Teratologia** foi historicamente definida como o ramo da embriologia e da patologia que estuda as anomalias congênitas (SEIFER, 2008). Hoje tem sido mais utilizado o conceito de **toxicologia do desenvolvimento** como referência a esta área (TYL, 2014), uma vez que a origem da palavra teratologia está associada ao termo grego *Teras*, que significa monstro, vocábulo que deprecia os acometidos por problemas no desenvolvimento. Entretanto, ainda são classificados como **teratógenos** os agentes químicos, físicos ou biológicos que, ao serem expostos a embriões ou fetos no período compreendido entre a fecundação e o nascimento, têm a capacidade de induzir anomalias congênitas (FENDERSON, 2008).

Os testes de toxicidade no desenvolvimento em modelos animais de mamíferos são recomendados por distintos órgãos reguladores (ORGANISATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT, 2018; AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2013) e visam prever a segurança da exposição de embriões e de fetos a potenciais teratógenos (KLAASSEN; WATKINS, 2012). A maioria dos testes é conduzida com o intuito de verificar se a exposição a tais agentes tem a capacidade de causar **anomalias estruturais congênitas**, que compreendem aquelas relacionadas a alterações macro anatômicas nos órgãos analisados. As avaliações celular, bioquímica, histológica, genética e molecular, por sua vez, são também muito importantes, uma vez que os mecanismos de toxicidade no desenvolvimento podem estar associados a alterações na expressão gênica, à inibição das interações celulares ou ao bloqueio dos movimentos celulares (FENDERSON, 2008).

As anomalias estruturais congênitas compreendem as malformações e as variações, que, embora a terminologia embriológica por vezes divirja, podem ser definidas como (SOLECKI et al., 2003):

- **Malformações** - Defeitos morfológicos de um órgão ou de uma região maior do corpo resultantes de um processo de desenvolvimento intrinsecamente anormal. O termo intrínseco se refere aos mecanismos moleculares e celulares envolvidos na organogênese. Moléculas de tais mecanismos podem ser alteradas por mutações, teratógenos ou efeitos combinados de ambos. Uma malformação pode ser causada por um teratógeno se este influenciar a função de tais moléculas de modo que o processo de desenvolvimento seja alterado (HENNEKAN et al., 2013). As malformações geralmente ocorrem com baixa

frequência na população e são capazes de causar prejuízo na sobrevivência e/ou no crescimento e/ou na função do segmento corporal envolvido (US DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES, 2011).

- **Variações** - Alterações estruturais menores que podem ocorrer em um órgão ou em uma região maior do corpo numa frequência menor que o normal, embora maior que as malformações, geralmente entre 2,5% e 10% da população. As variações podem representar um atraso no desenvolvimento, sendo, dessa maneira, transitórias ou alterações permanentes, e tendem não afetar a sobrevivência, o crescimento e a função do segmento corporal envolvido (HENNEKAN et al., 2013; US DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES, 2011).

Quando malformações múltiplas estiverem associadas a uma origem comum, de natureza genética ou em decorrência da exposição a teratógenos ambientais, e tais malformações não puderem ser explicadas com base em um único defeito inicial, mas, em vez disso, parecerem ser a consequência de múltiplos defeitos em um ou mais tecidos, o conjunto dessas constituirá uma **Síndrome Malformativa** (IKEDA; JONES, 2007). Outras anomalias congênitas isoladas incluem as disrupções, as deformações e as displasias, cuja análise não é o objetivo deste capítulo. Para consulta acerca da terminologia dos defeitos congênitos, sugerimos a leitura de Hennekam et al. (2013).



## ONDE SERÁ FEITO?

De acordo com os principais organismos internacionais que estabelecem as diretrizes para ensaios de toxicologia do desenvolvimento, estes devem ser realizados com espécies de mamíferos, utilizando roedores, preferencialmente ratos, e não roedores, preferencialmente coelhos (EUROPEAN MEDICINES AGENCY, 2020; ORGANISATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT, 2018; US DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES, 2011).

Os primeiros testes devem ser realizados com roedores. Embora a maior parte dos guias sugira que ratos sejam estudados preferencialmente, muitos estudos têm sido conduzidos com camundongos (COLLINS, 2006). Fetos de ratos são maiores que de camundongos, o que

facilita a investigação das anomalias estruturais. Os ensaios com coelhos devem acontecer somente se os testes com roedores evidenciarem efeito adverso no desenvolvimento destes.

É imprescindível que as instalações, as condições ambientais, o manejo e os cuidados com os animais sigam os padrões recomendados pelas diretrizes internacionais, entre elas as contidas no Guia de Cuidados e Uso de Animais de Laboratório (COMMITTEE FOR THE UPDATE OF THE GUIDE FOR THE CARE AND USE OF LABORATORY ANIMALS, 2018). Além disso, é necessário que os animais selecionados para a pesquisa estejam sexualmente maduros e uniformes quanto ao peso e à idade. Devem ser mantidos em gaiolas individuais ou em pequena quantidade, em alojamento com iluminação artificial, com períodos de claro e escuro de 12 horas cada, e suprimento de água filtrada e ração ilimitada. A temperatura deve ser controlada, permanecendo em  $22 \pm 3$  °C (para roedores), e a umidade do ar pode variar entre 30 e 70% (ORGANISATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT, 2018).

As conclusões dos ensaios com modelos animais não devem ser diretamente extrapoladas para a população humana sem estudos epidemiológicos adequados (US DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES, 2006). Entretanto, as descobertas nas quais há concordância entre espécies são mais convincentes que as descobertas em uma única espécie. Ao avaliar o potencial risco humano, se houver concordância entre espécies para um único tipo de efeito adverso, é provável que um efeito semelhante seja constatado em humanos expostos à mesma substância por intermédio da mesma via de exposição (US DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES, 2011). De acordo com estudos, embriões e fetos humanos tendem a ser mais susceptíveis aos efeitos da exposição a teratógenos do que a espécie mais susceptível testada (KLAASSEN; WATKINS, 2012).

Vários protocolos têm sido propostos para substituir o uso de animais em ensaios de teratogenicidade. Esses testes alternativos podem ser agrupados em ensaios utilizando cultura de células, cultura de embriões *in vivo*, testes *in vivo* de curta duração e ensaios em modelos animais não mamíferos (KLAASSEN; WATKINS, 2012). Entretanto, devido à complexidade da embriogênese dos mamíferos e da função placentária, tais testes têm resultados limitados e pouca aceitação, de modo que não são recomendados pelos órgãos reguladores (ORGANISATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT, 2018).



## QUANDO SERÁ FEITO?

Os testes de toxicidade pré-natais podem incluir a avaliação dos efeitos maternos, bem como das taxas de mortalidade, das anomalias e do crescimento alterado do feto. Muitas vezes, a toxicidade no desenvolvimento afeta a função de órgãos específicos, ainda que não seja possível constatar a presença de malformações ou variações nos mesmos. Caso seja de interesse do pesquisador investigar as alterações funcionais relacionadas a exposição de químicos no desenvolvimento, os testes devem ser realizados no período pós-natal, seguindo as diretrizes da Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD)<sup>3</sup>.

Os experimentos que visam estudar anomalias congênitas estruturais devem ser planejados de modo a levar em consideração os períodos de desenvolvimento nos quais os embriões e fetos estão mais susceptíveis à ação dos teratógenos. O intervalo de exposição mais adequado para tais estudos é o que vai da implantação embrionária ao fechamento do palato duro (EUROPEAN MEDICINES AGENCY, 2020). Segue abaixo a Tabela 1 com momentos de eventos-chave no desenvolvimento de rato e de coelho.

**Tabela 1 - Eventos-chave no desenvolvimento de ratos e coelhos, em dias de gestação**

Eventos	Rato	Coelho
Formação do blastocisto	3-5	2,6-6
Implantação	5-6	6
Organogênese	6-17	6-18
Linha primitiva	9	6,5
Broto de membro superior	10,5	10,5
Broto de membro inferior	11,2	11
Diferenciação dos testículos	14,5	20
Fechamento do palato duro	16-17	19,20
Duração da gestação	21-22	31-34

**Fonte:** Shepard (1998).

A exposição de fêmeas prenhes a substâncias químicas potencialmente tóxicas antes do estabelecimento das trocas embriomaternas não é recomendada, uma vez que tanto o procedimento de exposição quanto o próprio teratógeno podem ocasionar sofrimento dispensável ao modelo animal e prejudicar as conclusões acerca do efeito deste no desenvolvimento, visto que a reação do organismo materno ao estresse e à toxicidade tende a alterar as taxas de enzimas/hormônios que podem agir sobre o embrião, prejudicando a avaliação do efeito direto do químico testado (SCHUETZE et al., 2017; HANSEN; ABBOTT, 2008).

<sup>3</sup> As diretrizes estão disponíveis em:

<https://www.oecd.org/env/ehs/testing/oecdguidelinesforthetestingofchemicals.htm>

Por isso, ainda que o objetivo principal de um estudo seja avaliar o efeito de um agente no desenvolvimento, recomenda-se realizar avaliação bioquímica materna por meio de dosagens sanguíneas de T3, T4, TSH e outras substâncias de interesse (ORGANISATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT, 2018).



## **POR QUEM/COM O QUE SERÁ FEITO?**

No dia da coleta dos fetos, devem estar disponíveis:

- 1) Caixa plástica e bomba de CO<sub>2</sub> para eutanásia.
- 2) Tesouras, pinças, bisturis, alfinetes para fixação do animal, prancha de isopor ou de cortiça para laparotomia e histerectomia.
- 3) Balança digital para medir a massa dos fetos e das placentas.
- 4) Estereomicroscópio ou lupa de bancada com iluminação para observação de anomalias externas.
- 5) Régua para medir o comprimento dos fetos da cabeça à cauda.
- 6) Fichas para anotação dos seguintes dados obtidos após a cesariana: número de fetos vivos e mortos, massa do útero, massa dos fetos, medida dos fetos, massa das placentas, sexo dos fetos, massa dos órgãos das fêmeas e anomalias externas, bem como o resultado da realização da técnica de Salewsky (1964) no útero para identificar os sítios de implantação e reabsorção embrionárias. Consta um modelo na Ficha 1.

**Ficha 1 - Modelo de ficha para anotação de dados após coletados após a cesariana de fêmeas expostas a potenciais teratógenos**

**FICHA PARA ANOTAÇÃO DE DADOS APÓS A CESARIANA**

GRUPO EXPERIMENTAL: \_\_\_\_\_ AGENTE EXPOSTO: \_\_\_\_\_  
DOSE: \_\_\_\_\_ CÓDIGO DA FÊMEA: \_\_\_\_\_ DIA DA EUTANÁSIA: / / \_\_\_\_\_  
NÚMERO DE FETOS VIVOS: \_\_\_\_\_ NÚMERO DE FETOS MORTOS: \_\_\_\_\_ MASSA DO ÚTERO: \_\_\_\_\_

MASSA DOS FETOS, em gramas:

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18

Massa média dos fetos: \_\_\_\_\_

MEDIDA DOS FETOS, em centímetros:

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18

Medida média dos fetos: \_\_\_\_\_

MASSA DAS PLACENTAS, em gramas:

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18

Massa média das placentas: \_\_\_\_\_

SEXO DOS FETOS:

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18

Quantidade de fetos masculinos: \_\_\_\_\_ Quantidade de fetos femininos: \_\_\_\_\_

RESULTADO DA TÉCNICA DE SALEWSKY

Nº de sítios de implantações: \_\_\_\_\_ Nº de reabsorções \_\_\_\_\_

MASSA DOS ÓRGÃOS DAS FÊMEAS, em gramas:

Coração: \_\_\_\_\_ Fígado: \_\_\_\_\_ Rins: \_\_\_\_\_ Baço: \_\_\_\_\_

ANOMALIAS EXTERNAS OBSERVADAS: Descrever cada anomalia e número de fetos que a possui

---

---

---

**Fonte:** Elaboração dos autores.

Após a coleta, os fetos de cada fêmea devem ser divididos em dois grupos, cada qual com metade dos fetos, visando à preparação deles para análise esquelética e visceral. Para tanto, frascos de vidro devem ser anteriormente separados e etiquetados (2 frascos por fêmea). Nas etiquetas sugerimos inserir informações sobre o agente exposto, a dose, o código da fêmea, a data da cesariana, o número de fetos e o tipo de análise que será realizada.

**Exemplo:**

DROGA X - 100 mg/Kg - FÊMEA 10 - 23/03/2021 - 7 FETOS - ANÁLISE ESQUELÉTICA.

A preparação dos fetos para análise esquelética depende da disponibilidade dos seguintes reagentes e soluções:

- 1) Acetona PA.
- 2) Solução de Hidróxido de Potássio 0,8% (diluir 0,8 gramas de KOH para cada 100 mL de H<sub>2</sub>O destilada) \* essa solução pode ser armazenada para uso futuro.
- 3) Solução de coloração de Alizarina (diluir 0,3 gramas de Alizarina para cada 100 mL de H<sub>2</sub>O destilada) \* essa solução pode ser armazenada para uso futuro.
- 4) Solução clareadora (2:2:1 - etanol absoluto: glicerina: álcool benzílico).

Os fetos que serão submetidos à análise visceral devem ser fixados por no mínimo 72 horas em solução fixadora de Bodian. Para preparar 1 litro de fixador devem ser utilizados 142 ml de água destilada, 50 ml de ácido acético glacial, 50 ml de formaldeído e 758 ml de etanol 95%.



## COMO SERÁ FEITO?

Para compreender a distribuição dos roedores nos grupos experimentais e os aspectos que devem ser considerados no decorrer da exposição dos mesmos, recomendamos a leitura das diretrizes de pesquisa em toxicologia do desenvolvimento, já citadas anteriormente, sobretudo do guia 414 da OCDE (ORGANISATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT, 2018). Com o intuito de auxiliar o acompanhamento das fêmeas ao longo do período de tratamento, sugerimos o modelo exemplificado na Ficha 2.

**Ficha 2 - Modelo de ficha para acompanhamento diário de fêmeas prenhes submetidas à exposição de agentes com potencial teratogênico**

**FICHA PARA ACOMPANHAMENTO DIÁRIO DE FÊMEAS**

**Grupo Experimental:**  
**Código da Fêmea:**  
**Via de exposição:**  
**Agente de exposição e dose:**

Data do acasalamento	Data do início do tratamento	Data da laparotomia
____/____/____	____/____/____	____/____/____
Peso: _____	Peso: _____	Peso: _____

Dia 6	Dia 7	Dia 8	Dia 9	Dia 10
Peso: _____	Peso: _____	Peso: _____	Peso: _____	Peso: _____
Dose: _____	Dose: _____	Dose: _____	Dose: _____	Dose: _____
Dia 11	Dia 12	Dia 13	Dia 14	Dia 15
Peso: _____	Peso: _____	Peso: _____	Peso: _____	Peso: _____
Dose: _____	Dose: _____	Dose: _____	Dose: _____	Dose: _____
Dia 16	Dia 17	Dia 18		
Peso: _____	Peso: _____	Peso: _____		
Dose: _____	Dose: _____	Dose: _____		

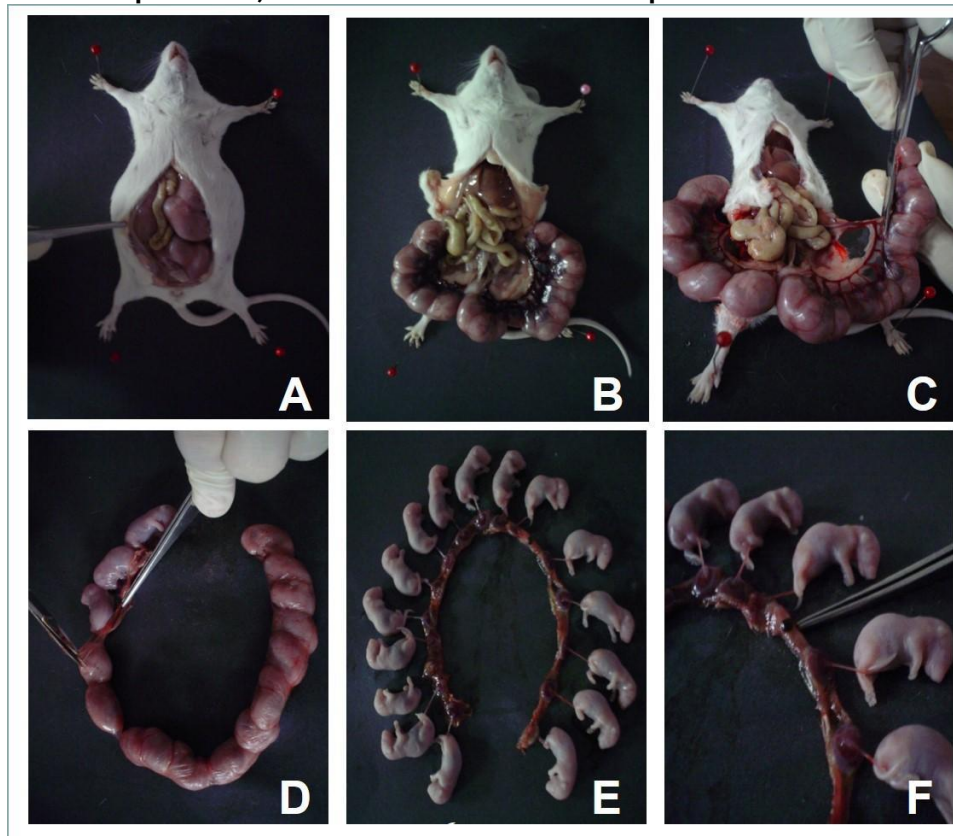
**Fonte:** Elaboração dos autores.

A coleta dos fetos para análise de anomalias congênitas estruturais deve ocorrer entre um a dois dias antes da data prevista para o parto natural. A gestação tem duração média de 21 dias em ratos (*Rattus norvegicus*) e 20 dias em camundongos (*Mus musculus*). Antes da coleta, as fêmeas devem ser previamente eutanasiadas, seguindo os princípios éticos da experimentação animal (COMMITTEE FOR THE UPDATE OF THE GUIDE FOR THE CARE AND USE OF LABORATORY ANIMALS, 2011). Sugerimos que a eutanásia seja conduzida por profissionais devidamente capacitados.

Imediatamente após a eutanásia, as fêmeas devem ser submetidas à abertura da cavidade abdominal (laparotomia) e à retirada do útero (histerectomia), a partir do qual os fetos poderão ser coletados (Foto 1).



**Foto 1 - Laparotomia, histerectomia e coleta de fetos para análise de anomalias**



**Fonte:** Acervo dos autores.

**Nota:** Entre (A) e (F): seqüência de procedimentos para coleta de fetos de roedores. (A): laparotomia. (B) e (C): histerectomia. D e (E): retirada dos embriões do útero e do interior do âmnio. E (F): ponta da pinça apontando um sítio de abortamento.

Como já dito anteriormente, para avaliação de anomalias congênitas estruturais, os fetos de cada fêmea devem ser divididos em dois grupos, pois os procedimentos de preparo deles para análise esquelética e visceral são distintos. Metade dos fetos deve ser fixada em acetona, eviscerada, clareada com hidróxido e potássio, e corada com alizarina para análise esquelética (STAPLES; SCHNELL, 1964). A outra metade deve ser fixada na mistura de Bodian para a análise visceral.

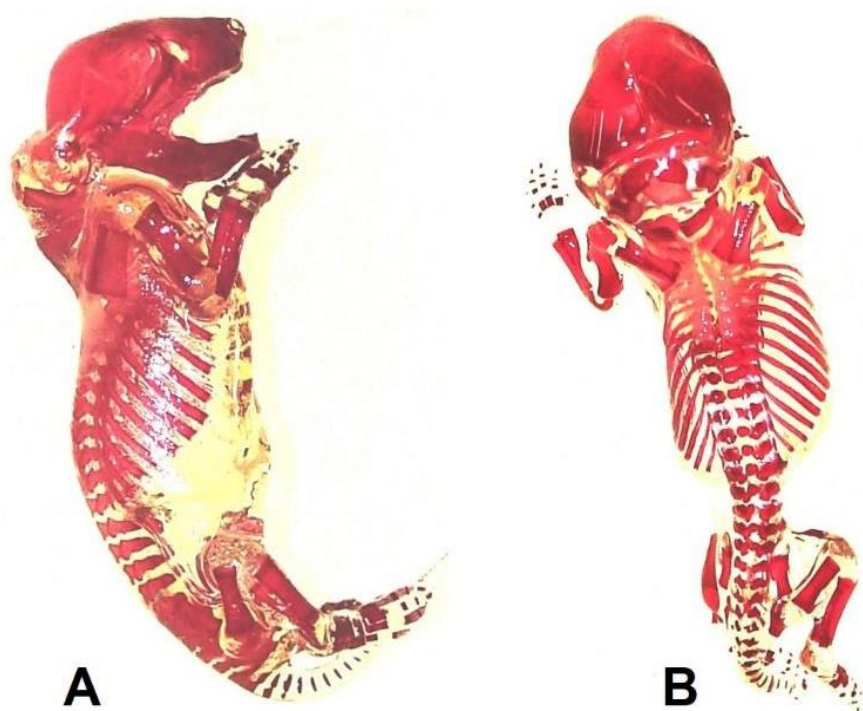
A visualização dos ossos ocorrerá após as partes moles do feto serem descoloridas e o esqueleto tingido. Para tanto, as seguintes etapas devem ser obedecidas. São baseadas nos estudos de Taylor (1969) e Manson e Kang (1994):

1. Imergir os fetos em solução de acetona P.A. por 48 horas.
2. Uma vez fixados em acetona, cada feto deve ser cuidadosamente analisado com a ajuda de um estereomicroscópio ou lupa de bancada com iluminação, quanto à presença de

- fissuras lábios-palatinas (abrir a boca com auxílio de uma pinça e visualizar o palato) e outras anormalidades externas. Qualquer anormalidade deve ser anotada e fotografada.
3. Em seguida, os fetos devem ser eviscerados. Para tanto, realizar uma excisão, com auxílio de bisturi, na linha alba, abaixo do esterno, até um pouco abaixo do cordão umbilical. Esse corte possibilitará a retirada das vísceras, do diafragma, do coração e dos pulmões com uma pinça fina e pequena. Deve-se ter o cuidado para não danificar os ossos internos no decorrer da evisceração.
  4. Após a evisceração, os fetos deverão ser submersos em solução de coloração durante três dias. A solução de coloração deverá ser trocada diariamente para facilitar as trocas de soluções; uma peneira pode ser útil.
  5. Uma vez corados, os fetos deverão ser colocados em solução clareadora por 24 horas para a visualização do esqueleto fetal. Os fetos podem ser deixados em solução clareadora por tempo indeterminado para a análise futura do esqueleto.

A Foto 2 traz imagens de 2 fetos submetidos à técnica de coloração com Alizarina.

**Foto 2 - Fetos de camundongos corados com alizarina**



**Fonte:** Acervo dos autores.

**Nota:** (A): Vista lateral direita. (B): Vista dorsal.

Para a investigação de anomalias esqueléticas, os fetos devem ser analisados quanto aos ossos do crânio, do esqueleto axial e das cinturas escapular e pélvica, com o auxílio de um estereomicroscópio e pinças. Para análise dos ossos do crânio é necessário fazer um corte transversal na altura da cavidade oral para melhor visualização dos ossos, que são os seguintes: frontal, nasal, zigomático, parietal, interparietal, supraoccipital, exoccipital, basoccipital, basosfenoide, bulla timpânica, hioide, palato, mandíbula e maxila. Quanto aos ossos do esqueleto axial, devem ser analisados: as esternébras; as vértebras cervicais, torácicas, lombares e sacrais; e as costelas. Os ossos da cintura escapular a serem analisados são: clavícula, escápula, úmero, rádio, ulna, metacarpos e as falanges proximais e distais. Quanto à cintura pélvica, deve-se avaliar os ossos íleo, ísquio, púbis, fêmur, tíbia, fíbula, metatarsos e as falanges proximais e distais. Cada osso analisado deve ser classificado como normal, ausente, não alinhado, reduzido, ondulado, dividido, com formato irregular e deve-se atentar se há fenda palatina. A Ficha 3 traz uma sugestão que pode ser utilizada no decorrer da avaliação do esqueleto ósseo fetal.

Ficha 3 - Modelo de ficha para análise esquelética de fetos

FICHA PARA ANÁLISE DO ESQUELETO DE FETOS

Data da análise:

Grupo experimental:

Código da fêmea:

Número de fetos: \* cada feto é representado com F nos quadros a seguir. Ex: F1 se refere ao feto 1

ABREVIACÕES			
OK - normal	A - ausente	FP – fenda palatina	I – formato irregular
NA – não alinhado	R - reduzido	O - ondulado	D - dividido

OSSOS DO CRÂNIO													
	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9	F10	F11	F12	F13
Frontal													
Nasal													
Zigomático													
Parietal													
Interparietal													
Supraoccipital													
Exoccipital													
Basoccipital													
Basosfenoide													
Bulla timpânica													
Hióide													
Palato													
Mandíbula													
Maxila													

ESQUELETO AXIAL													
	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9	F10	F11	F12	F13
Esternébrios													
Vértebras cervicais													
Vértebras torácicas													
Vértebras lombares													
Vértebras sacrais													
Costelas													

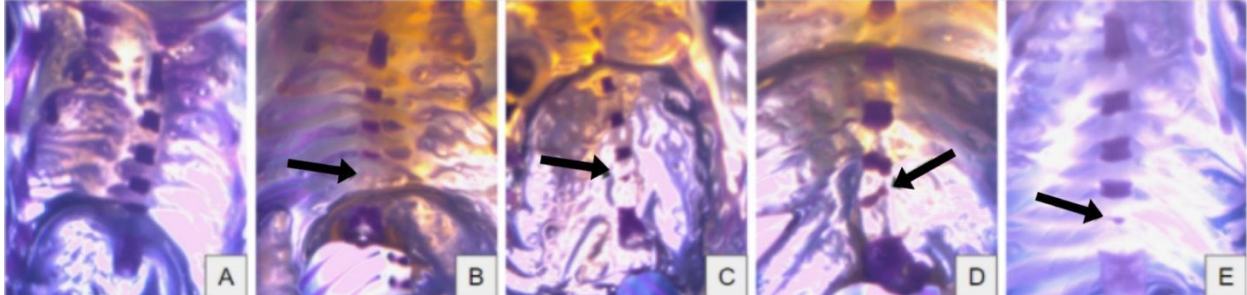
CINTURA ESCAPULAR																											
	F1		F2		F3		F4		F5		F6		F7		F8		F9		F10		F11		F12		F13		
	D	E	D	E	D	E	D	E	D	E	D	E	D	E	D	E	D	E	D	E	D	E	D	E	D	E	
Clavícula																											
Escápula																											
Úmero																											
Rádio																											
Ulna																											
Metacarpos																											
Falanges proximais																											
Falanges distais																											

CINTURA PÉLVICA																											
	F1		F2		F3		F4		F5		F6		F7		F8		F9		F10		F11		F12		F13		
	D	E	D	E	D	E	D	E	D	E	D	E	D	E	D	E	D	E	D	E	D	E	D	E	D	E	
Íleo																											
Ísquio																											
Púbis																											
Fêmur																											
Tíbia																											
Metatarsos																											
Falanges proximais																											
Falanges distais																											

Fonte: Elaboração dos autores.

A Figura 1 contém exemplos de anomalias que podem ser observadas no decorrer da avaliação no osso esterno.

**Figura 1 - Exemplos de anomalias esqueléticas em esternébras**



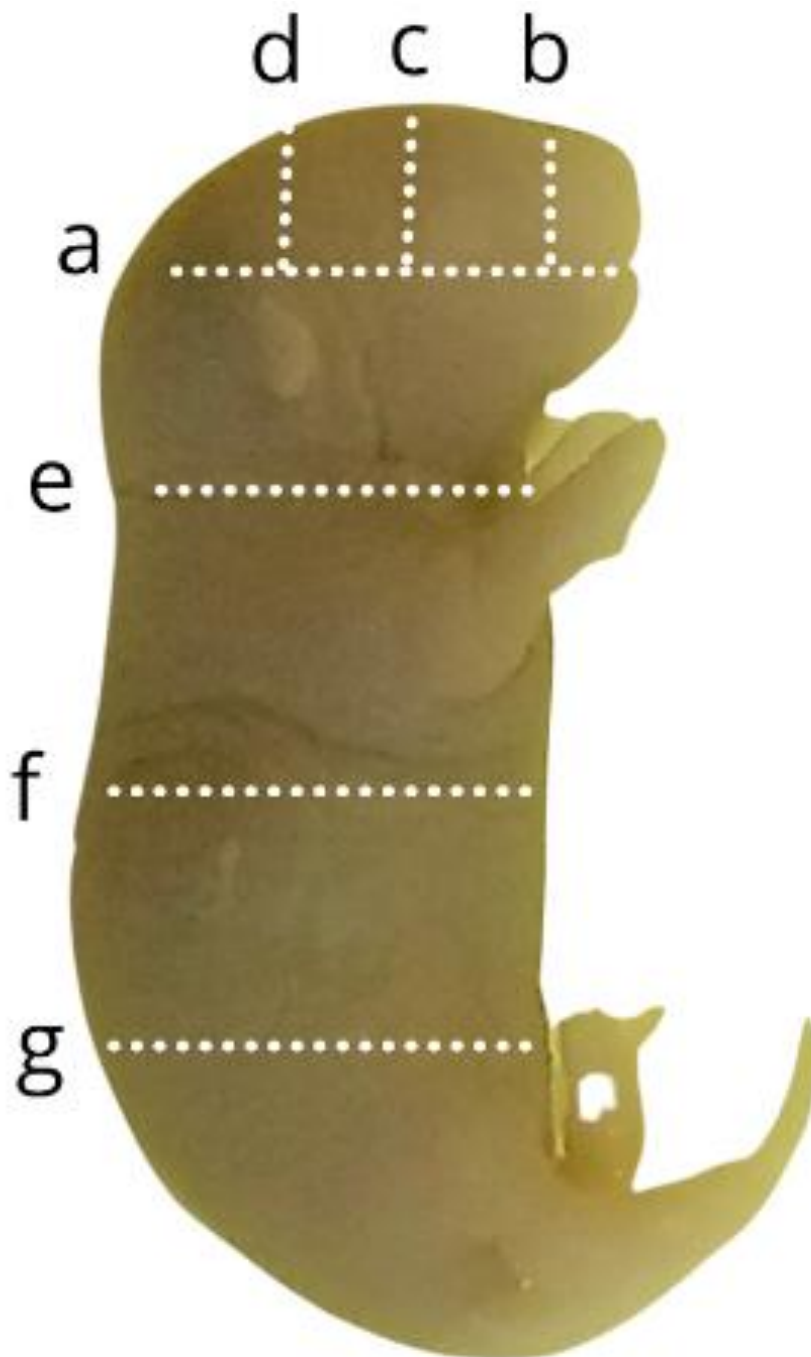
**Fonte:** Acervo dos autores.

**Nota:** Na imagem (A) é possível observar as esternébras sem alterações. (B): Ausência de uma das esternébras. (C): Excesso de uma esternébra. (D): Esternébra com formato irregular. (E): Esternébra reduzida.

A análise visceral deve ser realizada sob estereomicroscópio com auxílio de pinças, tesouras, e placas de Petri. Após fixados e antes de serem analisados, cada feto deve ser seccionado de acordo com os planos de secções propostos por Barrow e Taylor (1969) e Wilson (1965). Deverão ser feitas as seguintes secções para as análises viscerais:

1. Secção transversal na altura da cavidade oral para visualização do palato e do cérebro.
2. Secção frontal na região pré-glâbelar para visualização do septo nasal e coana.
3. Secção frontal na região orbital para visualização do bulbo olfatório, coana, cristalino e retina.
4. Secção frontal na região do vértex para visualização do ventrículo lateral e terceiro ventrículo.
5. Secção transversal na região cervical para visualização da traqueia, esôfago e medula espinhal.
6. Secção transversal na região abdominal para visualização do diafragma, medula espinhal, fígado, estômago, alças intestinais, rins, adrenais, ureteres e bexiga urinária.
7. Secção transversal na região pélvica para visualização da medula espinhal e gônadas. Após ser feita a secção transversal na região abdominal, é realizado um corte extra ventralmente na região torácica para a visualização da traqueia, timo e coração (átrios e ventrículos). Os planos de secções para a avaliação dos órgãos internos fetais estão ilustrados na Foto 3.

Foto 3 - Planos de secções fetais para análise visceral



**Fonte:** Acervo dos autores.

**Nota:** (A): Secção transversal na altura da cavidade oral. (B): Secção frontal na região pré-glabelar. (C): Secção frontal na região orbital. (D): Secção frontal na região do vértex. (E): Secção transversal na região cervical. (F): Secção transversal na região abdominal, logo abaixo do diafragma. (G): Secção transversal na região pélvica, passando pelo umbigo.

Ao realizar análise visceral nos fetos, sugerimos anotar os dados em fichas específicas para tal finalidade, conforme sugerido na Ficha 4.

**Ficha 4 - Modelo de ficha para análise visceral de fetos**

**FICHA PARA ANÁLISE VISCERAL DE FETOS**

Data da análise:

Grupo experimental:

Código da fêmea:

Nº de fetos:

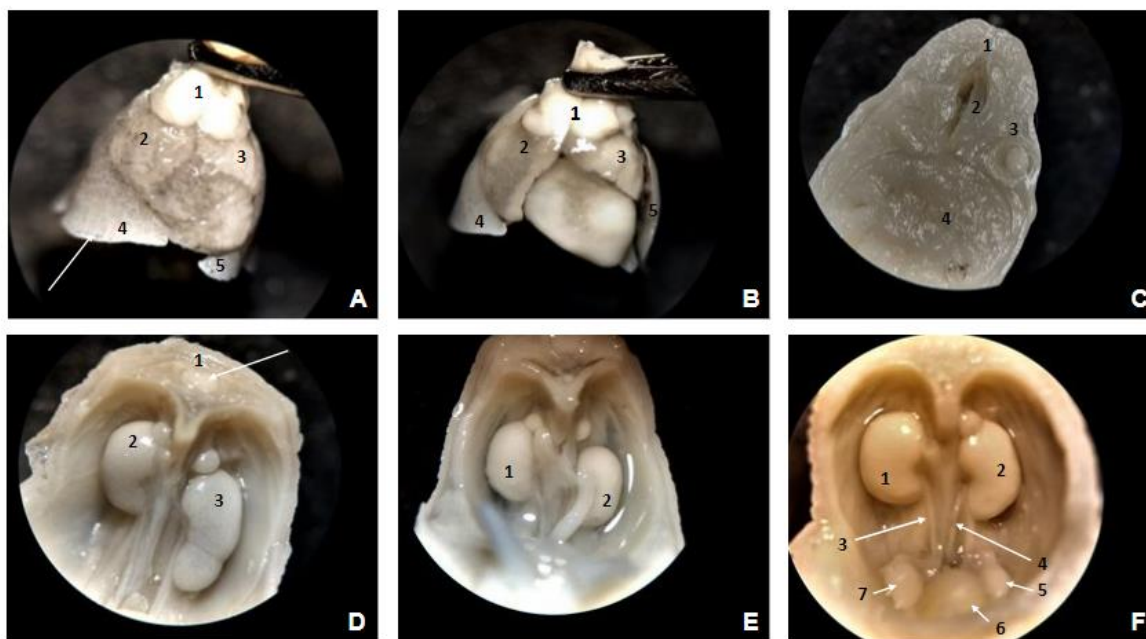
\* = anomalia congênita. Descrever a anomalia em ficha adicional

Secção transversal na altura da cavidade oral:												
	Ft 1	Ft 2	Ft 3	Ft 4	Ft 5	Ft 6	Ft 7	Ft 8	Ft 9	Ft 10	Ft 11	Ft 12
Palato												
Cérebro												
Secção frontal na região pré-gabelar:												
	Ft 1	Ft 2	Ft 3	Ft 4	Ft 5	Ft 6	Ft 7	Ft 8	Ft 9	Ft 10	Ft 11	Ft 12
Septo nasal												
Coana												
Secção frontal na região orbital:												
	Ft 1	Ft 2	Ft 3	Ft 4	Ft 5	Ft 6	Ft 7	Ft 8	Ft 9	Ft 10	Ft 11	Ft 12
Bulbo olfatório												
Coana												
Cristalino												
Retina												
Secção frontal da região do vértex:												
	Ft 1	Ft 2	Ft 3	Ft 4	Ft 5	Ft 6	Ft 7	Ft 8	Ft 9	Ft 10	Ft 11	Ft 12
Ventrículo lateral												
Terceiro ventrículo												
Secção transversal na região cervical:												
	Ft 1	Ft 2	Ft 3	Ft 4	Ft 5	Ft 6	Ft 7	Ft 8	Ft 9	Ft 10	Ft 11	Ft 12
Traqueia												
Esôfago												
Medula espinhal												
Timo												
Coração (ventrículo)												
Coração (átrio)												
Pulmão												
Secção transversal na região abdominal:												
	Ft 1	Ft 2	Ft 3	Ft 4	Ft 5	Ft 6	Ft 7	Ft 8	Ft 9	Ft 10	Ft 11	Ft 12
Medula espinhal												
Fígado												
Estômago												
Alças intestinais												
Rim												
Adrenal												
Ureter												
Bexiga urinária												
Secção transversal na região pélvica:												
	Ft 1	Ft 2	Ft 3	Ft 4	Ft 5	Ft 6	Ft 7	Ft 8	Ft 9	Ft 10	Ft 11	Ft 12
Medula espinhal												
Gônada												

Fonte: Elaboração dos autores.

A Foto 4 traz exemplos de anomalias que podem ser constatadas no decorrer da avaliação visceral.

**Foto 4 - Exemplos de anomalias viscerais em fetos de roedores**



**Fonte:** Acervo dos autores.

**Nota:** (A): Coração com formato e aspectos normais, evidenciando: timo (1); átrio direito (2); átrio esquerdo (3); porção inferior da base pulmonar direita, com seta indicando os espaços alveolares (4); porção inferior da base pulmonar esquerda (5). (B): Coração com possível hipertrofia atrial direita, comparado à foto A, evidenciando: timo (1); átrio direito (2); átrio esquerdo (3); porção inferior da base pulmonar direita; porção intermediária do pulmão esquerdo (5). (C): Fenda palatina (1); septo nasal (2); cavidade orbital com parte do globo ocular esquerdo; cérebro (4). (D): Medula espinhal (1); rim direito (2) e rim esquerdo (3) com suas respectivas glândulas adrenais aderidas à porção superior. O rim esquerdo apresenta-se bilobado e com formato anormal em comparação ao rim direito. Sobre o rim direito, há duas suprarrenais. (E): Rim direito com glândula adrenal aderida à porção superior e ureter esquerdo aumentado (1) e rim esquerdo com glândula adrenal não aderida à porção superior (2). (F): Ausência da glândula adrenal no rim direito (1); rim esquerdo com aspecto normal e glândula adrenal aderida à porção superior (2); ureteres direito (3) e esquerdo (4); gônadas masculinas direita (7) e esquerda (5); bexiga (6).



## QUANTO TEM SIDO USADO NA PESQUISA?

Há muitos anos, as anomalias congênitas despertam o interesse da humanidade, a qual no decorrer da história já as vinculou a fenômenos naturais, ao divertimento da natureza, a maldições e a eventos sobrenaturais (COSTA, 2010). Os primeiros experimentos científicos que ousaram expor embriões de mamíferos a ambientes hostis, entretanto, só ocorreram após o início do século XX, especificamente a partir da exposição de embriões de gatos a raios-X (UJHAZY et al., 2012).



A princípio, os estudos em teratologia eram conduzidos visando compreender o efeito da exposição de embriões e fetos a radiações, deficiências nutricionais, hormônios e patógenos. As investigações acerca da exposição pré-natal a substâncias químicas exógenas potencialmente nocivas, entretanto, só passaram a ser realizadas a partir da década de 1940, período no qual os protocolos de pesquisa em toxicologia do desenvolvimento ainda careciam de padronização internacional. A partir da década de 1960, quando se tornou evidente o potencial teratogênico da Talidomida, organismos reguladores internacionais passaram a divulgar protocolos padronizados (UJHAZY et al., 2012; COLLINS, 2006).

Em novembro de 1967, a Organização Mundial da Saúde se reuniu em Genebra para discutir os procedimentos de avaliação teratológica com modelos animais e a subsequente extrapolação dos resultados obtidos para humanos. No encontro foi destacada a necessidade de os organismos reguladores publicarem diretrizes com critérios e métodos padronizados e internacionalmente aceitos para pesquisa em teratologia (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1967).

Atualmente, os protocolos de pesquisa são padronizados e mais de 3.700 agentes já foram descritos como teratogênicos, entre substâncias químicas e patógenos (SHEPARD, 2011). É importante observar que muitos compostos com potencial para causar malformações em modelos animais não são teratogênicos para humanos. Entretanto, quando efeitos adversos no desenvolvimento são observados em humanos, sabe-se que ao menos uma espécie de modelo experimental, roedores e/ou coelhos, apresenta efeitos similares no desenvolvimento quando expostos ao mesmo agente (COLLINS, 2006).

Sobre tais constatações, além de diferenças na barreira placentária e nos processos intrínsecos de desenvolvimento entre mamíferos (GILBERT; BARRESI, 2019), sabemos que em testes realizados com modelos experimentais, é comum que a atividade teratológica observada de um composto ocorra na dose máxima materna tolerada ou próximo desta, que tende a ser muito superior que a dose terapêutica utilizada com humanos, portanto, é natural que mais efeitos adversos ocorram em animais experimentais que em humanos.

Por fim, para preservar a eficiência estatística dos estudos, ressaltamos que a experimentação científica em toxicologia do desenvolvimento deve se atentar ao controle de fatores externos, à aleatoriedade na seleção dos animais alocados nos grupos experimentais e ao tamanho amostral, que deve ser adequado para detectar efeitos significativos.

## REFERÊNCIAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (Brasil). **Guia para a condução de estudos não clínicos de toxicologia e segurança farmacológica necessários ao desenvolvimento de medicamentos**. Brasília, DF: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2013. Disponível em: <http://antigo.anvisa.gov.br/documents/33836/2492465/Guia+para+a+Condu%C3%A7%C3%A3o+de+Estudos+N%C3%A3o+Cl%C3%ADnicos+de+Toxicologia+e+Seguran%C3%A7a+Farmacol%C3%B3gica+Necess%C3%A1rios+ao+Desenvolvimento+de+Medicamentos+-+Vers%C3%A3o+2/a8cad67c-14c8-4722-bf0f-058a3a284f75>. Acesso em: 19 mar. 2021.

BARROW, Mark V.; TAYLOR, W. Jape. A rapid method for detecting malformations in rat fetuses. **Journal of Morphology**, v. 127, n. 3, p. 291-306, Mar. 1969.

CENTER FOR DRUG EVALUATION AND RESEARCH. **Guidance for industry**: reference guide: for the nonclinical toxicity studies of antiviral drugs indicated for treatment of non-life threatening diseases: evaluation of drug toxicity prior to phase I clinical studies. Rockville: US Food and Drug Administration, 1989. Disponível em: <https://www.fda.gov/media/72272/download>. Acesso em: 21 mar. 2021.

COLLINS, Thomas F. X. History and evolution of reproductive and developmental toxicology guidelines. **Current Pharmaceutical Design**, v. 12, n. 12, p. 1449-1465, 2006.

COMMITTEE FOR THE UPDATE OF THE GUIDE FOR THE CARE AND USE OF LABORATORY ANIMALS. Institute For Laboratory Animal Research. **Guide for the care and use of laboratory animals**. 8th ed. Washington, DC: National Academies Press, 2011. Disponível em: <https://grants.nih.gov/grants/olaw/guide-for-the-care-and-use-of-laboratory-animals.pdf>. Acesso em: 22 mar. 2021.

COOK, Margaret J; FAIRWEATHER, Frank A. Methods used in teratogenic testing. **Laboratory Animals**, v. 2, p. 219-228, 1968. Disponível em: <https://journals.sagepub.com/doi/pdf/10.1258/002367768781082834>. Acesso em: 7 abr. 2021.

COSTA, Palmira Fontes da. Livros sobre monstros e prodígios. In: BIBLIOTECA NACIONAL DE PORTUGAL (org.). **Arte médica e imagem do corpo**: de Hipócrates ao século XVIII: catálogo da exposição. Lisboa: Biblioteca Nacional de Portugal, 2010. p. 63-78.

DESESSO, John M. Future of developmental toxicity testing. **Current Opinion in Toxicology**, v. 3, p. 1-5, 2017.

EUROPEAN MEDICINES AGENCY. **ICH S5 (R3) guideline on reproductive toxicology**: detection of toxicity to reproduction for human pharmaceuticals. Amsterdam: European Medicines Agency: Committee for Medicinal Products for Human Use, 2020. Disponível em: [https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-s5-r3-guideline-reproductive-toxicology-detection-toxicity-reproduction-human-pharmaceuticals\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-s5-r3-guideline-reproductive-toxicology-detection-toxicity-reproduction-human-pharmaceuticals_en.pdf). Acesso em: 15 mar. 2021.

FENDERSON, Bruce A. Developmental and genetic diseases. In: DAMJANOV, Ivan. **Pathology secrets**. 3th ed. Saint Louis: Mosby, 2008.

GILBERT, Scott F; BARRESI, Michael J.F. **Biologia do desenvolvimento**. 11. ed. Porto Alegre: Artmed, 2019.

HANSEN, Deborah K.; ABBOTT, Barbara D. **Developmental toxicology**. New York: Informa Healthcare, 2008.

HENNEKAM, Raoul C. *et al.* Elements of morphology: general terms for congenital anomalies. **American Journal of Medical Genetics**, n. 161, v. 11, p. 2726-33, 2013. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1002/ajmg.a.36249>. Acesso em: 18 mar. 2021.

IKEDA, Kenneth Lyons; JONES, Marcos. **Smith padrões reconhecíveis de malformações congênitas**. 6. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007.

KLASSEN, Curtis D.; WATKINS III, John B. **Fundamentos em toxicologia de Casarett e Doull**. Tradutor Flavia Thiesen. 2. ed. Porto Alegre: AMGH, 2012.

MANSON, J. M.; SNODGRASS, W. R. Test methods for assessing female reproductive and developmental toxicology. *In*: HAYES, A. Wallace.; KRUGER, Claire L. **Hayes' principles and methods of toxicology applied pharmacology**. 3th ed. New York: Raven Press, 1994. p. 989-1037.

ORGANISATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT. **Guidelines for the testing of chemicals**: extended one-generation reproductive toxicity study. [S.l.]: Organization for Economic Cooperation and Development, 2018. Disponível em: <https://www.oecd-ilibrary.org/docserver/9789264185371-en.pdf?expires=1617573642&id=id&acname=quest&checksum=4E2122E60FF343A1C6A4056E008FD75B>. Acesso em: 15 mar. 2021.

ORGANISATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT. **OECD guidelines for the testing of chemicals**: prenatal developmental toxicity study. [S.l.]: Organization for Economic Cooperation and Development, 2004. Disponível em: <https://www.oecd-ilibrary.org/docserver/9789264070820-en.pdf?expires=1615830188&id=id&acname=quest&checksum=39C7A909FA1482F1E61456A56828F747>. Acesso em: 15 mar. 2021.

SALEWSKI, E. Faerbemethode zum makroskopischen Nachweis von Implantationstellen am Uterus der Ratte. **Nauyn-Schmiedeberg's Archives für Experimentelle Pathologie und Pharmakologi**, v. 247, p. 367, 1964.

SCHUETZE, Pamela *et al.* Prenatal risk and infant regulation: indirect pathways via fetal growth and maternal prenatal stress and anger. **Child Development**, v. 89, n. 2, p. 123-137, 2017. Disponível em: <https://srcd.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1111/cdev.12801>. Acesso em: 18 mar. 2021.

SEIFER, R. Teratology. *In*: BENSON, Janette B. **Encyclopedia of infant and early childhood development**. Cambridge: Elsevier, 2008.

SHEPARD, Thomas H. **Catalog of teratogenic agents**. 13th ed. Baltimore: The Johns Hopkins Press, 2011.

SOLECKI, Roland *et al.* Harmonization of rat fetal external and visceral terminology and classification: report of the Fourth Workshop on the Terminology in Developmental Toxicology, Berlin, 18-20 April, 2002. **Reproductive Toxicology**, v. 17, n. 5, p. 625-37, 2003.

STAPLES, R. E.; SCHNELL, V. L. Refinements in rapid clearing technic in the Koh-Alizarin red S method for fetal bone. **Stain Technology**, v. 39, p. 61-63, Jan. 1964.

TAYLOR, Pamela. **Practical teratology**. London: Academic Press, 1986.

TYL, R. W. Toxicity testing, developmental. *In*: WEXLER, Philip. **Encyclopedia of toxicology**. 3th ed. San Diego: Elsevier, 2014.

UJHAZY, Eduard *et al.* Teratology: past, present and future. **Interdisciplinary Toxicology**, v. 5, n. 4, p. 163-168, Dec. 2012. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3600518/>. Acesso em: 18 mar. 2021.

US DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES. Food and Drug Administration. Center for Drug Evaluation and Research. **Guidance for industry: reproductive and developmental toxicities: integrating study results to assess concerns**. Silver Spring: Center for Drug Evaluation and Research, 2011. Disponível em: <https://www.fda.gov/media/72231/download>. Acesso em: 15 mar. 2021.

US DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES. Food and Drug Administration. **Content and format of labeling for human prescription drug and biological products: requirements for pregnancy and lactation labeling**. [S.l.]: Food and Drug Administration, 2006. (Docket nº FDA-2006-N-0515). Disponível em: <https://www.fda.gov/media/90279/download>. Acesso em: 15 mar. 2021.

WILSON, James Grant. Methods for administering agents and detecting malformations in experimental animals. *In*: WILSON, James Grant.; WARKANY, Josef. **Teratology: principles and techniques**. Chicago: University of Chicago Press, 1965. p. 262-277.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Congenital malformations, deformations and chromosomal abnormalities. *In*: WORLD HEALTH ORGANIZATION. **ICD-10: international statistical classification of diseases and related health problems**. 10th rev. [S.l.]: World Health Organization, 2016. Cap. 17. Disponível em: <https://icd.who.int/browse10/2016/en#/XVII>. Acesso em: 19 mar. 2021.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Principles for the testing of drugs for teratogenicity: report of a WHO scientific group**. Geneve: World Health Organization, 1967. (Report Series, n. 364). Disponível em: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/40657>. Acesso em: 21 mar. 2021.

## SUGESTÕES DE LEITURAS

GRANDJEAN, Phillipe; LANDRIGAN, Philip J. Neurobehavioural effects of development toxicity. **The Lancet Neurology**, v. 13, n. 3, p. 230-38, 2014.

JEROME, Cristopher; HOCH, Benjamin; CARLSON, Cathy S. Skeletal system *In*: TREUTING, Piper M.; DINTZIS, Suzanne M.; MONTINE, Kathleen. **Comparative anatomy and histology**. 2nd. ed. Cambridge: Academic Press, 2018. p. 67-88.

OLSHAN, Andrew F.; FAUSTMAN, Elaine M. Male-mediated developmental toxicity. **Reproductive toxicity**, v. 7, n. 3, p. 191-202, May/June 1993.

PIERSMA, Aldert H. Alternative methods for developmental toxicity testing. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 98, n. 5, p. 427-431, May 2006. Disponível em: [https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1111/j.1742-7843.2006.pto\\_373.x](https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1111/j.1742-7843.2006.pto_373.x). Acesso em: 18 mar. 2021.

SCIALLI, Anthony R. *et al.* Rethinking developmental toxicity testing: evolution or revolution? **Birth Defects Research**, v. 11, n. 10, p. 840-50, 2018. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1002/bdr2.1212>. Acesso em: 18 mar. 2021.

WEINBAUER, Gerhard F. *et al.* **Developmental and reproductive testing in the nonhuman primate in nonclinical drug development and safety assessment**. Cambridge: Academic Press, 2015. p. 471-499.

## 14 ENSAIO COM MEMBRANA CORIOALANTÓICA (CAM) DO EMBRIÃO DE GALINHA: UM MODELO ROBUSTO PARA IDENTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS PRÓ E ANTIANGIOGÊNICOS

Aline Pic-Taylor  
José Eduardo Baroneza  
Laise Rodrigues de Andrade



### O QUE SERÁ FEITO?

A membrana corioalantóica - *chorioallantoic membrane* (CAM) do embrião de galinha é rica em vasos sanguíneos e pode ser utilizada para avaliar a atividade de diversos agentes na angiogênese e na antiangiogênese. A técnica consiste em observar o efeito da exposição da zona vascular da CAM a um disco de papel de filtro embebido com a substância a ser testada (CHEN; WEN; BAI, 2013).

Uma das formas de acessar a zona vascular da CAM é a partir da abertura de uma pequena janela no ovo embrionado de galinha pré-incubado por 3,5 dias - método *in ovo*. Alternativamente, o conteúdo interno do ovo pode ser transferido para uma placa de Petri - método *ex ovo*. Após a exposição, o ovo deve ser reincubado por intervalo de tempo suficiente para observar o efeito sobre os vasos sanguíneos (RIBATTI, 2016).



### POR QUE SERÁ FEITO?

O método, além de ser simples e rápido para ser executado, tem baixo custo, reprodutibilidade e, uma vez que a CAM consiste em um tecido vivo não imunocompetente, células de diferentes espécies podem ser transplantadas sobre ela sem que haja resposta imune. Além disso, a técnica diminui o uso de mamíferos na investigação científica e se posiciona como intermediária racional entre as metodologias *in vitro* e *in vivo*, sendo facilmente incorporada no cotidiano dos laboratórios de pesquisa (RIBATTI, 2016).

Nas últimas décadas, muitas espécies de animais foram utilizadas em pesquisas sobre angiogênese e antiangiogênese, entre elas estão os camundongos, os ratos, os coelhos e as galinhas (FEDER et al., 2013; ANDRADE et al., 1997; GIMBRONE et al., 1974). Entretanto,

atualmente diversos órgãos reguladores têm se posicionado para que as pesquisas científicas sejam conduzidas, preferencialmente, por métodos que dispensem a necessidade do uso de animais ou que causem o menor sofrimento possível, caso sejam imprescindíveis (TRÉZ, 2018; CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE E EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL, 2015).

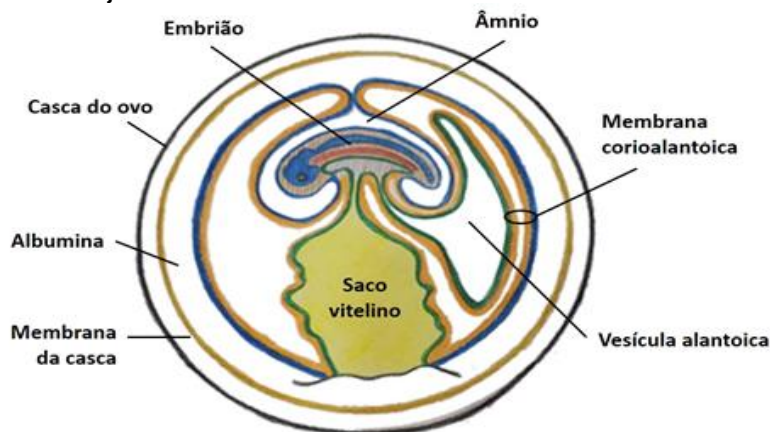
Desde o final da década de 1950, a busca pelo uso racional dos animais em pesquisa levou Russell e Burch (1959) a proporem o “**Princípio dos 3 Rs**” (do inglês *reduction, replacement and refinement*), que visa à redução, à substituição e ao refinamento no uso de animais. De lá para cá, cientistas do mundo todo passaram a buscar estratégias alternativas, que não somente pudessem substituir os métodos tradicionais, mas também pudessem reduzir ou refinar o uso de animais, minimizando a dor e o desconforto durante a experimentação animal (SNEDDON; HALSEY; BURY, 2017). No Brasil, a Lei nº 11.794 de 2008, conhecida como Lei Arouca (BRASIL, 2008), regulamentou o uso animal na experimentação científica e promoveu a criação das comissões de ética para o seu controle e fiscalização de pesquisas.



## ONDE SERÁ FEITO?

No decorrer do desenvolvimento, os embriões de galinha dividem espaço no interior do ovo com quatro distintos anexos extraembrionários: o âmnio, o córion, o saco vitelino e a vesícula alantoica – alantoide (Figura 1). A vesícula alantoica, que em aves se desenvolve a partir da extremidade caudal da linha primitiva, é revestida pelo epitélio alantoico e pelo mesoderma esplâncnico extraembrionário adjacente (GILBERT; BARRESI, 2019).

**Figura 1 - Diagrama da disposição do embrião de galinha e dos anexos extraembrionários às 96 horas após incubação**



**Fonte:** Elaboração dos autores.

Em razão do rápido crescimento da vesícula, que acontece entre o 4º e o 10º dias do desenvolvimento, a camada mesodérmica do alantoide se funde com o mesoderma somático extraembrionário, adjacente ao epitélio coriônico. Juntos, o mesoderma extraembrionário e os epitélios alantoico e coriônico passam a constituir a CAM (GABRIELLI; ACCILI, 2010). Com 14 dias, por causa do aumento em seu volume, o alantoide envolve o âmnio e o saco vitelino, ao mesmo tempo que empurra o albúmen para a extremidade menor do ovo (GARCIA; FERNÁNDEZ, 2011).

As funções relacionadas à CAM incluem servir como reservatório de excretas, reabsorver água e íons, realizar trocas gasosas e transportar cálcio para o embrião a partir da casca do ovo (GILBERT; BARRESI, 2019). Em seu mesoderma, forma-se uma rica rede de vasos sanguíneos constituída por arteríolas, vênulas e capilares (RIBATTI, 2016). Devido à lentidão da circulação do sangue na rede vascular da CAM e a sua proximidade com a casca porosa do ovo, a membrana se comporta como um sítio ideal para as trocas gasosas (GABRIELLI; ACCILI, 2010).



## QUANDO SERÁ FEITO?

Por muitos anos, as pesquisas com a CAM de embriões de galinha foram realizadas com o intuito de identificar os componentes moleculares e os mecanismos relacionados às suas funções (NARBATZ et al., 1995). Atualmente, a CAM tem sido utilizada para investigações científicas em diversas áreas do conhecimento, tais como: transplantes teciduais, crescimento tumoral e metástase, cicatrização de feridas, toxicidade de substâncias, genética e angiogênese (BALDAVIRA, 2017; RIBATTI, 2016; RIBATI et al., 2001; RIBATI et al., 1995).

A principal limitação dos estudos com a CAM diz respeito ao fato de ser necessário o enxerto de células, o qual é a resposta inflamatória inespecífica que ocorre, sobretudo, em experimentos que se estendem por intervalo de tempo superior a 15 dias de incubação. Nestes casos, estudos já demonstraram a presença de infiltrado inflamatório perivascular e hiperplasia no epitélio coriônico (LEENE; DUYZINGS; STEEG, 1973).

Na avaliação da angiogênese e da antiangiogênese, para evitar viés na interpretação dos resultados, torna-se relevante distinguir a neovascularização do aumento da densidade vascular motivada pelo rearranjo dos vasos existentes (KNIGHTON; FIEGEL; PHILIPS, 1991). Além disso, os fatores ambientais devem ser controlados, uma vez que a CAM é muito sensível à variação na tensão de oxigênio, no pH e na osmolaridade (AUERBACH et al., 2000).



Em muitos países, as pesquisas realizadas com embriões precoces de galinha não precisam ser autorizadas por comissões de ética. Na Austrália, nos Estados Unidos e na Inglaterra, por exemplo, a exigência de autorização só ocorre caso os embriões sejam incubados por período superior a 10, 14 e 16 dias, respectivamente (BOSTON UNIVERSITY, 2020; SIERO; VÉRON; MARCELLE, 2017; NATIONAL INSTITUTE OF HEALTH, 1991). No Brasil, entretanto, para submeter projetos de pesquisa com embriões de galinha, se faz necessário o encaminhamento a comissões de ética, independentemente do tempo de incubação, uma vez que de acordo com o Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal (CONCEA), todos os estudos que utilizam animais vertebrados não humanos devem ser submetidos à avaliação pelas Comissões de Ética no Uso Animal (CEUA) das instituições devidamente credenciadas no referido órgão (CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE E EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL, 2015).



## **POR QUEM/COM O QUE SERÁ FEITO?**

Para testar o potencial angiogênico e antiangiogênico de substâncias ou células na CAM do embrião de galinha, os seguintes materiais, reagentes e equipamentos devem estar disponíveis:

- Material cirúrgico: pinças, tesoura pequena, seringa de 10 ml com agulha grossa.
- Béquer de 250 ml.
- Fita adesiva transparente.
- Placa de Petri.
- Algodão e gaze.
- Papel filtro cortado em pequenas rodela de 0,5 cm de diâmetro. Sugerimos usar um furador de papel para gerar círculos uniformes; estes devem ser duplamente autoclavados. Outros suportes físicos podem ser usados, dependendo do que será testado. Para testar o potencial pró-angiogênico ou antiangiogênico de substâncias sobre células cancerosas, pode ser usado um pequeno inserto (~ 1 mm<sup>2</sup>) de esponja hemostática feita de colágeno hidrolisado (GUIDO et al., 2015).
- Etanol 70%.
- Etanol 92% para descarte de albúmen.
- Incubadora com rotação automatizada e controle de temperatura e umidade (37-38°C e 40-60% de umidade).
- Câmara de fluxo laminar para evitar contaminação.

- Lupa ou estereomicroscópio.
- Aparelho para registro fotográfico.

Sugerimos, no mínimo, cinco ovos embrionados por grupo a ser testado, incluindo um grupo-controle, uma vez que a análise estatística requer pelo menos 3 ovos por grupo e, considerando que perdas possam ocorrer, recomendamos 2 ovos extras. Os ovos devem, preferencialmente, ser adquiridos por meio de granjas bem estabelecidas, que os colem logo após a postura, no dia de desenvolvimento embrionário 0 (EDD 0), para que os embriões estejam no mesmo período de desenvolvimento quando forem incubados. É importante que a data do recebimento e a proveniência sejam anotadas para controle. Os ovos trincados devem ser excluídos do experimento e descartados.

Caso haja interesse na utilização de células tumorais, elas devem estar diluídas em meio de cultura apresentando concentrações distintas para cada grupo experimental. E, se o teste for conduzido apenas com substâncias, estas devem estar previamente diluídas em veículo apropriado.



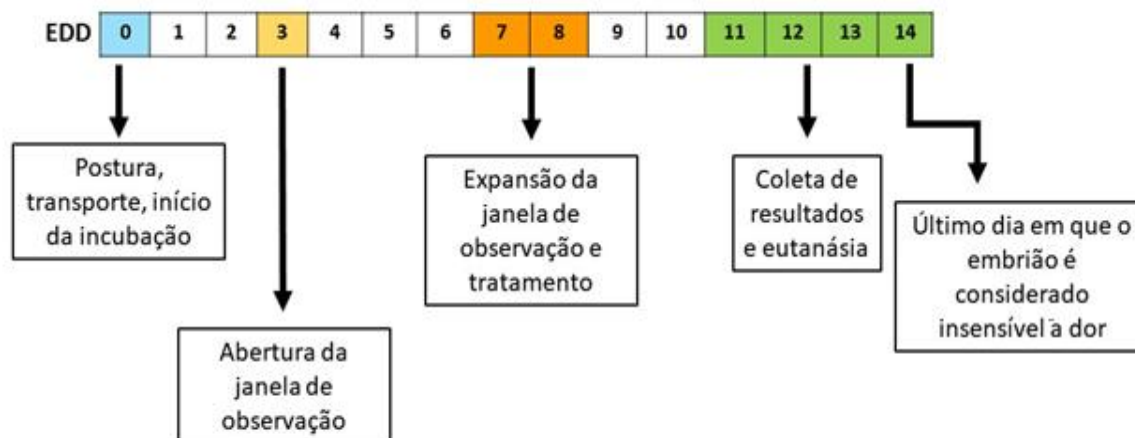
## COMO SERÁ FEITO?

### 1°) Preparação e incubação inicial dos ovos fertilizados (EDD 0-3)

Os ovos embrionados devem, preferencialmente, ser incubados no dia da postura (EDD 0). Caso não seja possível, podem ser armazenados a 10°C por até 10 dias ou sob a temperatura de 20 a 25°C, sempre abrigados pela luz, por no máximo 5 dias. O transporte dos ovos deve ser feito cuidadosamente, sem muita movimentação para não comprometer o embrião.

Sugerimos o planejamento prévio e cauteloso das etapas que constituem o experimento com a CAM, conforme modelo exemplificado na Figura 2. Por motivos éticos, para a avaliação do potencial de angiogênese e de antiangiogênese associada à exposição de substâncias e células, é recomendável que a coleta dos resultados ocorra até o EDD 14, visto que até esse dia o embrião não desenvolveu sensibilidade à dor (RIBATTI, 2016).

Figura 2 - Proposta de planejamento do ensaio com a CAM de embrião de galinha



Fonte: Elaboração dos autores.

Todos os procedimentos, incluindo a abertura dos ovos embrionados e o preparo das substâncias e células, devem ocorrer em condições estéreis, no interior de câmara de fluxo laminar, para diminuir a possibilidade de contaminação. A incubadora deve estar limpa e desinfetada com etanol 70%, e o material cirúrgico deve estar previamente autoclavado. O manipulador deve usar equipamentos de proteção individual durante todos os procedimentos com os ovos.

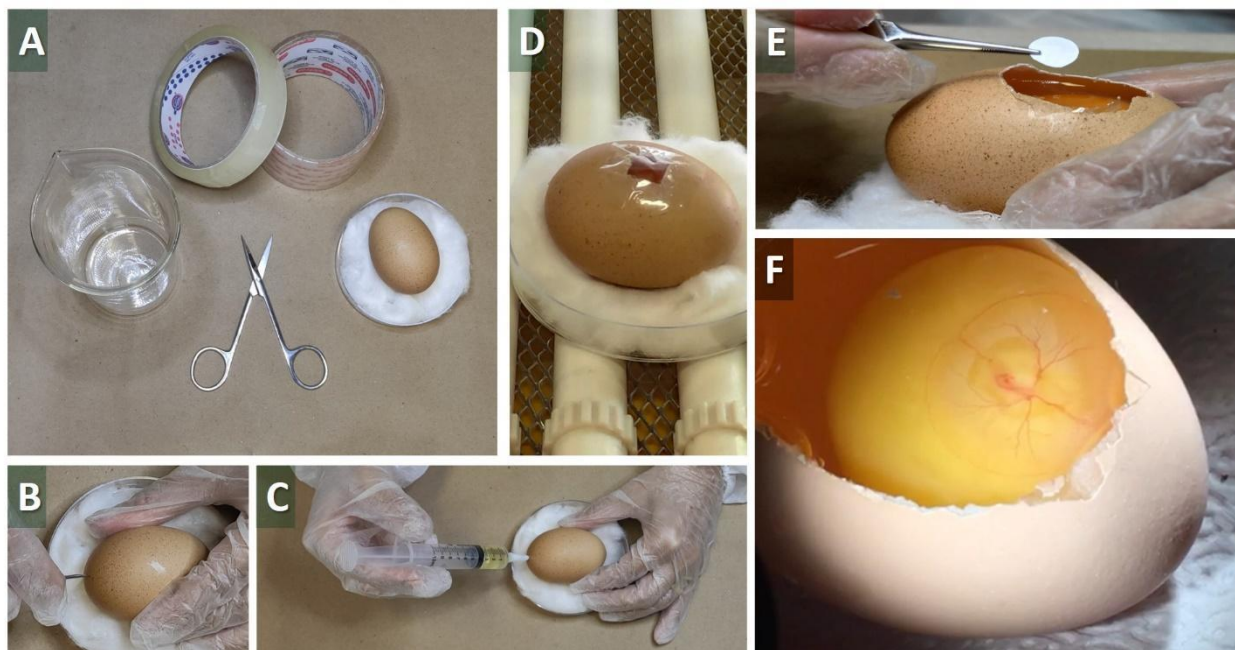
Antes da incubação, os ovos devem ser higienizados. Para tanto, recomendamos passar gaze umedecida em água destilada sobre a casca dos ovos e, posteriormente, borrifar etanol 70%. Antes do início do tratamento, os ovos devem ser incubados por três dias em incubadora rotativa automatizada (37-38°C e 40-60% de umidade) com rotação de meio ciclo a cada hora para evitar o acoplamento do embrião e/ou de membrana corioalantóica na casca do ovo. Caso a incubadora não esteja disponível, a incubação dos ovos pode ocorrer no interior de estufas com rotação manual completa a cada 2 horas durante o dia (BARONEZA, 2013).

## 2°) Abertura para observação da viabilidade do ovo (EDD 3)

No terceiro dia, deve ser feito um pequeno orifício na parte do ovo onde se encontra a câmara de ar (Foto 1, letra B). Por meio dele, com o auxílio de uma seringa contendo agulha grossa (25 x 8 mm), é necessário retirar 2 a 3 ml de albúmen do interior do ovo (Foto 1, letra C)

para manter a integridade da CAM durante a abertura do ovo. O uso de um suporte, como uma placa de Petri com algodão, é recomendável para aumentar a estabilidade do ovo durante a manipulação, como mostra a Foto 1.

**Foto 1 - Procedimento de abertura de ovos de galinha, incubação e testagem**



**Fonte:** Elaboração dos autores.

**Nota:** (3A): Materiais para coleta. (3B): Perfuração do ovo na região da câmara de ar para retirar parte do albúmen. (3C): Retirada de albúmen. (3D): Abertura de janela na casca do ovo para observar o embrião. (3E): Inserção de disco de papel filtro embebido em substância a ser testada. (3F): Embrião de galinha com 3 dias de desenvolvimento (EDD 3).

Uma pequena janela com aproximadamente 1cm<sup>2</sup> deve ser aberta na porção do ovo voltada para cima. Por meio dessa janela, o desenvolvimento do embrião poderá ser acompanhado dia a dia. Para diminuir a possibilidade de fragmentos de casca caírem sobre o embrião e a CAM no decorrer da abertura, sugerimos que um pedaço de fita adesiva seja colado sobre a parte da casca onde a janela será aberta. Em seguida, com o uso de uma agulha grossa, um pequeno orifício deve ser feito na casca, por onde as pontas finas da tesoura serão inseridas para a abertura da janela de observação. A tesoura deve ser mantida o mais paralelo possível à casca para evitar lesionar o embrião.

O embrião no EDD 3 deve ter o aspecto daquele que se encontra na Foto 1, letra F (HAMBURGER; HAMILTON, 1951). Na sequência, a janela deve ser vedada com uma nova fita adesiva transparente para evitar desidratação e contaminação, e os ovos recolocados na incubadora, dessa vez apoiados na placa de Petri e sem rotação (Foto 1, letra D). A incubação, então, seguirá até o primeiro dia de tratamento.

Desde o dia da abertura da janela até o final do experimento, é importante observar diariamente se os embriões estão vivos, se continuam o seu desenvolvimento normalmente e se permanecem livres de contaminações. Caso algum embrião tenha morrido ou fungos tenham proliferado, os ovos precisam ser descartados, conforme orientações da CEUA que analisou o projeto.

### **3º) Início do tratamento (EDD 7-8)**

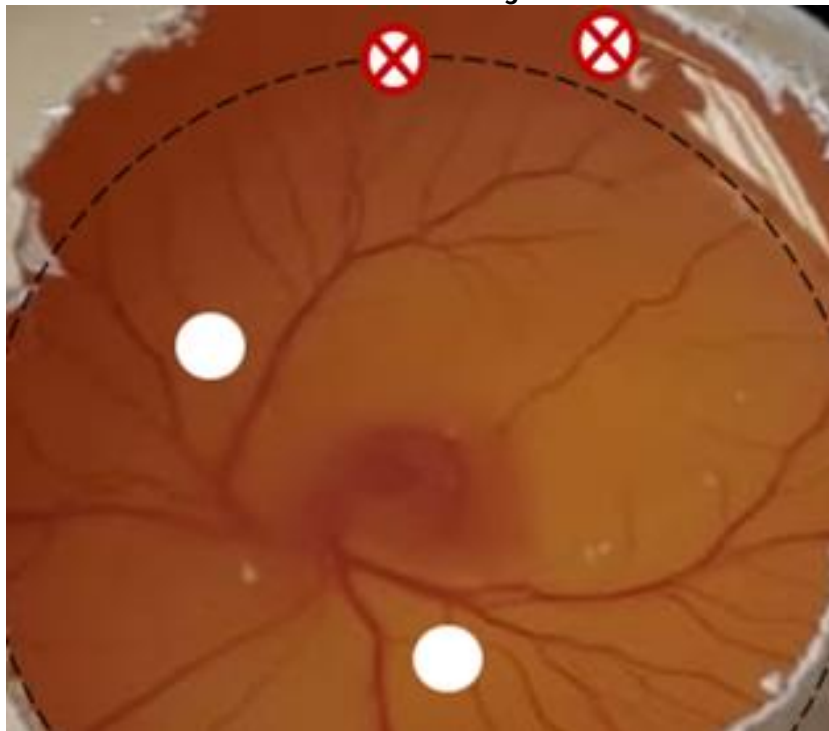
Para a avaliação do potencial angiogênico ou antiangiogênico, a inserção da substância e/ou célula teste deve ocorrer entre o EDD 7 e o EDD 8. De acordo com Nowak-Sliwinska et al. (2018), o EDD 7 é o mais apropriado pelas seguintes razões: (a) as áreas entre os grandes vasos estão menos vascularizadas, permitindo uma melhor avaliação dos eventos angiogênicos e (b) o sistema imune ainda não está desenvolvido.

Segundo Blacher (2005), a CAM tem um crescimento acelerado entre o EDD 5 e o 10. Após o EDD 10, a rede de proliferação dos capilares sanguíneos diminui significativamente e inicia a sua maturação.

No dia de início do tratamento, os ovos embrionados devem ser cuidadosamente retirados da incubadora e transportados para o fluxo laminar, previamente esterilizado. Com a ajuda de uma pequena tesoura, a janela de observação deve ser aumentada (Foto 1, letra F). Sugerimos que, assim como na primeira manipulação, seja aderida uma fita adesiva sobre a casca durante a abertura para minimizar a contaminação.

Com auxílio de pinças previamente autoclavadas, colocar o papel de filtro embebido com a substância a ser testada sobre a CAM. É importante que o controle seja feito com o veículo de diluição da substância e que o papel de filtro esteja embebido com o mesmo volume em todas as amostras. Estas devem ser colocadas com cuidado sobre a CAM, entre o embrião e a borda da CAM, conforme indicado na Foto 2.

**Foto 2 - Locais apropriados para inserção dos discos de papel de filtro embebidos com substância a ser testada no ensaio da CAM do embrião de galinha**



**Fonte:** Elaboração dos autores.

**Nota:** Os círculos brancos indicam os locais corretos de inserção do papel de filtro, enquanto os círculos brancos com X indicam locais incorretos. É importante localizar a borda da CAM (linha pontilhada) para que os suportes físicos das substâncias a serem testadas se encontrem na parte de dentro, longe das bordas.

Uma vez que os suportes sólidos com o tratamento foram implantados, é importante checar e registrar diariamente a sobrevivência do embrião e a resposta ao agente testado.

#### **4º) Coleta dos resultados (EDD 11-14)**

A coleta dos resultados deve ocorrer entre o EDD 11 e 14. A resposta angiogênica ou antiangiogênica ocorre cerca de 96 horas após o estímulo, com um aumento ou diminuição na densidade dos vasos ao redor do suporte sólido. Caso o agente testado seja angiostático, a densidade de vasos diminuirá progressivamente após 72-96 horas e eventualmente desaparecerá (RIBATTI, 2016). Para a coleta dos resultados, é fundamental seguir os passos:

1. Verificar se os embriões estão vivos, tendo em vista que membranas corioalantoicas de embriões mortos podem gerar falso negativo.
2. Fotografar a CAM utilizando, preferencialmente, um estereomicroscópio com câmera acoplada. Caso o equipamento esteja indisponível, é possível utilizar uma câmera

fotográfica fixada a uma distância padrão para o registro de todas as amostras, com um bom sistema de iluminação, pois o ambiente do ovo é naturalmente escuro. O plano do foco deve ser escolhido entre o plexo capilar ectodérmico e a rede de vasos sanguíneos preexistentes.

3. Uma vez fotografadas, as membranas corioalantoicas podem ser retiradas e fixadas em formaldeído 3,7% para estudo histológico. Para tanto, recomendamos a leitura de Deryugina e Quigley (2008).

4. Uma vez finalizados os procedimentos, os embriões devem ser eutanasiados seguindo a orientação do CONCEA. De acordo com o Guia Brasileiro de Boas Práticas para Eutanásia em Animais (CONSELHO FEDERAL DE MEDICINA VETERINÁRIA, 2012), para ovos embrionados de até 14 dias, recomenda-se o resfriamento por submersão de 20 minutos com posterior maceração ou decapitação.

## 5º) Análise dos resultados

A primeira etapa para a análise dos resultados é a aquisição de imagens digitais de boa qualidade. A quantificação da angiogênese realiza-se de 3 a 4 dias após o estímulo pela implantação do composto e/ou célula a ser estudado(a) e envolve a contagem do número de vasos da CAM na área do disco de papel de filtro. Vale ressaltar que a área analisada é a mesma em todas as amostras.

Em resposta a agentes que estimulam a angiogênese, os vasos sanguíneos recém-formados convergem para a direção do disco de papel de filtro em um padrão de raio de roda. Já os agentes antiangiogênicos levam à diminuição da formação de novos vasos sanguíneos e, às vezes, ao desaparecimento de redes preexistentes. Os níveis de angiogênese também podem ser determinados pela contagem dos pontos de ramificação nos vasos adjacentes aos discos. Para maior detalhamento sobre os métodos de quantificação da angiogênese na CAM, sugerimos a leitura de Blacher et al. (2005).



## QUANTO TEM SIDO USADO NA PESQUISA?

Por mais de 50 anos, a CAM tem sido empregada como uma plataforma para estudos diretos da biologia vascular em condições fisiológicas e patológicas, e para a avaliação de agentes e terapias que modulam positiva ou negativamente a angiogênese (NOWAK-SLIWINSKA

et al., 2018). Ademais, a CAM é uma alternativa com aceitação regulatória internacional aos testes de avaliação de toxicidade ocular em coelhos que abrangem alterações no sistema vascular (ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION DEVELOPMENT, 2019). O custo-efetividade, a acessibilidade da CAM e o fácil manuseio do modelo para intervenção e imageamento da vasculatura em tempo real da experimentação têm atraído muitos pesquisadores (NOWAK-SLIWINSKA; SEGURA; IRUELA-ARISPE, 2014).

Inúmeros agentes pró e antiangiogênicos foram identificados por meio do ensaio CAM, incluindo fatores de crescimento (RIBATTI et al., 2001), hormônios (GAGLIARDI; COLLINS, 1993), compostos naturais livres (RIBATTI et al., 2011; SU et al., 2016) e compostos nanoemulsionados (DEHELEAN et al., 2011). Os pontos de ramificação dos vasos, a densidade vascular e o tamanho médio da malha são critérios comumente utilizados para análise do padrão vascular (NOWAK-SLIWINSKA et al., 2018).

A reconstrução da rede vascular é crítica para o sucesso clínico de transplantes e regeneração tecidual. Biomateriais desenvolvidos com propriedades personalizadas para induzir a angiogênese foram testados no modelo CAM, contribuindo significativamente para os campos da engenharia de tecidos e medicina regenerativa. Yang et al. (2004); Liu et al. (2012); Ahtzaz et al. (2020) e Mangir et al. (2019), por exemplo, demonstraram a habilidade de *scaffolds* poliméricos carregados com um tipo de proteína morfogenética e semeados com osteoprogenitores humanos promover extensa angiogênese e deposição de matriz óssea para correção de defeito segmentar femoral. Nesses estudos, fêmures de embriões de galinha em EDD 18 foram excisados e houve a criação de defeitos ósseos para a inserção dos *scaffolds*. Fêmures com *scaffolds* foram, então, implantados diretamente na CAM de ovos em EDD 10 e os explantes foram obtidos após sete dias para análise. Moreno-Jiménez et al. (2016) também observaram infiltração de capilares da CAM em enxerto ósseo humano e manutenção da viabilidade das células humanas. Segundo os autores, o modelo CAM pode mimetizar a contribuição vascular para a regeneração óssea humana, consistindo em uma alternativa simples e refinada de experimentos com animais.

A utilização de CAM como plataforma de *screening* de agentes angiostáticos para o tratamento de câncer também é amplamente reportada por Guido et al. (2015); Kleibeuker et al. (2015); Weiss (2015); Berndsen et al. (2017); Ghazaryan et al. (2019) e Oliveira et al. (2019). Apesar das inúmeras variações nos protocolos experimentais, em geral, todas elas envolvem a transplantação de células tumorais na superfície da CAM. Quando implantadas sobre a CAM, as células tumorais são capazes de estimular a angiogênese, obtendo o seu suprimento, o que



permite que se desenvolvam como em seus hospedeiros naturais, tendo o potencial de invadir e metastatizar (NASCIMENTO et al., 2019).

A utilização da CAM propicia diversidade no tipo de suporte sólido, no tempo de início de tratamento, nos tipos celulares e compostos a serem testados, entre outras inúmeras variações que podem influenciar os resultados. Por exemplo, Kleibecker et al. (2015) usaram células de adenocarcinoma de cólon e esôfago em suporte de Matrigel em CAM previamente lacerada no EDD 6. O tratamento, neste caso, ocorreu no EDD 10 e foi aplicado topicamente próximo ao tumor. Já Guido et al. (2015) usaram células de adenocarcinoma mamário ressuspendidas em meio de cultura com inibidores mitóticos sobre esponja hemostática de colágeno hidrolisado, o qual foi inserido na CAM em EDD 10. Enquanto Weiss et al. (2015) transplantaram esferoides de carcinoma ovariano no EDD 7 para a superfície da CAM, e avaliaram o efeito combinatório de agentes antiangiogênicos por meio de injeção intravenosa no EDD 10. Sendo assim, recomendamos a leitura de revisões abrangentes que descrevem adaptações do ensaio padrão da CAM (NOWAK-SLIWINSKA; SEGURA; IRUELA-ARISPE, 2014; RIBATTI, 2017).

## REFERÊNCIAS

- AHTZAZ, Samreen *et al.* Boron for tissue regeneration-it's loading into chitosan/collagen hydrogels and testing on chorioallantoic membrane to study the effect on angiogenesis. **International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials**, v. 69, n. 8, p. 525-534, 2020. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/00914037.2019.1581202?journalCode=gpom20>. Acesso em: 12 abr. 2021.
- ANDRADE, Silvia P. *et al.* Sponge-induced angiogenesis in mice and the pharmacological reactivity of the neovasculature quantitated by fluorimetric method. **Microvascular Research**, v. 54, n. 3, p. 253-261, 1997. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9441896/>. Acesso em: 12 abr. 2021.
- AUERBACH, Robert *et al.* Angiogenesis assays: problems and pitfalls. **Cancer and Metastasis Reviews**, v. 19, n. 1-2, p. 167-172, 2000. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11191056/>. Acesso em: 12 abr. 2021.
- BALDAVIRA, Camila Machado. **Estudo do efeito da beta-2-glicoproteína I no desenvolvimento da rede vascular corioalantóida de embriões de galinha**. 2017. 74 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017. Disponível em: <https://teses.usp.br/teses/disponiveis/5/5160/tde-28072017-134103/pt-br.php>. Acesso em: 26 mar. 2021.
- BARONEZA, José Eduardo. **Atividades práticas em embriologia**. Brasília, DF: Editora da UnB, 2013.
- BERNSEN, Robert H. *et al.* Combination of ruthenium(II)-arene complex [Ru( $\eta^6$ -p-cymene)Cl<sub>2</sub>(pta)] (RAPTA-C) and the epidermal growth factor receptor inhibitor erlotinib results in efficient angiostatic and antitumor activity. **Scientific Reports**, v. 7, n. 43005, p. 1-16, 2017. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/srep43005>. Acesso em: 29 mar. 2021.
- BLACHER, Silvia *et al.* Quantification of angyogenesis in the chicken chorioallantoic membrane (CAM). **Image Analysis & Stereology**, v. 24, n. 3, p. 169-180, 2005. Disponível em: <https://www.ias-iss.org/ojs/IAS/article/view/784>. Acesso em: 1 abr. 2021.
- BOSTON UNIVERSITY. **IACUC**: use of live embryonated eggs of egg-laying vertebrate species. Boston: Boston University, 2020. Disponível em: <https://www.bu.edu/researchsupport/forms-policies/iacuc-use-of-live-embryonated-eggs-of-egg-laying-vertebrate-species/>. Acesso em: 27 mar. 2021.
- BRASIL. Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008. Regulamenta o inciso VII do parágrafo 1º do art. 225 da Constituição Federal, estabelecendo procedimentos para o uso científico de animais, revoga a Lei nº 6.638, de 8 de maio de 1979; e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 9 out. 2008. Disponível em: [http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/\\_ato2007-2010/2008/lei/l11794.htm#:~:text=Regulamenta%20o%20inciso%20VII%20do,1979%3B%20e%20d%C3%A1%20outras%20provid%C3%A2ncias](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2007-2010/2008/lei/l11794.htm#:~:text=Regulamenta%20o%20inciso%20VII%20do,1979%3B%20e%20d%C3%A1%20outras%20provid%C3%A2ncias). Acesso em: 16 mar. 2021.

CHEN, Zhengo; WEN, Zhihua; BAI, Xiaochun. In vivo chick Chorioallantoic Membrane (CAM) angiogenesis assays. **Bio-protocol**, v. 3, n. 18, p. 1-5, Sept. 2013. Disponível em: <https://bio-protocol.org/e913>. Acesso em: 26 mar. 2021.

CONSELHO FEDERAL DE MEDICINA VETERINÁRIA. **Guia brasileiro de boas práticas para eutanásia em animais**. Brasília, DF: Conselho Federal de Medicina Veterinária: Comissão de Ética, Bioética e Bem-estar Animal, 2012. Disponível em: <https://www.cfmv.gov.br/guia-brasileiro-de-boas-praticas-para-a-eutanasia-em-animais/comunicacao/publicacoes/2020/08/03/#4>. Acesso em: 1 abr. 2021.

CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE E EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL. **Resolução Normativa nº 25, de 29 de setembro de 2015**. Baixa o Capítulo "Introdução Geral" do Guia Brasileiro de Produção, Manutenção ou Utilização de Animais para Atividades de Ensino ou Pesquisa Científica do Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal - CONCEA. Brasília, DF: Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal, 2015. Disponível em: [https://www.in.gov.br/materia/-/asset\\_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/33252781/do1-2015-10-02-resolucao-normativa-n-25-de-29-de-setembro-de-2015-33252777](https://www.in.gov.br/materia/-/asset_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/33252781/do1-2015-10-02-resolucao-normativa-n-25-de-29-de-setembro-de-2015-33252777). Acesso em: 26 mar. 2021.

DEHELEAN, C. A. et al. Anti-angiogenic effects of betulinic acid administered in nanoemulsion formulation using chorioallantoic membrane assay. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 7, n. 2, p. 317-324, 2011. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21702370/>. Acesso em: 12 abr. 2021.

DERYUGINA, Elena I.; QUIGLEY, James P. Chapter two: chick embryo chorioallantoic membrane models to quantify angiogenesis induced by inflammatory and tumor cells or purified effector molecules. **Methods in Enzymology**, v. 444, p. 1-20, 2008. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2699944/>. Acesso em: 1 abr. 2021.

FEDER, David et al. Standardization of a method to study angiogenesis in a mouse model. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 85, n. 4, p. 1483-1487, 2013. Disponível em: [https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0001-37652013000401483#B03](https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0001-37652013000401483#B03). Acesso em: 26 mar. 2021.

GABRIELLI, Maria Gabriella; ACCILI, Daniela. The chick Chorioallantoic Membrane: a model of molecular, structural, and functional adaptation to transepithelial ion transport and barrier function during embryonic development. **BioMed Research International**, v. 2010, p. 1-12, Mar. 2010. Disponível em: <https://www.hindawi.com/journals/bmri/2010/940741/>. Acesso em: 25 mar. 2021.

GAGLIARDI, A.; COLLINS, D. C. Inhibition of angiogenesis by antiestrogens. **Cancer Research**, v. 53, n. 3, p. 533-535, Feb. 1993. Disponível em: <https://cancerres.aacrjournals.org/content/53/3/533>. Acesso em: 31 mar. 2021.

GARCIA, Sonia M. Lauer; FERNÁNDEZ, Casimiro G. **Embriologia**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2011.

GHAZARYAN, Narine et al. The antitumor efficacy of monomeric disintegrin obtustatin in S-180 sarcoma mouse model. **Investigational New Drugs**, v. 37, n. 5, p. 1044-1051, 2019. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30680583/>. Acesso em: 12 abr. 2021.

GILBERT, Scott F.; BARRESI, Michael J. F. **Biologia do desenvolvimento**. 11. ed. Porto Alegre: Artmed, 2019.

GIMBRONE, Michael A. *et al.* Tumor growth neovascularization: an experimental model using rabbit cornea. **Journal of National Cancer Institute**, v. 52, n. 2, p. 413-427, Feb. 1974. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/4816003/>. Acesso em: 12 abr. 2021.

GUIDO, Bruna C. *et al.* Impact of kinesin Eg5 inhibition by 3,4-dihydropyrimidin-2(1H)-one derivatives on various breast cancer cell features. **BMC Cancer**, v. 15, n. 283, p. 1-15, 2015. Disponível em: <https://bmccancer.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12885-015-1274-1>. Acesso em: 15 mar. 2021.

HAMBURGER, Viktor; HAMILTON, Howard L. A series of normal stages in the development of the chick embryo. **Journal of Morphology**, v. 88, n. 1, p. 49-92, 1951. Disponível em: <https://anatomypubs.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/aja.1001950404>. Acesso em: 1 abr. 2021.

KLEIBEUKER, Esther A. *et al.* Optimal treatment scheduling of ionizing radiation and sunitinib improves the antitumor activity and allows dose reduction. **Cancer Medicine**, v. 4, n. 7, p. 1003-1015, 2015. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1002/cam4.441>. Acesso em: 29 mar. 2021.

KNIGHTON, D. R.; FIEGEL, V. D; PHILIPS, G. D. The assay of angiogenesis. **Progress in Clinical and Biological Research**, v. 365, p. 291-299, 1991.

LEENE, W; DUYZINGS, M.J.; STEEG, C Van. Lymphoid stem cell identification in the developing thymus and bursa of Fabricius of the chick. **Zeitschrift für Zellforschung und Mikroskopische Anatomie**, v. 136, p. 521-533, 1973. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/BF00307368>. Acesso em: 12 abr. 2021.

LIU, Xi *et al.* In vivo studies on angiogenic activity of two designer self-assembling peptide scaffold hydrogels in the chicken embryo chorioallantoic membrane. **Nanoscale**, v. 4, n. 8, p. 2720–2727, 2012. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22430460/>. Acesso em: 12 abr. 2021.

MANGIR, Nasid *et al.* Using ex ovo chick chorioallantoic membrane (CAM) assay to evaluate the biocompatibility and angiogenic response to biomaterials. **ACS Biomaterials, Science & Engineering**, v. 5, n. 7, p. 3190-3200, 2019. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/acsbiomaterials.9b00172>. Acesso em: 12 abr. 2021.

MORENO-JIMÉNEZ, Inés *et al.* The chorioallantoic membrane (CAM) assay for the study of human bone regeneration: a refinement animal model for tissue engineering. **Scientific Reports**, v. 6, n. 32168, p. 1-12, 2016. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5006015/>. Acesso em: 31 mar. 2021.

NARBAITZ, R. *et al.* Ultrastructural and immunocytochemical evidence for the presence of polarised plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase in two specialised cell types in the chick embryo chorioallantoic membrane. **Journal of Anatomy**, v. 186, n. 2, p. 245-252, 1995. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7649823/>. Acesso em: 26 mar. 2021.

NASCIMENTO, Bruno F. O. *et al.* Ring-fused diphenylchlorins as potent photosensitizers for photodynamic therapy applications: in vitro tumor cell biology and in vivo chick embryo chorioallantoic membrane studies. **ACS Omega**, v. 4, n. 17, p. 17244-17250, 2019. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acsomega.9b01865>. Acesso em: 29 mar. 2021.

NATIONAL INSTITUTE OF HEALTH. The public health service responds to commonly asked questions. **ILAR News**, v. 33, n. 4, p. 68-70, Fall 1991. Disponível em: <https://grants.nih.gov/grants/olaw/references/ilar91.htm>. Acesso em: 27 mar. 2021.

NOWAK-SLIWINSKA, Patrycja *et al.* Consensus guidelines for the use and interpretation of angiogenesis assays. **Angiogenesis**, v. 21, n. 3, p. 425-532, Aug. 2018. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6237663/>. Acesso em: 22 mar. 2021.

NOWAK-SLIWINSKA, Patrycja; SEGURA, Tatiana; ARISPE, Maria Luiza Iruela. The chicken chorioallantoic membrane model in biology, medicine and bioengineering. **Angiogenesis**, v. 17, p. 779-804, 2014.

NOWAK-SLIWINSKA, Patrycja; SEGURA, Tatiana; IRUELA-ARISPE, M. Luisa. The chicken chorioallantoic membrane model in biology, medicine and bioengineering. **Angiogenesis**, v. 17, n. 4, p. 779-804, 2014. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4583126/>. Acesso em: 22 mar. 2021.

ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION DEVELOPMENT. **Guidance Document on Integrated Approaches to Testing and Assessment (IATA) for serious eye damage and eye irritation**. 2nd. ed. Paris: Organisation for Economic Co-Operation Development, 2019. (Series on Testing and Assessment, n. 263). Disponível em: [http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV-JM-MONO\(2017\)15/REV1%20&doclanguage=en](http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV-JM-MONO(2017)15/REV1%20&doclanguage=en). Acesso em: 29 mar. 2021.

OLIVEIRA, Catarina *et al.* Fucoïdan from *Fucus vesiculosus* inhibits new blood vessel formation and breast tumor growth in vivo. **Carbohydrate Polymers**, v. 223, n. 115034, 2019. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31426965/>. Acesso em: 12 abr. 2021.

RIBATTI, Domenico. The chick embryo chorioallantoic membrane (CAM) assay. **Reproductive Toxicology**, v. 70, p. 97-101, June 2017. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0925477316300363>. Acesso em: 12 abr. 2021.

RIBATTI, Domenico. The chick embryo chorioallantoic membrane (CAM): a multifaceted experimental mode. **Mechanisms of Development**, v. 141, p. 70-77, Aug. 2016. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27178379/>. Acesso em: 12 abr. 2021.

RIBATTI, Domenico *et al.* Chorioallantoic membrane capillary bed: a useful target for studying angiogenesis and anti-angiogenesis in vivo. **The Anatomical Record**, v. 264, n. 4, p. 317-324, 2001. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11745087/>. Acesso em: 29 mar. 2021.

RIBATTI, Domenico *et al.* Endogenous basic fibroblast growth factors is implicated in the vascularization of the chick embryo chorioallantoic membrane. **Developmental Biology**, v. 170, p. 39-49, 1995. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11745087/>. Acesso em: 26 mar. 2021.

RIBATTI, Domenico *et al.* Tryptase and chymase are angiogenic in vivo in the chorioallantoic membrane assay. **The International Journal of Developmental Biology**, v. 55, n. 1, p. 99-102, 2011. Disponível em: <http://www.ijdb.ehu.es/web/paper.php?doi=10.1387/ijdb.103138dr>. Acesso em: 22 mar. 2021.

RUSSEL, W. M. S.; BURCH, R. L. **The principles of humane experimental technique**. London: Johns Hopkins University, 1959. Disponível em: <https://caat.jhsph.edu/principles/the-principles-of-humane-experimental-technique>. Acesso em: 26 mar. 2021.

SIERO, Daniel; VÉRON, Nadège; MARCELLE, Christophe. The chicken embryo as an efficient model to test the function of muscle fusion genes in amniotes. **Plos One**, v. 12, n. 5, p. 1-13, May 2017. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0177681>. Acesso em: 27 mar. 2021.

SNEDDON, Lynne U.; HALSEY, Lewis G.; BURY, Nic R. Considering aspects of the 3Rs principles within experimental animal biology. **Journal of Experimental Biology**, v. 220, p. 3007-3016, 2017. Disponível em: <https://jeb.biologists.org/content/220/17/3007.long>. Acesso em: 26 mar. 2021.

SU, Min *et al.* The anti-angiogenic effect and novel mechanisms of action of Combretastatin A-4. **Scientific Reports**, v. 6, n. 28139, p. 1-11, 2016. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27338725/>. Acesso em: 22 mar. 2021.

TRÉZ, Thalles de Astrogildo e. Considerações sobre o conceito dos 3Rs e o potencial conflito com novas compreensões do animal experimental. **Revista Brasileira de Zootecias**, v.19, n. 2, p. 97-113, 2018. Disponível em: <https://www.semanticscholar.org/paper/Considera%C3%A7%C3%B5es-sobre-o-conceito-dos-3Rs-e-o-conflito-Tr%C3%A9z/dc4ae582ee3caa0bc2e4c5b20b68dd1c3e7ff5e4>. Acesso em: 26 mar. 2021.

WEISS, Andrea *et al.* Rapid optimization of drug combinations for the optimal angiostatic treatment of cancer. **Angiogenesis**, v. 18, n. 3, p. 233-244, 2015. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4473022/>. Acesso em: 29 mar. 2021.

YANG, Xuebin B. *et al.* Human osteoprogenitor bone formation using encapsulated bone morphogenetic protein 2 in porous polymer scaffolds. **Tissue Engineering**, v. 10, n. 7-8, p. 1037-1045, 2004. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15363161/>. Acesso em: 12 abr. 2021.

## SUGESTÕES DE LEITURAS

BLACHER, Silvia *et al.* Quantification of angiogenesis in the chicken chorioallantoic membrane (CAM). **Image Analysis & Stereology**, v. 24, n. 3, p. 169-180, 2005. Disponível em: <https://www.ias-iss.org/ojs/IAS/article/view/784>. Acesso em: 1 abr. 2021.

DERYUGINA, Elena I.; QUIGLEY, James P. Chapter two: chick embryo chorioallantoic membrane models to quantify angiogenesis induced by inflammatory and tumor cells or purified effector molecules. **Methods in Enzymology**, v. 444, p. 1-20, 2008a. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2699944/>. Acesso em: 1 abr. 2021.

DERYUGINA, Elena I.; QUIGLEY, James P. Chick embryo chorioallantoic membrane model systems to study and visualize human tumor cell metastasis. **Histochemistry Cell Biology**, v. 130, n. 6, p. 1119-1130, Dec. 2008b. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2699943/>. Acesso em: 1 abr. 2021.

## 15 ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS DE TOXICIDADE EM ENSAIOS PRÉ-CLÍNICOS

Ana Paula Negreiros Nunes Alves  
Marcus Davis Machado Braga



### O QUE SERÁ FEITO?

A avaliação das alterações patológicas induzidas por novas drogas em animais de laboratório representa um pilar de segurança antes do uso clínico. Esta primeira avaliação, que é feita por meio de colorações histopatológicas convencionais, representa, sem sombra de dúvidas, a maior contribuição para o desenvolvimento de novos tratamentos para as doenças de humanos e animais.

A coloração de Hematoxilina-eosina (HE) é universalmente utilizada na rotina diagnóstica para corar tecidos previamente fixados em formaldeído utilizando esses corantes na revelação do material a ser estudado. Nas células coradas por HE, os ácidos nucleicos presentes no núcleo são corados pela acidófila hematoxilina, dando ao núcleo um tom azul-purpúrea. A eosina é atraída pelos elementos básicos das proteínas plasmáticas corando o citoplasma de róseo a vermelho claro. Destaca-se que esta coloração sempre deve ser feita e analisada antes de qualquer outra coloração histoquímica, reação imuno-histoquímica, ou mesmo de análises moleculares (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

É imperioso sempre buscar a confecção de lâminas histológicas de alta qualidade, representadas por macroscopia adequada, fixação em soluções bem preparadas, processamento histológico com microtomia e coloração apropriados, além de correta inclusão dos fragmentos. Ressalta-se, ainda, a necessidade de uma interpretação de excelência. Somente assim, o patologista poderá identificar as possíveis alterações nos órgãos ou nos tecidos relacionando-os ou não aos efeitos induzidos pela substância testada.



### POR QUE SERÁ FEITO?

O uso de animais de laboratório para o estudo de efeitos de agentes químicos e terapêuticos vem de longa história. Ressalta-se, que, no século XVIII, Morgagni reportou suas tentativas de comparar as alterações histopatológicas induzidas por ingestão acidental de



substâncias químicas, como o arsênio, em pessoas que as manipulavam nos testes com animais (GREAVES, 2012).

Os princípios dos testes de substâncias químicas com potencial terapêutico foram definidos em 1938 por Geilling e Cannon, os quais podem ser resumidos em nove tópicos (GREAVES, 2012):

- a) Conhecimento da composição da droga ou método de preparação.
- b) Estudos de toxicidade aguda em diferentes espécies de animais.
- c) Experimentos variados de toxicidade crônica com doses e em diferentes espécies.
- d) Avaliação microscópica minuciosa de órgãos e/ou tecidos.
- e) Efeitos das substâncias nas vias de metabolização e excreção, como no fígado e no rim.
- f) Avaliação da taxa de absorção e eliminação, via de excreção e concentração no sangue periférico e nos tecidos.
- g) Interação com outros medicamentos e alimentos.
- h) Cuidadosa avaliação de reações idiossincráticas ou desconhecidas.

Vê-se, portanto, que a avaliação morfológica de toxicidade se constitui em um passo importante e imprescindível para o desenvolvimento de fármacos.

A análise microscópica pode, ainda, sanar deficiências de modelos animais em que os parâmetros analisados não detectam alterações de toxicidade. Citam-se como exemplos: a neurotoxicidade causada por drogas anticâncer, a hipersensibilidade cutânea diante das injeções intramusculares e subcutâneas, além da toxicidade hepática e renal, onde o patologista pode detectar alterações inflamatórias mínimas que são de grande significado clínico. Geralmente é muito esclarecedora a correlação das alterações do trato gastrointestinal, a via de absorção com as hepáticas e renais, e as vias de excreção. A microscopia representa, ainda, uma das mais sensíveis técnicas para avaliar alterações causadas no sistema reprodutor, no pulmão e no miocárdio (GREAVES, 2012; KUMAR, 2010).

O patologista pode detectar desde alterações incipientes e preliminares, como também pode avaliar a extensão do dano causado pela substância teste nos órgãos e tecidos.

Com essas observações, tem-se o objetivo de facilitar as análises histopatológicas e o entendimento dos diversos achados descritos nos relatórios das pesquisas laboratoriais, principalmente nos roedores (ratos e camundongos), haja vista a sua ampla utilização. Isso é justificado pelo fato de serem animais pequenos, de fácil manutenção das condições de alimentação e habitação, reprodução rápida e com metabolismo acelerado, fornecendo os

resultados dos processos estudados de forma mais célere. Além desses roedores serem passíveis das mesmas doenças que acometem os humanos, como as cardiopatias, cânceres, diabetes, dentre outras (SOUZA, 2013; ARGENTA et al., 2009; GOBATTO et al., 2008; FAGUNDES; TAHA, 2004).



## ONDE SERÁ FEITO?



## COM QUE SERÁ FEITO?

O estudo morfológico de toxicidade inclui a análise das alterações celulares reversíveis e irreversíveis visualizadas nos principais órgãos afetados por drogas, seja em virtude da sensibilidade a possíveis efeitos tóxicos intrínsecos à sua atividade, seja por seu papel excretor, ou mesmo pelo metabolismo dessas substâncias químicas, as quais podem, por sua vez, ser de origem sintética ou biológica (GREAVES, 2012; KUMAR, 2010; KANEL; KORULA, 2005).

Vale ressaltar que a análise do efeito histopatológico deve ser contextualizada com as doses utilizadas e, também, com as substâncias experimentais testadas, como ocorre na maioria dos modelos animais utilizados nas pesquisas laboratoriais na Universidade Federal do Ceará.

Assim, este capítulo propõe tecer considerações sobre o estudo dos pulmões, os rins, o baço, o coração, o fígado, o estômago e os intestinos, utilizando amostras montadas em lâminas de ponta fosca coradas por HE em microscopia ótica para verificação das estruturas híginas e alterações histopatológicas em cada órgão específico após administração de substâncias testadas.



## COMO SERÁ FEITO?

### Pulmões

Os pulmões exercem uma função chave na oxigenação sanguínea, recebendo grande parte do fluxo sanguíneo, carreador de substâncias químicas diversas. É de tal forma sensível à ação de drogas que muitos dos seus receptores têm uma resposta inversa aos congêneres nas demais localizações corporais, no sentido de manter o fluxo sanguíneo permanente, mesmo em situações de hipovolemia ou vasoplegia. Qualquer alteração no seu parênquima afeta enormemente sua produtividade funcional com reflexos sistêmicos cruciais.

### Considerações Histofisiológicas

Os pulmões de camundongos têm proporcionalmente menores espaços alveolares com uma distribuição bronquiolar não dicotômica. Isso faz com que o corte histológico longitudinal dos pulmões desses animais apresente numerosos espaços bronquiolares, que podem sugerir erroneamente bronquiectasia, uma consequência do efeito inflamatório de algumas drogas administradas, como aerossóis por via pulmonar.

Nos ratos, a divisão dicotômica não deixa dúvidas, pois eles são vistos mais esparsamente. Os septos alveolares anterobasais do pulmão dos ratos costumam apresentar aparente espessamento, decorrente de congestão fisiológica, a qual desaparece nos alvéolos posteriores.

Outro achado fisiológico comum a ambas as espécies é o aglomerado linfocitário na periferia de bronquíolos, os linfócitos BALT (do inglês: *bronchus-associated lymphoid tissue*), os quais não representam necessariamente resposta imune ativada, a não ser quando o achado for muito acentuado.

### Considerações Histopatológicas

Hemorragia pulmonar é um achado comum como resultado do efeito de drogas administradas local ou sistemicamente. Essa hemorragia é visível nos espaços intra-alveolares, só abrangendo os bronquíolos quando decorrente de aspiração. Na hemorragia de longa duração é frequente a concomitância de macrófagos hemossiderófagos dispersos na região da ocorrência (Figuras 1 e 2).

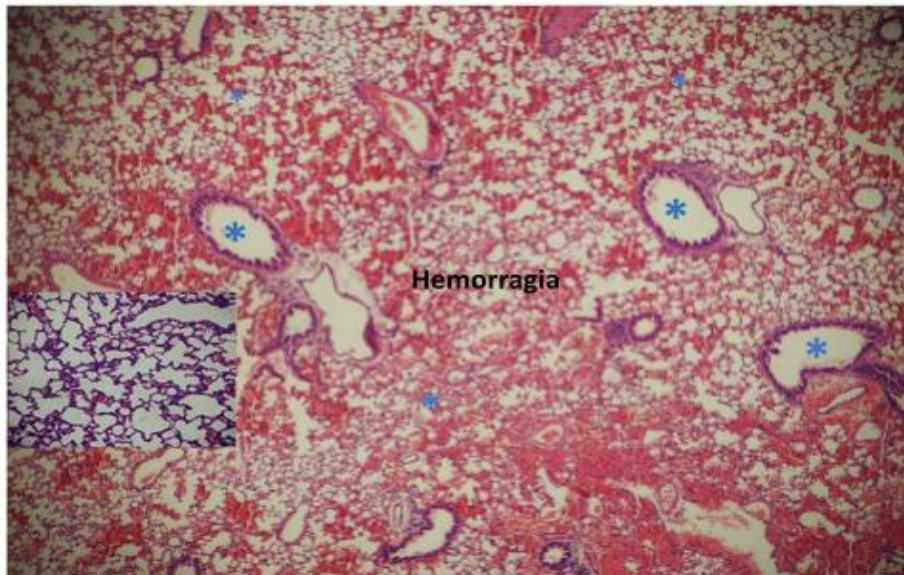
Infiltrado polimorfonuclear pode ser visto em resposta à infecção ou necrose. Não se pode deixar de considerar a possível contaminação nas gaiolas. No entanto, também pode ser decorrente do uso de drogas com toxicidade pulmonar, administradas sistemicamente ou localmente, via gasosa, principalmente quando provocam necrose em alguma intensidade. Em geral, o infiltrado polimorfonuclear é localizado nos alvéolos, estendendo-se aos bronquíolos. Quando preponderante nos bronquíolos, esse infiltrado é mais sugestivo de contaminação externa, enquanto que, quando predominante no parênquima, sugere resultar do efeito de drogas. Quando, por sua vez, ele é visto nas paredes dos vasos, é provável se tratar de uma vasculite de etiologia medicamentosa (Figura 3).

Edema intra-alveolar pode variar de intensidade e ser consequência da agressão toxicológica ao parênquima pulmonar por drogas administradas por via aérea, através de

aerossóis, como também da administração de drogas hipertensivas, ou mesmo de substâncias que aumentem a permeabilidade vascular.

A presença de fibras ou cristais no parênquima pulmonar pode representar aspiração de misturas heterogêneas no momento da administração de gavagem.

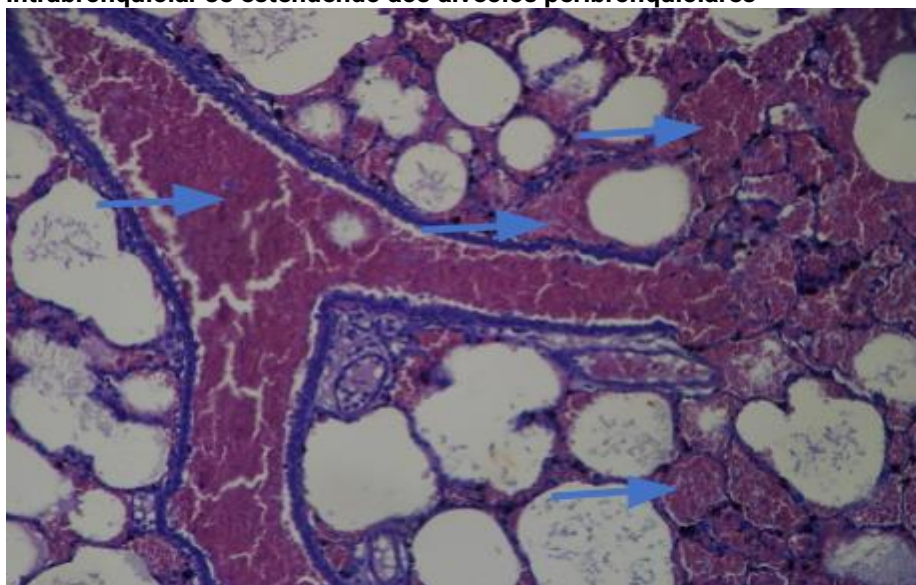
**Figura 1 - Fotomicrografia mostrando múltiplos bronquíolos no pulmão de camundongo resultante da divisão bronquiolar não dicotômica. Vê-se hemorragia alveolar difusa. No detalhe, alvéolos periféricos bem aerados**



**Fonte:** Acervo dos autores.

**Nota:** Asteriscos(\*): bronquíolos. Coloração de Hematoxilina-eosina, 40x. Detalhe 200x.

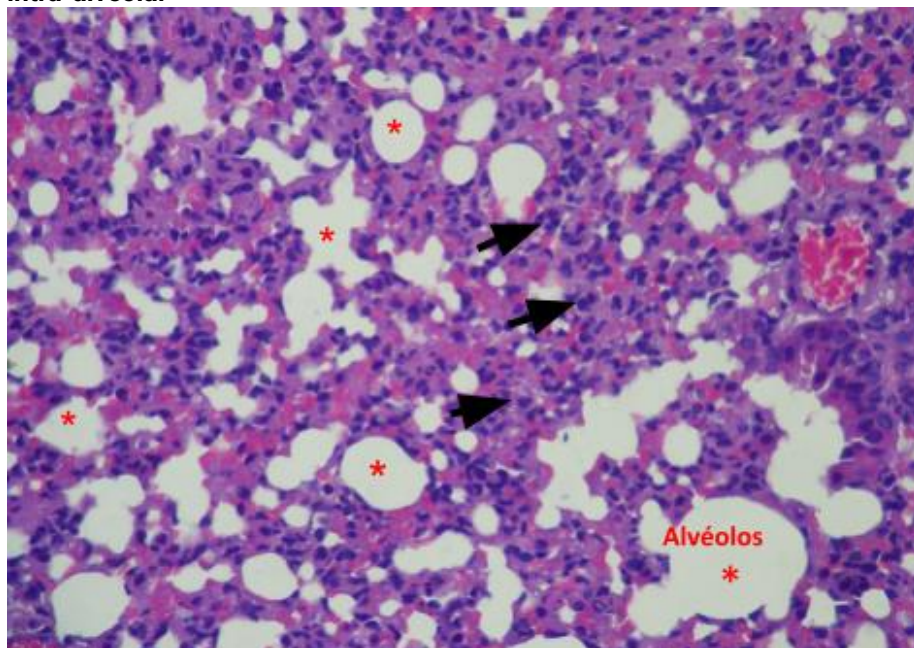
**Figura 2 - Fotomicrografia de pulmão de rato exibindo divisão bronquiolar dicotômica e hemorragia intrabronquiolar se estendendo aos alvéolos peribronquiolares**



**Fonte:** Acervo dos autores.

**Nota:** Seta: hemorragia. Coloração de Hematoxilina-eosina, 400x.

**Foto 3 - Fotomicrografia de pulmão de camundongo mostrando infiltrado inflamatório polimorfonuclear intra-alveolar**



**Fonte:** Acervo dos autores.

**Nota:** Seta: infiltrado inflamatório. Asterisco(\*): alvéolos aerados. Coloração de Hematoxilina-eosina, 400x.

## Rins

Importante filtro depurador, os rins exercem papel fundamental no estudo de atividades de diversas substâncias químicas, refletindo sua capacidade de responder e resistir aos possíveis efeitos adversos de medicamentos.

Sua capacidade reguladora de eletrólitos e de água no organismo define sua importância na pesquisa relacionada a drogas. São exemplos os diuréticos e outros medicamentos que controlam o nível desses íons, como exemplo, na sua reabsorção pelos túbulos proximais ou nos túbulos distais e canais coletores, onde a atividade da aldosterona se faz presente mais intensamente.

## Considerações Histofisiológicas

Os rins de roedores são muito semelhantes aos de humanos, guardando as devidas proporções relativas ao tamanho das estruturas. Entretanto, enquanto no rato a região medular pode ser bem identificada, o mesmo não acontece nos camundongos, sendo sua visualização dependente da incidência do corte macroscópico. Os glomérulos estão distribuídos por praticamente todo o parênquima renal. Da mesma forma, nos camundongos a região dos ductos

coletores é mais restrita em extensão. Essas diferenças parcialmente se explicam devido ao menor tamanho do órgão nestes últimos, dificultando cortes que abranjam as regiões citadas.

Geralmente, as arteríolas arqueadas estão fisiologicamente congestionadas, possivelmente em decorrência de alterações no momento do sacrifício.

É também frequente e fisiológico o encontro de células nas luzes tubulares, descamadas, quando em pequena quantidade.

Cilindros hialinos ocasionalmente dispersos são frequentemente encontrados e sem maior significado clínico. Contudo, quando ocorrendo em grande número e difusamente dispersos devem ser importantes na análise histopatológica.

### **Considerações Histopatológicas**

Os túbulos renais proximais sempre guardam, em certa medida, a vacuolização relacionada ao processo de morte, decorrentes da extrema sensibilidade e responsividade do órgão ao déficit circulatório, seja por hemorragia, seja por vasoplegia. Dessa forma sua presença deve ser considerada com reservas, a não ser quando muito marcante.

A descamação acentuada de células tubulares reflete sofrimento isquêmico ou toxicidade direta ao epitélio tubular, como no caso dos vírus e dos mercuriais. Se for intensa e bem evidente leva à formação de cilindros de células epiteliais em qualquer altura do trajeto urinário, mas principalmente nos túbulos proximais e distais (Figura 4).

Hemorragias podem ser vistas no interstício renal, entre os túbulos e canais coletores, como resultado da ação de drogas com potencial hemorrágico mais acentuado. As hemorragias intratubulares já refletem uma origem intraglomerular, como as decorrentes de drogas que alteram a permeabilidade do tufo glomerular. Geralmente se fazem acompanhar de cilindros hemáticos (Figura 5).

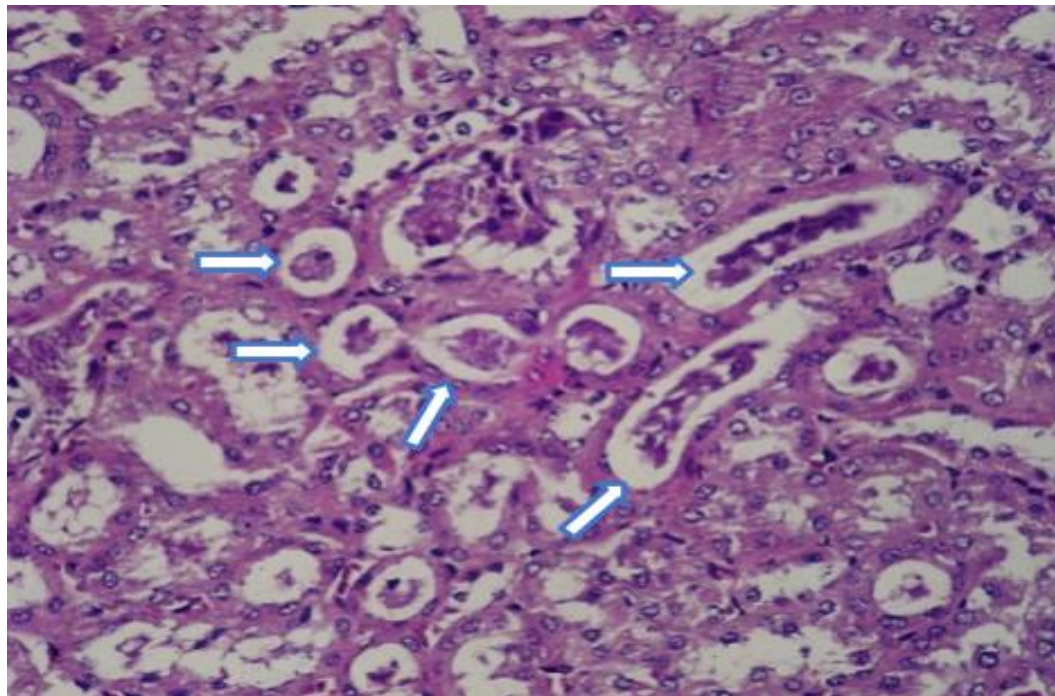
Drogas vasodilatadoras podem produzir congestão intraglomerular, reduzindo o espaço de Bowman. De forma inversa, drogas que reduzam o fluxo renal podem provocar a exsanguineidade do tufo capilar glomerular. No caso das drogas que aumentam a permeabilidade capilar glomerular é comum ser visualizado o preenchimento do Espaço de Bowman com derrame proteináceo.

Infiltrado polimorfonuclear intersticial reflete infecção ou necrose, as quais podem ser localizadas em qualquer ponto do parênquima renal, por vezes, o comprimindo ou fazendo desaparecer localmente os túbulos ou glomérulos, substituídos por autênticos abscessos.

Nesses casos, podem também ser encontrados cilindros leucocitários. Não é infrequente sua apresentação quando ocorrem infecções ocasionais durante a pesquisa (Figuras 6).

O acúmulo de linfócitos no parênquima renal, geralmente, é sugestivo de reação a drogas, atividade autoimune, viroses, ou infiltrado linfomatoso (Figura 7).

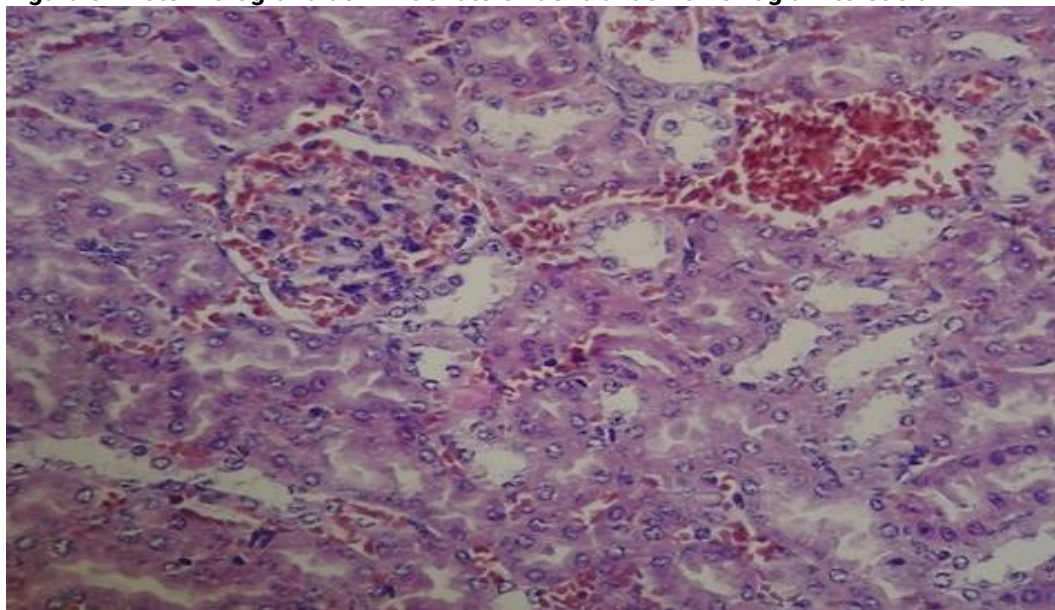
**Figura 4 - Fotomicrografia de túbulos renais de rato com cilindros hialinos em grande quantidade**



**Fonte:** Acervo dos autores.

**Nota:** Seta: cilindros hialinos em túbulos proximais e distais. Coloração de Hematoxilina-eosina, 400x.

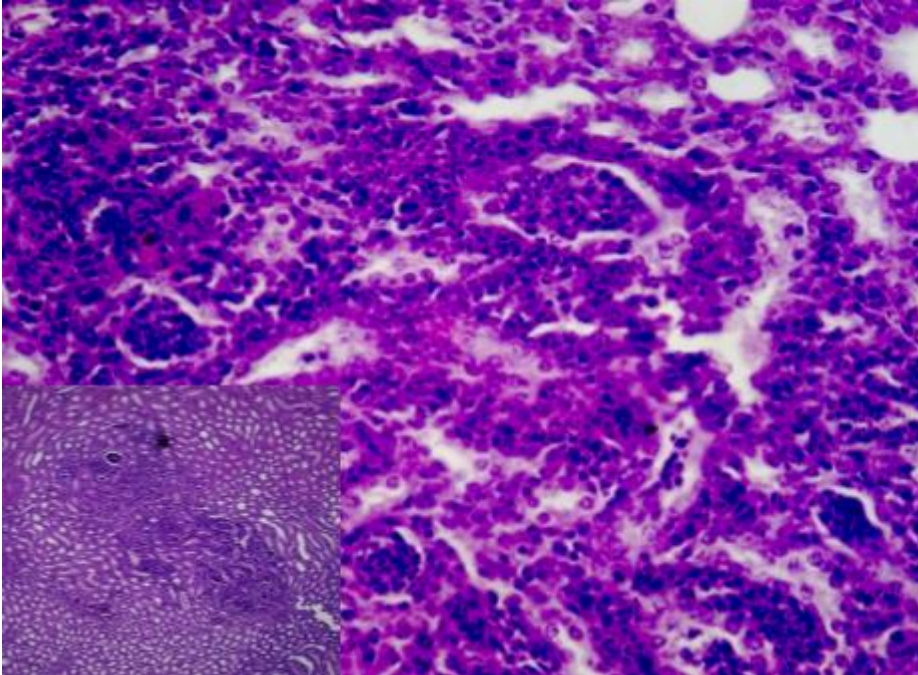
**Figura 5 - Fotomicrografia do rim de rato evidenciando hemorragia intersticial**



**Fonte:** Acervo dos autores.

**Nota:** Coloração de Hematoxilina-eosina, 400x.

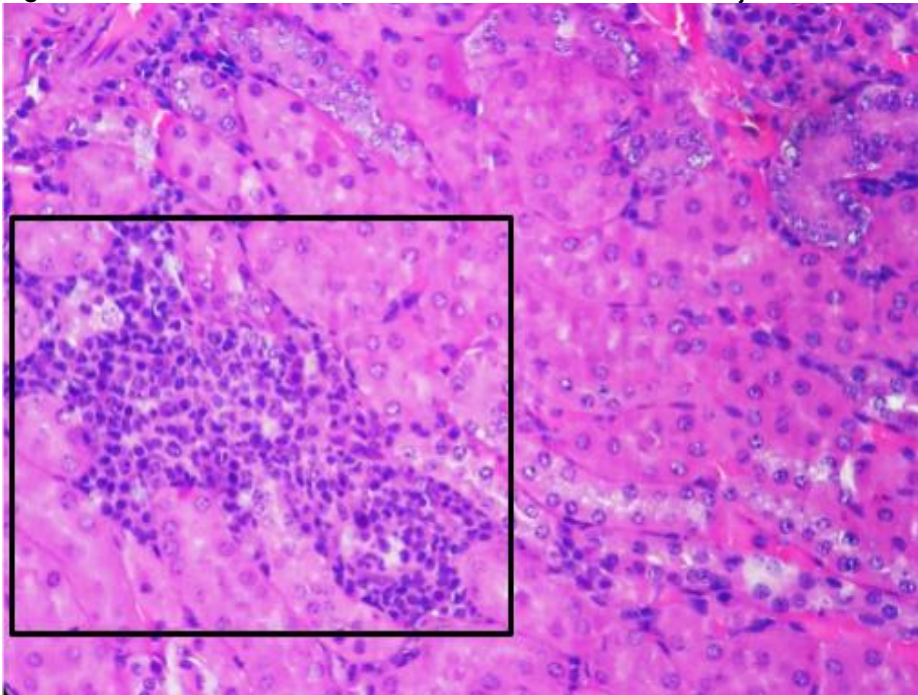
**Figura 6 - Fotomicrografia mostrando necrose com polimorfonuclear com distorção da arquitetura do parênquima renal de rato**



**Fonte:** Acervo dos autores.

**Nota:** No detalhe, visão panorâmica da necrose renal (4x). Coloração de Hematoxilina-eosina, 400x.

**Figura 7 - Infiltrado mononuclear associado à intensa tumefação celular dos túbulos renais de rato**



**Fonte:** Acervo dos autores.

**Nota:** Detalhe: infiltrado inflamatório mononuclear. Coloração de Hematoxilina-eosina, 400x.



## Baço

O baço, como importante órgão reciclador de hemácias, sendo um órgão linfoide e morada de células de defesa, reflete, sobremaneira, quaisquer agressões toxicológicas ou atividades medicamentosas que possam ser compreendidas como tais.

É um órgão que expressa muito bem a relação do animal com organismos externos ou drogas de atividade sistêmica, mesmo quando abrangendo outros órgãos.

### Considerações Histofisiológicas

Ao contrário dos humanos, tanto no rato como no camundongo a hematopoiese extramedular, principalmente, esplênica, permanece por toda a vida adulta. Portanto, é frequente o encontro de progenitores hemáticos além de megacariócitos, mais passíveis de identificação ao microscópio óptico. A frequência normal de apresentação desses megacariócitos, avaliada de forma subjetiva, aproxima-se a duas células por campo de grande aumento (400 x), principalmente na zona peritrabecular.

Como um órgão de reaproveitamento de hemácias é frequente o encontro de hemossiderófagos nos sinusóides do baço. Sua intensidade é variável a depender de uma série de fatores como o estado nutricional, idade, raça, dentre outros, além da ação de drogas.

A proporção normal entre a polpa vermelha e a polpa branca é cerca de 50% ou um pouco mais em favor da vermelha. Discreta congestão da polpa vermelha é um achado esperado e dentro da normalidade, levando a essa pequena diferença. Nos animais *specific pathogen free* (SPF) com microbiota intestinal controlada, a polpa branca não expressa centros germinativos nos folículos.

### Considerações Histopatológicas

Partindo dos achados normais, variações encontradas sinalizam claramente possíveis reações do órgão à administração de drogas.

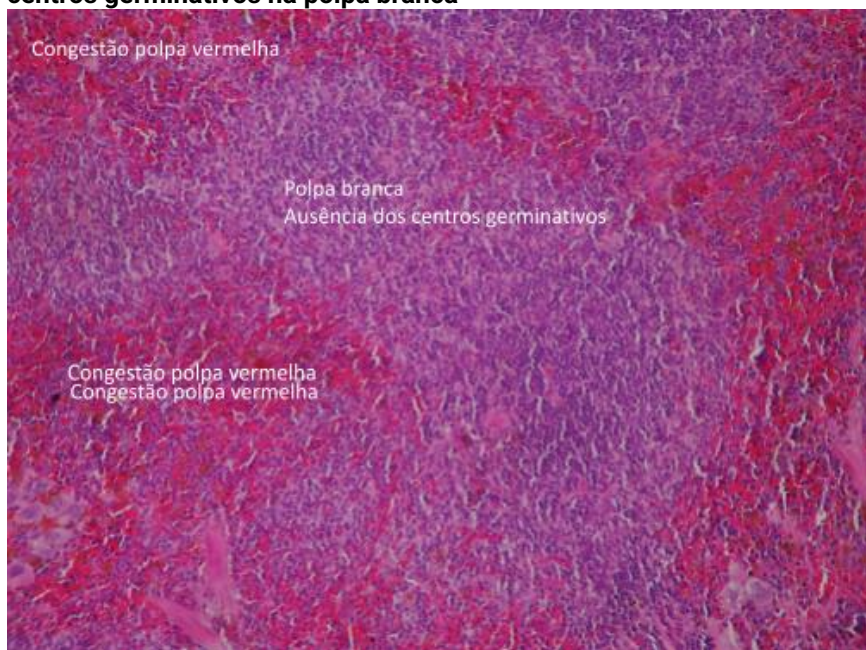
Drogas que produzem reações de sensibilidade modificam a proporção entre a polpa vermelha e a branca, hiperplasiando a polpa branca. Nos animais infectados por vírus ou mesmo por bactérias, são típicos os folículos proliferativos com um evidente centro germinativo. A polpa branca, nesses casos varia de proporção, podendo chegar a abranger quase todo o parênquima, dependendo da intensidade da reação (Figuras 8 e 9)

Naquelas drogas que afetam os componentes sanguíneos, a hematopoiese pode ser aumentada ou reduzida de acordo com a sua atividade, afetando positivamente ou negativamente esse mecanismo. Conseqüentemente, tem-se variação no número de megacariócitos e de hemossiderófagos, onde a resposta é mais explicitada. Com o uso de drogas hemolíticas pode se intensificar a presença de hemossiderófagos. Com drogas que produzem hipoplasia de células sanguíneas, o número de megacariócitos pode ser grandemente reduzido (Figuras 9 e 10).

Entretanto, nem sempre essa resposta apresenta o mesmo sentido da ação tóxica da droga, pois no limite da exaustão do órgão ele pode parar de produzir a reação esperada.

Finalmente, a cápsula do baço pode estar espessada nos processos que cronicamente afetam o tamanho do órgão, como leucemias, tumores linfóides sólidos e infecções parasitárias.

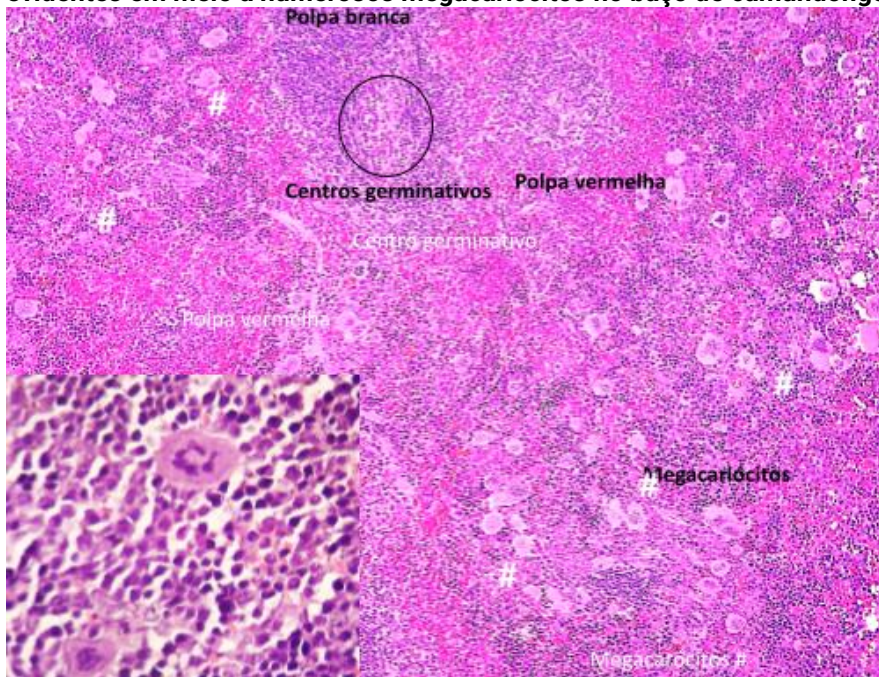
**Figura 8 - Fotomicrografia do baço de rato demonstrando congestão da polpa vermelha e ausência de centros germinativos na polpa branca**



**Fonte:** Acervo dos autores.

**Nota:** Coloração de Hematoxilina-eosina, 200x.

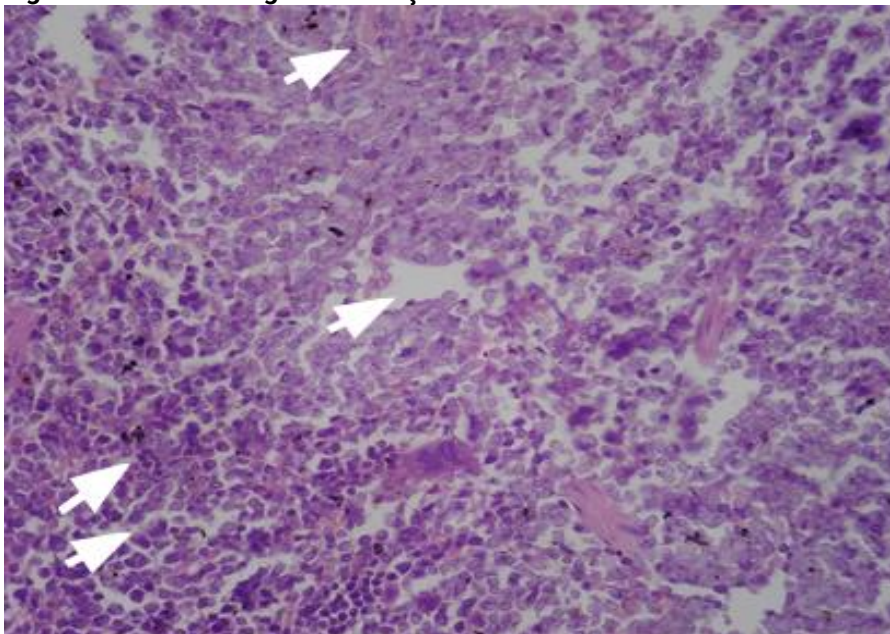
**Figura 9 - Fotomicrografia evidenciando hiperproliferação da polpa branca com centros germinativos evidentes em meio a numerosos megacariócitos no baço de camundongo**



**Fonte:** Acervo dos autores.

**Nota:** No detalhe: megacariócitos. Coloração de Hematoxilina-eosina/ 100x. Detalhe: 400x.

**Figura 10 - Fotomicrografia de baço de rato com numerosos hemossiderófagos**



**Fonte:** Acervo dos autores.

**Nota:** Seta: Hemossiderófagos. Coloração de Hematoxilina-eosina, 400x.

## **Coração**

Um órgão muito sensível e dinâmico, experimentalmente, nele dificilmente se encontram achados histopatológicos em resposta à atividade de drogas, a não ser em pesquisas de ação crônica. Referente a drogas de atividade cardiotoxicidade aguda, antes das lesões surgirem, ocorre sua paralisação.

Qualquer droga com atividade cardiotrópica possui o potencial efeito de descompensar a despolarização das células dos núcleos geradores do impulso elétrico, levando ao seu bloqueio e morte imediata. Da mesma forma, drogas podem agir na condução desse impulso pelas fibras de Purkinje, levando à fibrilação ou parada súbita do coração, em geral não havendo tempo para necrose ou evidente sofrimento do parênquima. Somente com técnicas de coloração especial a necrose incipiente seria detectável.

### **Considerações Histofisiológicas**

Devido ao tamanho do órgão desses animais, é possível a visão panorâmica permitindo uma análise das câmaras cardíacas, septos e paredes (Figura 11).

É importante ressaltar que as células do esqueleto fibroso do coração são visualizadas frequentemente. Ressalte-se que podem ser confundidas com infiltrado linfocitário em meio aos cardiomiócitos (Figura 12).

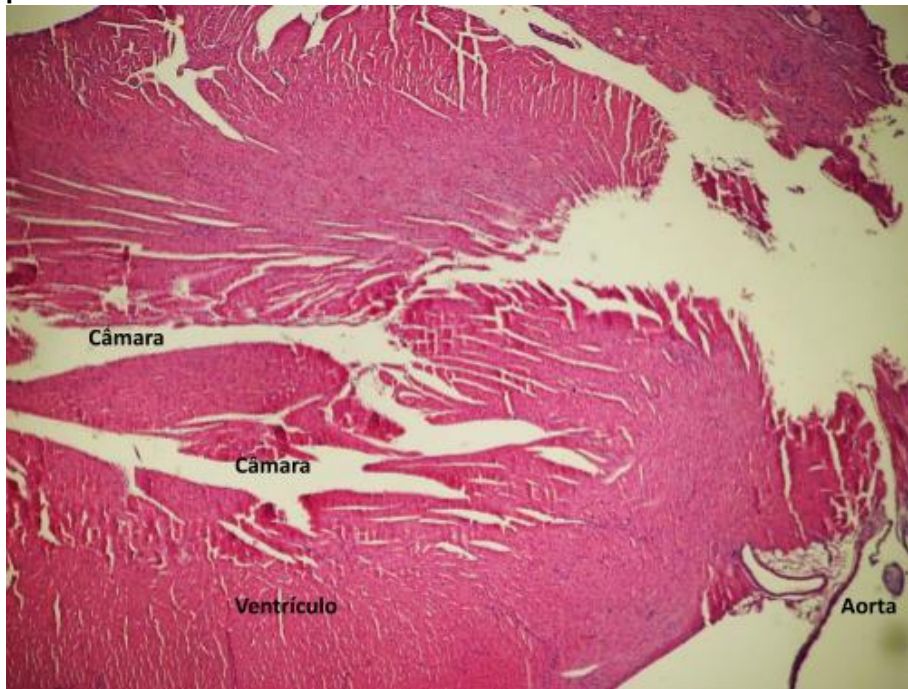
### **Considerações Histopatológicas**

O aumento do tamanho nuclear das fibras cardíacas significa que elas estão sobrecarregadas no esforço de manter o débito cardíaco. Essa manifestação, porém, somente vem ocorrer com a aplicação de drogas ou mecanismos de efeito em longo prazo.

Alterações também de longo prazo podem surgir na deposição lipídica crônica, mais visíveis nas grandes artérias que deixam o coração, especialmente a aorta, ou mesmo na degeneração lipídica dos cardiomiócitos (Figura 13).

Hemorragia e infiltrado inflamatório dificilmente são achados histopatológicos em curto prazo, a não ser por meio do uso de drogas específicas com propriedades hemorrágicas ou necrotizantes, além de infecções bacterianas, quando podem ser vistos polimorfonucleares neutrófilos. O infiltrado linfocitário pode ser encontrado em resposta à ação de drogas e reações autoimunes.

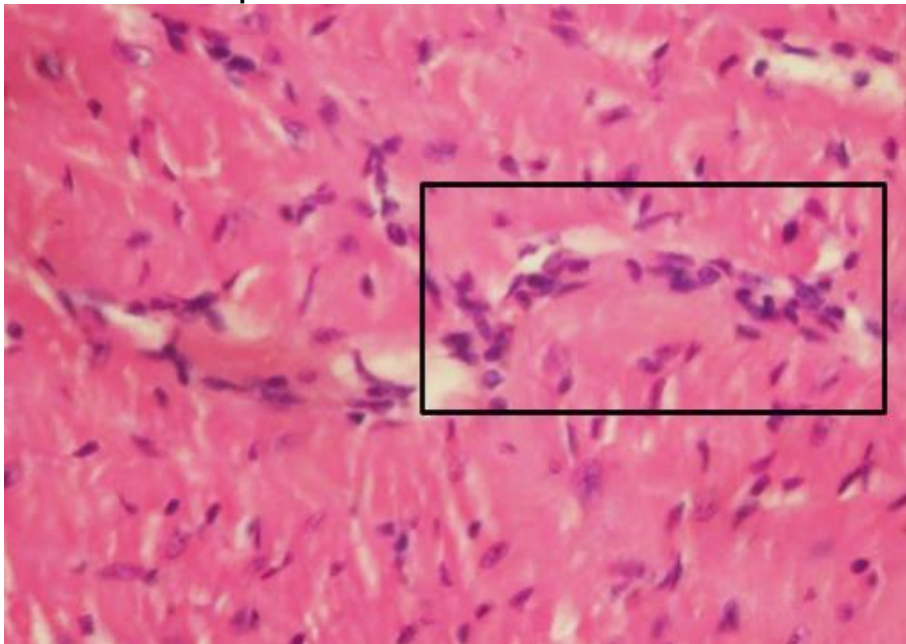
**Figura 11 - Visão panorâmica do coração de camundongo com visualização das câmaras, septos e paredes**



**Fonte:** Acervo dos autores.

**Nota:** Coloração de Hematoxilina-eosina / 100x.

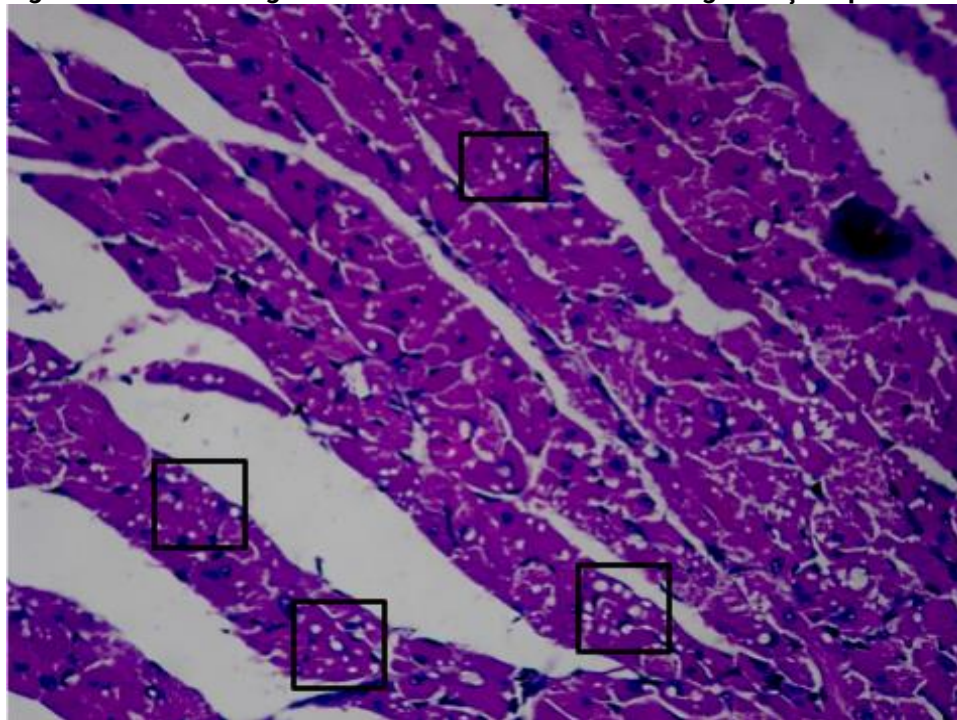
**Figura 12 - Fotomicrografia do coração de camundongo mostrando células do esqueleto fibroso em meio aos cardiomiócitos passíveis de confusão com infiltrado linfocitário**



**Fonte:** Acervo dos autores.

**Nota:** Detalhe: células do esqueleto fibroso. Coloração de Hematoxilina-eosina, 400x.

**Figura 13 - Fotomicrografia de cardiomiócitos exibindo degeneração lipídica em rato**



**Fonte:** Acervo dos autores.

**Nota:** Detalhe: degeneração lipídica de cardiomiócitos. Coloração de Hematoxilina-eosina, 400x.

## Fígado

O fígado é o principal órgão metabolizador de drogas e eliminador de impurezas nos mamíferos. Todo elemento exógeno que chega ao intestino para reabsorção, ou à corrente sanguínea, passa obrigatoriamente por ele, seja através da veia porta ou mesmo artéria hepática.

Tratando-se de um órgão filtrante no qual circula grande parte do débito cardíaco na detoxicação sanguínea das excretas corporais, o fígado é extremamente suscetível a sofrer com a ação de drogas e infecções. Em geral, vê-se alteração dos hepatócitos, hemorragias ou infiltrados inflamatórios, além de acúmulos de excretas por ele eliminados com a bile.

## Considerações Histofisiológicas

O fígado dos roedores (ratos e camundongos) apresentam estrutura lobular com composição microscópica semelhante ao do fígado humano. A literatura mostra que há cerca de 70% de similaridade entre as alterações histológicas detectadas em ensaios clínicos e a toxicidade correspondente encontrada em animais de laboratório.

O arranjo é hexagonal e bem evidente com presença de espaço porta (constituído por artéria hepática, veia porta e ducto biliar), cordões de hepatócitos de morfologia poliédrica, sinusóides e veia hepática terminal (veia centrolobular). Os lóbulos hepáticos são orientados ao redor de veia central com tratos portais em três dos seus ápices.

O parênquima hepático é organizado em placas de cordões “anastomosados” de hepatócitos ao redor da veia hepática terminal. Os hepatócitos exibem alteração mínima entre eles, mas os núcleos podem variar de tamanho, número e ploidia. Por entre os cordões de hepatócitos são observados os sinusóides, onde é possível visualizar nas paredes sinusoidais as células de Kupffer.

As lesões hepáticas exibem distribuição zonal, e a depender da sua localização, terão impacto maior ou não na toxicidade. Há três zonas definidas a partir do suprimento sanguíneo, disponibilização de oxigênio e nutrientes (zonas acinares de Rappaport). Assim a zona 1 é aquela próxima ao espaço porta, a zona 2 seria a faixa intermediária e a zona 3, a região de maior proximidade com a veia hepática centrolobular com menor suprimento vascular de nutrientes.

Diferentemente de outros órgãos, as alterações podem ser vistas após 5 a 90 dias após a administração da substância.

### Considerações Histopatológicas

A principal alteração reversível encontrada nos hepatócitos é a tumefação celular (turva) em consequência da incapacidade das células de manterem a homeostase iônica e hídrica, tornando-se tumefactas ou “inchadas”. Quando a tumefação é progressiva e intensa, o citoplasma da célula apresenta-se vacuolizado, recebendo a denominação de degeneração hidrópica ou vacuolar. A presença da degeneração hidrópica nas zonas 2 e 3 sugerindo lesão por hipóxia.

A degeneração em balão, acentuado aumento da célula em resposta a uma agressão grave, é vista nos modelos animais de hepatites infecciosas, sendo encontrada nas análises de toxicidade aguda.

Da mesma forma, a degeneração espumosa, onde o material biliar fica retido no hepatócito, dando um aspecto difuso, espumoso e tumefacto, é pouca observada nas análises químicas, a não ser naquelas envolvendo alterações na produção de bilirrubina ou causando estase biliar.

Os hepatócitos também podem apresentar acúmulos gordurosos intracelulares, condição denominada esteatose ou degeneração gordurosa. Ocorre na lesão hipóxica, em várias

lesões tóxicas e metabólicas, e nas alterações nutricionais (obesidade, debilidade), hormonais e no diabetes. A esteatose pode ser do tipo microvesicular visualizada como múltiplas gotículas diminutas que não deslocam o núcleo e do tipo macrovesicular, quando as gotículas coalescem em gotas grandes que preenchem todo o citoplasma do hepatócito, deslocando o núcleo para a periferia (Figuras 14 e 15).

A clara identificação das células de Kupffer parece ser uma característica peculiar dos roedores, visto que no ser humano não é um achado comum. Essas células, muitas vezes, apresentam-se hiperplasiadas à medida que outras alterações reversíveis ou irreversíveis também estão presentes.

Resposta inflamatória focal e/ou cordões constituídos por células mononucleares linfocitárias isoladas ou acompanhadas de polimorfonucleares neutrófilos podem ser encontrados no parênquima hepático diante da ação de diversas substâncias químicas (Figura 16).

A presença de áreas de edema e a hemorragia sinusoidal representam alterações importantes, principalmente se houver deposição de hemossiderina associada ao extravasamento de hemácias. Estas alterações acontecem, em sua maioria, na zona 1 (próximo do espaço porta) (Figura 17).

Consequente à atividade toxicológica, pode ocorrer alteração celular irreversível dos hepatócitos, como a necrose coagulativa, na qual o citoplasma das células hepáticas cora-se bem, os núcleos são lisados ou emanescerentes e há associação com células inflamatórias no entorno (Figura 18). Além disso, a apoptose, mais raramente, pode ser encontrada, sendo caracterizada por hepatócitos arredondados intensamente corados pela eosina com corpúsculos picnóticos e encolhidos no núcleo.

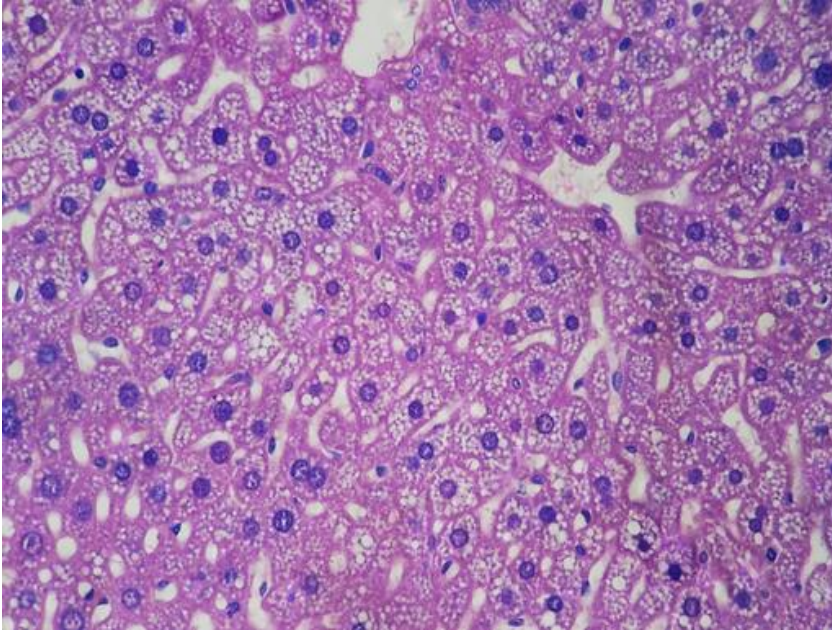
A necrose relacionada a substâncias químicas é observada mais frequentemente na zona 3, ou seja, próxima da veia centrolobular hepática. Quando a necrose hepatocelular ocorre, mas a estrutura de tecido conjuntivo reticular permanece intacta, a restituição quase perfeita da estrutura hepática é restabelecida.

Finalmente, apesar de rara nas análises de toxicidade, a fibrose hepática é formada em resposta à inflamação ou ação tóxica direta no fígado de forma repetida e crônica. É uma alteração irreversível e nos estágios iniciais desenvolve-se ao redor dos tratos portais, expandindo-se para os vizinhos ou para a veia hepática centrolobular.

Com a progressão da fibrose, o fígado é subdividido em nódulos de hepatócitos em regeneração circundado por tecido cicatricial com perda da arquitetura (cirrose).



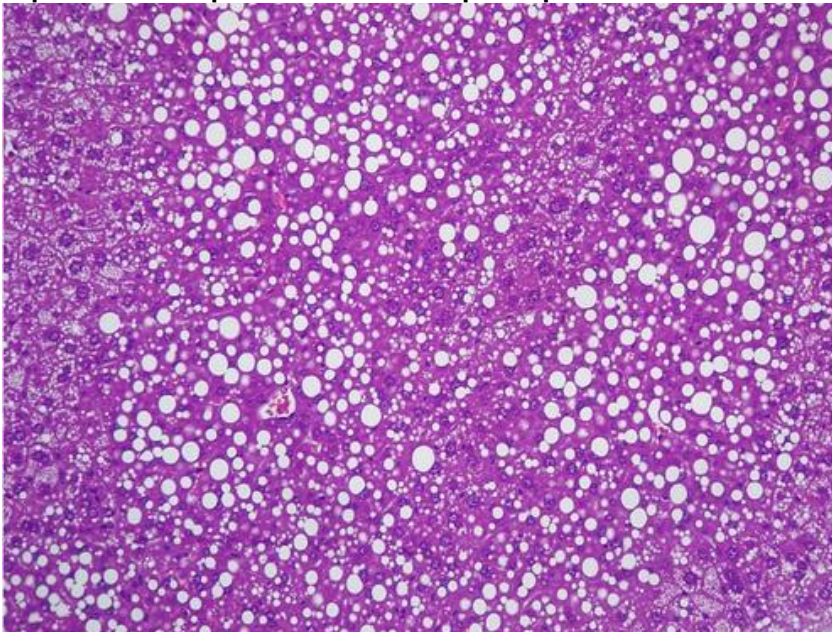
**Figura 14 - Fotomicrografia do fígado de rato demonstrando esteatose microvesicular no citoplasma dos hepatócitos sem deslocamento periférico nuclear**



**Fonte:** Acervo dos autores.

**Nota:** Múltiplos pequenos vacúolos intracitoplasmáticos. Coloração de Hematoxilina-eosina, 200x.

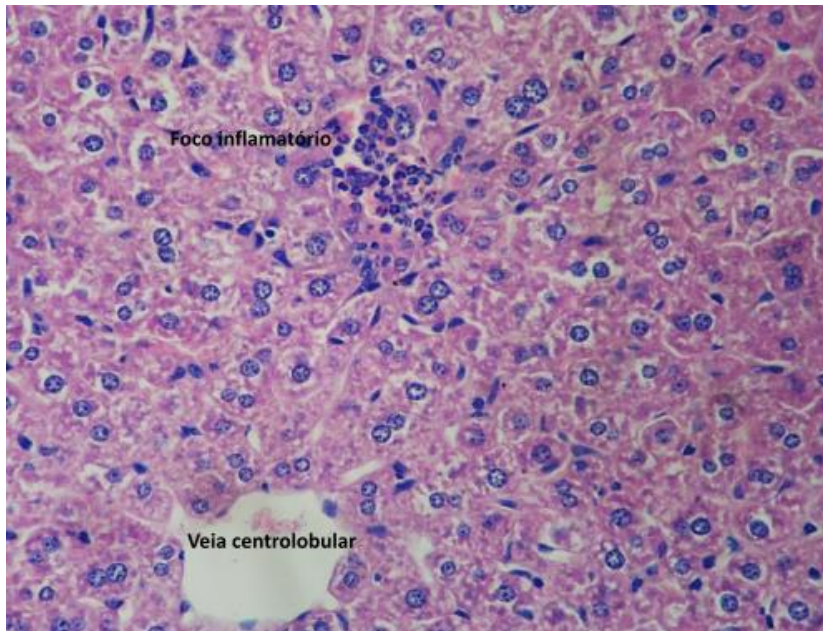
**Figura 15 - Fotomicrografia mostrando esteatose macrovesicular nos hepatócitos do parênquima hepático de rato que desloca o núcleo para a periferia**



**Fonte:** Acervo dos autores.

**Nota:** Grandes vacúolos preenchendo integralmente o citoplasma celular. Coloração de Hematoxilina-eosina, 200x.

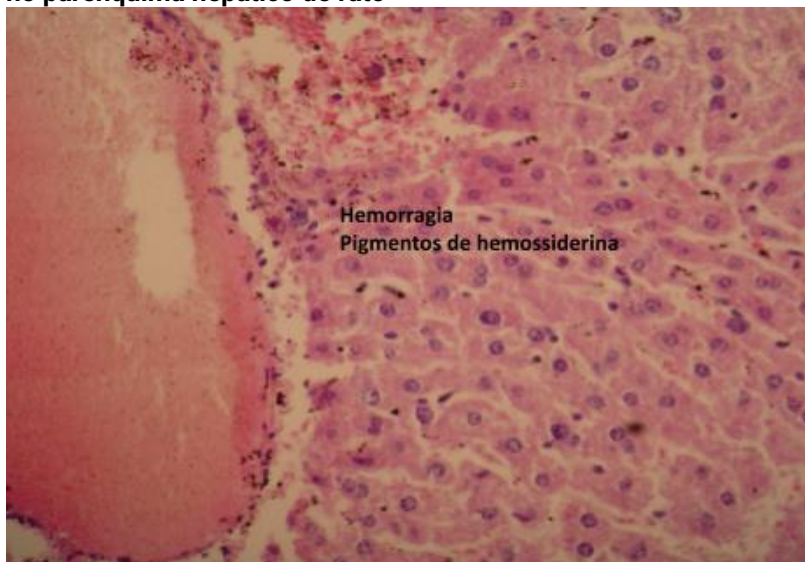
**Figura 16 - Fotomicrografia do parênquima hepático mostrando foco de células inflamatórias intrasinusoidal em rato**



**Fonte:** Acervo dos autores.

**Nota:** Coloração de Hematoxilina-eosina, 400x.

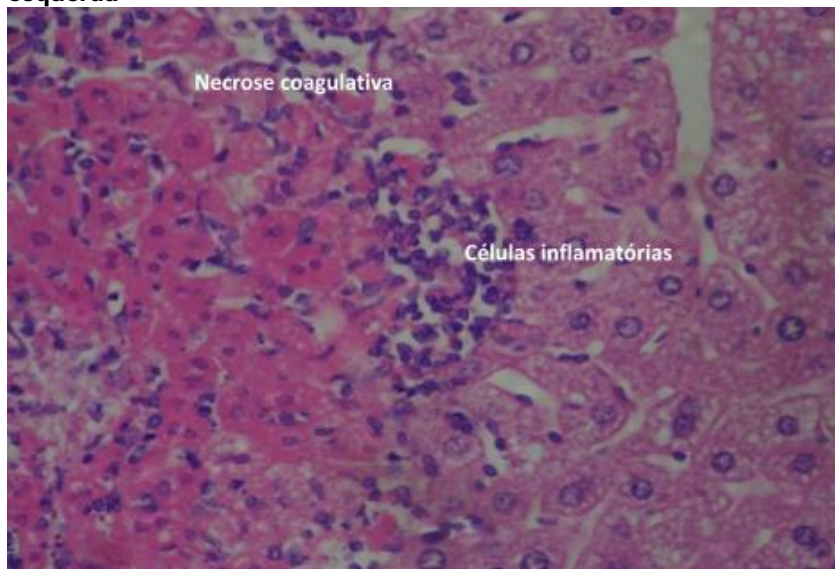
**Figura 17 - Hemorragia sinusoidal na periferia da veia centrolobular com pigmentos de hemossiderina no parênquima hepático de rato**



**Fonte:** Acervo dos autores.

**Nota:** Coloração de Hematoxilina-eosina, 200x.

**Figura 18 - Fotomicrografia do fígado de rato demonstrando extensa área de necrose coagulativa à esquerda**



**Fonte:** Acervo dos autores.

**Nota:** Coloração de Hematoxilina-eosina, 400x.

## Estômago

O estômago é um órgão coletor e digestor que acumula toda ingesta do indivíduo e, portanto, geralmente é onde se depositam as drogas administradas por via oral, seja espontaneamente ou por meio da gavagem.

Peculiarmente, sua porção superior, a parte do corpo e fundo, é produtora de ácido clorídrico, resultando em um ambiente acidificado, enquanto a porção mais inferior, o antro pilórico e parte inferior do fundo, é produtora de mucoproteínas e, portanto, promotora de um ambiente mais básico.

Essas qualidades bioquímicas podem afetar a ação de drogas testadas, seja por alteração do pH, modificando sua atividade final, seja por alterar a capacidade absorptiva, interferindo com sua meia-vida, ou mesmo por agressão às paredes do órgão mediante a responsividade de cada porção ao pH da droga.

## Características Histofisiológicas

Especialmente, os roedores (ratos, camundongos e hamster) apresentam o *forestomach*, que ocupa cerca de dois terços da área proximal do estômago, sendo revestido por epitélio pavimentoso estratificado constituído por poucas camadas celulares, além de ser hiperqueratinizado contendo ortoceratina ou paraceratina. Estudos sugerem que o *forestomach*

desses animais desempenha uma função de estocagem dos alimentos de difícil digestão, sendo liberado, gradativamente, para o estômago glandular.

Nos animais que são desprovidos do *forestomach*, a porção proximal da mucosa do estômago ou cárdia é revestida por glândulas mucosas.

É importante salientar que há uma diferença de sensibilidade na produção de alterações gástricas dentre os diferentes animais de laboratório. Por exemplo, ratos Sprague-Dawley parecem ter menor susceptibilidade aos efeitos ulcerogênicos do que os ratos Wistar.

Assim, para a análise de toxicidade no estômago, a manutenção ou a perda das características histológicas do epitélio do órgão são consideradas.

Basicamente, o epitélio colunar dos animais (rato e camundongo) da região fúndica guarda as mesmas características daquelas visualizadas nos seres humanos. A mucosa e submucosa se mantêm íntegras na ausência de agressões, sem a presença de células inflamatórias. Podem ser observados linfócitos associados à mucosa, MALT - do inglês: *mucosa-associated lymphoid tissues*, mostrando uma continuidade do revestimento com as camadas internas.

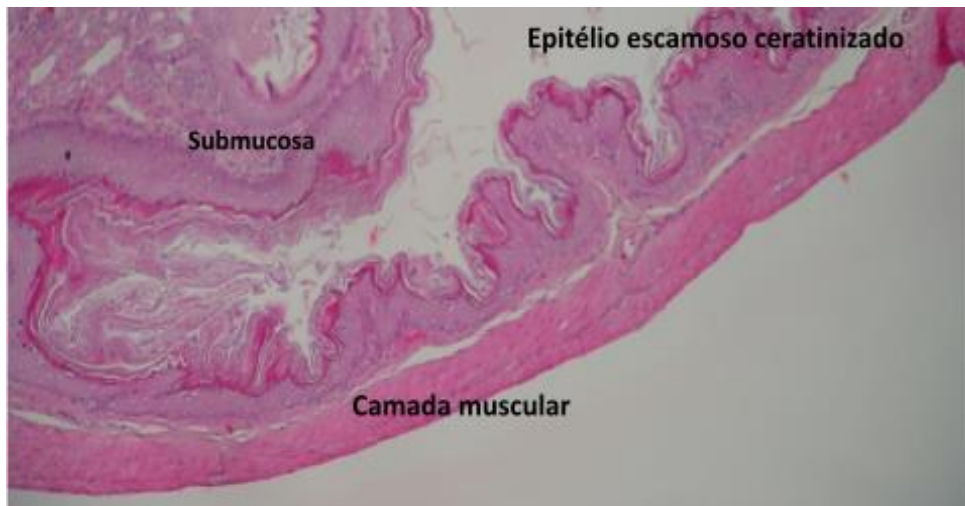
### Características Histopatológicas

Na região do *forestomach* correspondente à localização da cárdia nos seres humanos (Figura 19), podem ser encontradas agressões à integridade do epitélio de revestimento representadas por ulceração e inflamação na submucosa. Quando ulcerada, ocorrem proliferação vascular, ectasia, hemorragia e pigmentos de hemossiderina. Nas regiões circunjacentes à úlcera, acantose e hiperkeratose são achados comuns. Ocasionalmente, hiperplasia epitelial com hiperkeratose é visualizada em roedores idosos não tratados.

Na região de fundo, a integridade do revestimento mucoso com alterações nas células parietais e principais deve ser avaliada. Podem surgir vasos congestionados ou não de hemorragia na mucosa e submucosa, às vezes com células inflamatórias polimorfonucleares, além dos linfócitos GALT. Ruptura do revestimento mucoso com a presença de erosão ou ulceração em qualquer nível das camadas mais profundas, ocasionalmente, acontece (Figura 20).

Finalmente, deve-se considerar, também, a rarefação de células principais ou parietais induzidas por drogas anticancerígenas com atividade antiproliferativa, como o metotrexato (Figura 21), como também o aparecimento de metaplasia intestinal (Figura 22).

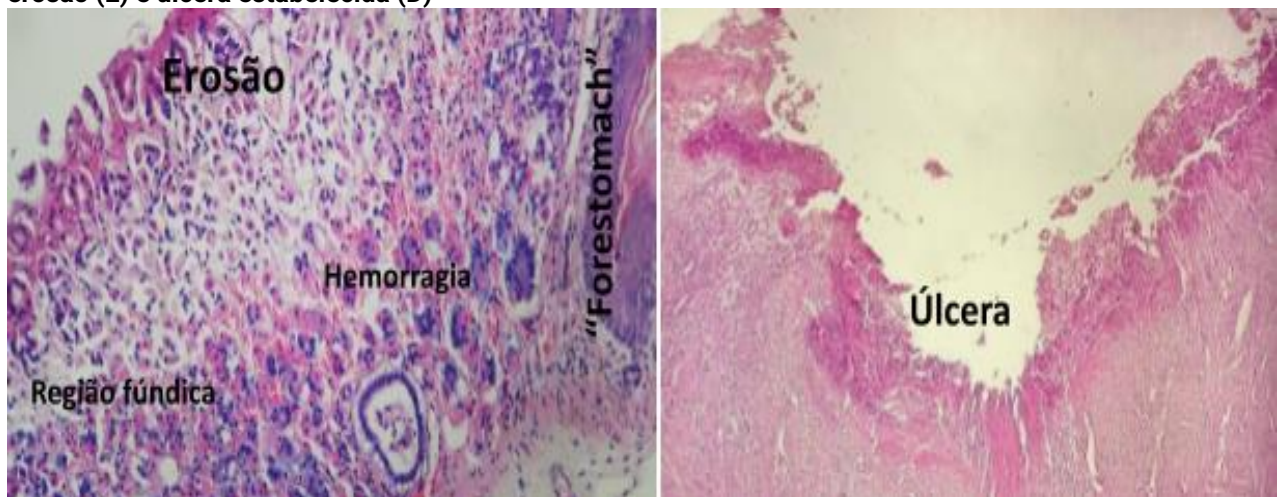
**Figura 19** - Fotomicrografia do estômago de rato evidenciando região correspondente à localização da cárdia em seres humanos, *forestomach*, com seu revestimento epitelial escamoso



**Fonte:** Acervo dos autores.

**Nota:** Coloração de Hematoxilina-eosina, 100x.

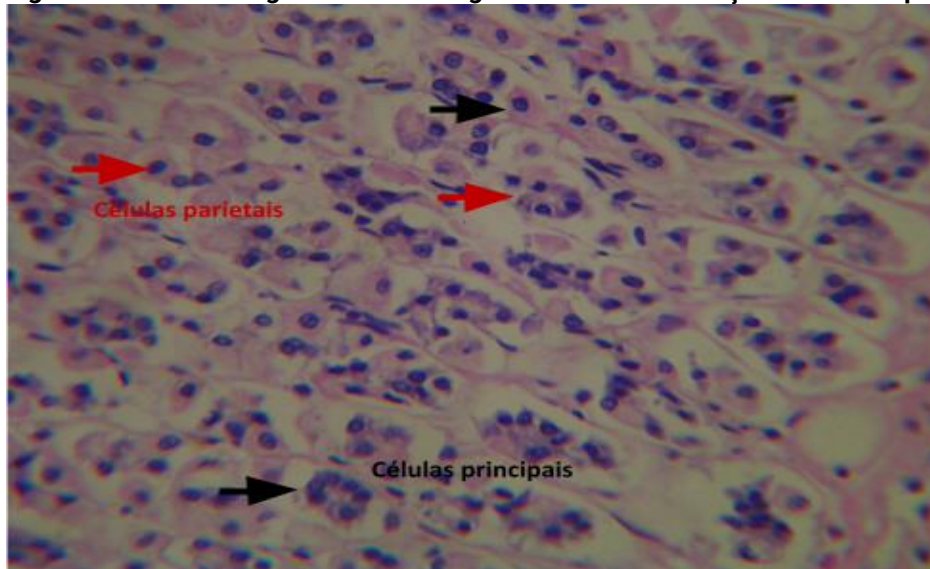
**Figura 20** - Estômago de rato exibindo alterações na região do fundo representadas por necrose com erosão (E) e úlcera estabelecida (D)



**Fonte:** Acervo dos autores.

**Nota:** E=lado esquerdo e D=lado direito. Coloração de Hematoxilina-eosina, 200x(E), 100(D).

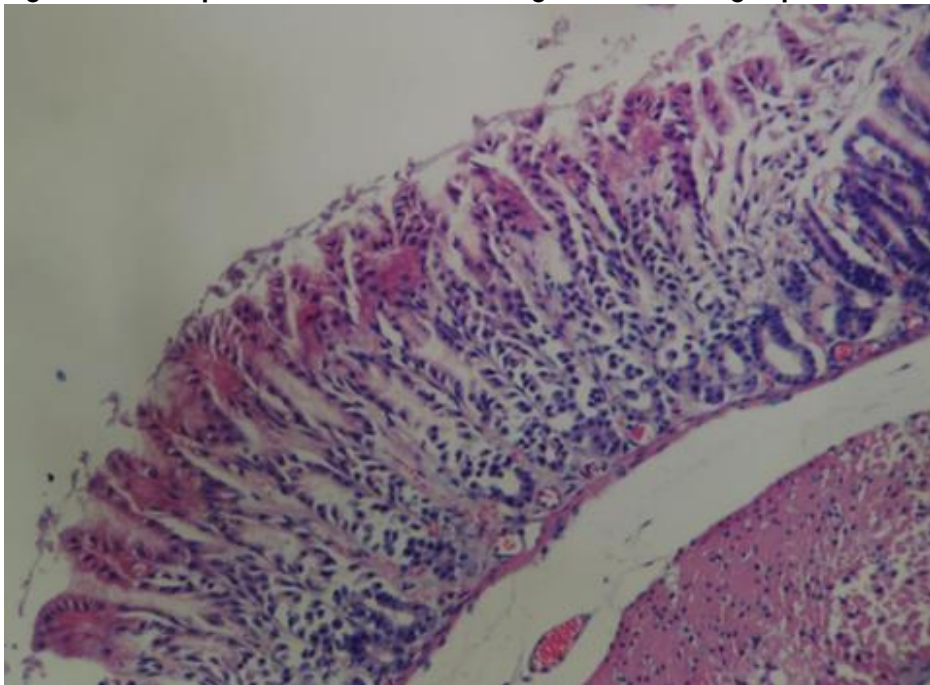
**Figura 21 - Fotomicrografia do estômago de rato com rarefação de células principais e parietais**



**Fonte:** Acervo dos autores.

**Nota:** Coloração de Hematoxilina-eosina, 400x.

**Figura 22 - Metaplasia intestinal em estômago de camundongo apresentando aspecto viloso**



**Fonte:** Acervo dos autores.

**Nota:** Coloração de Hematoxilina-eosina, 100x.

## Intestinos (delgado e cólon)

O intestino delgado é fundamental para a manutenção nutricional com sua função digestiva complementar ao estômago e, principalmente, absorptiva, que varia em cada segmento.

Uma porção proximal é encarregada de secreções básicas a partir de enzimas hepáticas e pancreáticas, se continuando com um epitélio característico com borda em escova, que amplifica sua capacidade de captar e de introduzir ao meio interno do organismo os nutrientes que chegam com os alimentos. É assim o principal mantenedor do trofismo corporal.

Nos seres humanos, no final do intestino delgado, na submucosa da região do íleo, as placas de Peyer consistem em tecido linfóide associado ao intestino ou GALT, que podem sinalizar reação de sensibilidade a drogas experimentais. Nos camundongos, porém, são uniformemente distribuídos nas três regiões (duodeno, jejuno e íleo). E, nos ratos, observa-se, ainda, a probabilidade de se encontrar tanto um maior número de placas de Peyer como também com dimensões variadas.

O intestino grosso é responsável não apenas pela eliminação da excreção do resíduo alimentar, mas também pelo controle de boa parcela da água que chega a ele com o bolo alimentar. Sendo a localização frequente de um dos cânceres mais comuns relacionados ao meio externo através do trajeto de alimentos. As pesquisas relacionadas com o câncer colorretal tornam-se muito importantes.

## Considerações Histofisiológicas

No intestino delgado, as enzimas secretadas pelo fígado e pâncreas são lançadas no alimento que chega do estômago, alterando o meio por alcalinização. Isso permite que as células colunares que apresentam membrana luminal ondulada com aspecto em escova e que revestem as vilosidades e glândulas, amplificando sua superfície de contato com o quimo e exerçam com excelência seu papel absorvedor dos nutrientes, principalmente no duodeno.

Quando lesionadas por qualquer agressão, muito frequentemente em relação a drogas, as células ficam edemaciadas, perdem a ondulação característica e, conseqüentemente, diminuem o potencial absorptivo.

Se uma droga desperta o sistema imune do animal, as placas de Peyer podem se hiperplasiar a ponto de cobrirem grandes extensões da alça intestinal na região ileocecal.

O intestino delgado apresenta, sob o ponto de vista microscópico, arranjo arquitetural na forma de vilos que terminam nas criptas Lieberkuhn, sendo as vilosidades revestidas por

epitélio cilíndrico simples, os enterócitos com células caliciformes de permeio. Na profundidade das criptas observam-se células eosinofílicas de Paneth (Figura 23).

No entanto, cada um dos três segmentos intestinais apresenta características próprias. No duodeno, observam-se, nas vilosidades, regiões mal coradas correspondentes às glândulas de Brunner, as quais não são vistas no jejuno. As células mucosas estão presentes em pequeno número, porém, há um incremento delas no íleo, quando comparado ao jejuno. Os três segmentos mostram, igualmente, uma estreita camada submucosa seguida pela muscular da mucosa.

No intestino grosso, a predominância de células caliciformes reflete bem seu papel mucoprodutor. O muco lubrifica o que restou do bolo alimentar, facilitando o trajeto através das porções finais do tubo digestório. Nesse meio tempo, a mucosa é capaz de absorver água, deixando a excreta com seu característico aspecto sólido-pastoso.

Especificamente no cólon, a mucosa apresenta glândulas tubulosas simples (criptas) com numerosas células caliciformes e pequenos enterócitos recobertos por microvilosidades. A submucosa pode penetrar na mucosa que se eleva em pregas grosseiras.

É interessante ressaltar que o epitélio entérico é totalmente renovado a cada dois a três dias em ratos e camundongos, enquanto nos seres humanos essa renovação acontece entre três e seis dias. A migração celular ao longo das glândulas nos ratos é mais rápida no íleo do que no jejuno, principalmente como resultado da menor altura dos vilos no íleo.

### Considerações Histopatológicas

No intestino delgado, as principais alterações histopatológicas encontradas são representadas por inflamação de intensidade variada, ulceração, hemorragia, necrose e apoptose da mucosa intestinal.

Na mucosa, visualizam-se perda da arquitetura das criptas, atrofia dos vilos e das criptas, além de achatamento dos vilos e das células epiteliais como consequência da apoptose e inibição da proliferação celular. Infiltração de células inflamatórias e tumefação ou vacuolização das células dos vilos também devem ser avaliadas (Figura 24).

Já na submucosa, a presença de edema e de infiltração de células inflamatórias, principalmente os granulócitos polimorfonucleares, além do aumento de vasos sanguíneos e ectasia, constituem importantes alterações em resposta a medicamentos (Figura 25).

No cólon, alterações microscópicas da mucosa aliadas ao uso de drogas, encontradas nos experimentos laboratoriais, objeto deste capítulo, são essencialmente de



natureza inflamatória, e, raramente, observadas hiperplasias e displasias epiteliais. Assim sendo, infiltrado inflamatório agudo no epitélio intacto, aumento da proliferação celular, abscessos nas criptas e ulceração da mucosa são achados comuns. Na submucosa colônica podem ser identificados infiltrado inflamatório da lâmina própria com edema, hiperemia, congestão e trombose vascular (Figura 26).

Infiltrados linfoides podem ser vistos ocasionalmente no intestino grosso de ratos, já tendo sido relatado em animais submetidos ao tratamento com interleucina 2 recombinante humana.

Finalmente, para a pesquisa é importante a possibilidade da gradação das alterações inflamatórias intestinais. Uma classificação muito utilizada na literatura foi proposta por MacPherson et al. (1978), sendo avaliada a integridade das camadas mucosa, submucosa e muscular da mucosa. As alterações histopatológicas são agrupadas e recebem um escore, onde zero significa ausência de lesão e o maior número, grave dano na mucosa intestinal.

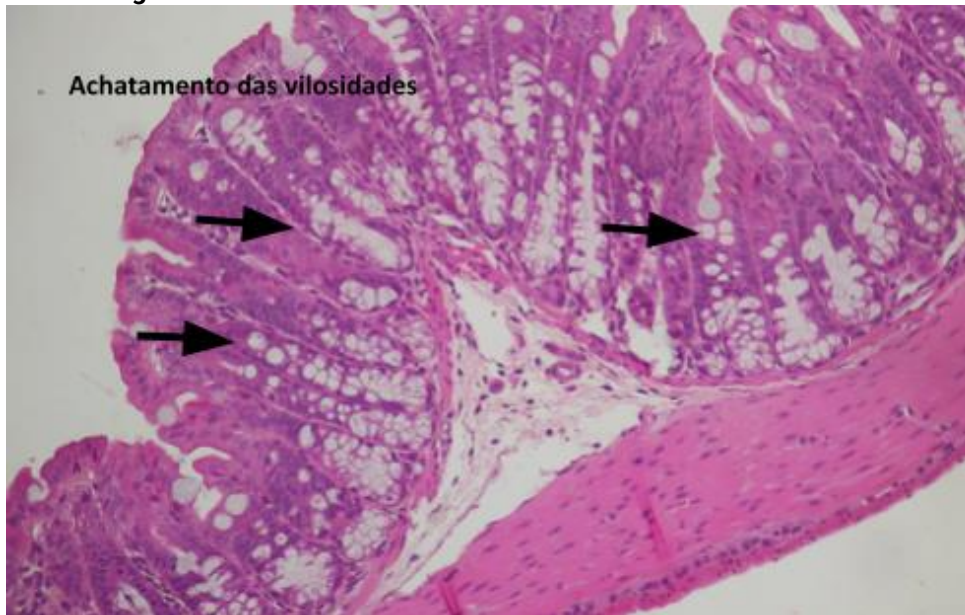
**Figura 23 - Fotomicrografia de segmento de duodeno de camundongo representado por vilosidades recobertas por epitélio cilíndrico simples**



**Fonte:** Acervo dos autores.

**Nota:** Coloração de Hematoxilina-eosina, 100x.

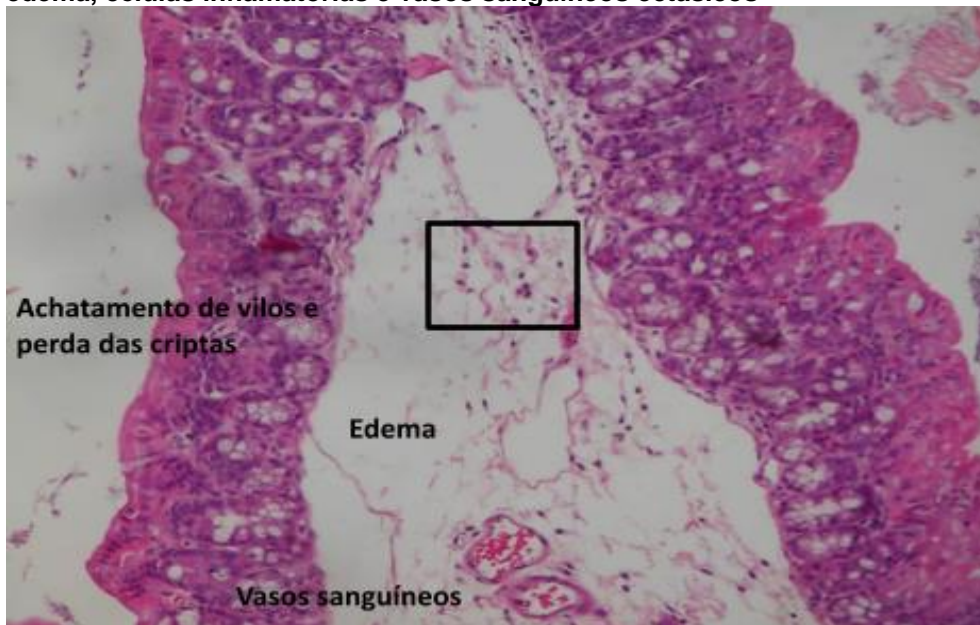
**Figura 24 - Achatamento patológico dos vilos e proliferação de células caliciformes no duodeno de camundongo**



**Fonte:** Acervo dos autores.

**Nota:** Seta: células caliciformes. Coloração de hematoxilina-eosina, 200x.

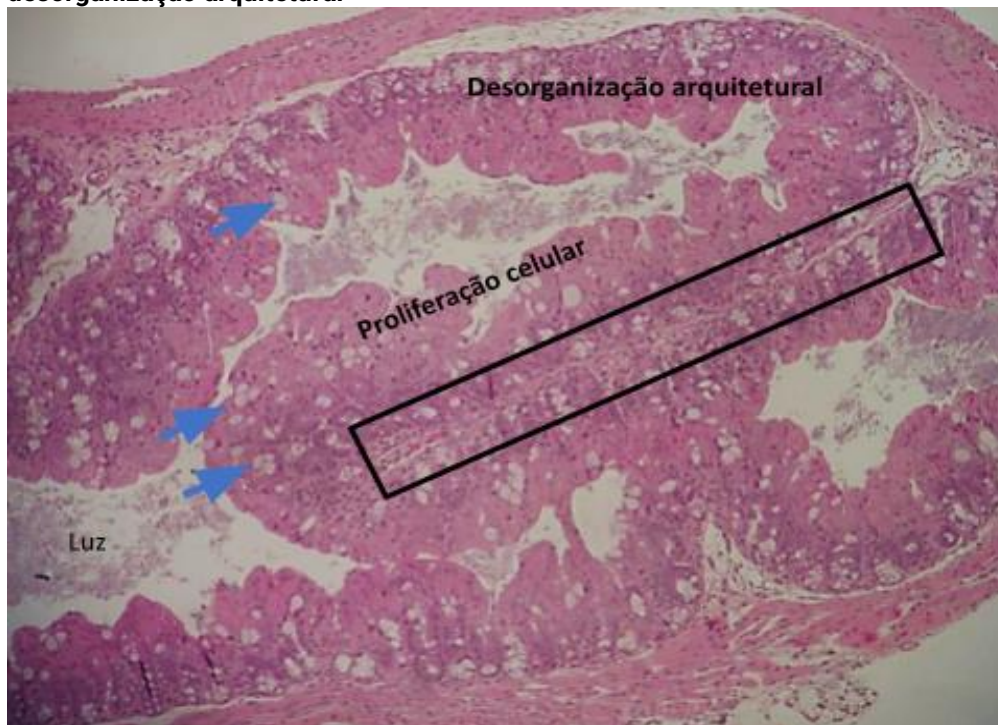
**Figura 25 - Fotomicrografia da região de submucosa do duodeno de camundongo mostrando edema, células inflamatórias e vasos sanguíneos ectásicos**



**Fonte:** Acervo dos autores.

**Nota:** Coloração de Hematoxilina-eosina, 200x.

**Figura 26 - Fotomicrografia da mucosa do cólon de camundongos exibindo proliferação celular e desorganização arquitetural**



**Fonte:** Acervo dos autores.

**Nota:** Seta: células caliciformes. No detalhe: pregas da submucosa que penetram na mucosa associada a células inflamatórias. Coloração de Hematoxilina-eosina, 200x.



## QUANTO TEM SIDO UTILIZADO NA PESQUISA?

Em suma, acreditamos que a segurança e o sucesso dos ensaios clínicos dependem da interpretação dos achados pré-clínicos, e, em particular, dos dados histopatológicos, os quais devem ser corretamente interpretados e julgados dentro das limitações dos estudos animais, porém, sempre valendo-se do senso comum.

Os relatos histopatológicos devem ser lidos e estudados com extremo cuidado e de maneira integrada com os aspectos toxicológicos, bioquímicos, hematológicos, microbiológicos, dentre outros. Os cuidados com a utilização de uma linguagem clara, apropriada e com terminologia explicitada são imprescindíveis para se evitar discrepâncias e conclusões errôneas. Portanto, a clareza na explanação de todos os achados constitui o nosso maior desafio.

Espera-se que a visão geral fornecida neste capítulo sobre as alterações microscópicas de alguns órgãos encontrados em pesquisas pré-clínicas utilizando ratos e camundongos associadas ao uso de fármacos inovadores ou já estabelecidos, forneçam aos leitores, alunos da graduação, pós-graduação e pesquisadores de diferentes áreas, subsídios para otimização de suas pesquisas. Assim, o esforço despendido será recompensado.

## REFERÊNCIAS

ALVES, Ana Paula Negreiros Nunes *et al.* Gastric toxicity of Alendronate and Methotrexate in Walker 256 carcinosarcoma jaw model. **Journal of Health Biological Sciences**, v. 7, n. 2, p. 126-132, 2019.

ARGENTA, Rodrigo; PEREIRA, Adamastor Humberto. Modelos animais de aneurisma de aorta. **Jornal Vascular Brasileiro**, v. 8, n. 2, p. 148-153, 2009.

FAGUNDES, Djalma José; TAHA, Murched Omar. Modelo animal de doença: critérios de escolha e espécies de animais de uso corrente. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 19, n. 1, p. 59-65, 2004.

GOBATTO, Claudio Alexandre *et al.* Avaliações fisiológicas adaptadas a roedores: aplicações ao treinamento em diferentes modelos experimentais. **Revista Mackenzie de Educação Física e Esporte**, v. 7, n. 1, p. 137-147, 2008.

GREAVES, Peter. **Histopathology of preclinical toxicity studies**: interpretation and relevance in drug safety studies. 4th ed. Amsterdam: Elsevier, 2012.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, José. **Histologia básica**: texto e atlas. 12. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013.

KANEL, G. C.; KORULA, J. **Atlas of liver pathology**. 2nd. ed. China: Elsevier: Saunders 2005.

KUMAR, Vinay *et al.* **Robbins & Cotran**: patologia: bases patológicas das doenças. 8. ed. Rio de Janeiro: Elsevier: Medicina Nacionais, 2010.

MACPHERSON, B. R.; PFEIFER, C. J. Experimental production of diffuse colitis in rat. **Digestion**, v. 17, n. 2, p. 135-140, 1978.

SOBOTTA, Johannes. **Atlas de histologia**: citologia, histologia e anatomia microscópica humana. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007.

SOUZA, Iara Maria de Almeida. Vidas experimentais: humanos e roedores no laboratório. **Etnográfica**, v. 17, n. 2, p. 241-268, 2013.

## 16 ANÁLISE QUANTITATIVA DO TECIDO ÓSSEO EM ENSAIOS PRÉ-CLÍNICOS

Paula Goes Pinheiro Dutra  
Hellíada Vasconcelos Chaves  
Maria Luzia Herminia Teixeira de Sousa  
Iracema Matos de Melo  
Mirna Marques Bezerra Brayner



### O QUE SERÁ FEITO?

O osso é um tecido conjuntivo mineralizado que, a despeito de sua aparência inerte, é extremamente dinâmico, estando em constante remodelação (FLORENCIO-SILVA et al., 2015). Apresenta também como peculiaridade duas características aparentemente antagônicas: forte para suportar forças mecânicas e leveza para permitir mobilidade, o que permite exercer as funções de locomoção, suporte/proteção do organismo, hematopoiese e homeostase mineral (FONSECA et al., 2014). Para exercer suas funções com maestria, o osso é composto de uma matriz extracelular representada por sais inorgânicos e matriz orgânica, e de um componente celular.

Os principais sais inorgânicos são os íons de fosfato e cálcio que formam os cristais de hidroxiapatita ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ) que representam um depósito de 99% do cálcio corporal e 80% do fósforo total (SCHLESINGER et al., 2020). Além disso, estão presentes quantidades significativas de bicarbonato, sódio, potássio, citrato, magnésio, carbonato, zinco, bário e estrôncio (FLORENCIO-SILVA et al., 2015).

A matriz orgânica contém proteínas colágenas (90%), predominantemente colágeno tipo I e proteínas não colágenas, incluindo osteocalcina, osteonectina, osteopontina, fibronectina e sialoproteína II óssea, proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs) e fatores de crescimento (UNAL; CREECE; NYMAN, 2018). As proteínas com o colágeno da matriz não colágena formam um arcabouço para a deposição dos cristais de hidroxiapatita, assegurando a rigidez e resistência ao tecido ósseo.

Quanto ao componente celular, o osso é composto por quatro tipos, a saber: osteoblastos, células de revestimento ósseo, osteoclastos e osteócitos, responsáveis pela morfogênese, desenvolvimento, crescimento e remodelação óssea (KULAR et al., 2012).

Os osteoblastos, conhecidos por sua função de formação de osso, representam 4% a 6% do total de células ósseas residentes. À análise histológica os osteoblastos aparecem como

células cuboides, apresentando características de células sintetizadoras de proteínas, incluindo retículo endoplasmático rugoso abundante e complexo de Golgi com várias vesículas secretoras (TETI, 2011).

As células do revestimento ósseo são osteoblastos quiescentes que cobrem as superfícies ósseas, onde não ocorrem a reabsorção e a formação óssea. Entretanto, dependendo do estado fisiológico do osso, essas células podem readquirir sua atividade secretora. Embora sua função ainda seja motivo de controvérsias, as células do revestimento ósseo parecem atuar protegendo o osso da reabsorção óssea (FLORENCIO-SILVA et al., 2015).

Os osteoclastos são células gigantes diferenciadas das células da linhagem de monócitos/macrófagos pelo fator estimulador de colônias de macrófagos (M-CSF) e ativador do receptor do ligante do fator nuclear  $\kappa$ B (RANKL) (ONO; NAKASHIMA, 2018). RANKL traduz seu sinal através do seu receptor de sinalização, RANK. A sinalização RANKL/RANK ativa o NFATc1, o regulador mestre da osteoclastogênese, induzindo a expressão do gene osteoclastogênico. Muitos tipos de células (osteoblastos, osteócitos e células do estroma) expressam RANKL para apoiar a osteoclastogênese. Assim, para assegurar o equilíbrio entre formação e reabsorção óssea, a interação célula-célula é um mecanismo cuidadosamente regulado por fatores locais e sistêmicos, incluindo hormônios, citocinas, quimiocinas e estimulação biomecânica (CHEN et al., 2018).

E por fim, mas não menos importante, tem-se os osteócitos, que foram considerados por décadas como células sem nenhuma função no tecido ósseo, a despeito de representarem 90% a 95% do total das células ósseas. Entretanto, recentemente foi sugerido que essas células parecem atuar como mecanossensores e orquestradores da remodelação óssea, regulando a atividade dos osteoblastos e osteoclastos (HEMMATIAN et al., 2017).

Considerando esse arranjo estrutural híbrido do osso, com sua matriz orgânica e componentes inorgânico e celular, a análise quantitativa desse tecido pode ser realizada por diferentes métodos, incluindo: análises macro e microscópica, bem como exames de imagens, testes biomecânicos e ensaios de biologia molecular.



## POR QUE SERÁ FEITO?

A remodelação óssea fisiológica é um processo altamente coordenado responsável pela reabsorção e formação óssea, sendo necessária para reparar o osso danificado e manter a homeostase mineral. Entretanto, um desequilíbrio na reabsorção e formação óssea resulta em

várias doenças ósseas. Por exemplo, quando há o aumento anormal na atividade dos osteoclastos, a reabsorção excede a formação, como consequência ocorre a diminuição da densidade óssea e acontece aumento das fraturas ósseas, determinando doenças ósseas, como a osteoporose (FÖGER-SAMWALD et al., 2020).

Uma outra doença caracterizada pela ativação dos osteoclastos é a periodontite, uma enfermidade que afeta os tecidos de suporte dos dentes e que é causada por uma interação entre um biofilme disbiótico e a resposta imunoinflamatória do hospedeiro, associada com o aumento anormal da reabsorção óssea no osso alveolar (HIENZ; PALIWAL; IVANOVSKI, 2015). Além disso, a ativação anormal dos osteoclastos também está associada com metástases ósseas produzindo lesões osteolíticas dolorosas (FORNETTI; WELM; STEWART, 2018) e na artrite inflamatória resultando em erosões periarticulares (TATEIWA; YOSHIKAWA; KAITO, 2019).

Considerando o impacto dessas doenças ósseas sobre a qualidade de vida dos pacientes e sobre os serviços de saúde, estratégias que possam contribuir para a elucidação da sua fisiopatologia poderão contribuir para uma terapia mais acertada. Desta forma, a análise quantitativa do tecido ósseo por meio de ensaios pré-clínicos representa um importante modo de estudar os mecanismos envolvidos no curso evolutivo das doenças ósseas.



## ONDE SERÁ FEITO?

Ensaios pré-clínicos em animais são largamente utilizados para análise de eficácia e segurança de ferramentas farmacológicas e biomateriais que possam aumentar a atividade dos osteoblastos, restaurar a resistência óssea e reduzir o risco de fratura. Nessa seara foram desenvolvidos uma miríade de modelos animais para a triagem de terapias que estimulem a formação de osso, dos quais podemos destacar: indução de perda óssea por ligadura em maxila e mandíbula de roedores (BEZERRA et al., 2000; LISBOA et al., 2015), ou por desafio bacteriano em maxila e mandíbula de roedores (KESAVALU et al., 2007; BLASCO-BAQUE et al., 2017); defeitos críticos em calvária de roedores (HILDEBRANDT et al., 2021); estudo de osteoporose em roedores tratados com glicocorticoides (SOUSA et al., 2017; LANE, 2019) pela coleta da maxila e ossos longos (fêmur e tíbia), ou por meio da realização de ovariectomia em ratas (LELOVAS et al., 2008) e ovelhas (DIAS et al., 2018) das quais é possível obter amostras de fêmur, tíbia e vértebras lombares. Além disso, o estudo do metabolismo ósseo pode também ser realizado em animais de maior porte, incluindo primatas não humanos (macacos *Cynomolgus*) que podem representar um modelo para estudo de estrutura e força óssea (OMINSKY et al., 2010).

Independente do modelo animal selecionado para responder à pergunta de partida de um determinado projeto de pesquisa, todo protocolo experimental deve ser sistematicamente planejado e incluir cálculos de tamanho de amostra e poder de estudo, permitindo assim a obtenção de resultados reprodutíveis. Ademais, é lícito enfatizar que os experimentos com animais estão sujeitos à aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA).

Considerando que neste capítulo serão abordadas as principais técnicas utilizadas para análise quantitativa do tecido ósseo em ensaios pré-clínicos, incluindo: **macroscopia, exames de imagem (radiografia e microtomografia computadorizada -  $\mu$ CT), microscopia Raman, histomorfometria, testes biomecânicos e ensaios de biologia molecular (RT-qPCR e *western blot*)**, a partir deste momento serão respondidas às perguntas: **Quando será feito? Por Quem/Com que será feito? E como será feito** para cada uma dessas técnicas.

## Macroscopia



### QUANDO SERÁ FEITA?

Alguns modelos de estudo do tecido ósseo permitem sua avaliação macroscópica. Essa análise macroscópica tem sido amplamente utilizada no modelo de periodontite experimental em roedores, a fim de avaliar quantitativamente a reabsorção óssea alveolar (LIMA et al., 2000; GOES et al., 2010; MAEKAWA et al., 2017).



### POR QUEM/COM O QUE SERÁ FEITO?

Para o processamento das amostras (maxila ou mandíbula), os seguintes passos devem ser seguidos:

- 1) Fixação das amostras:** em formol a 10% por 24h a 48 h.
- 2) Dissecação das amostras.**
- 3) Coloração:** em azul de metileno a 1%.
- 4) Aquisição de imagens:** as peças são fotografadas para quantificação da reabsorção óssea em *software*. A aquisição das imagens de maxila e de mandíbula de ratos pode ser realizada somente com câmera digital, enquanto as imagens de camundongos requerem a utilização de lupas ou microscópios.



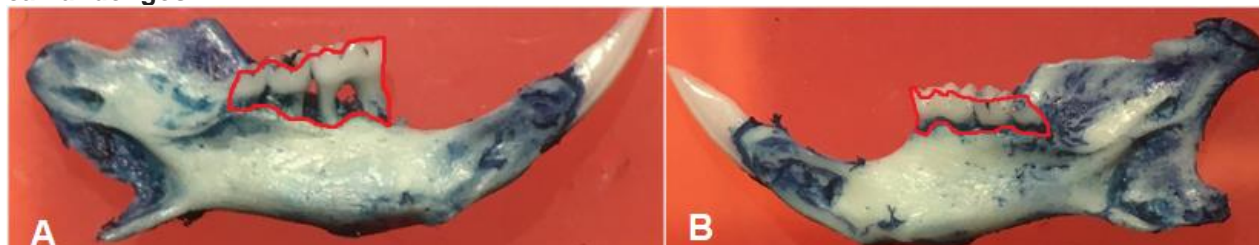


## COMO SERÁ FEITO?

A reabsorção óssea no modelo de periodontite é considerada como a distância entre a junção cimento-esmalte (JCE) e a crista óssea remanescente, obtida por meio do *software* e comparada com uma medida previamente conhecida em milímetros. Os métodos para a quantificação dessa reabsorção são variados e medidas lineares e de área são descritas (KUHR et al., 2004).

As medidas de área podem ser obtidas de forma direta (LIMA et al., 2020) ou indireta (GOES et al., 2010). A Foto 1 ilustra essas diferentes metodologias para quantificação da reabsorção óssea alveolar.

**Foto 1 - Quantificação da área de reabsorção óssea alveolar na face lingual da mandíbula de camundongos**



**Fonte:** Arquivo pessoal de Iracema Matos de Melo.

**Nota:** A área de reabsorção foi obtida indiretamente pela diferença das áreas compreendidas entre a ponta das cúspides dos molares e a crista óssea remanescente da hemiarcada em que a periodontite foi induzida (A) e da hemiarcada contralateral normal (B).

A literatura também descreve diferentes formas para obter medidas lineares de reabsorção óssea alveolar. Abe e Hajishengallis (2013) realizaram 9 medidas pelas faces vestibular e palatina e identificaram 6 pontos mais suscetíveis a alterações de altura óssea após a colocação da ligadura em torno do segundo molar superior de camundongos. Os pontos de referências consistiram nas cúspides méso-palatina ou méso-vestibular, disto-palatina ou disto-vestibular e sulcos palatinos ou vestibulares do 2º molar; sulcos disto-palatino ou disto-vestibular e cúspide distal do 1º molar; e cúspides palatinas ou vestibulares do 3º molar. Após a identificação desses pontos, a reabsorção óssea do lado em que a periodontite foi induzida determinou-se da seguinte forma: distância entre a JCE e a crista óssea remanescente desses 6 pontos no lado com ligadura subtraída das medidas correspondentes do lado contralateral sem a ligadura.

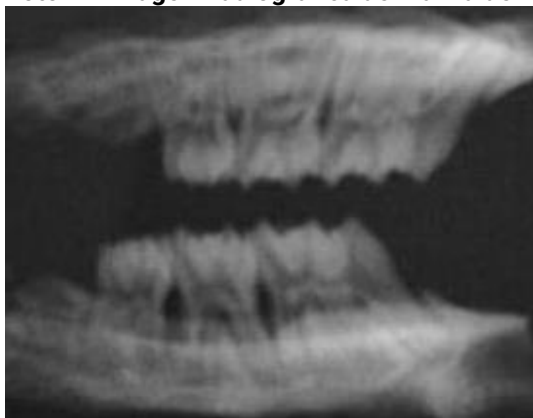
## Exames de Imagem: Radiografias



### QUANDO SERÃO FEITOS?

As radiografias, sejam convencionais ou digitais, também são utilizadas para a análise do tecido ósseo. Embora forneçam imagens somente em duas dimensões, o que pode dificultar uma análise morfométrica mais precisa. Estudos têm relatado o uso de radiografias para a obtenção da densidade radiográfica em amostras ósseas, por vezes chamada de densidade óssea (CASTRO et al., 2020; GOES et al., 2010; MARQUES et al., 2005). Essa densidade radiográfica é obtida a partir das tonalidades de cinza das imagens. A Foto 2 ilustra uma imagem radiográfica obtida por meio do aparelho de radiografia digital *Digora Soredex System® - Dental Imaging Company Ltd., Portslade - East Sussex, UK*.

**Foto 2 - Imagem radiográfica de maxila de ratos submetida à periodontite experimental**



**Foto:** Arquivo pessoal de Iracema Matos de Melo.



### POR QUEM/COM O QUE SERÃO FEITOS?

A literatura relata a utilização de radiografias em diferentes protocolos de estudo do osso. Goes et al. (2010) descreveram o seguinte protocolo para análise da densidade radiográfica em maxila de ratos submetidos à periodontite experimental:

- 1) Remoção das amostras e fixação:** em solução de formol 10% por 24 h.
- 2) Dissecação das amostras.**

3) Radiografia das amostras com o aparelho de radiografia digital *Digora Soredex System*<sup>®</sup> (*Dental Imaging Company Ltd., Portslade - East Sussex, UK*): imagens podem ser adquiridas usando 63 kVp, 8 mA, com 0,06 segundos de exposição e distância focal de 30 cm.

4) Avaliação das imagens: por meio do software (*Image J 1.32j, National Institute of Health, USA*).



## COMO SERÃO FEITOS?

Para análise das radiografias, Goes et al. (2010) adotaram os seguintes critérios:

- 1) Delimitação de uma região de interesse de 128 *pixels* na hemiarcada submetida à periodontite e na hemiarcada contralateral normal.
- 2) A densidade radiográfica é obtida utilizando a ferramenta histograma do software *Image J*, que utiliza uma escala de 256 tons de cinza. As diferenças de tons de cinzas das regiões de interesse de ambas hemiarcadas é considerada como um valor de densidade radiográfica.

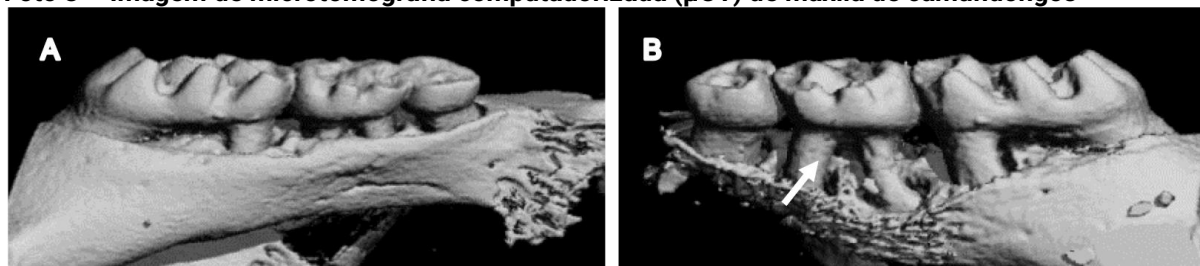
**Exames de Imagem:** Microtomografia Computadorizada ( $\mu$ CT)



## QUANDO SERÃO FEITOS?

Primeiramente apresentada por Lee A. Feldkamp e outros estudiosos na década de 1980, a  $\mu$ CT tornou-se o padrão-ouro para a avaliação da microarquitetura e morfologia óssea em pequenos animais, como ratos e camundongos. A técnica consiste na atenuação de raios-x adquiridos por meio de vários ângulos para reconstrução de uma imagem em 3 dimensões de um espécime (BOUXSEIN et al., 2010).

**Foto 3 – Imagem de microtomografia computadorizada ( $\mu$ CT) de maxila de camundongos**



**Fonte:** Arquivo pessoal de Paula Goes.

**Nota:** maxila de camundongos submetidos à periodontite por ligadura (B) revelando diminuição no osso alveolar ao redor do segundo molar (seta branca) em relação à maxila do animal normal (A).



## POR QUEM/COM O QUE SERÃO FEITOS?

Uma vantagem da  $\mu$ CT consiste em ser uma técnica não destrutiva. Assim, após a varredura do espécime em microtomógrafo, a mesma amostra pode ser utilizada para outras análises, como no caso da histologia (BOUXSEIN et al., 2010).

O protocolo para avaliação da morfometria e densidades ósseas por  $\mu$ CT envolve (BOUXSEIN et al., 2010):

**1) Aquisição da imagem:** Lisboa et al. (2015) descrevem o escaneamento das peças *ex vivo* não desmineralizadas em microtomógrafo (*Skyscan 1172, Bruker, Kontich, Belgium*), operado a 50 kV e 200  $\mu$ A, com um tempo de exposição de 650 milissegundos. Dependendo do tamanho do animal, também é possível realizar a análise com o animal vivo, tal como descrito por Alyessary et al. (2018) em um modelo de expansão maxilar em coelhos. Para isso, os animais devem estar anestesiados de forma a permitir a realização da  $\mu$ CT.

**2) Processamento e análise da imagem:** determinação de eixos de análises e quantidades de *slices* para cada tipo amostra.

**3) Relatório de resultados para apresentação dos dados.**



## COMO SERÃO FEITOS?

Resumidamente, a  $\mu$ CT permite a medição 3D direta da morfologia trabecular, como volume ósseo, espessura e separação trabeculares, número de trabéculas, bem como estima a mineralização do tecido ósseo e a densidade mineral óssea. Além disso, permite que a análise seja feita considerando somente o osso trabecular ou somente o osso cortical (BOUXSEIN et al., 2010; JIN et al., 2007; KANZAKI et al., 2016; TATARA et al., 2017). Análises em duas dimensões também podem ser obtidas a partir das imagens reconstruídas em 3D, ou ainda de alguma imagem 2D escolhida em determinado plano entre todas as imagens que a  $\mu$ CT fornece (GOES et al., 2019; JIN et al., 2007; LISBOA et al., 2015).

Como no mercado existem vários sistemas de  $\mu$ CT disponíveis e, conseqüentemente, diversos programas de aquisição e avaliação de imagens, o protocolo a ser usado deve ser estabelecido conforme o aparelho e programas disponíveis para a pesquisa (BOUXSEIN et al., 2010).

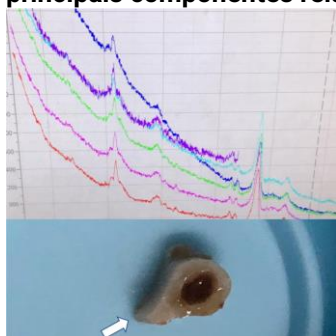
## Microscopia Raman



### QUANDO SERÁ FEITA?

O chamado efeito Raman foi primeiramente descrito pelo físico indiano Sir Chandrasekhara Venkata, e consiste em um fenômeno de espalhamento inelástico de luz através da matéria usando uma técnica de microespectroscopia (KANN et al., 2015). Essa luz espalhada carrega informações da vibração dos átomos em uma molécula, que são típicas de cada porção química. A mudança observada no comprimento de onda específico entre o fóton incidente na amostra e o fóton espalhado representa uma característica única de uma estrutura química específica, e consiste em uma impressão digital molecular. Dessa forma, a técnica é utilizada quando há o objetivo de obter informações estruturais e químicas de uma determinada amostra (BUTLER et al., 2016; KANN et al., 2015), incluindo o osso.

**Foto 4 - Gráfico ilustrando as intensidades dos picos Raman estudados nos espectros Raman dos principais componentes relacionados ao tecido ósseo do fêmur de rato (seta branca)**



**Fonte:** Arquivo pessoal de Paula Goes.



### POR QUEM/COM O QUE SERÁ FEITA?

Uma grande vantagem da espectroscopia Raman é a necessidade de mínima preparação da amostra. No entanto, deve ser considerado que o formol, comumente utilizado para fixação tecidual, modifica as proteínas por reticulação e pode alterar o pico espectral associado a proteínas entre  $1500$  e  $1700\text{ cm}^{-1}$ . De forma semelhante, a parafina tem sinais fortes em diversas regiões do espectro ( $892$ ,  $1065$ ,  $1135$ ,  $1174$ ,  $1298$ ,  $1421$ ,  $1443$  e  $1464\text{ cm}^{-1}$ ), o que pode causar importante sobreposição com a amostra biológica. Dessa forma, a análise de tecidos frescos e congelados pode superar tais dificuldades (BUTLER et al., 2016).

Um protocolo a seguir para análise de componentes orgânicos e inorgânicos do osso pode ser encontrado no estudo de Castoldi et al. (2020):

- 1) Remoção da amostra (fêmur).
- 2) Imersão em solução salina e armazenamento em *freezer* -20 °C até o momento da análise.
- 3) Análise do tecido ósseo usando microscopia Raman (*micro-Raman spectrograph, brand Renishaw, in-Via model*).
- 4) Comprimento de onda do *laser* utilizado: 633 nm.
- 5) Tempo de exposição de 10 segundos.



### COMO SERÁ FEITA?

Para a análise de componentes orgânicos e inorgânicos do osso são observadas as alterações nas bandas. No estudo de Castoldi et al. (2020), as alterações foram correspondentes aos seguintes compostos: fosfato ( $428,38\text{ cm}^{-1}$ ), colágeno tipo 1 ( $937,07\text{ cm}^{-1}$ ), fosfato de cálcio ( $960,09\text{ cm}^{-1}$ ), ácido fosfolipídico-nucleico ( $1080,39\text{ cm}^{-1}$ ), amida III ( $1246,54\text{ cm}^{-1}$ ) e amida I ( $1656,01\text{ cm}^{-1}$ ).

A maioria das bandas de uma espectroscopia Raman no osso pode ser atribuída aos minerais fosfato e carbonato ou à matriz de colágeno. No entanto, essas intensidades de bandas absolutas, raramente são usadas, pois são afetadas por outros efeitos ópticos, como tamanho de grão, índice de refração e rugosidade da amostra. Portanto, uma outra opção de análise do tecido ósseo utilizando a espectroscopia Raman consiste nas intensidades de pico relativas ou áreas de pico de pares de bandas selecionadas. Por exemplo, para se obter a razão mineral-matriz, que indicaria a quantidade de mineralização, pode dividir a banda de fosfato pela banda de amida I (MORRIS; MANDAIR, 2011).

## Histomorfometria

### QUANDO SERÁ FEITA?

De forma geral, as análises microscópicas de amostras do tecido ósseo permitem a avaliação das estruturas corticais e trabeculares, o processo de mineralização, a presença e morfologia das células ósseas. Assim, a partir dos referidos dados é possível avaliar a histomorfometria estática e dinâmica do osso. Apesar de nenhuma dessas técnicas ser capaz de determinar densidade óssea, todas as informações são importantes para o estudo acerca da fisiopatologia do tecido ósseo.



### POR QUEM/COM O QUE SERÁ FEITA?

O tecido ósseo pode ser avaliado inicialmente por microscopia óptica. Dois protocolos podem ser utilizados para a obtenção de lâminas ósseas, com ou sem descalcificação, seguindo as etapas:

**1) Fixação:** em paraformaldeído tamponado a 10% por 48 horas.

**2) Descalcificação:**

- A. Ácido nítrico 5% ou ácido fórmico 7% por 7 dias.
- B. EDTA 10% por 30 a 40 dias.

As soluções de ácido fórmico e ácido nítrico promovem boa preservação do tecido. A adição de etanol gera excelente qualidade na coloração HE, mas pode causar danos aos determinantes antigênicos do tecido. A solução de EDTA tem sido mais amplamente usada entre os pesquisadores. Apesar da excelente preservação da antigenicidade do tecido, o tempo para descalcificação, especialmente em amostras de tamanho maior, pode ser uma desvantagem. Estudos recomendam ainda manter a solução em agitação contínua e a uma temperatura de 4°C para melhor penetração do agente descalcificante no tecido (LIU et al., 2017).

### 3) Inclusão:

- A. Parafina.
- B. Metilmetacrilato (MMA).

Lâminas do tecido ósseo não descalcificado são incluídas em solução de metilmetacrilato. Nesse método o processo de polimerização é uma reação exotérmica que pode gerar bolhas dentro da preparação e movimentar a amostra alterando a orientação estabelecida, assim deve haver controle rígido da temperatura durante a solidificação. O tamanho da amostra também influencia a polimerização, que pode variar de dias a semanas. Todas as etapas desse processo devem ser realizadas em capela de exaustão de gases.

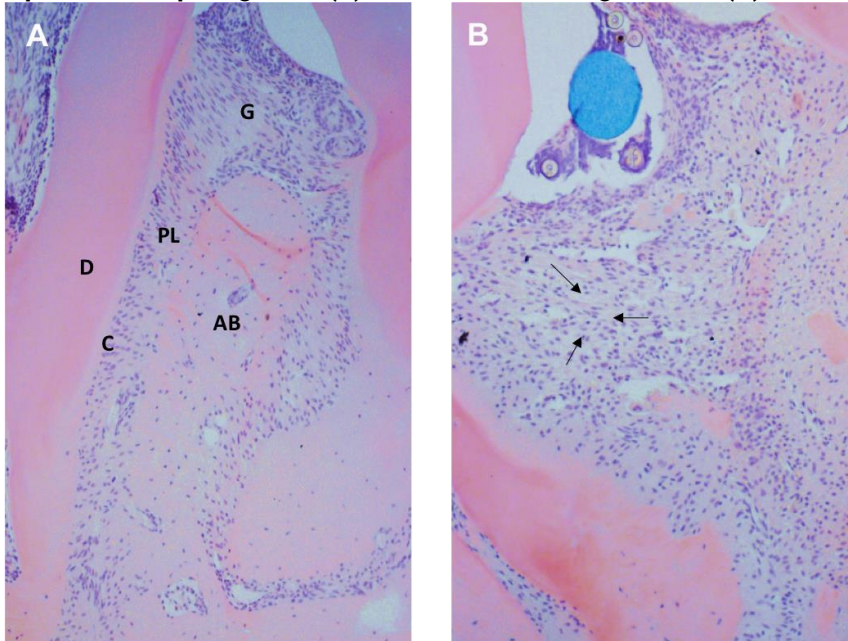
**4) Microtomia de 3-5  $\mu\text{m}$ :** a microtomia dos blocos de MMA pode ser feita em micrótomo convencional utilizando navalha específica. A microtomia a *laser*, apesar de ser ainda um método caro, também é uma opção interessante, considerando a precisão do corte sua principal vantagem. Em blocos de MMA com amostras de tamanho grande, como exemplo, na mandíbula de porco podem ser feitos desgaste e polimento com visualização por meio de lente de aumento.

### 5) Coloração:

- A. Hematoxilina e Eosina (HE): amplamente utilizadas; apresentam boa relação custo-benefício; permitem avaliação de estruturas e organização do tecido ósseo, bem como suas células.
- B. TRAP: marca osteoclastos em atividade (ERBEN; GLÖSMANN, 2019).
- C. Von Kossa: identifica a mineralização do tecido ósseo que se cora em preto (ERBEN; GLÖSMANN, 2019).
- D. Tricrômico de Mallory ou de Masson-Goldner e *Picrosirius red*: permite avaliar a presença e a organização de fibras colágenas. As lâminas coradas com *Picrosirius red* quando analisadas sob microscopia de luz polarizada contribuem para a identificação do tipo de fibra colágena de acordo com a birrefringência apresentada (colágeno tipo I - birrefringência laranja-amarelado à laranja e vermelha; e tipo III - birrefringência verde ou verde-amarela) (SCHMITZ et al., 2010).



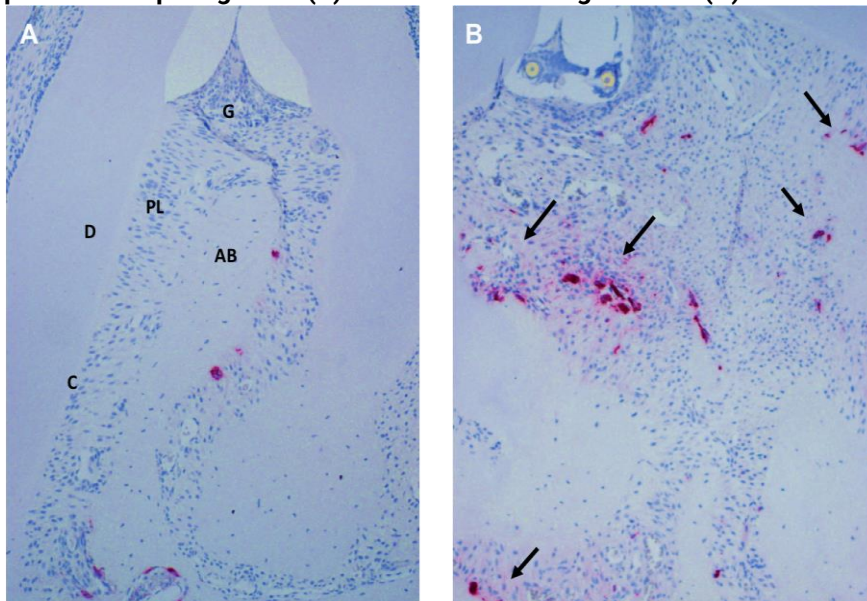
**Figura 1 - Imagem representativa de coloração em H&E (x100) da maxila de um camundongo submetido à periodontite por ligadura (B) e de um camundongo normal (A)**



**Fonte:** Arquivo pessoal Paula Goes.

**Nota:** (B) maxila de camundongo revelando reabsorção (setas pretas) do osso alveolar (AB) em relação à maxila do animal normal (A). C = cimento; D = dentina; PL = ligamento periodontal; AB = osso alveolar; G = gengiva.

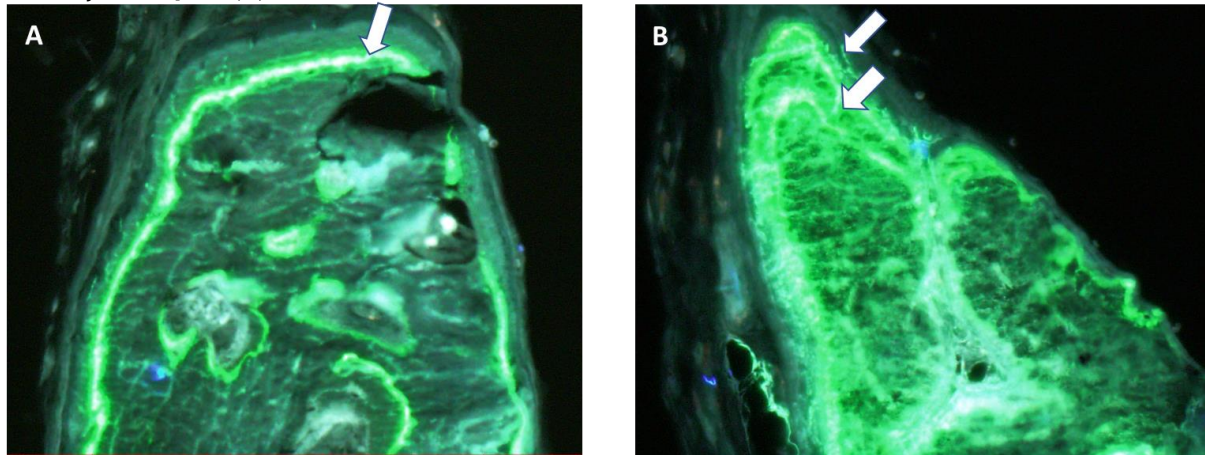
**Figura 2 - Imagem representativa da coloração TRAP (x100) da maxila de um camundongo submetido à periodontite por ligadura (B) e de um camundongo normal (A)**



**Fonte:** Arquivo pessoal de Paula Goes.

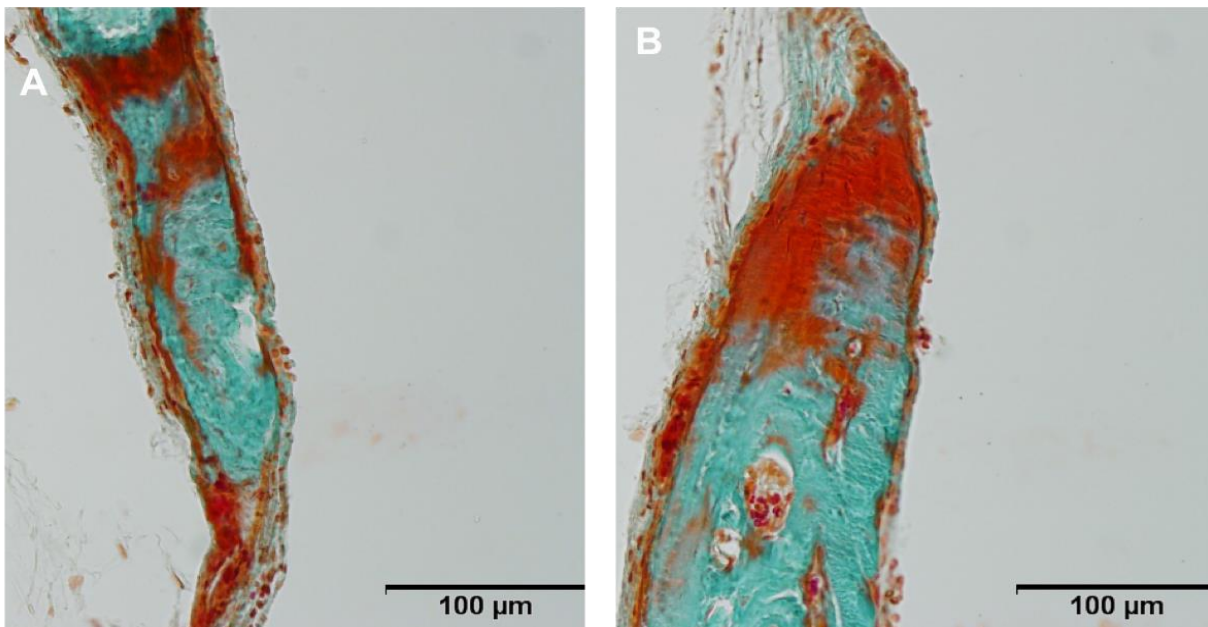
**Nota:** (B) maxila de camundongo revelando intensa atividade de osteoclastos (setas pretas) em relação à maxila do animal normal (A). C = cimento; D = dentina; PL = ligamento periodontal; AB = osso alveolar; G = gengiva.

**Figura 3 - Imagem representativa da marcação de calceína (x100) em borda de óssea de camundongos submetidos a defeito subcrítico de calvária revelando (setas brancas) marcação dupla (B) em relação à marcação simples (A)**



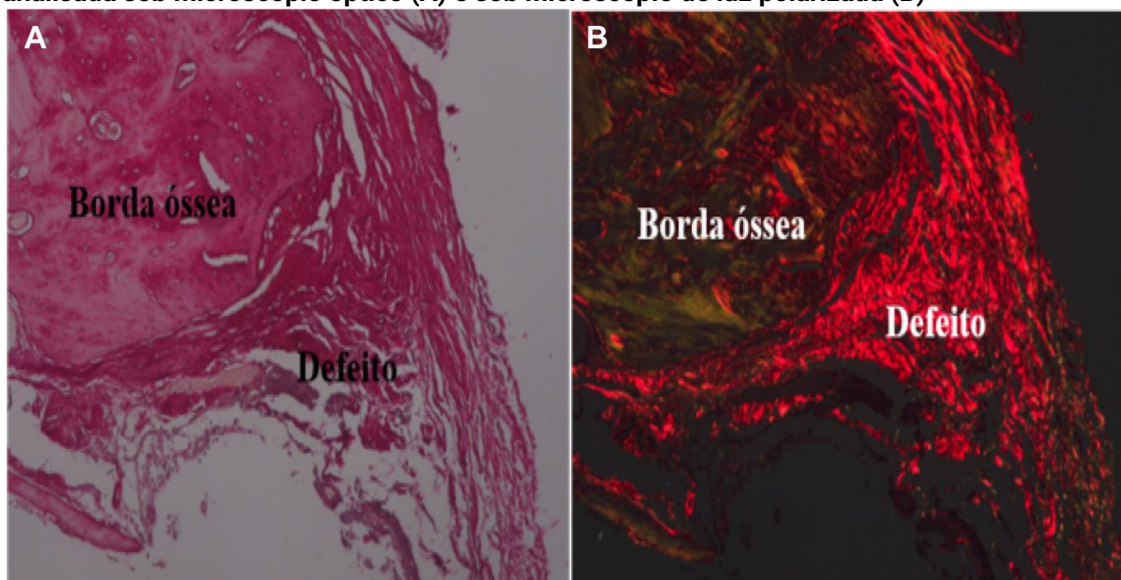
Fonte: Arquivo pessoal de Paula Goes.

**Figura 4 - Imagem representativa da coloração pelo método Tricrômico de Masson-Goldner (x100) em calvária de camundongos submetido a defeito subcrítico revelando tecido osteoide em grande quantidade (B) em relação à calvária de um camundongo normal (A)**



Fonte: Arquivo pessoal de Paula Goes.

**Figura 5 - Imagem representativa da coloração Picosirius red (x100) na borda óssea calvária de rato analisada sob microscópio óptico (A) e sob microscópio de luz polarizada (B)**



**Fonte:** Arquivo pessoal de Paula Goes.

**Nota:** (A) ilustrando a quantidade total de colágeno; (B) mostrando a diferença dos tipos de colágeno de acordo com a birrefringência.

Fluorocromos, tais como: tetraciclina, calceína (Figura 3), xilenol laranja, alizarina *red*, dentre outros podem ser utilizados. Eles devem ser injetados em intervalos de dias antes da eutanásia. As peças devem ser emblocadas em MMA e são úteis para análise histomorfométrica dinâmica do tecido ósseo.

A partir de secções dos blocos de parafina podem ser realizados protocolos de imuno-histoquímica e imunofluorescência, a fim de permitir a detecção de antígenos específicos usando anticorpos, promovendo assim uma informação adicional sobre o tecido ósseo (VIDAL et al., 2012).



## COMO SERÁ FEITA?

Conhecendo essa ampla diversidade de protocolos e colorações disponíveis, dois tipos de análises do tecido ósseo podem ser realizados: histomorfometria estática, dinâmica ou mineralização óssea.

- **Histomorfometria estática** envolve a determinação de parâmetros estruturais ósseos básicos que são divididos em 4 medidas primárias: área total, área óssea, perímetro ósseo e número de trabéculas. A partir desses parâmetros de 2 ou 3

dimensões podem ser obtidos. Número de trabéculas por área de tecido, área trabecular e número de trabécula por área de osso são parâmetros 2D que indiretamente refletem a conectividade da rede trabecular (ERBEN; GLÖSMANN, 2019). Os parâmetros 3D, por sua vez, tais como: espessura, número e separação de trabéculas são rotineiramente calculados, porém têm sido cada vez mais substituídos pelas análises de micro CT (ERBEN; GLÖSMANN, 2019). Adicionalmente podem ser calculados os números de células ósseas, osteoclastos (TRAP) enquanto osteócitos e osteoblastos (HE). Parâmetros primários básicos como: perímetro ósseo, número de células (osteoclastos, osteoblastos ou osteócitos) e perímetro da célula são importantes para determinação, por exemplo, do número de osteoclastos/perímetro ósseo (ERBEN; GLÖSMANN, 2019).

- **Histomorfometria dinâmica** é uma ferramenta indispensável para avaliar os mecanismos de *turnover* local dentro do osso. Ela se baseia na avaliação de fluorocromos nos espécimes ósseos e é usada para determinar a taxa de aposição mineral (MAR  $\frac{1}{4}m/dia$ ), que indica a medida da taxa linear de deposição de novo osso, dada pela distância média entre marcações/intervalo de tempo; e taxa de formação óssea (BFR/BS,  $\frac{1}{4}m^3/ \frac{1}{4}m^2/dia$ ), que revela a quantidade de novo osso formado em unidade de tempo/unidade de superfícies ósseas. Os parâmetros de histomorfometria dinâmica são uma forma de analisar a síntese de matriz por osteoblastos e sua subsequente mineralização. Assim, esses parâmetros são claramente superiores a qualquer medida morfológica de atividade de osteoblastos, como perímetros ou número de osteoblastos. Um problema recai quando drogas antirreabsortivas são utilizadas devido à inibição do *turnover* ósseo, o que resulta na ausência de dupla marcação de fluorocromo (ERBEN; GLÖSMANN, 2019).
- **Mineralização óssea** em geral é analisada por meio da coloração de Von Kossa, a qual permite uma distinção clara e segura entre tecido ósseo mineralizado e tecido osteoide não mineralizado. Alguns parâmetros primários podem ser analisados: perímetro ósseo, área de osso, perímetro osteoide, área osteoide, perímetro de osteoblasto e espessura osteoide (ERBEN; GLÖSMANN, 2019).

## Testes Biomecânicos



### QUANDO SERÃO FEITOS?

Doenças ósseas podem causar ossos frágeis ao afetar estrutura óssea de diferentes maneiras. Por exemplo, osteoporose e osteomalácia causam aumento do risco de fratura. No entanto, essas doenças resultam em grosseiramente diferentes características biomecânicas ósseas (TURNER et al., 2002). A osteopetrose causa ossos rígidos e quebradiços. Os ossos osteoporóticos absorvem muito pouco energia antes de quebrar (trabalho reduzindo a falha) e são, portanto, mais suscetíveis à fratura resultante de trauma (TURNER et al., 2002).

A avaliação da perda óssea por testes biomecânicos é uma importante forma de estudar as alterações e evolução de doenças ósseas, além de possivelmente sugerir a sua gravidade e extensão.



### POR QUEM/COM O QUE SERÃO FEITOS?

As análises biomecânicas podem ser realizadas utilizando modelos computacionais, o método dos elementos finitos, ou modelos *in vitro*. Com frequência, métodos *in vitro* e *in vivo* são utilizados para validar os modelos computacionais, já que estes são a simplificação de um sistema real (PRENDERGAST et al., 2005). Independente do modelo experimental utilizado, amostras de osso permitem a realização de diferentes métodos de estudo acerca dos componentes da estrutura óssea. Assim, a coleta da amostra óssea e o correto acondicionamento permitirão a preservação de seus componentes anatômicos e morfológicos.

O protocolo a seguir para realização de teste biomecânico pode ser encontrado no estudo de Xu et al. (2014).

- 1) Remoção da amostra (fêmur) e acondicionamento em gaze embebida com solução salina tamponada com fosfato.
- 2) Realização dos testes em máquina de ensaio de materiais (*InstronE10000*, *Instron Corporation*, Norwood, MA, EUA).



## COMO SERÃO FEITOS?

Antes de iniciar o teste, os fêmures são transferidos para uma temperatura ambiente para descongelamento. Os fêmures são analisados em máquina de ensaio de materiais (*InstronE10000*, *Instron Corporation*, *Norwood, MA, EUA*), utilizando um procedimento de flexão em três pontos. No estudo de Yanagihara et al. (2015) é possível consultar uma foto ilustrativa dessa máquina. Os fêmures são comprimidos até a falha a uma taxa de deslocamento de 3 mm / min (amplitude = 20 mm) com o lado anterior para baixo, e todos os dados de força e deslocamento são registrados até que o espécime seja quebrado. Em seguida, a medição do calibre dos diâmetros periosteal e endosteal é realizada nos fêmures quebrados e a tensão de flexão (MPa), a deformação de flexão (mm / mm) e o módulo de Young (MPa) são calculados, assumindo a geometria da seção transversal dos fêmures (XU et al., 2014).

### Ensaio de Biologia Molecular



## QUANDO SERÃO FEITOS?

Também é possível avaliar o tecido ósseo por meio de técnicas de biologia molecular. No entanto, o componente mineral do tecido ósseo pode representar uma dificuldade na obtenção de amostras para tais técnicas. Diante disso, as culturas de células ósseas representam uma alternativa. Diante do referido cenário, podem ser usadas culturas de osteoblastos para a quantificação da expressão de marcadores do metabolismo ósseo através das técnicas de PCR em tempo real (qRT-PCR) e *western blotting*.

Inicialmente, deve ser estabelecida a cultura de células. Para a cultura de osteoblastos, podem ser usados osteoblastos murinos (OFCOLL II) mantidos em meio de Dulbecco modificado por Eagle (DMEM) contendo 10% de soro fetal bovino na presença de antibióticos (100 U/ml de penicilina e 100 µg/ml de estreptomicina) a 37 °C em estufa umidificada, incubada em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. O crescimento celular deve ser acompanhado por meio de observação em microscópio invertido (Nikon Eclipse TS100). Essas células são subcultivadas após tripsinização quando formada uma monocamada confluenta. As trocas de meio devem ser realizadas a cada 48h.

Uma vez assegurada a viabilidade da cultura, é possível realizar a expressão de marcadores do metabolismo ósseo, incluindo osteocalcina, RANK e RANK-L, por qRT-PCR e por *western blotting*, conforme descrito a seguir.



## POR QUEM/COM O QUE SERÃO FEITOS?

### qRT-PCR e *Western Blotting*

A técnica de qRT-PCR, acrônimo para *Quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction* (em português: transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase) e a técnica de *western blotting* podem ser realizadas em cultura de osteoblastos usando reagentes de biologia molecular, conforme descrito no item a seguir.



## COMO SERÁ FEITO?

### qRT-PCR

Para quantificação da expressão gênica de marcadores do metabolismo ósseo, os osteoblastos cultivados por um período de 21 dias podem então ser submetidos às seguintes etapas, de acordo com Abuna et al. (2018):

- 1) Isolamento do RNA total e lise por utilização de Trizol (Invitrogen, São Paulo, Brasil), de acordo com as instruções do fabricante. Em seguida, os lisados são submetidos à digestão com a utilização de DNase livre de RNase (340 Kunitz units/ml) por 15 minutos.
- 2) Avaliação da concentração de RNA total com a utilização de um espectrofotômetro (*Instrutherm*).
- 3) Realização da transcrição reversa em um volume total de 20 ml, sendo composto de 10 ml da amostra de RNA, 4 ml tampão da transcriptase reversa (Invitrogen, São Paulo, Brasil), 8 unidades RNAsin, 150 unidades de transcriptase reversa Super-script III, 0.036 U primers aleatórios, 10 mM de DTT e 0.5 mM de cada dNTP (Invitrogen, São Paulo, Brasil).
- 4) A quantificação dos RNA mensageiros para os marcadores ósseos específicos é então realizada com a utilização de SYBR Green Master Mix (PE Applied Biosystems, Foster City, CA);
- 5) O PCR em tempo real é realizado em um termociclador.



## COMO SERÁ FEITO?

### *Western Blotting*

Para quantificação da expressão proteica de marcadores do metabolismo ósseo, os osteoblastos cultivados por um período de 21 dias podem então ser submetidos às seguintes etapas, de acordo com Braga (2017):

- 1) Inicialmente, preparar cada amostra, adicionando tampão da amostra (65,8 mM Tris-HCl; pH 6,8; 26,3% glicerol; 2,1% SDS; 0,01% azul de bromofenol e  $\beta$ - mercaptoetanol) (*BioRad*, EUA).
- 2) Em seguida, é realizada eletroforese vertical de proteínas em gel de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE em duas concentrações) a 60 V para posicionar as proteínas na interface do gel mais concentrado e depois 120 V para o restante da corrida. Após isso, é realizada a eletrotransferência das proteínas do gel para a membrana de PVDF - Fluoreto de polivinilideno (*BioRad*, EUA).
- 3) Bloqueio das membranas por 1h em agitação constante com 5% BSA ou leite diluído em tampão salina Tris-HCl suplementado com *Tween* 20, seguido de lavagem.
- 4) Incubação *overnight* das membranas com os anticorpos primários, seguida de lavagem e incubação com os anticorpos secundários por 2 horas em temperatura ambiente. Após esse período, as membranas são lavadas e adicionado o reagente de quimioluminescência (*BioRad*, EUA, *Clarity Western ECL blotting substrate*);
5. Para a revelação, as imagens das bandas são capturadas por um sistema de *ChemiDoc XRS* (*BioRad*, EUA) e a densidade das bandas mensurada por meio do *software ImageLab* (*BioRad*).



## QUANTO TEM SIDO USADO NA PESQUISA?

As sociedades internacionais para estudo do tecido ósseo, incluindo *The American Society for Bone and Mineral Research (ASBMR)*, *The European Calcified Tissue Society (ECTS)*, e *The Osteology Foundation* fomentam a pesquisa básica e clínica em busca de avanços no conhecimento científico da estrutura e função dos tecidos calcificados e assuntos relacionados, definindo critérios e parâmetros que possam nortear os pesquisadores. Em sintonia com essas sociedades, nas últimas duas décadas nosso grupo de pesquisa vem colaborando para o avanço da ciência do metabolismo ósseo usando as técnicas descritas neste capítulo. As técnicas estão amparadas pela literatura que demonstra sua reprodutibilidade, além de sua utilidade no estudo



da fisiopatologia de doenças ósseas, como a osteoporose e periodontite, e do estudo da eficácia e segurança de novas opções terapêuticas.

Por meio da técnica da macroscopia, diversos autores demonstraram os mediadores que modulam a lise óssea inflamatória na periodontite, além de demonstrar a eficácia de produtos naturais e derivados semissintéticos no curso dessa doença (TEIXEIRA et al., 2017; RIBEIRO et al., 2018; FREIRE et al., 2019; PINTO et al., 2020).

Goes et al. (2010) demonstraram a utilidade do exame radiográfico no estudo da perda óssea alveolar em ratos Wistar. Ainda considerando os exames de imagem, Furlaneto et al. (2014) demonstraram que a microtomografia computadorizada ( $\mu$ CT) pode trazer maior robustez para a análise dos dados por ser uma técnica mais sensível para medir o trabeculado do osso alveolar, permitindo a detecção de pequenas alterações.

Quanto à espectroscopia Raman, Ferreira et al. (2021) usaram essa técnica para análise da composição do osso em um modelo de osteonecrose induzida por bifosfonato na mandíbula de ratos.

Usando a histomorfometria, Goes et al. (2019) demonstraram o papel dos osteócitos na periodontite induzida por ligadura em camundongos, contribuindo para um melhor entendimento de como os osteócitos atuam na perda óssea inflamatória.

Considerando os testes biomecânicos, foi observada a efetividade desses testes em um estudo pré-clínico em que foram utilizados fêmures de ratos para avaliar a perda óssea causada por glicocorticoides (SOUSA et al., 2017).

Com relação aos ensaios de biologia molecular, nosso grupo de pesquisa tem realizado estudos mostrando que a técnica de qRT-PCR pode ajudar a esclarecer o envolvimento de mediadores inflamatórios na fisiopatologia da periodontite (TEIXEIRA et al., 2017; RIBEIRO et al., 2018; FREIRE et al., 2019; PINTO et al., 2020). E por fim, a técnica de *western blot* tem permitido realizar dosagens de marcadores ósseos em culturas de células ósseas (BRAGA, 2017).

Uma vez que o risco de fraturas ósseas tem impactos negativos em termos de morbimortalidade, diminuição da autonomia dos pacientes e custos sobre os serviços de saúde, as técnicas apresentadas até aqui têm como objetivo contribuir para o desenvolvimento de pesquisas que contribuam para a melhor compreensão dos eventos celulares e moleculares que formam a base da fisiopatologia das doenças ósseas, como a osteoporose e a periodontite. Dessa forma, busca-se preencher as lacunas do conhecimento sobre os mecanismos que regulam a formação/reabsorção óssea e como modular esses eventos, colaborando para melhoria na massa óssea.

## REFERÊNCIAS

ABE, Toshiharu; HAJISHENGALLIS, George. Optimization of the ligature-induced periodontitis model in mice. **Journal of Immunological Methods**, v. 394, n. 0, p. 49-54, Aug. 2013. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3707981/>. Acesso em: 31 mar. 2021.

ABUNA, Rodrigo P. F. *et al.* Selection of reference genes for quantitative real-time polymerase chain reaction studies in rat osteoblasts. **Journal of Cellular Physiology**, v. 234, n. 1, p. 749-756, Jan. 2018.

ALYESSARY, Akram S. *et al.* Bone-borne accelerated sutural expansion: a microcomputed tomography study in rabbits. **American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics**, v. 154, n. 2, p. 260-269, Aug. 2018.

BEZERRA, Mirna M. *et al.* Selective cyclooxygenase-2 inhibition prevents alveolar bone loss in experimental periodontitis in rats. **Journal of Periodontology**, v. 71, n. 6, p. 1009-1014, June 2000.

BLASCO-BAQUE, Vincent *et al.* Periodontitis induced by porphyromonas gingivalis drives periodontal microbiota dysbiosis and insulin resistance via an impaired adaptive immune response. **Gut Microbiota**, v. 66, n. 5, p. 872-885, May 2017. Disponível em: <https://gut.bmj.com/content/66/5/872.long>. Acesso em: 4 abr. 2021.

BOUXSEIN, Mary L. *et al.* Guidelines for assessment of bone microstructure in rodents using micro-computed tomography. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 25, n. 7, p. 1468-1486, July 2010. Disponível em: <https://asbmr.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/jbmr.141>. Acesso em: 5 abr. 2021.

BRAGA, Cíntia de Melo. **Efeito de nanopartículas carregadas com sinvastatina na proliferação e ativação de osteoblastos murinos**. 2017. 60 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Morfofuncionais) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2017.

BUTLER, Holly J. *et al.* Using Raman spectroscopy to characterize biological materials. **Nature Protocols**, v. 11, n. 4, p. 664-687, Feb. 2016.

CASTOLDI, Robson Chacon *et al.* Effects of muscular strength training and growth hormone (GH) supplementation on femoral bone tissue: analysis by Raman spectroscopy, dual-energy X-ray absorptiometry, and mechanical resistance. **Lasers in Medical Science**, v. 35, n. 2, p. 345-354, Mar. 2020.

CASTRO, Bárbara Bruno Abreu de *et al.* Digital radiography as an alternative method in the evaluation of bone density in uremic rats. **Brazilian Journal of Nephrology**, v. 42, n. 1, p. 8-17, Jan./Mar. 2020. Disponível em: [https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0101-28002020000100008](https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0101-28002020000100008). Acesso em: 31 mar. 2021.

CHEN, Xiao *et al.* Osteoblast-osteoclast interactions. **Connective Tissue Research**, v. 59, n. 2, p. 99-107, Mar. 2018.

DIAS, Isabel R. *et al.* Preclinical and translational studies in small ruminants (sheep and goat) as models for osteoporosis research. **Current Osteoporosis Reports**, v. 16, n. 2, p. 182-197, Feb. 2018.

ERBEN, Reinhold G.; GLÖSMANN, Martin. Histomorphometry in rodents. *In*: IDRIS, Aymen I. (ed.). **Bone research protocols**. [S.l.]: Springer Protocols, 2019.

FERREIRA, Vanessa Costa de Sousa *et al.* Bisphosphonate-related osteonecrosis induced change in alveolar bone architecture in rats with participation of Wnt signaling. **Clinical Oral Investigation**, v. 25, n. 2, p. 673-682, Feb. 2021.

FLORENCIO-SILVA, Rinaldo *et al.* Biology of bone tissue: structure, function, and factors that influence bone cells. **BioMed Research International**, v. 2015, p. 1-18, July 2015. Disponível em: <https://www.hindawi.com/journals/bmri/2015/421746/>. Acesso em: 31 mar. 2021.

FÖGER-SAMWALD, Ursula *et al.* Osteoporosis: pathophysiology and therapeutic options. **EXCLI Journal**, v. 19, p. 107, July 2020. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7415937/>. Acesso em: 31 mar. 2021.

FONSECA, Helder *et al.* Bone quality: the determinants of bone strength and fragility. **Sports Medicine**, v. 44, n. 1, p. 37-53, Aug. 2014.

FORNETTI, Jaime; WELM, Alana L.; STWERT, Sheila A. Understanding the bone in cancer metastasis. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 33, n. 12, p. 2099-2113, Dec. 2018. Disponível em: <https://asbmr.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1002/jbmr.3618>. Acesso em: 31 mar. 2021.

FREIRE, Jordânia M. O. *et al.* Protective effect of *Platymiscium floribundum* Vog. in tree extract on periodontitis inflammation in rats. **PLoS One**, p. 1-15, Nov. 2019. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0223800>. Acesso em: 5 abr. 2021.

FURLANETO, Flávia A. C. *et al.* Effects of locally administered tiludronic acid on experimental periodontitis in rats. **Journal of Periodontology**, v. 85, n. 9, p. 1291-12301, Sept. 2014.

GOES, Paula *et al.* Effect of Atorvastatin in radiographic density on alveolar bone loss in wistar rats. **Brazilian Dental Journal**, v. 21, n. 3, p. 193-198, July 2010. Disponível em: [https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0103-64402010000300003](https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-64402010000300003). Acesso em: 31 mar. 2021.

GOES, Paula *et al.* Loss of Dkk-1 in osteocytes mitigates alveolar bone loss in mice with periodontitis. **Frontiers in Immunology**, v. 10, p. 2924, June 2019. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6914827/>. Acesso em: 31 mar. 2021.

HEMMATIAN, Haniyeh. *et al.* Aging, osteocytes, and mechanotransduction. **Current Osteoporosis Reports**, v. 15, n. 5, p. 401-411, Sept. 2017. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5599455/>. Acesso em: 31 mar. 2021.

HIENZ, Stefan A.; PALIWAL, Sweta; IVANOVSKI, Saso. Mechanisms of bone resorption in periodontitis. **Journal of Immunology Research**, v. 2015, p. 1-11, May 2015. Disponível em: <https://www.hindawi.com/journals/jir/2015/615486/>. Acesso em: 31 mar. 2021.

HILDEBRANT, Nick *et al.* Role of osteogenic Dickkopf-1 in bone remodeling and bone healing in mice with type I diabetes mellitus. **Scientific Reports**, v. 11, p. 1-10, Jan. 2021. Disponível em: <https://www.meta.org/papers/role-of-osteogenic-dickkopf-1-in-bone-remodeling/33479403>. Acesso em: 31 mar. 2021.

JIN, Quiming *et al.* RANKL inhibition through osteoprotegerin blocks bone loss in experimental periodontitis. **Journal of Periodontology**, v. 78, n. 7, p. 1300-1308, July 2007.

KANN, Birthe *et al.* Raman microscopy for cellular investigations: from single cell imaging to drug carrier uptake visualization. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 89, p. 71-90, July 2015.

KANZAKI, Hiroyuki *et al.* Soluble RANKL cleaved from activated lymphocytes by TNF- $\alpha$ -converting enzyme contributes to osteoclastogenesis in periodontitis. **The Journal of Immunology**, v. 197, n. 10, p. 3871-3883, Nov. 2016. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5120874/>. Acesso em: 31 mar. 2021.

KESAVALU, Lakshmyya *et al.* Rat model of polymicrobial infection, immunity, and alveolar bone resorption in periodontal disease. **Infection and Immunity**, v. 75, n. 4, p. 1704-1712, Apr. 2007. Disponível em: <https://iai.asm.org/content/75/4/1704>. Acesso em: 31 mar. 2021.

KUHR, A. *et al.* Observations on experimental marginal periodontitis in rats. **Journal of Periodontal Research**, v. 39, n. 2, p. 101-106, May 2004.

KULAR Jasreen *et al.* An overview of the regulation of bone remodelling at the cellular level. **Clinical Biochemistry**, v. 45, n. 12, p. 863-873, Aug. 2012. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22465238/>. Acesso em: 22 jun. 2021.

LANE, Nancy E. Glucocorticoid-induced osteoporosis: new insights into the pathophysiology and treatments. **Current Osteoporosis Reports**, v. 17, n. 1, p. 1-7, Feb. 2019. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6839409/>. Acesso em: 31 mar. 2021.

LELOVAS, Pavlos P. *et al.* The laboratory rat as an animal model for osteoporosis research. **Comparative Medicine**, v. 58, n. 5, p. 424-430, Oct. 2008. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2707131/>. Acesso em: 31 mar. 2021.

LIMA, Vima de *et al.* Effects of chlorpromazine on alveolar bone loss in experimental periodontal disease in rats. **European Journal of Oral Sciences**, v. 108, n. 2, p. 123-129, Feb. 2000.

LIMA, Vilma *et al.* Uncaria tomentosa reduces osteoclastic bone loss in vivo. **Phytomedicine**, v. 79, p. 1-9, Dec. 2020.

LISBOA, Mario R. P. *et al.* Effects of electroacupuncture on experimental periodontitis in rats. **Journal of periodontology**, v. 86, n. 6, p. 801-811, Mar. 2015.

LIU, Haixia *et al.* Evaluation of decalcification techniques for rat femurs using HE and immunohistochemical staining. **BioMed Research International**, v. 2017, p. 1-6, Jan. 2017. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5299168/>. Acesso em: 31 mar. 2021.

MAEKAWA, T. *et al.* Differential expression and roles of secreted frizzled-related protein 5 and the wingless homolog Wnt5a in periodontitis. **Journal of Dental Research**, v. 96, n. 5, p. 571-577, May 2017. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5453495/>. Acesso em: 31 mar. 2021.

MARQUES, Marcelo Rocha *et al.* Effect of intermittent PTH administration in the periodontitis-associated bone loss in ovariectomized rats. **Archives of Oral Biology**, v. 50, n. 4, p. 421-429, Apr. 2005.

MORRIS, Michael D.; MANDAIR, Gurjit S. Raman assessment of bone quality. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, v. 469, n. 8, p. 2160-2169, June 2011. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3126952/>. Acesso em: 31 mar. 2021.

OMINSKY, Michael S. *et al.* Two doses of sclerostin antibody in cynomolgus monkeys increases bone formation, bone mineral density, and bone strength. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 25, n. 5, p. 948-959, May 2010. Disponível em: <https://asbmr.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/jbmr.14>. Acesso em: 31 mar. 2021.

ONO, Takehito; NAKASHIMA, Tomoki. Recent advances in osteoclast biology. **Histochemistry and Cell Biology**, v. 149, n. 4, p. 325-341, Apr. 2018.

PINTO, Isabela R. *et al.* A semi-synthetic flavonoid from Bauhinia pulchella stem attenuates inflammatory osteolysis in periodontitis in rats: impact on cytokine levels, oxidative stress, and RANK/RANKL/OPG pathway. **Archives of Oral Biology**, p. 1-10, Sept. 2020.

PRENDERGAST, P. *et al.* Analysis of muscle and joint loads. **Basic Orthopaedic Biomechanics and Mechano-Biology**, v. 3, p. 29-89, Aug. 2005.

RIBEIRO, Debora da Silva Freitas *et al.* Tocoyena sellowiana extract decreases bone loss in experimental model of periodontitis in rats: putative role for cyclooxygenase-2 and IL-1? Inhibition. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 98, p. 863-872, Feb. 2018.

SCHLESINGER, Paul H. *et al.* Cellular and extracellular matrix of bone, with principles of synthesis and dependency of mineral deposition on cell membrane transport. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 318, n. 1, p. C111-C124, Jan. 2020. Disponível em: [https://journals.physiology.org/doi/full/10.1152/ajpcell.00120.2019?rfr\\_dat=cr\\_pub++0pubmed&url\\_ver=Z39.88-2003&rfr\\_id=ori%3Arid%3Acrossref.org](https://journals.physiology.org/doi/full/10.1152/ajpcell.00120.2019?rfr_dat=cr_pub++0pubmed&url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori%3Arid%3Acrossref.org). Acesso em: 31 mar. 2021.

SCHMITZ, N. *et al.* Basic methods in histopathology of joint tissues. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 18, p. S113-S116, Oct. 2010. Supplement 3. Disponível em: [https://www.oarsijournal.com/article/S1063-4584\(10\)00240-2/fulltext](https://www.oarsijournal.com/article/S1063-4584(10)00240-2/fulltext). Acesso em: 31 mar. 2021.

SOUSA, Luzia Hermínia *et al.* Effects of glucocorticoid-induced osteoporosis on bone tissue of rats with experimental periodontitis. **Archives of Oral Biology**, v. 77, p. 55-61, May 2017.

TATARA, Marcin R. *et al.* Effects of long-term oral administration of methimazole on femur and tibia properties in male Wistar rats. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 94, p. 124-128, Aug. 2017.

TATEIWA, Daisuke; YOSHIKAWA, Hideki; KAITO, Takashi. Cartilage and bone destruction in arthritis: pathogenesis and treatment strategy: a literature review. **Cells**, v. 8, n. 8, p. 818, Aug. 2019. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31382539/>. Acesso em: 31 mar. 2021.

TEIXEIRA, Alrieta H. *et al.* *Stemodia maritima* L. extract decreases inflammation, oxidative stress, and alveolar bone loss in an experimental periodontitis rat model. **Frontiers in Physiology**, v. 8, p. 988, Dec. 2017. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5717945/>. Acesso em: 5 abr. 2021.

TETI, Anna. *et al.* Bone development: overview of bone cells and signaling. **Current Osteoporosis Reports**, v. 9, n. 4, p. 264-273, Apr. 2011.

TURNER, C. *et al.* Biomechanics of bone: determinants of skeletal fragility and bone quality. **Osteoporosis International**, v. 13, n. 2, p. 97-104, Mar. 2002.

UNAL, Mustafa; CREECE, Amy; NYMAN, Jeffrey. The role of matrix composition in the mechanical behavior of bone. **Current Osteoporosis Reports**, v. 16, n. 3, p. 205-215, June 2018. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5948175/>. Acesso em: 31 mar. 2021.

VIDAL, B. *et al.* Bone histomorphometry revisited. **Acta Reumatológica Portuguesa**, v. 37, n. 4, p. 294-300, Dec. 2012.

XU, Xin-Chen *et al.* Simvastatin prevents alveolar bone loss in an experimental rat model of periodontitis after ovariectomy. **Journal of Translational Medicine**, v. 12, n. 1, p. 1-9, Oct. 2014. Disponível em: <https://translational-medicine.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12967-014-0284-0>. Acesso em: 31 mar. 2021.

YANAGIHARA, Gabriela Rezende *et al.* Effects of long-term administration of omeprazole on bone mineral density and the mechanical properties of the bone. **Revista Brasileira de Ortopedia**, v. 50, n. 2, p. 232-238, Mar. 2015. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26229922/>. Acesso em: 31 mar. 2021.

## 17 MODELO EXPERIMENTAL DE ARTRITE INDUZIDA POR ZYMOSAN COMO FERRAMENTA PARA A AVALIAÇÃO DA MIGRAÇÃO CELULAR AGUDA

Ana Caroline Rocha de Melo Leite  
Virgínia Cláudia Carneiro Girão-Carmona  
Ana Carolina Matias Dinelly Pinto  
Ana Karine Rocha de Melo Leite  
Mirna Marques Bezerra Brayner  
Francisco Airtton Castro da Rocha



### O QUE SERÁ FEITO?

A artrite reumatoide é uma doença inflamatória crônica sistêmica associada à destruição da cartilagem articular e osso subcondral (KOGA; KAWAKAMI; TSOKOS, 2021; EMERY et al., 2021), incapacitando e interferindo na qualidade de vida do indivíduo (RAMOS-PETERSEN et al., 2021). Embora a literatura mencione a participação de mecanismos autoimunes (KOGA; KAWAKAMI; TSOKOS, 2021) e de citocinas pró-inflamatórias e suas vias de sinalização (EMERY et al., 2021), a sua patogênese ainda não é totalmente compreendida (KOGA; KAWAKAMI; TSOKOS, 2021).

Assim, o uso de modelos experimentais animais para a compreensão dos mecanismos envolvidos no surgimento e desenvolvimento da artrite reumatoide ainda se faz necessário (ASQUITH et al., 2009).

Nesse sentido, o modelo de artrite induzida por zymosan (AZy), um polissacarídeo derivado da parede do fungo *Saccharomyces cerevisiae*, embora reproduza uma condição monoartrítica e requeira uma habilidade técnica para a administração intra-articular (i.art.) (ASQUITH et al., 2009), permite, de uma forma rápida, reproduzível e de baixo custo, o estudo de diferentes fenômenos e mecanismos inflamatórios, como dor, permeabilidade vascular, migração celular, sinovite, destruição da cartilagem articular e produção de mediadores pró e anti-inflamatórios (ROCHA et al., 1999; ROCHA et al., 2003; BEZERRA et al., 2004; GOES et al., 2020).

Esse modelo possibilita uma avaliação precoce (inferior a 7 dias) ou tardia (superior a 25 dias) dos processos envolvidos, tendo como fatores desencadeadores o reconhecimento do polissacarídeo pelo receptor *Toll-Like 2* (TLR2) do macrófago e ativação da via alternativa do sistema complemento (ASQUITH et al., 2009).

Especificamente, a técnica abordada neste capítulo torna-se relevante por permitir a quantificação de células migradas para a cavidade articular de animais submetidos à AZy, especialmente neutrófilos. Estes são células abundantes na articulação de indivíduos com artrite, responsáveis pela produção e liberação de mediadores pró-inflamatórios na fase aguda da doença. A ausência de apoptose fisiológica desse tipo celular pode desencadear a formação de armadilhas extracelulares de neutrófilos (neutrophil extracellular traps - NETs) capazes de aumentar a resposta inflamatória em condições, como a artrite (FELIX et al., 2020).



### **POR QUE SERÁ FEITO?**

A técnica a ser aplicada em modelo de artrite induzida por zymosan representa a coleta de lavado articular para a quantificação das células migradas nas fases aguda e crônica da AZy. O benefício da técnica baseia-se em avaliar a migração celular aguda.



### **ONDE SERÁ FEITO?**

A técnica poderá ser aplicada na cavidade articular de ratos e camundongos submetidos ou não à AZy.



### **QUANDO SERÁ FEITO?**

A técnica poderá ser utilizada quando se desejar investigar a participação celular, especialmente neutrofílica, na resposta inflamatória observada na artrite.



### **COM O QUE SERÁ FEITO?**

Para a indução da AZy em ratos ou camundongos, serão necessários, como reagentes, éter, salina estéril e zymosan. Como insumos, serão utilizados seringa hipodérmica convencional com agulha de 0,5 mL, algodão, luva e máscara. Como equipamentos, serão usados depilador, luminária e câmara de inalação.



Para a coleta do lavado articular, serão necessários, como reagentes, cloridrato de xilazina, cloridrato de cetamina, ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) e tampão fosfato-salino (PBS). Como insumos, serão utilizados seringa hipodérmica convencional com agulha de 1 mL ou 0,5 mL, luva, máscara e microtubo de centrifugação 1,5 mL. Como equipamentos, será usada luminária. Será utilizada ainda uma pequena caixa de isopor com tampa contendo gelo.

Para a quantificação do número de células, serão necessários, como reagentes, solução de Turk e álcool 70%. Como insumos, serão utilizados ponteira, gaze (para higienização da ponteira previamente à transferência de seu conteúdo para a solução de Turk e secagem da câmara de Neubauer após sua limpeza com álcool 70%) e microtubo de centrifugação 1,5 mL. Como equipamentos, serão usados a câmara de Neubauer e microscópio óptico. Serão utilizadas ainda micropipeta monocanal e placa de Petri.



## COMO SERÁ FEITO?

**Indução da AZy** – Ratos Wistar ou camundongos Swiss serão levemente anestesiados com éter, para depilação e administração *i.art.*, no joelho direito, de 1 mg (50  $\mu$ L) e 100  $\mu$ g (25  $\mu$ L) de zymosan diluído em salina estéril, respectivamente. Grupos-controle serão submetidos aos mesmos procedimentos, embora apenas *salina i.art.* será administrada (ROCHA et al., 2008).

**Coleta do lavado articular** – Após 6 horas da indução, os animais serão anestesiados com cloridrato de xilazina (10 mg/kg) e cloridrato de cetamina (80 mg/kg), via intraperitoneal, e a morte será confirmada pela ausência de movimentos respiratórios, batimentos cardíacos e reflexos do animal. Em seguida, a pele do joelho direito será retirada, o tendão patelar será pinçado e rebatido, e a membrana sinovial será exposta. Logo após, o lavado articular será obtido pela administração *i.art.*, no joelho direito, de 200 mL e 50  $\mu$ L de PBS contendo 10 mM de EDTA, para ratos e camundongos, respectivamente, seguida imediatamente por aspiração e transferência desse material para microtubo de centrifugação. Em cada animal, essa coleta será realizada duas vezes de modo a obter, ao final, em um mesmo microtubo, quantidade suficiente de lavado articular para quantificação do número de células (LEITE et al., 2009). As amostras serão armazenadas em uma caixa de isopor refrigerada.

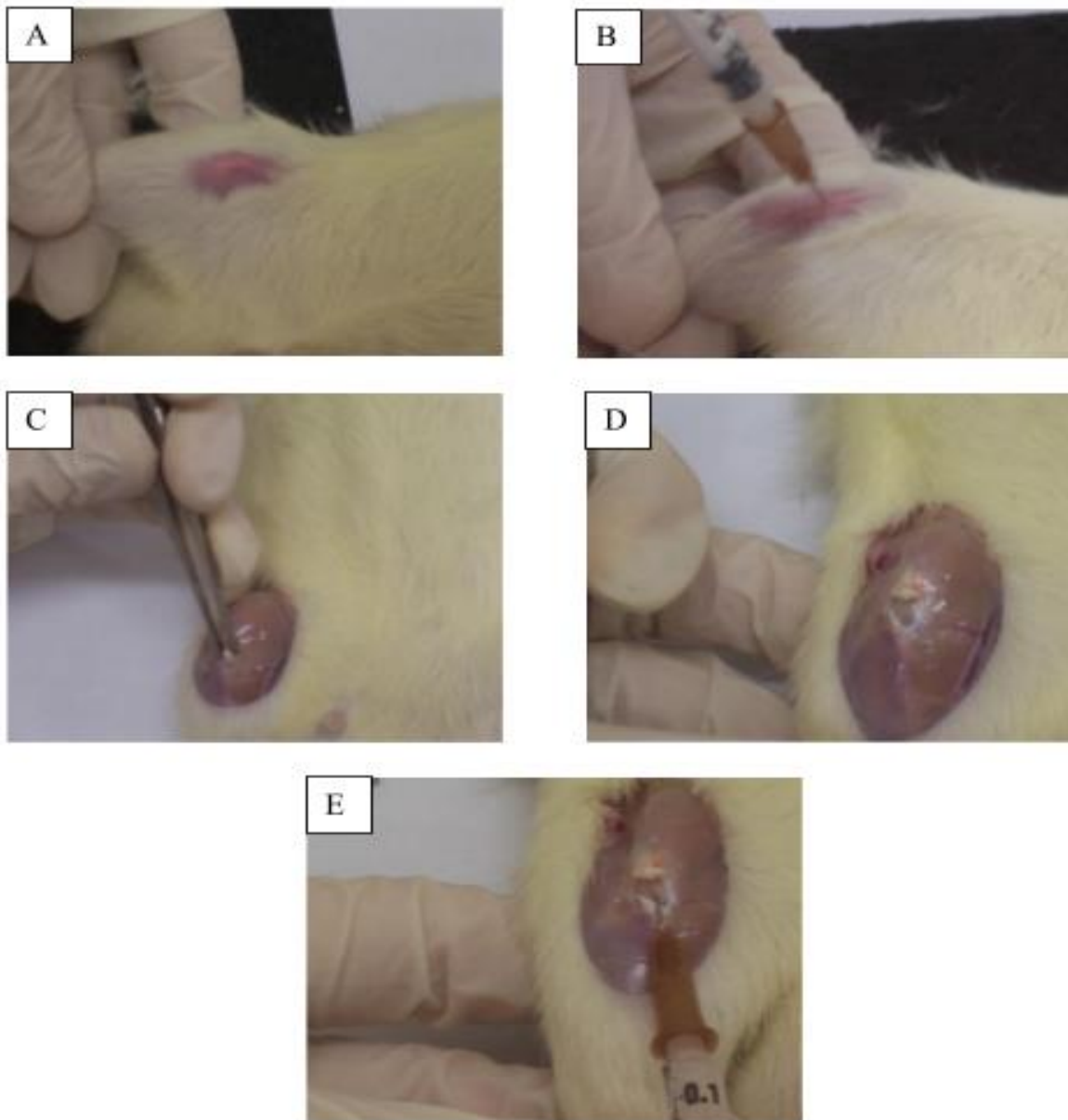
**Quantificação do número de células** – Cerca de 10  $\mu$ L da amostra de lavado articular do microtubo refrigerado será coletada e transferida para o microtubo de centrifugação, contendo 10  $\mu$ L de solução de Turk. Após leve homogeneização, 10  $\mu$ L da solução obtida será transportada para a câmara de Neubauer e essa será visualizada no microscópio óptico. Neste, será feita a

contagem de todas as células presentes nos quatro quadrantes laterais da câmara. Logo após, essa será imersa em placa de Petri contendo álcool 70% para a sua desinfecção. Toda essa sequência será seguida para cada amostra.

Para o cálculo da quantidade de células, será utilizada a seguinte fórmula:

Células totais = (total de células obtido nos 4 quadrantes x fator de diluição x 10)/4.

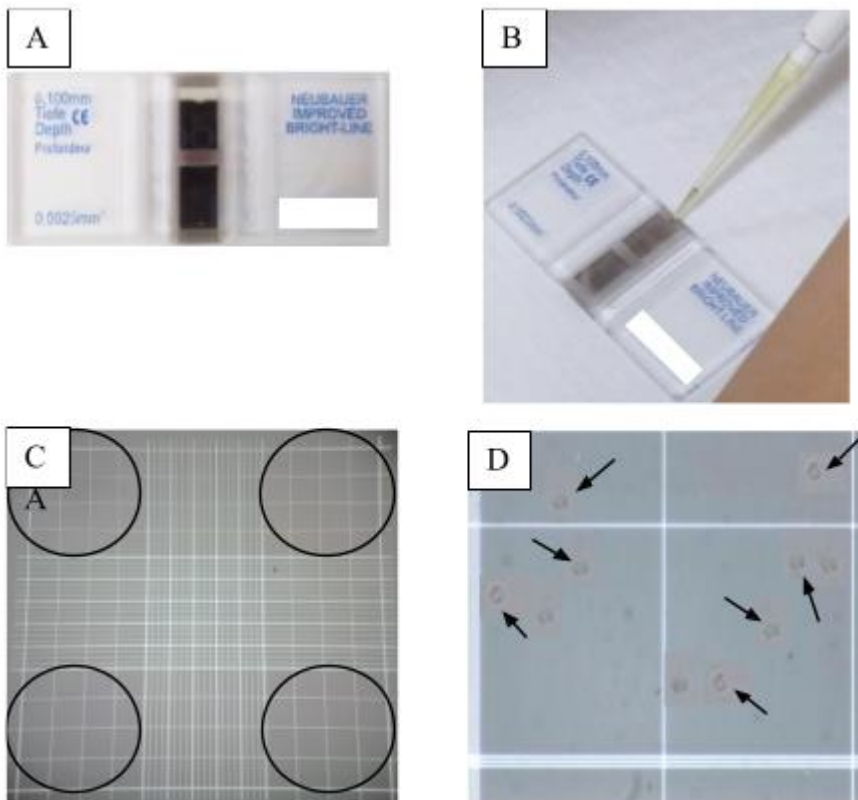
**Foto 1 - Indução da artrite por zymosan em ratos e coleta do lavado articular**



**Fonte:** Acervo dos autores.

**Nota:** Ratos Wistar foram submetidos à anestesia e depilação da pele do joelho direito (A), seguida por administração i.art de zymosan (B). Após 6 horas, a pele foi removida e o tendão patelar pinçado e rebatido (C) para exposição da membrana sinovial (D). O lavado articular foi obtido pela administração i.art de PBS com EDTA, seguida pela aspiração imediata (E).

**Foto 2 - Câmara de Neubauer, micropipetagem do lavado articular e visualização em microscópio óptico**



**Fonte:** Acervo dos autores, do Dr. Thales Kenny Ferreira Peixoto e da técnica de laboratório Maria da Conceição Capistrano de Souza.

**Nota:** Em A, observa-se a câmara de Neubauer. Em B, observa-se a micropipetagem do lavado articular diluído em solução de Turk. Em C, observam-se os quatro quadrantes laterais da câmara (circulados em preto) em aumento de 40 x. Em D, observa-se, em um dos quatro quadrantes, a presença de leucócitos (setas pretas), em um aumento de 400 x.



## QUANTO TEM SIDO USADO NA PESQUISA?

De acordo com a literatura, a técnica de coleta do lavado articular aqui abordada já foi utilizada nas fases aguda e crônica da AZy (ROCHA et al., 2008; LEITE et al. 2009; SOUZA et al., 2020), artrite induzida por lipopolissacarídeo (LPS) (LEITE et al., 2009) e modelos experimentais de osteoartrite (meniscectomia, meniscotomia e osteoartrite induzida por monoiodoacetato) (LEITE et al., 2014; SA et al., 2020).

Os estudos que fizeram uso da técnica apresentaram os mais diversos objetivos, os quais incluíram: - investigação do efeito do óxido nítrico sobre o influxo de polimorfonucleares na AZy (ROCHA et al., 2008); - análise do efeito de nanopartículas poliméricas de nerolidol em modelo de AZy (SOUZA et al., 2020); - investigação do efeito do salidroside no alívio dos sinais e sintomas em modelo de osteoartrite induzida por monoiodoacetato (SA et al., 2020).

Especificamente, para Rocha et al. (2008), a administração de extrato de *Ascaris suum*, via oral ou intraperitoneal, reduziu significativamente o influxo celular agudo na AZy em ratos, assim como a migração leucocitária em camundongos submetidos às fases aguda e crônica da artrite por zymosan. Segundo Leite et al. (2009), a aplicação sistêmica ou local de inibidores da síntese de óxido nítrico (NOS) diminuiu consideravelmente a migração neutrofílica para a cavidade articular de ratos submetidos à AZy. Esse resultado foi também observado em camundongos que receberam inibidor de NOS por via subcutânea ou intraperitoneal. Os autores constataram ainda uma redução do influxo neutrofílico quando esse inibidor foi administrado na artrite por lipopolissacarídeo (LPS).

Assim, apesar de ser uma técnica simples, ela permite estudar a participação da migração celular em diferentes modelos experimentais animais de artrite e osteoartrite, reproduzindo achados observados na artrite reumatoide e osteoartrite (SOUZA et al., 2020). Ela possibilita ainda o estudo da participação de mediadores anti e pró-inflamatórios nesses modelos experimentais (BEZERRA et al., 2007; ROCHA et al., 2008; CASTRO et al., 2006).

## REFERÊNCIAS

- ASQUITH, Darren L. *et al.* Autoimmune disease: rheumatoid arthritis animal models of rheumatoid arthritis. **European Journal of Immunology**, v. 39, p. 2040-2041, 2009.
- BEZERRA, Mirna Marques *et al.* Reactive nitrogen species scavenging, rather than nitric oxide inhibition, protects from articular cartilage damage in rat zymosan-induced arthritis. **Journal of Pharmacology**, v. 141, n. 1, p. 172-182, Jan. 2004.
- BEZERRA, Mirna M. *et al.* Neutrophils-derived peroxynitrite contributes to acute hyperalgesia and cell influx in zymosan arthritis. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 374, p. 265-273, 2007.
- CASTRO, R. R. *et al.* A quantitative approach to measure joint pain in experimental osteoarthritis: evidence of a role for nitric oxide. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 14, p. 769-776, 2006.
- EMERY, Paul *et al.* Baricitinib inhibits structural joint damage progression in patients with rheumatoid arthritis: a comprehensive review. **Arthritis Research & Therapy**, v. 23, n. 3, p. 1-13, 2021.
- FELIX, Franciel Batista *et al.* Biochanin A attenuates zymosan-induced arthritis in mice similarly to 17- $\beta$  estradiol: an alternative to hormone replacement therapy? **Inflammation Research**, v. 69, n. 12, p. 1245-1256, 2020.
- GOES, Paulo Roberto Nunes de *et al.* Rheological behavior and antiarthritic activity of Pterodon pubescens nanoemulsion. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 10, p. 1-21, 2020.
- KOGA, Tomohiro; KAWAKAMI, Atsushi; TSOKOS, George C. Current insights and future prospects for the pathogenesis and treatment for rheumatoid arthritis. **Clinical Immunology**, v. 225, p. 1-6, Apr. 2021.
- LEITE, Ana Caroline Rocha de Melo *et al.* Effects of nitric oxide on neutrophil influx depends on the tissue: role of leukotriene B4 and adhesion molecules. **British Journal of Pharmacology**, v. 156, p. 818-825, 2009.
- LEITE, Ana Caroline Rocha de Melo *et al.* Meniscal transection rather than excision increases pain behavior and structural damage in experimental osteoarthritis in mice. **Rocha Osteoarthritis and Cartilage**, v. 22, p.1878-1885, 2014.
- RAMOS-PETERSEN, Laura *et al.* A systematic review to identify the effects of biologics in the feet of patients with rheumatoid arthritis. **Medicina**, v. 57, n. 23, p. 1-11, 2021.
- ROCHA, Francisco Airton Castro da *et al.* Efeito de inibidores da sintase de óxido nítrico na dor inflamatória articular e influxo celular da artrite induzida por zymosan em ratos. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 43, n. 4, p. 206-17, jul./ago. 2003.
- ROCHA, Francisco Airton Castro da *et al.* Periarthritis promotes gait disturbance in zymosan-induced arthritis in rats. **Inflammation Research**, v. 48, n. 9, p. 485-490, Sept. 1999.

ROCHA, Francisco Airton Castro *et al.* Protective effect of an extract from ascaris suum in experimental arthritis models. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 6, p. 2736-2745, June 2008.

SA, Lina *et al.* Contribution of salidroside to the relieve of symptom and sign in the early acute stage of osteoarthritis in rat model. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 259, p. 1-12, 2020.

SOUZA, Eloísa Portugal Barros Silva Soares de *et al.* Anti-inflammatory effect of nano-encapsulated nerolidol on zymosaninduced arthritis in mice. **Food and Chemical Toxicology**, v. 135, p. 1-9, 2020.

## 18 PROCESSAMENTO DE AMOSTRAS MINERALIZADAS

Ingrid Chaves Cavalcante Kischinhevsky  
Adriana Terezinha Neves Novellino Alves  
Suelen Cristina Sartoretto Lorenzi  
Monica Diuana Calasans-Maia



### O QUE SERÁ FEITO?

O desenvolvimento de novos biomateriais substitutos ósseos destinados à regeneração óssea e de novas superfícies de implantes metálicos utilizados na odontologia e ortopedia trouxe a necessidade de técnicas de processamento histológico para tecidos mineralizados e para implantes metálicos, com a intenção de esclarecer os mecanismos fisiológicos do reparo ósseo e interface osso-implante.

A avaliação histológica da interface osso-biomaterial e osso-implante dentário requer o preparo de amostras não desmineralizadas. Para isso, os fragmentos ósseos fixados aos implantes são desidratados e incluídos em resina metilmetacrilato (MMA) para, então, serem cortados. A resina MMA, devido à sua natureza dura, é um material indicado para infiltrar amostras de: tecido ósseo não desmineralizado, de outros tecidos mineralizados (como o tecido dentário) e tecido ósseo/dentário associados a estruturas metálicas, dentre eles os implantes dentários e ortopédicos (DOMINGUEZ et al., 2012).

A primeira técnica de processamento histológico para amostras que continham materiais duros, como os metais, foi descrita por Donath e Breuner (1982). Desde então, outras diversas técnicas surgiram com o objetivo de buscar o aprimoramento na qualidade das imagens.

O Exakt System é um sistema de corte de alta precisão capaz de preparar lâminas histológicas com espessura de até 10  $\mu\text{m}$ . As amostras teciduais não são descalcificadas, preservando, desse modo, as informações celulares e a morfologia tecidual. O referido método é particularmente indicado para a observação da interface osso/implante metálico, osso/cartilagem, dente/osso, dentre outros, uma vez que as interfaces são preparadas e conservam as estruturas teciduais. Placas, restaurações, coroas, pontes, implantes e tecidos moles são mantidos *in situ* e os detalhes teciduais macroscópicos e microscópicos preservados para avaliações histológica e morfométrica (DONATH; BREUNER, 1982).

A técnica descrita neste capítulo resulta da nossa experiência na inclusão em resina acrílica de amostras não desmineralizadas associadas ou não aos implantes metálicos,

executada no Laboratório Associado de Pesquisa Clínica em Odontologia (LPCO) da Universidade Federal Fluminense (UFF). A sequência será subdividida em fixação, desidratação, infiltração em resina, inclusão em resina, montagem da lâmina, microtomia e acabamento/polimento de acordo com o EXAKT® System.

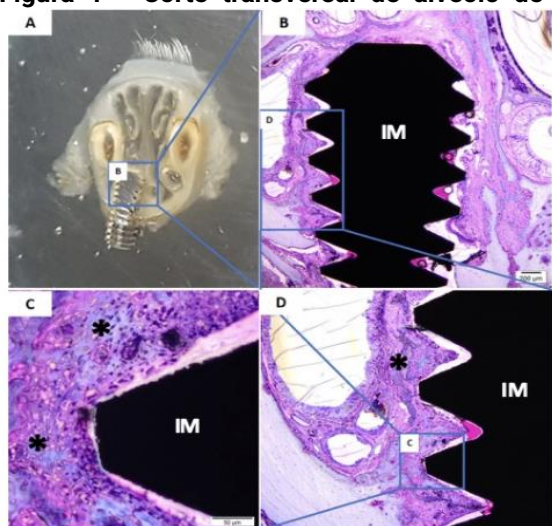


## POR QUE SERÁ FEITA?

A inclusão de seções de osso mineralizado com implantes dentários em resina MMA é considerada o melhor método para a avaliação do metabolismo ósseo associado a implantes dentários. Uma vez que essa técnica produz lâminas histológicas de alta qualidade com a capacidade de se observar a arquitetura óssea, o processo de mineralização biológica e os tipos celulares presentes sem prejuízo da qualidade da interface osso-implante (DOMINGUEZ et al., 2012).

A versatilidade do processamento histológico com inclusão das amostras em resina permite a preparação de lâminas para avaliação histológica do tecido ósseo, dentário e de cartilagem associados a materiais de alta dureza (placas, obturações, coroas, pontes, implantes) (DONATH; BREUNER, 1982) com a grande vantagem de não desmineralizar os tecidos, permitindo, assim, o estudo da relação dos tecidos com diversos tipos de biomateriais (Figura 1).

**Figura 1 - Corte transversal de alvéolo de rato Wistar com mini-implante dentário**

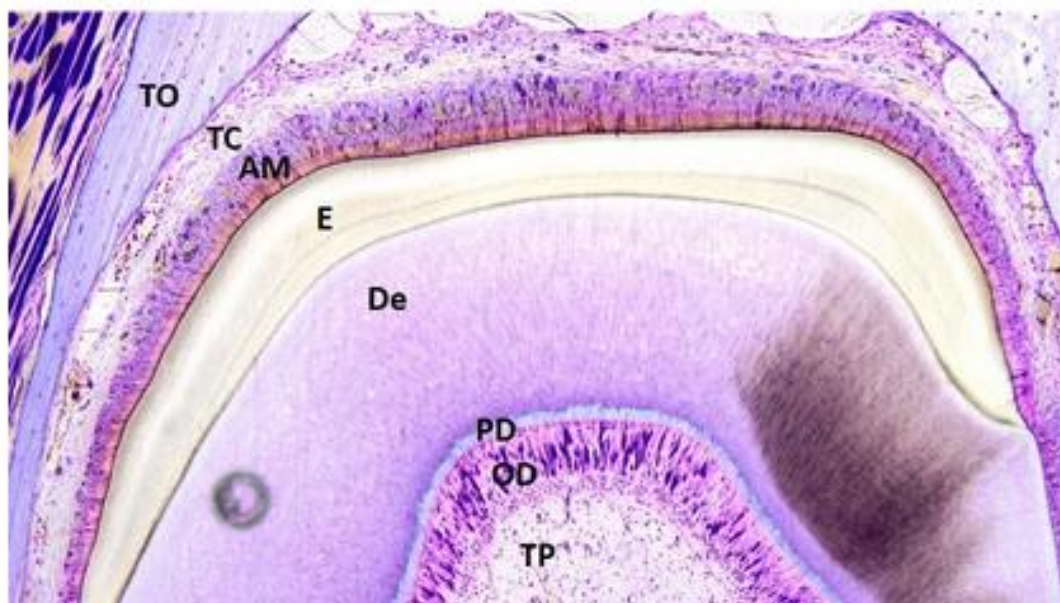


**Fonte:** Os próprios autores. Laboratório Associado de Pesquisa Clínica em Odontologia (LPCO) da Universidade Federal Fluminense (UFF).

**Nota:** (A): Macroscopia da peça. (B): Menor aumento com visualização do implante dentário (IM). (C) e (D): Detalhe da interface do implante com osso neoformado (\*).

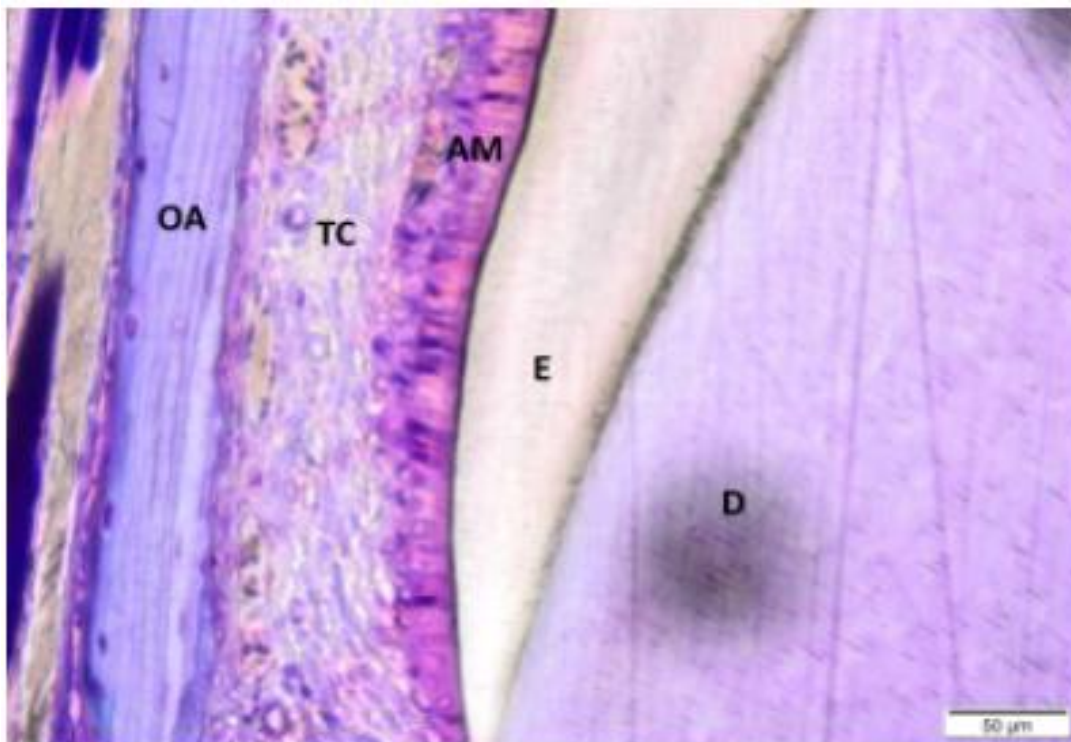


**Figura 2 - Alvéolo dentário de rato Wistar com a visualização de: ósseo alveolar (OA); tecido conjuntivo pericoronário (TC); ameloblastos (AM); esmalte dentário (E); dentina (De); pré-dentina (PD); odontoblastos (OD) e tecido pulpar (TP)**



**Fonte:** Os próprios autores. Laboratório Associado de Pesquisa Clínica em Odontologia (LPCO) da Universidade Federal Fluminense (UFF).

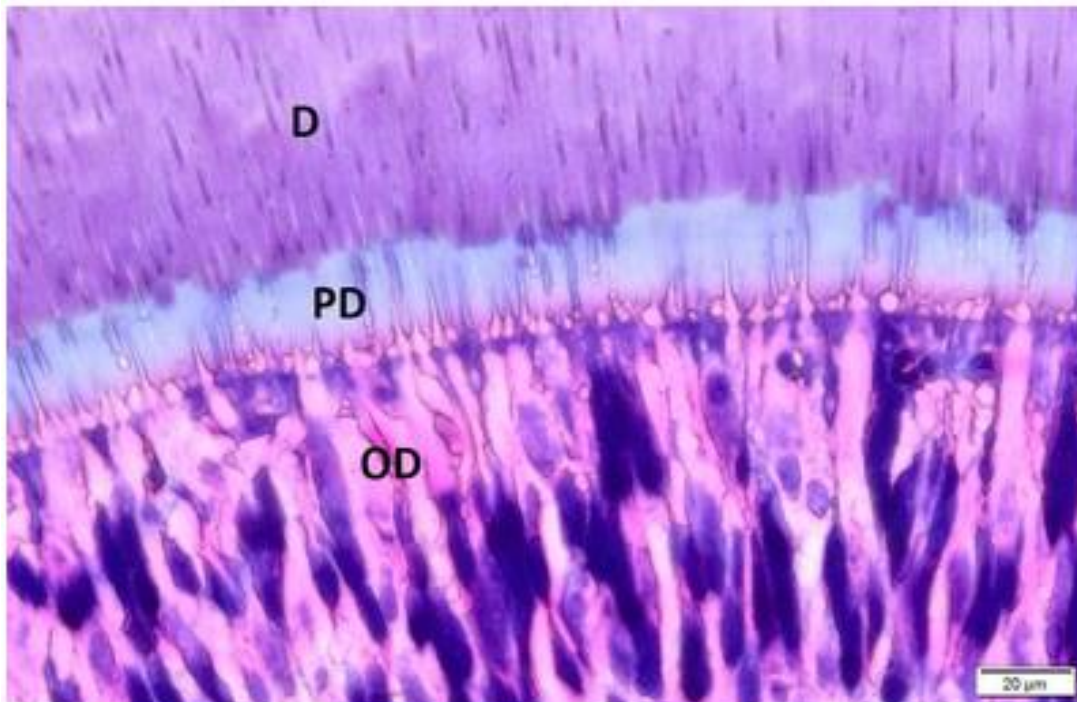
**Figura 3 - Alvéolo dentário de rato Wistar com detalhe da região amelo-dentinária**



**Fonte:** Os próprios autores. Laboratório Associado de Pesquisa Clínica em Odontologia (LPCO) da Universidade Federal Fluminense (UFF).

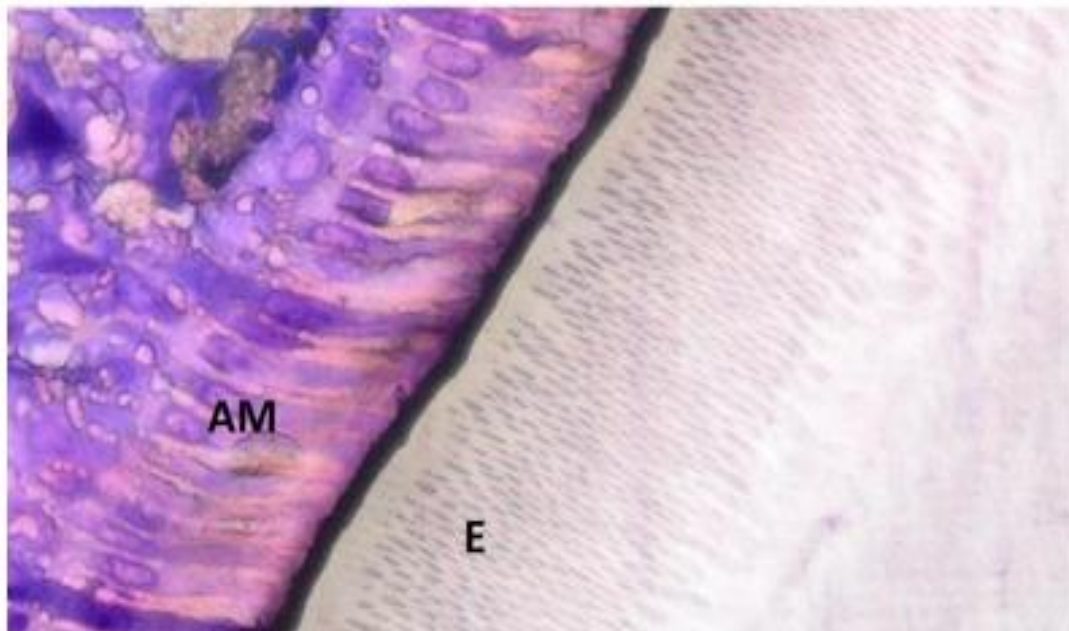
**Nota:** (D): Dentina. (E): Esmalte. (AM): Ameloblastos. (TC): Tecido conjuntivo pericoronário. (OA): Osso alveolar.

**Figura 4 - Alvéolo dentário de rato Wistar. Visualização em maior aumento com detalhe das características morfológicas da Dentina (D); Pré-dentina (PD) e Odontoblastos (OD)**



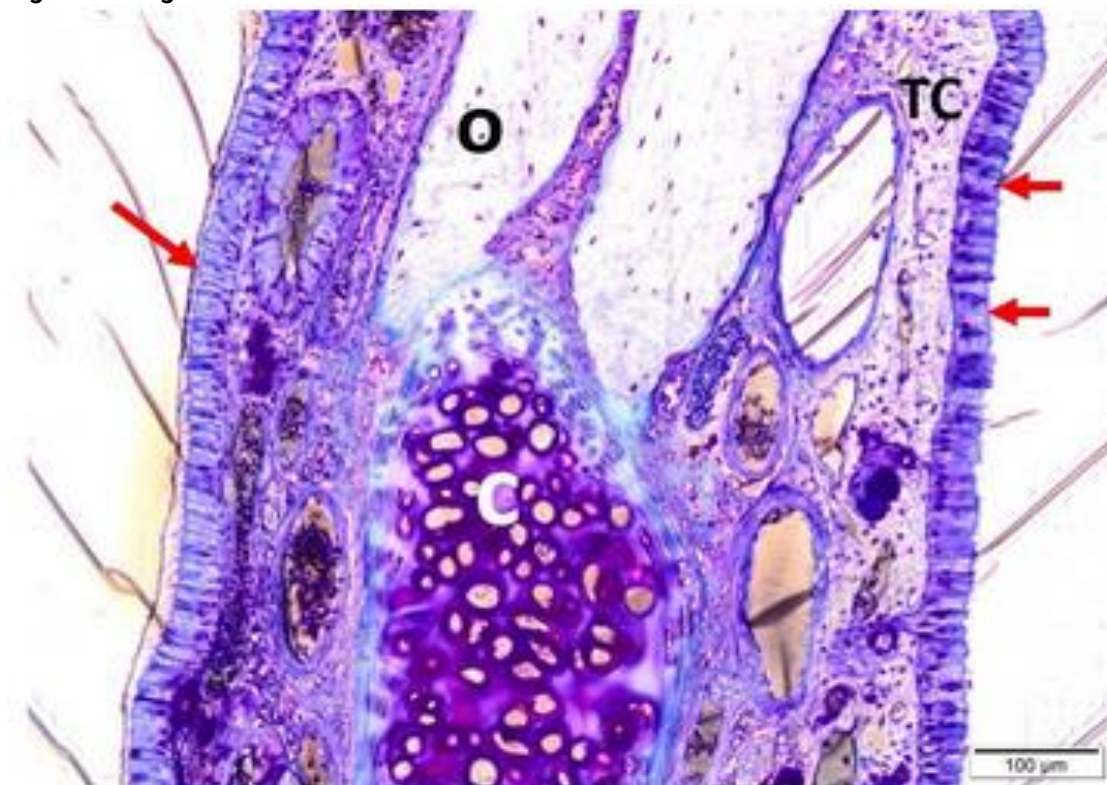
**Fonte:** Os próprios autores. Laboratório Associado de Pesquisa Clínica em Odontologia (LPCO) da Universidade Federal Fluminense (UFF).

**Figura 5 - Alvéolo dentário de rato Wistar com detalhamento dos Ameloblastos (A) e Esmalte (E)**



**Fonte:** Os próprios autores. Laboratório Associado de Pesquisa Clínica em Odontologia (LPCO) da Universidade Federal Fluminense (UFF).

**Figura 6 - Região mediana das cavidades nasais de rato Wistar**



**Fonte:** Os próprios autores. Laboratório Associado de Pesquisa Clínica em Odontologia (LPCO) da Universidade Federal Fluminense (UFF).

**Nota:** Epitélio respiratório (setas vermelhas). (O): Tecido ósseo. (TC): Tecido conjuntivo e (C): Tecido cartilagemoso.



## QUANDO SERÁ FEITO?

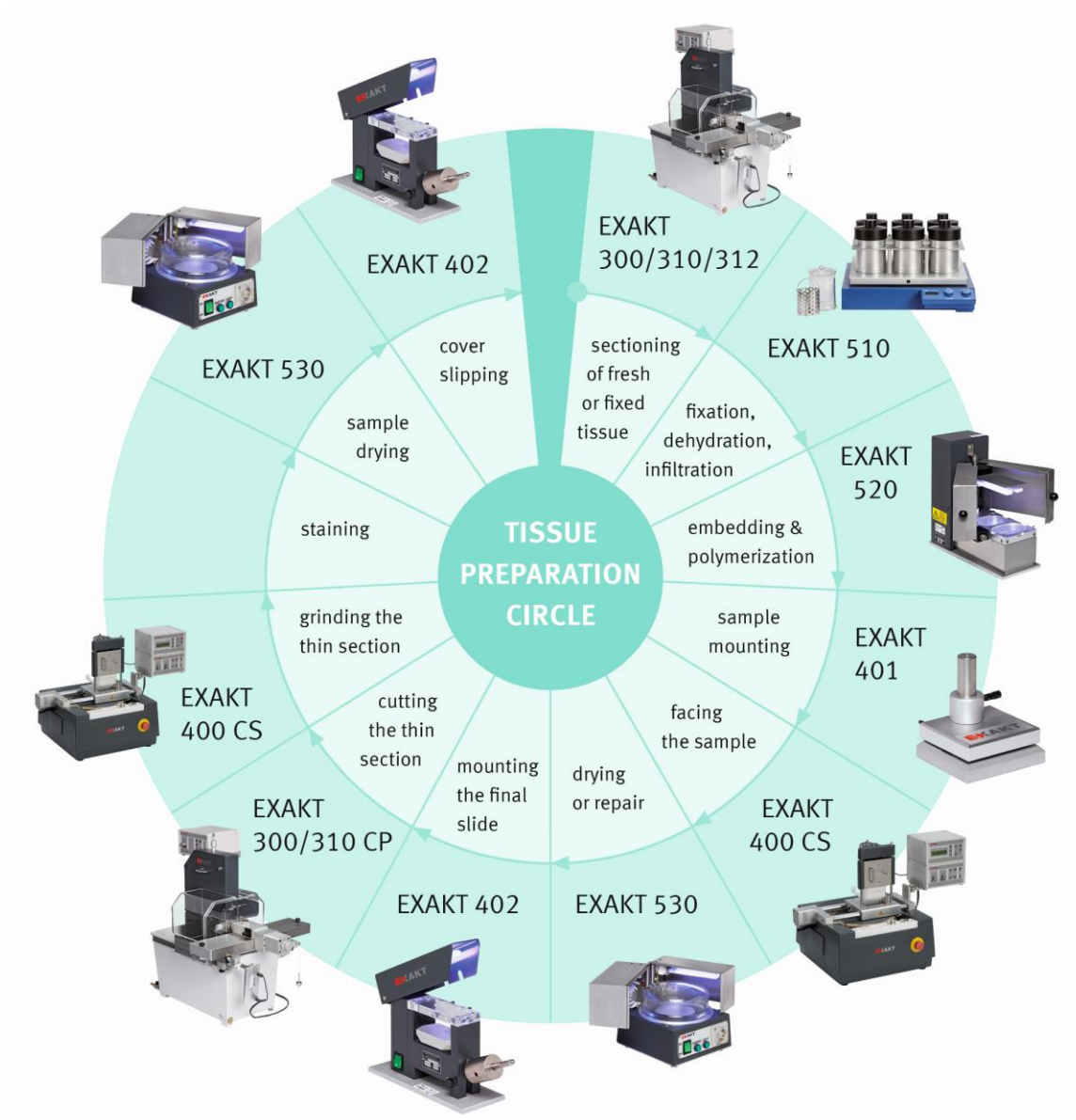
Sempre que houver a necessidade de realizar a avaliação histológica de amostras mineralizadas associadas ou não a estruturas metálicas (Figuras 1 a 6). Sabe-se que a avaliação histológica de amostras mineralizadas também pode ser feita por meio da desmineralização das amostras e inclusão em parafina. Porém, o processo de desmineralização não está indicado quando se precisa avaliar as fases de mineralização biológica do osso ou quando estruturas metálicas se encontram nas amostras de osso ou dente.



## POR QUEM/COM O QUE SERÁ FEITO?

O EXAKT System é um sistema integrado que permite desde a desidratação das amostras até o polimento da lâmina para posterior coloração (Figura 7).

Figura 7 - Sequência de equipamentos utilizados pelo sistema EXAKT para processamento histológico e inclusão em resina



Fonte: EXAKT Advanced Technologies GmbH (20--, p. 17).

Nota: Imagem gentilmente cedida pelo Sr. Tim Milligan, Diretor de Marketing da EXAKT Technologies ([exaktusa.com](http://exaktusa.com)).



## COMO SERÁ FEITO?

### Fixação

As amostras contendo osso e/ou implante devem ser fixadas em solução de formol tamponada neutra a 3.7% imediatamente após a sua obtenção, por no mínimo 24h. O objetivo da fixação é evitar a destruição das células por suas próprias enzimas ou por bactérias. Após a fixação, as amostras seguem direto para a desidratação. Recomenda-se que elas não devem permanecer por mais de 7 dias na solução de formol para evitar uma leve descalcificação que pode ser provocada pelo longo contato com o formol e prejudicar a sua análise (YANG et al., 2003; HOROBIN, 2008).

### Desidratação

Para a etapa de desidratação, as amostras devem ser cortadas no tamanho variando de 2mm (ideal) até 5mm (máximo). As amostras finas permitem melhor desidratação, infiltração de resina e melhor inclusão. As amostras, dentro dos cassetes de histologia, já devidamente identificadas com lápis preto e arrumadas nas cestas metálicas, serão expostas a soluções alcoólicas ascendentes 60%, 80%, 96% e 100%, respectivamente (Foto 1). O tempo de exposição em cada álcool é dependente do tamanho da amostra: duração de 1 dia, para amostras de 2-3mm; de 3 dias, para amostras de 3-5mm (SARTORETTO et al., 2020).

**Foto 1 - Cestas metálicas onde os cassetes histológicos com as amostras são arrumados**



**Fonte:** EXAKT Technologies (2021).

**Nota:** Imagem gentilmente cedida pelo Sr. Tim Milligan, Diretor de Marketing da EXAKT Technologies ([exaktusa.com](http://exaktusa.com)).

## Infiltração em resina

Após a completa desidratação das amostras, estas iniciarão o processo de infiltração em resina Technovit 7200 VLC, seguindo o protocolo do fabricante (Technovit 7200 VLC; Kulzer & Co., Wehrheim, Germany). Tal etapa acontece em 5 fases de infiltração com duração, também, dependente do tamanho da amostra: 1 dia para amostras de 2-3mm ou 3 dias para amostras de 3-5mm:

- 1ª: solução com 70% de álcool e 30% de resina;
- 2ª: solução com 50% de álcool e 50% de resina;
- 3ª: solução com 30% de álcool e 70% de resina;
- 4ª: solução 1, 100% de resina e
- 5ª: solução 2, 100% de resina.

Dessa forma, os cassetes, após a desidratação, são transferidos para as soluções crescentes de resina Technovit 7200 VLC, conforme descrição acima. Este processo pode ser acelerado utilizando o equipamento EXAKT 510 (Foto 2), que permite a agitação (velocidade 45) durante o processo de infiltração.

**Foto 2 - Equipamento EXACT 510: sistema de desidratação e infiltração**



**Fonte:** EXAKT Technologies (2021).

**Nota:** Imagem gentilmente cedida pelo Sr. Tim Milligan, Diretor de Marketing da EXAKT Technologies ([exaktusa.com](http://exaktusa.com)).

## Inclusão em resina

Para a inclusão em resina, as amostras são removidas dos cassetes e posicionadas na moldeira plástica da máquina de polimerização (EXAKT 520) (Foto 3). Essas placas são, então, preenchidas com a resina Technovit 7200 até cobrirem completamente as amostras (Foto 4), evitando o excesso de resina. Este processo é concluído em duas etapas: inicialmente luz branca e em seguida luz azul (Foto 5). O tempo para cada lâmpada depende do tamanho das amostras.

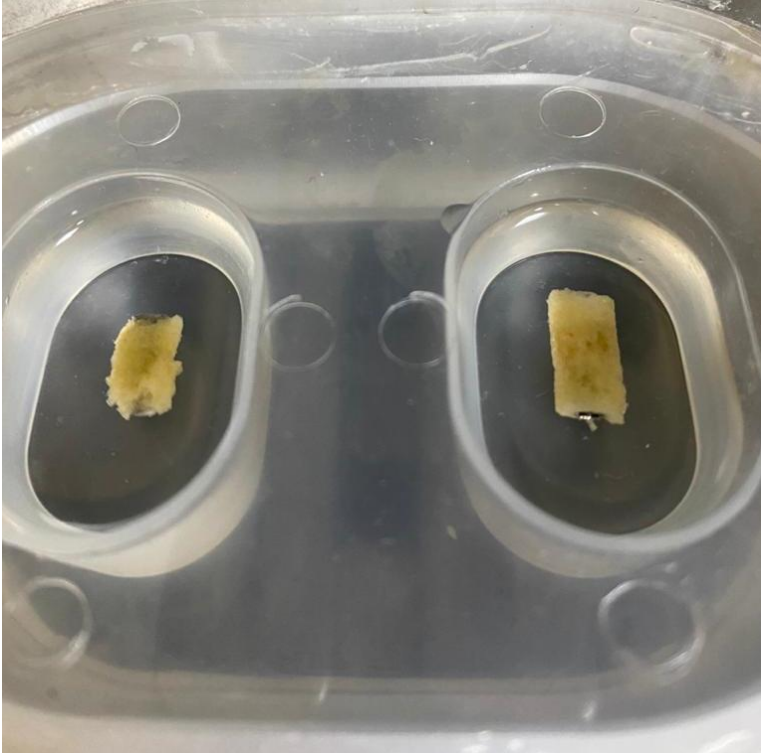
Foto 3 - Exakt 520 - unidade de polimerização leve



**Fonte:** EXACT Technologies (2021).

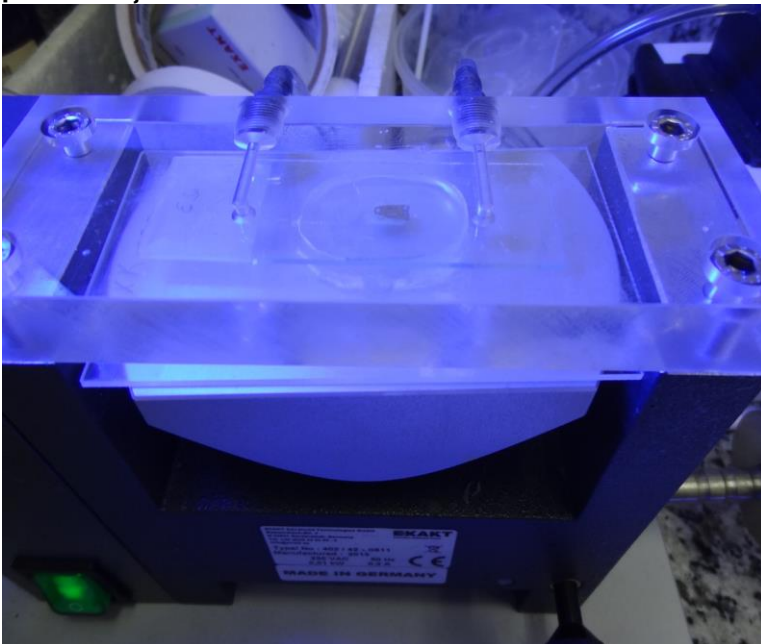
**Nota:** Imagem gentilmente cedida pelo Sr. Tim Milligan, Diretor de Marketing da EXAKT Technologies ([exaktusa.com](http://exaktusa.com)).

**Foto 4 - Amostras incluídas em resina dentro das placas plásticas preenchidas com resina**



**Fonte:** Os próprios autores. Laboratório Associado de Pesquisa Clínica em Odontologia (LPCO) da Universidade Federal Fluminense (UFF).

**Foto 5 - As amostras incluídas em resina no interior da placa plástica durante o processo de polimerização**



**Fonte:** Os próprios autores. Laboratório Associado de Pesquisa Clínica em Odontologia (LPCO) da Universidade Federal Fluminense (UFF).



Terminada a polimerização, os blocos contendo as amostras são facilmente removidos da placa plástica. No entanto, a polimerização não é completa na superfície dos blocos por causa do contato com o oxigênio, formando uma superfície *soft*. Dessa forma, os blocos devem ser secos na máquina *block drying* (EXAKT 530) (Foto 6) com o auxílio de uma bomba a vácuo. Após secagem, a pequena superfície *soft* é removida com faca ou espátula. Logo após, utiliza-se, manualmente, uma lixa de 600  $\mu\text{m}$  para remover imperfeições e excessos a fim de se obter um bloco paralelo (Fotos 7 e 8).

**Foto 6 - EXAKT 530 - *block drying*: secagem com segurança a 40°C dos blocos de resina**



**Fonte:** EXACT Technologies (2021).

**Nota:** Imagem gentilmente cedida pelo Sr. Tim Milligan, Diretor de Marketing da EXAKT Technologies ([exaktusa.com](http://exaktusa.com)).

**Foto 7 - Bloco de acrílico após remoção da superfície *soft* com auxílio de lixa de 600  $\mu\text{m}$**



**Fonte:** Os próprios autores. Laboratório Associado de Pesquisa Clínica em Odontologia (LPCO) da Universidade Federal Fluminense (UFF).

**Foto 8 - Bloco de acrílico contendo material**



**Fonte:** Os próprios autores. Laboratório Associado de Pesquisa Clínica em Odontologia (LPCO) da Universidade Federal Fluminense (UFF).

**Nota:** Observa-se a ausência de bolhas no bloco de resina que melhora muito a qualidade da lâmina e a sua imagem.

### Montagem das lâminas

A próxima etapa é colar o bloco na lâmina plástica. Para isso, essa lâmina deve ser devidamente preparada:

- 1) todas as margens da lâmina devem ser aplainadas na máquina de lixar com lixa de 600  $\mu\text{m}$  para remoção de imperfeições e resíduos oriundos da manufatura;
- 2) fazer retenções na superfície que receberá a cola e o bloco usando a lixa 600  $\mu\text{m}$ . Na superfície do bloco que receberá a cola, também são feitas rugosidades com essa lixa. Por fim, bloco e lâmina devem ser limpos com álcool absoluto.

### A colagem do bloco segue o protocolo:

- 1) Colagem da 1ª lâmina: liga-se o aparelho (EXAKT 401) para criar o vácuo acoplado na plataforma e posiciona-se a lâmina no centro do suporte (Foto 9). A cola recomendada pelo fabricante é a Technovit 5100, mas pode ser usada também a cola instantânea à base de etil-

cianoacrilato (Super Bonder®), que deve ser espalhada sobre o bloco de resina. O bloco de resina, então, é posicionado no centro do suporte e, delicadamente, a plataforma é abaixada até encostar no bloco de resina (pressão leve). Após o tempo de polimerização da cola, o vácuo deve ser desligado e o sistema formado pela lâmina + cola + bloco de resina (sistema lâmina/cola/bloco) (Figura 8) é removido da plataforma do equipamento EXAKT 401.

**Foto 9 - EXAKT 401 - Vacuum Adhesive Press**

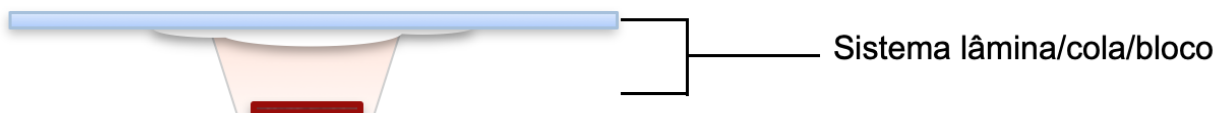


**Fonte:** Exakt Technologies (2021).

**Nota 1:** Imagem gentilmente cedida pelo Sr. Tim Milligan, Diretor de Marketing da EXAKT Technologies ([exaktusa.com](http://exaktusa.com)).

**Nota 2:** O bloco de resina com a amostra incorporada é colocado de forma absolutamente precisa e paralela a uma lâmina que está contida pelo vácuo.

**Figura 8 - Desenho esquemático ilustrando o sistema lâmina/cola/bloco após remoção da plataforma do equipamento EXAKT 401**



**Fonte:** Os próprios autores. Laboratório Associado de Pesquisa Clínica em Odontologia (LPCO) da Universidade Federal Fluminense (UFF).

Para se obter um sistema paralelo, o sistema lâmina/cola/bloco é transferido para a máquina de lixar com lixa 800 µm; o vácuo é ligado, a lâmina encaixada na máquina (EXAKT 400 CS) (Foto 10) e o lixamento iniciado. Durante esse processo, a rotação e a oscilação devem estar ligadas.

Foto 10 - EXAKT 499 CS



**Fonte:** Exakt Technologies (2021).

**Nota 1:** Imagem gentilmente cedida pelo Sr. Tim Milligan, Diretor de Marketing da Exakt Technologies ([exaktusa.com](http://exaktusa.com)).

**Nota 2:** Esse sistema lixa as peças utilizando papéis e filmes abrasivos com precisão de  $\pm 1,5$  micron. As peças são lixadas e finalizadas com um paralelismo perfeito devido ao controle eletrônico do equipamento.

O paralelismo é conferido, visualmente, com o auxílio do “paralelômetro”. Este deve ser encostado na superfície do bloco voltado para a luz; se houver passagem de luz entre o bloco e o equipamento significa que o bloco ainda não está paralelo e deve voltar para o lixamento.

Ao atingir o paralelismo, a amostra no interior do bloco deve ser exposta utilizando uma lixa 1200  $\mu\text{m}$ . Quando o material de interesse estiver exposto, a segunda lâmina deve ser colada.

### Colagem da 2ª lâmina (montagem da lâmina final)

O sistema lâmina/cola/bloco deve ser medido com paquímetro digital e seu valor anotado (Foto 11A). A 2ª lâmina também é preparada com lixamento das margens e limpeza com álcool absoluto. A espessura da 2ª lâmina é verificada (Foto 11B) e ela é encaixada no equipamento de colagem (tipo sanduicheira com sistema de luz acoplado) com auxílio de vácuo (EXAKT 402) (Fotos 12 e 13).

**Foto 11 - Mensuração da espessura do sistema lâmina/cola/bloco no paquímetro digital (A). Mensuração da 2ª lâmina no paquímetro digital (B)**



**Fonte:** Os próprios autores. Laboratório Associado de Pesquisa Clínica em Odontologia (LPCO) da Universidade Federal Fluminense (UFF).

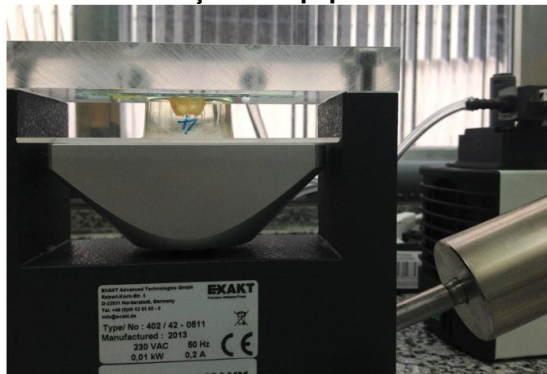
**Foto 12 - Prensa Adesiva de Precisão EXAKT 402**



**Fonte:** Exakt Technologies (2021).

**Nota:** Imagem gentilmente cedida pelo Sr. Tim Milligan, Diretor de Marketing da Exakt Technologies ([exaktusa.com](http://exaktusa.com)).

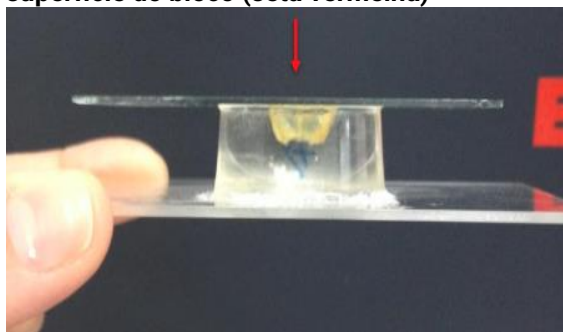
**Foto 13 - Utilização do equipamento Exakt 402 (sanduicheira) para a colagem da segunda lâmina**



**Fonte:** Os próprios autores. Laboratório Associado de Pesquisa Clínica em Odontologia (LPCO) da Universidade Federal Fluminense (UFF).

A superfície livre do bloco de resina também deve ser limpa com álcool absoluto e, então, a cola Technovit 7210 ou a cola instantânea à base de etilcianocrilato (Super Bonder®) espalhada. Se a cola utilizada for a do *kit* (Technovit 7210), será necessário ligar a lâmpada do equipamento e aguardar 10 minutos para a total fotopolimerização. Se a utilizada for a cola instantânea à base de etilcianocrilato (Super Bonder®), apenas aguardar alguns minutos para a secagem. O bloco, então, é posicionado sobre a plataforma e ela é elevada até tocar a lâmina. O equipamento é travado, permitindo, assim, a pressão constante do bloco contra a lâmina (Foto 14). Para remover o “sanduíche” da máquina, é necessário sempre desligar o vácuo antes.

**Foto 14 - Aspecto do sistema após a colagem da 2ª lâmina. Observar a exposição da amostra na superfície do bloco (seta vermelha)**



**Fonte:** Os próprios autores. Laboratório Associado de Pesquisa Clínica em Odontologia (LPCO) da Universidade Federal Fluminense (UFF).

**Foto 15 - EXAKT 300 & 300 CP**



**Fonte:** Exakt Technologies (2021).

**Nota 1:** Imagem gentilmente cedida pelo Sr. Tim Milligan, Diretor de Marketing da Exakt Technologies. (exaktusa.com).

**Nota 2:** Esse equipamento possui serras de fita de diamante de alta precisão. É indicado para cortar tecidos altamente sensíveis, bem como tecido ósseo associado a implantes metálicos para análise histológica.

### Microtomia, Acabamento e Polimento

Para o procedimento do corte das peças é necessário, primeiramente, selecionar a plataforma de suporte compatível ao tamanho da lâmina. Feito isso, a plataforma é acoplada no vácuo e a lâmina presa no sistema - EXAKT 300 & 310 CP (Foto 15).

A base de corte é encaixada de forma paralela e o sistema fixado. A serra, então, é ligada e, aos poucos, a lâmina de vidro encostará na serra (ponto zero). A serra deve estar ligada e em baixa rotação (velocidade 6 ou 7). Após a localização do ponto zero, deve-se controlar a espessura do corte (cada giro do botão que seleciona a espessura de corte equivale a 100  $\mu\text{m}$ ). E, para a segurança, o primeiro corte deve ser realizado em 200 a 300  $\mu\text{m}$ .

Nesse momento, o sistema é bloqueado, o fluxo de água ligado, a velocidade alterada para 10 e o bloco encostado, delicadamente, na serra até formar uma leve edentação. A base deve ser solta devagar, sem a necessidade de empurrar. A base de corte está conectada a um peso que deve ser solto na parte posterior e vai “puxar” o sistema e conduzir o corte. Após formar a edentação, ligar o botão de oscilação – o bloco será girado no próprio eixo, favorecendo o corte (Foto 16A e B).

**Foto 16 A e B - Momento que as amostras estão sendo cortadas por meio da utilização do Equipamento EXAKT 300 & 300 CP**



**Fonte:** Os próprios autores. Laboratório Associado de Pesquisa Clínica em Odontologia (LPCO) da Universidade Federal Fluminense (UFF).

Após a conclusão do corte (Foto 17), o conjunto de interesse (lâmina 2 + cola 2+ resina) é medido com um paquímetro digital. Desse valor é subtraído o valor da cola 2 e da lâmina 2 para se obter o valor total da fatia de resina contendo a amostra.

**Foto 17 - Aspecto da 2ª lâmina e da fatia de resina obtida após concluído o processo**



**Fonte:** Os próprios autores. Laboratório Associado de Pesquisa Clínica em Odontologia (LPCO) da Universidade Federal Fluminense (UFF).



Obtido o valor da fatia de resina, a lâmina é transferida para a máquina de lixar a fim de que essa fatia seja reduzida de acordo com a necessidade, até 10  $\mu\text{m}$ . Para isso, será utilizada uma sequência de lixas, conforme a Tabela 1 abaixo.

**Tabela 1 - Sequência de lixas utilizada para a redução da espessura da fatia de resina**

ESPESSURA DA AMOSTRA	LIXA	LIMITE DE $\mu\text{M}$
250 $\mu\text{m}$	K800	130 $\mu\text{m}$
120 $\mu\text{m}$	K1000	40 $\mu\text{m}$
80 $\mu\text{m}$	K1200	40 $\mu\text{m}$
40 $\mu\text{m}$	K2500	10 $\mu\text{m}$
30 $\mu\text{m}$	P2000	3 $\mu\text{m}$

**Fonte:** Os próprios autores. Protocolo utilizado pelo Laboratório Associado de Pesquisa Clínica em Odontologia (LPCO) da Universidade Federal Fluminense (UFF).

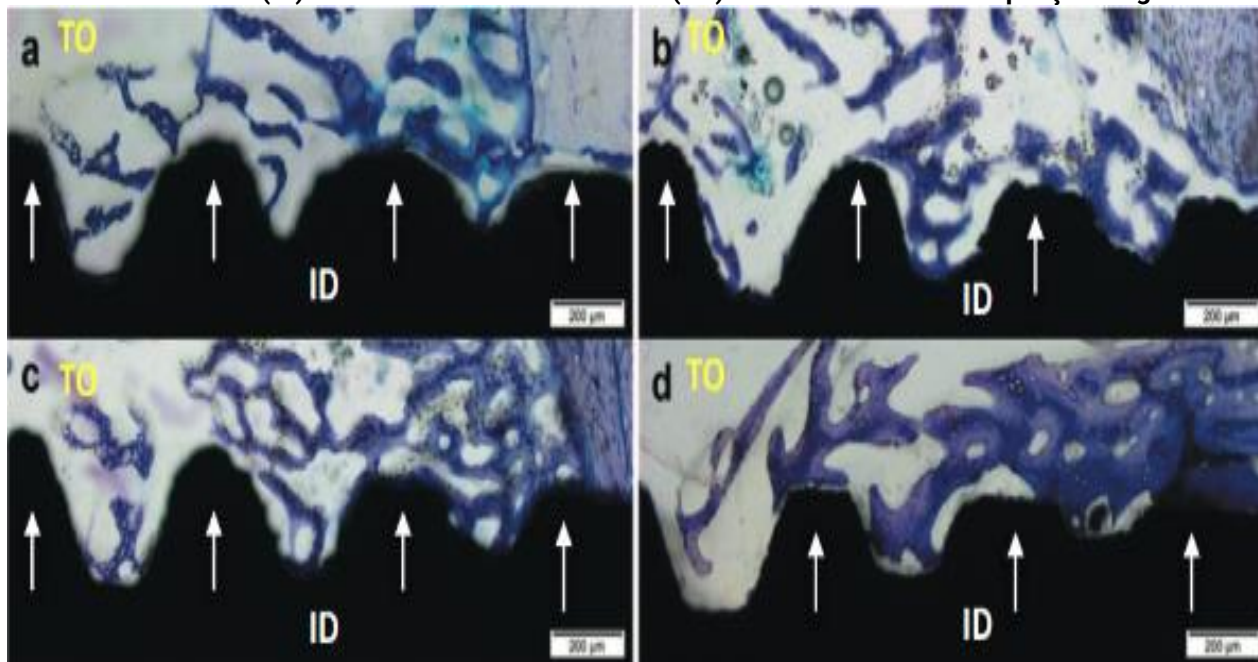
As lixas do tipo “K” podem ser usadas para material ósseo e biomateriais. As lixas “P” são indicadas para implantes metálicos, uma vez que elas evitam que a resina seja mais desgastada do que o material de interesse. E a lixa 4000 é destinada para polimento. A espessura mínima de corte recomendada é de 10  $\mu\text{m}$ .



## QUANTO TEM SIDO USADO NA PESQUISA?

Estudos prévios têm utilizado essa mesma metodologia, obtendo-se resultados com importante contribuição para a literatura e para o desenvolvimento de novos biomateriais e avaliação de implantes dentários, como técnicas de instrumentação, superfícies de implantes e macrogeometrias de implantes dentários. Tais estudos apontam que pequenas amostras de osso contendo biomateriais ou implantes dentários são removidas com pequena margem de segurança (1-2 mm) (CALASANS-MAIA et. al., 2014; RESENDE et. al., 2013; SARTORETTO et al., 2015; SARTORETTO et al., 2016; SARTORETTO et al., 2020).

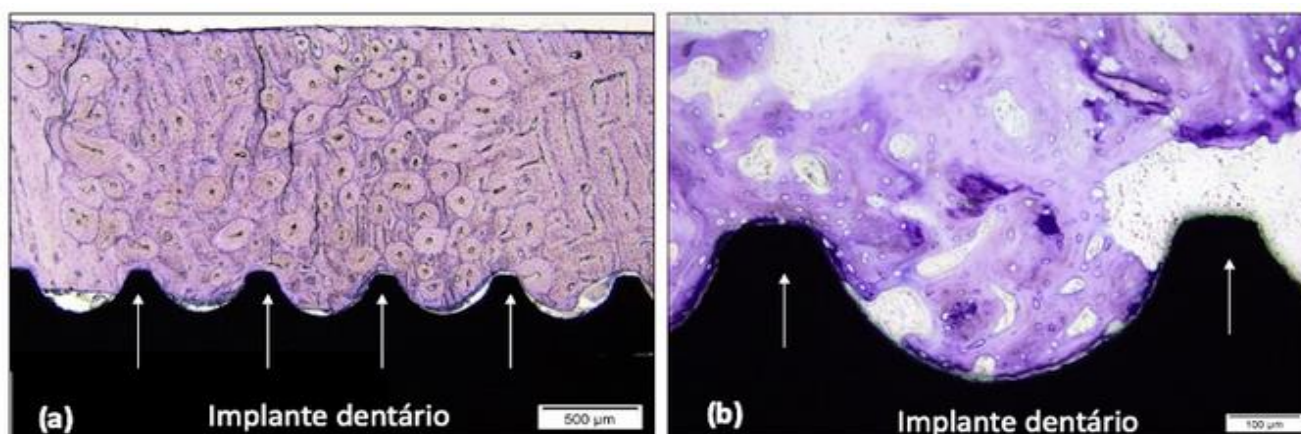
**Figura 9 - Fotomicrografias de seções finas coradas com azul de toluidina da cicatrização de implantes dentários de titânio (ID) instalados em tecido ósseo (TO) de tibia de ratos. Ampliação original 10X**



**Fonte:** Sartoretto et al. (2015).

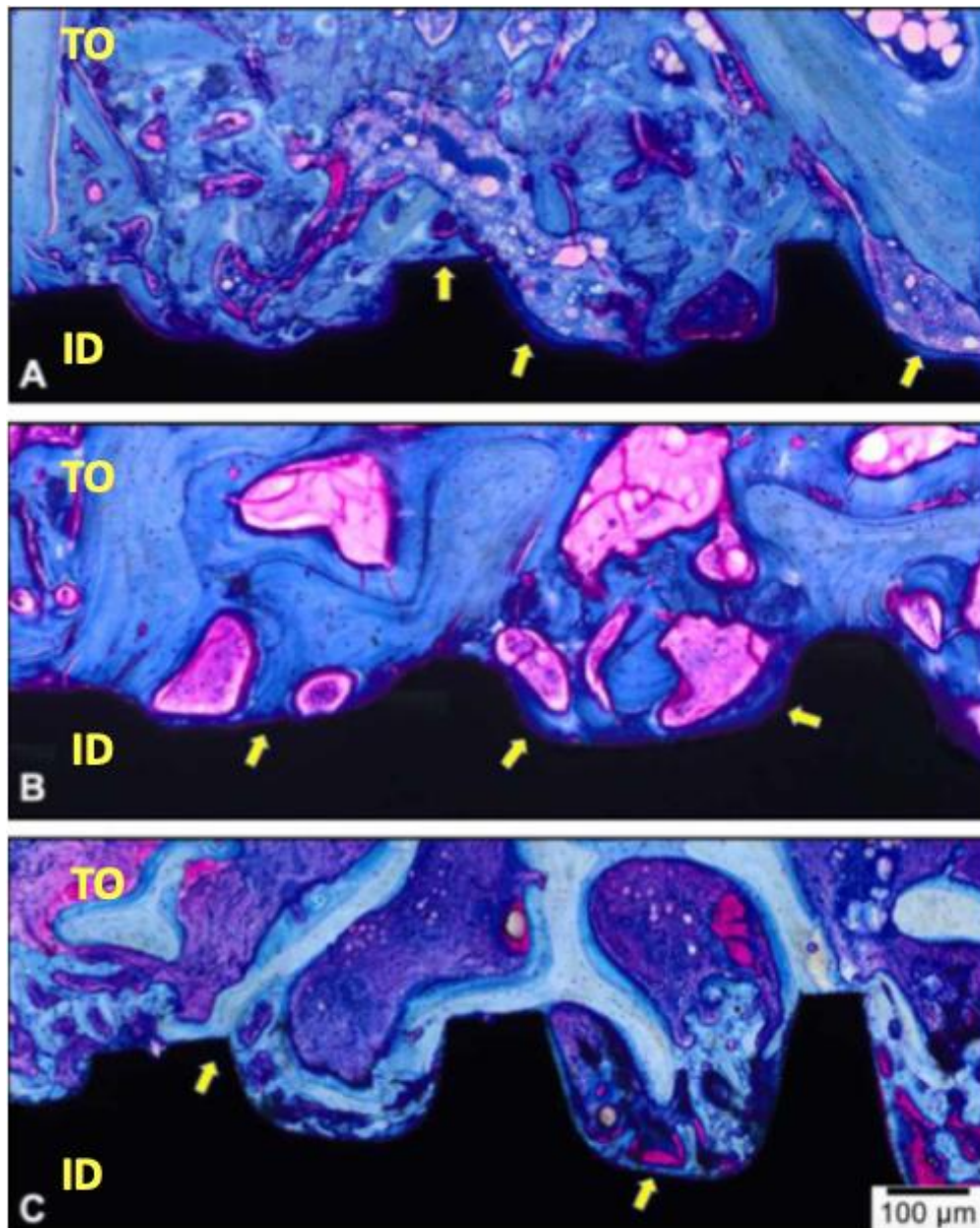
**Nota:** Observa-se a presença de neoformação óssea entre as roscas dos implantes dentários (setas brancas) e o contato do osso com os implantes em tíbias de coelho.

**Figura 10 - Fotomicrografias da cicatrização do tecido ósseo (TO) de tíbias de ovelhas após instalação de implantes dentários de titânio com diferentes superfícies de tratamento. Em (a), observe o padrão de trabeculado ósseo maduro e cortical (magnificação 4x). Em (b), observe as projeções de osso novo menos organizado entre as espiras do implante dentário (setas brancas) (magnificação 20x). Coloração de azul de toluidina**



**Fonte:** Os próprios autores. Laboratório Associado de Pesquisa Clínica em Odontologia (LPCO) da Universidade Federal Fluminense (UFF).

**Figura 11 - Fotomicrografias representativas da cicatrização do tecido ósseo (TO) após 28 dias da instalação de implantes dentários de titânio (ID) com diferentes superfícies de tratamento instalados em crista ilíaca de ovelhas**



**Fonte:** Sartoretto et al. (2020).

**Nota:** (A): HANANO<sup>®</sup> ; (B): SLActive<sup>®</sup> ; (C): TiUnite<sup>®</sup> . As setas amarelas sinalizam as regiões de contato osso-implante. Coloração: Azul de Toluidina e Fucsina Ácida. Ampliação: 20X. Barra de escala: 100µm.

## AGRADECIMENTO

Agradecemos ao Sr. Tim Milligan, Diretor de *Marketing* da EXAKT Technologies, pela concessão do uso das imagens provenientes do site da EXAKT ([exaktusa.com](http://exaktusa.com)) que agregaram um enorme valor a este capítulo.

## REFERÊNCIAS

CALASANS-MAIA, Monica *et al.* Short-term in vivo evaluation of zinc-containing calcium phosphate using a normalize procedure. **Materials Science and Engineering**, v. 41, p. 309-310, Aug. 2014.

DOMINGUEZ, Gladys Cristina *et al.* Como preparar secções histológicas de tecidos não descalcificados com implantes metálicos? Descrição de técnica modificada. **RPG Revista da Pós-Graduação da FOUSP**, v. 19, n. 2, p. 81-7, 2012. Disponível em: <http://revodonto.bvsalud.org/pdf/rpg/v19n2/a08v19n2.pdf>. Acesso em: 2 abr. 2021.

DONATH, Karl; BREUNER, G. A method for the study of undecalcified bones and teeth with attached soft tissues The Säge-Schliff (sawing and grinding) technique. **Journal of Oral Pathology Medicine**, v. 11, n. 4, p. 318-326, 1982. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1600-0714.1982.tb00172.x>. Acesso em: 2 abr. 2021.

EXAKT ADVANCED TECHNOLOGIES GMBH. **Cutting grinding thin section technology because precision matters**. Germany: EXAKT Advanced Technologies GmbH, [20--]. Disponível em: <https://www.histocom.ch/wp-content/uploads/2020/05/EXAKT-Katalog.pdf>. Acesso em: 20 jul. 2021.

EXAKT TECHNOLOGIES. **EXAKT 530**: block drying and post-infiltration: highlights. Oklahoma: Exakt Technologies, 2021a. Disponível em: <https://exaktusa.com/thin-section-products/thin-section-exakt-530/>. Acesso em: 20 jul. 2021.

EXAKT TECHNOLOGIES. **EXAKT 510**: dehydration and infiltration system: highlights. Oklahoma: Exakt Technologies, 2021b. Disponível em: <https://exaktusa.com/thin-section-products/thin-section-exakt-510/>. Acesso em: 20 jul. 2021.

EXAKT TECHNOLOGIES. **EXAKT 402**: light polymerization: highlights. Oklahoma: Exakt Technologies, 2021c. Disponível em: <https://exaktusa.com/thin-section-products/thin-section-exakt-402/>. Acesso em: 20 jul. 2021.

EXAKT TECHNOLOGIES. **EXAKT 520**: precision adhesive press: highlights. Oklahoma: Exakt Technologies, 2021d. Disponível em: <https://exaktusa.com/thin-section-products/thin-section-exakt-520/>. Acesso em: 22 jul. 2021.

EXAKT TECHNOLOGIES. **EXAKT 401**: vacuum adhesive press. Oklahoma: Exakt Technologies, 2021e. Disponível em: <https://exaktusa.com/thin-section-products/thin-section-exakt-401/>. Acesso em: 2021.

HOROBIN, R. W. How do histological stains work? *In*: BANCROFT, John; GAMBLE, Marylin. **Theory and practice of histological techniques**. 6th ed. [London]: Elsevier Health Sciences, 2008. p. 105-119.

RESENDE, Rodrigo F. B. *et al.* Long-term biocompatibility evaluation of 0,5% zinc containing hydroxyapatite in rabbits. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 24, p. 1455-1463, 2013.

SARTORETTO, Suelen C. *et al.* Hydrophilic surface of Ti6Al4V-ELI alloy improves the early bone apposition of sheep tibia. **Clinical Oral Implants Research**, v. 0, p. 1-9, 2016.

SARTORETTO, Suelen Cristina *et al.* Accelerated healing period with hydrophilic implant placed in sheep tibia. **Brazilian Dental Journal**, v. 28, n. 5, p. 559-565, 2017. Disponível em: <https://www.scielo.br/pdf/bdj/v28n5/1806-4760-bdj-28-05-559.pdf>. Acesso em: 2 abr. 2021.

SARTORETTO, Suelen Cristina *et al.* Early osseointegration driven by the surface chemistry and wettability of dental implants. **Journal of Applied Oral Science**, v. 23, n. 3, p. 279-287, May/June 2015. Disponível em: <https://www.scielo.br/pdf/jaos/v23n3/1678-7757-jaos-23-3-0279.pdf>. Acesso em: 2 abr. 2021.

SARTORETTO, Suelen Cristina *et al.* The influence of nanostructured hydroxyapatite surface in the early stages of osseointegration: a multiparameter animal study in low-density bone. **International Journal of Nanomedicine**, v. 15, p. 8803-8817, 2020. Disponível em: <https://www.dovepress.com/the-influence-of-nanostructured-hydroxyapatite-surface-in-the-early-st-peer-reviewed-article-IJN>. Acesso em: 2 abr. 2021.

YANG, Rosanna *et al.* Immunohistochemistry of matrix markers in Technovit 9100 new embedded undecalcified bone sections. **Europea Cells & Materials**, v. 6, p. 57-71, 2003. Disponível em: <https://www.ecmjournal.org/papers/vol006/pdf/v006a06.pdf>. Acesso em: 2 abril 2021.

## 19 CLARITY: IMAGEM 3D ATRAVÉS DO CLAREAMENTO E TRANSPARÊNCIA DE TECIDOS

Hellíada Vasconcelos Chaves  
Jacqueline Lopez Gross  
Barry John Sessle  
Limor Avivi-Arber

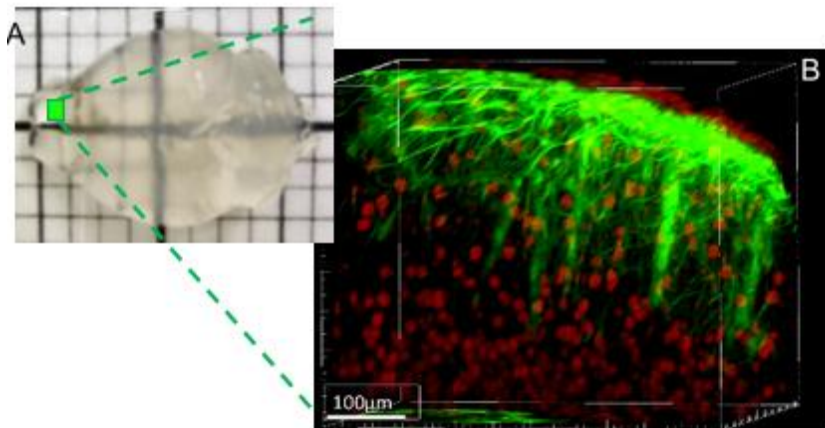
Este capítulo do livro descreve a técnica de clareamento de tecido denominada CLARITY, desenvolvida pelo Dr. Karl Deisseroth, da Universidade de Stanford (EUA) e, posteriormente, otimizada pelos Drs. Lopez Gross e Avivi-Arber para imunomarcacão e geraçã de imagens de neurônios e astrócitos no córtex sensorio-motor orofacial de rato. Enquanto as seções 1 a 4 e 7 trazem informações gerais sobre os métodos da técnica, bem como suas vantagens, desvantagens e indicações, as seções 5 e 6 fornecem informações mais específicas sobre a técnica CLARITY e o protocolo passo a passo para clareamento do tecido cerebral em ratos.



### O QUE SERÁ FEITO?

A técnica CLARITY promove clareamento de tecidos, caracterizando-se como um poderoso método capaz de tornar os tecidos biológicos opticamente transparentes. Junto com o uso de imunomarcacão ou fluorescência endógena e subsequente imagem tridimensional (3D) de biomarcadores, este método permite a visualização 3D de alta resolução das relações espaciais de diferentes elementos celulares no cérebro (por exemplo, neurônios, glia e vasos sanguíneos), proteínas - *Neuronal Nuclei* (NeuN), *Glial Fibrillary Acid Protein* (GFAP), biomoléculas (por exemplo, neurotransmissores) e ácidos nucleicos em seções finas ( $\mu\text{m}$ ), bem como espessas (mm - cm) ou em tecidos moles e duros totalmente preservados, órgãos ou até mesmo em um organismo inteiro. Além disso, ao utilizar rastreamento e detecção automatizados de células juntamente com testes estatísticos, a utilização de *softwares* na identificação de estruturas por imuno-histoquímica e/ou hibridização *in situ* realizadas em tecidos ou órgãos clareados pela técnica CLARITY permite a quantificação automática de características estruturais (arquitetônicas e morfológicas) de células e de redes de conexão que têm longas projeções anatômicas que vão desde alguns milímetros a centímetros (Figura 1) (BRENNAN et al., 2020; CHUNG et al., 2013; CHUNG; DEISSEROTH, 2013; GRADINARU et al., 2018; GUO; ZHENG; ZHANG, 2021; HUANG et al., 2019; LOPEZ GROSS, 2018; MUNTIFERING et al., 2018; TIAN; YANG; LI, 2021; TOMER et al., 2014; YANG et al., 2014; ZHANG, L. Y. et al., 2018).

**Figura 1 – Cérebro transparente clareado pela técnica CLARITY e estruturas neurais em 3D identificadas por imunofluorescência**



**Fonte:** (A) Autores. (B) Lopez Gross (2018).

**Nota:** (A) Tecido cerebral transparente. (B) Visão tridimensional do córtex somatossensorial de ratos, mostrando imunomarcagem para NeuN + núcleos de forma plana (vermelho), os limites da glia identificados como uma camada contínua de células GFAP + astrogliais (verde).

A maioria dos tecidos biológicos é translúcida, ou seja, não transparente, uma vez que são tecidos constituídos por células aquosas rodeadas por lípidos e proteínas que absorvem ou dispersam a luz que passa impedindo, assim, que a luz penetre profundamente no tecido. Quando a luz de todos os comprimentos de onda pode passar pelo tecido sem absorção ou dispersão, o tecido se torna transparente. Uma medida da quantidade de dispersão de luz é denominada "índice de refração" ou 'IR'. Os métodos de clareamento de tecidos podem eliminar e substituir a maioria dos elementos celulares que causam dispersão de luz no tecido. Esse tecido clareado tem um IR mais homogêneo que permite a penetração de luz profunda em todo o tecido, e esta característica o torna opticamente transparente.

O método de clareamento de tecidos e foco deste capítulo é denominado CLARITY. Este método foi desenvolvido por Karl Deisseroth da Stanford University (EUA), e significa *Clear Lipid-exchanged Acrylamide-hybridized Rigid Imaging-compatible Tissue-hydrogel*. CLARITY pode ser realizada através da utilização de eletroforese, sendo denominada de *Electrophoresis for Tissue-Clearing* (ETC), definido também como CLARITY ativo, ou através de um processo de clareamento passivo conhecido como *PAssive Clearing Technique* (PACT) (ANDO et al., 2014; CHUNG et al., 2013; CHUNG; DEISSEROTH, 2013; COSTANTINI et al., 2015; GUO; ZHENG; ZHANG, 2021; HSUEH et al., 2017; JENSEN; BERG, 2016; TOMER et al., 2014; ZHENG; RINAMAN, 2016; CLARITY RESOURCE CENTER, 2020; CLARITY TECHNIQUES, 2021) (Ver Figuras 1 a 5 e Fotos 1 a 4).

No entanto, desde o desenvolvimento da técnica CLARITY, métodos adicionais de clareamento de tecidos vêm sendo desenvolvidos nos últimos anos, incluindo as técnicas **Clear**, **Unobstructed Brain/Body Imaging Cocktails ('CUBIC')**, **2,2'-ThioDiEthanol ('TDE')**, **Benzyl Alcohol: Benzyl Benzoate ('BABB')** (DODT et al., 2007; SCHWARZ et al., 2015; KLINGBERG et al., 2017; MASSELINK et al., 2019), **Ethyl Cinnamate ('ECi')** e **Dimensional Imaging of Solvent-Cleared Organs ('iDISCO')** (RENIER et al., 2014, 2016). Cada um desses métodos tem seus próprios reagentes, vantagens e desvantagens, conforme resumido no Quadro 1

**Quadro 1 - Comparação das diferentes técnicas de clareamento**

Métodos básicos	ETC	PACT	CUBIC	DISCO	TDE	BABB	ECi
Hidrofóbicos				<i>Organic solvents: Dehydration in methanol; Clearing in DCM/ methanol</i> <sup>1</sup> DCM <sup>2</sup> DBE		Solventes orgânicos: Desidratação em Metanol; Clareamento em solução BABB	Solventes orgânicos: Desidratação em etanol a pH 9 ou em 1-propanol; Clareamento em Ethil Cinamato
Hidrofílicos			√		√		
Hidrogel	√	√					
Transparência	Apropriada	Apropriada	Alta	Alta	Baixa	Alta	Baixa
Expansão/Encolhimento	Alta expansão	Alta expansão	Alta expansão	Alta, 50% encolhimento	Encolhimento	Alta, 50% encolhimento	Alta expansão
Aparência física	Gelatinosa	Gelatinosa				Firme	
Tempo de clareamento	Horas dias	Dias semanas	10-14 dias	2-3 dias	Horas, Cérebro (2 semanas)	2-3 dias	1-2 dias
Tempo de armazenamento	Longo	Longo	Curto	Curto		Longo	
Microscopia confocal	Não apropriado	Não apropriado				Excelente	Excelente
Microscopia <i>light-sheet</i>	Excelente	Excelente				Excelente	Excelente
Tempo de preservação de fluorescência endógena	Longa duração	Longa duração	Longa duração	Curta a longa duração	Longa duração	Curta duração	Curta duração
Compatibilidade de com plásticos	Compatível	Compatível				Incompatível	
Vantagens	Preservação macromolecular, RNA detectável, rápido, pode ser feito em estruturas maiores	Preservação macromolecular, RNA detectável, integridade da estrutura do tecido e informação molecular	Biossegurança	Rápido e simples	Biossegurança	Rápido e simples	Rápido e simples
Dano tecidual	Severo	Médio		Danos à integridade estrutural e traz artefatos às imagens finais		Danos à integridade estrutural e traz artefatos às imagens finais	Danos à integridade estrutural e traz artefatos às imagens finais
Perda de informação biológica	Muito	Pouco					
Custo e complexidade	Alto custo e complexo	Baixo custo e complexo			Baixo custo e simples		
Desvantagens	Dano tecidual,		Longa incubação	Toxicidade, reagentes da	Longa incubação	Toxicidade	Toxicidade



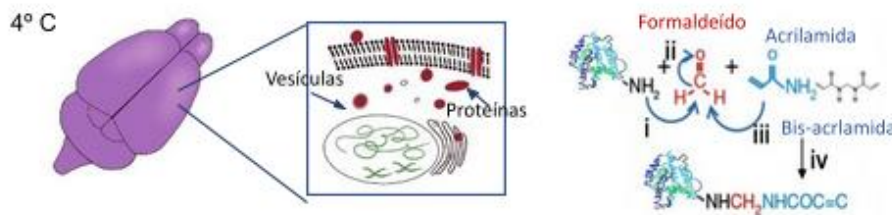
	capacidade de clarear um número limitado de cérebros de uma só vez (depende do número de sistemas de eletroforese disponível) e distorção do tecido cerebral	Velocidade lenta, o que o torna inadequado para clareamento de grandes volumes de tecido ou organismos inteiros		técnica 3DISCO extinguem sinais de fluorescência nas amostras dos tecidos			
Comentários		Tem sido usado para hibridização <i>in situ</i> e imuno-histoquímica com coloração e descoloração repetitivas		Pode clarear tecidos calcificados	Adequado para pequenos volumes, não indicado para órgãos inteiros	Pode clarear tecidos calcificados	Também pode ser usado para autofluorescência de tecidos. Pode clarear tecidos calcificados
Clareamento de órgãos e tecidos	Baço Cérebro Coração Fígado Medula espinhal Medula óssea Músculo esquelético Placenta de camundongo Tumor no cérebro	Baço Camundongo adulto Cérebro Coração Fígado Gânglio da raiz dorsal Medula espinhal Medula óssea Músculo esquelético Osso Placenta de camundongo Vasculatura	Baço Camundongo adulto Cérebro Coração Embrião de camundongo Fígado Intestino Linfonodo Medula espinhal Medula óssea Músculo esquelético Olhos Ovário Pele Pulmão Tumor no cérebro Vasculatura Zebrafish	Baço Camundongo adulto Cérebro Coração Embrião de camundongo Fígado Intestino Linfonodo Medula espinhal Medula óssea Músculo esquelético Olhos Osso Ovário Pele Pulmão Tumor no cérebro Vasculatura			

**Fonte:** Adaptado e modificado de Bernal et al. (2019); Feuchtinger; Walch e Dobosz (2016) e Muntifering et al. (2018).

**Nota:** DCM-Diclorometano; DBE-Dibenzileter; ETC-*Electrophoresis for Tissue-Clearing*; CLARITY ativa; PACT- CLARITY passive.

Uma vez que este capítulo tem como foco a técnica CLARITY, os passos descritos a seguir descrevem a metodologia CLARITY original, que é composta de várias etapas. O protocolo CLARITY pode ser encontrado nas seções 5 e 6.

### Etapa 1: Infusão-perfusão de monômero de hidrogel

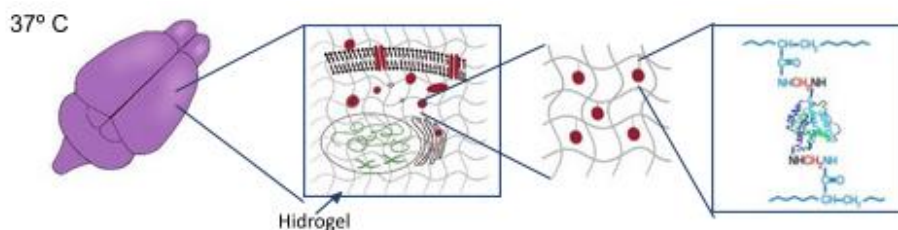


**Fonte:** Elaboração dos autores.

Nesta etapa, o animal é infundido-perfundido primeiro com uma solução salina isotônica e, em seguida, com uma solução de hidrogel. O tecido é então incubado a 4° C em uma solução de hidrogel por 1-7 dias, dependendo do volume do tecido. A baixa temperatura evita a polimerização do hidrogel e permite a difusão do monômero de hidrogel em camadas profundas do tecido.

Os objetivos da etapa 1 são: 1. eliminar moléculas de pigmento (por exemplo, hemoglobina sanguínea, mioglobina, melanina) que absorvem luz e, assim, limitam a penetração de luz no tecido e a emissão de fluorescência que retorna ao detector; e 2. Perfundir-infundir a solução de hidrogel em todo o tecido. O hidrogel é uma matriz porosa opticamente transparente composta por formaldeído (ii, vermelho), monômeros de hidrogel acrilamida e bis-acrilamida (iii, azul), bem como iniciadores térmicos. O formaldeído forma ligações cruzadas com o tecido e ligações covalentes (compartilhamento de elétrons) entre os monômeros de hidrogel e proteínas de tecido, ácidos nucleicos e outras biomoléculas (MIYAWAKI, 2020).

### Etapa 2: Incorporação e hibridização de hidrogel no tecido

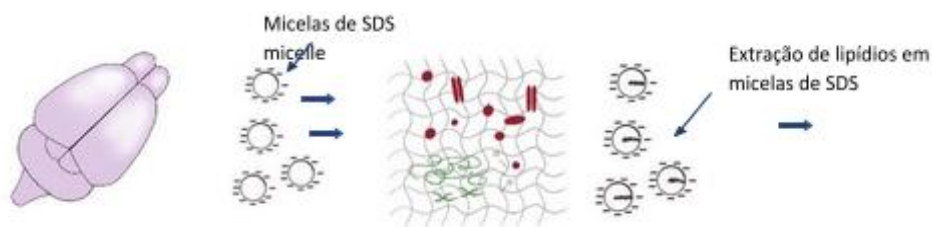


**Fonte:** Elaboração dos autores.

Nesta etapa, o tecido e o hidrogel são incubados a 45° C por 3-4 horas. Isso inicia a polimerização dos monômeros ligados ao tecido e à subsequente geração de um arcabouço híbrido de tecido-hidrogel solidificado, poroso, que liga proteínas de tecido, ácidos nucleicos e outras biomoléculas a esse arcabouço de hidrogel.

O objetivo desse arcabouço é preservar a estrutura do tecido, a citoarquitetura (por exemplo, de neurônios e glia) e a orientação espacial, imunogenicidade e antigenicidade das biomoléculas (por exemplo, proteínas e ácidos nucleicos) durante as etapas subsequentes de clareamento (MIYAWAKI, 2020).

### Etapa 3: Clareamento do tecido



**Fonte:** Elaboração dos autores.

As etapas de lavagem e incubação do tecido na solução de clareamento eliminam e substituem alguns dos elementos de dispersão de luz do tecido. Embora esta etapa possa ser realizada em temperatura ambiente, a incubação a 37° C ou temperaturas mais altas (<60° C) pode acelerar o clareamento do tecido. Uma vez que o clareamento do tecido esteja concluído, a solução salina tamponada com fosfato e tritonX (PBST) ou borato de fosfato triton (PBT) são usados para interromper o processo de clareamento através da remoção das micelas da solução. No entanto, deve-se ter cuidado, pois temperaturas mais altas e tempo de clareamento prolongado podem danificar as proteínas fluorescentes, reduzir antigenicidade do tecido, levando até à ruptura do tecido (KE; FUJIMOTO; IMAI, 2013; MUNTIFERING et al., 2018; TOMER et al., 2014; YU et al., 2017; ZHANG, L. Y. et al., 2018).

O objetivo da Etapa 3 é, portanto, remover os lipídios do tecido e assim tornar o tecido opticamente transparente, permitindo a penetração profunda da luz, bem como a penetração de macromoléculas (por exemplo, anticorpos e marcadores fluorescentes).

O clareamento do tecido pode ser realizado através de técnica passiva (PACT) ou ativa (ETC), que conta com o auxílio de uma corrente de eletroforese. Ambos os métodos utilizam a mesma solução de clareamento. O ETC utiliza câmaras de eletroforese, e o PACT utiliza um protocolo em que o tecido é incubado em um roteador colocado em um forno com temperatura controlada ou em uma incubadora (SPENCE et al., 2014; TOMER et al., 2014; YANG et al., 2014).

Em ambos os métodos, as micelas de detergente (dodecil sulfato de sódio, SDS) se difundem através do tecido para capturar e remover lipídios e moléculas que não se ligam ao hidrogel. No entanto, o tempo de clareamento é significativamente mais longo no PACT do que

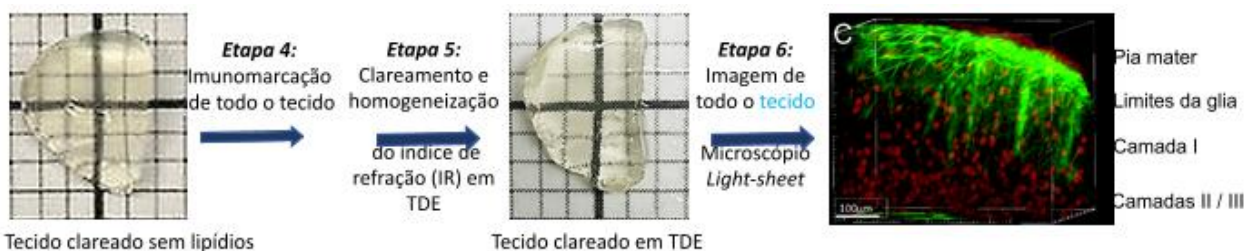
no ETC; por exemplo, dependendo da espessura do tecido, leva algumas semanas a alguns meses para clarear todo o cérebro de um camundongo através da técnica PACT, em comparação com alguns minutos a algumas horas através da técnica ETC. Por outro lado, o clareamento por ETC é relativamente complexo e, dependendo do número de câmaras de eletroforese disponível, ele pode clarear apenas um número limitado de cérebros de uma vez. Também existe o risco de distorção do tecido com a técnica ETC (TOMER et al., 2014; ZHENG; RINAMAN, 2016). Além disso, embora alguns estudos sugiram que não haja diferença significativa na concentração de proteína antes e depois do clareamento com ETC versus PACT (EPP et al., 2015), outros estudos sugerem que a imunomarcacão pode funcionar melhor em amostras que foram clareadas passivamente em contrapartida através da técnica ETC (CLARITY TECHNIQUES, 20-- (LOPEZ GROSS, 2018). É também digno de nota que, embora o clareamento do tecido esteja associado ao aumento de volume do tecido (Foto 3), a estrutura do tecido, a citoarquitetura, a orientacão espacial, a imunogenicidade e a antigenicidade de biomoléculas, como proteínas e ácidos nucleicos, são preservadas.

#### **Etapa 4: Imunomarcacão**

A imunomarcacão segue protocolos convencionais para microscopia de fluorescência (consulte a Seção 5). Uma vantagem da técnica CLARITY é que o hidrogel é poroso e pode facilitar a penetracão profunda de macromoléculas, incluindo anticorpos e marcadores fluorescentes. As seções 5 e 6 fornecem um exemplo de imunomarcacão de proteínas específicas para o citoesqueleto astrogliar e núcleos neuronais baseados no fato de que GFAP é um marcador específico do citoesqueleto astrogliar (Tabela 1) (BASTRUP; LARSEN, 2017; CHUNG et al., 2013; CHUNG; DEISSEROTH, 2013; COSTANTINI et al., 2015; DAHL; BIGNAMI, 1977; ENG; GHIRNIKAR; LEE, 2000; GARCÍA-CABEZAS et al., 2017; LOPEZ GROSS, 2018; SILVESTRI et al., 2016; TOMER et al., 2014; IMMUNOSTAINING, 2021), e a proteína NeuN é um marcador específico de núcleos neuronais conhecido como uma proteína Fox-3, que é expressa exclusivamente na maioria dos núcleos neuronais e desempenha um papel na regulacão da diferenciação de células neuronais (DUAN et al., 2016; KIM; ADELSTEIN; KAWAMOTO, 2009). NeuN é convencionalmente aplicado para distinguir células gliais de neurônios e também pode ser usado para auxiliar no delineamento da camada cortical 1 e camadas corticais mais profundas (GUSEL'NIKOVA; KORZHEVSKIY, 2015; LOPEZ GROSS, 2018; MULLEN; BUCK; SMITH, 1992; IMMUNOSTAINING, 2021).

Ambos os anticorpos primários GFAP e NeuN, usados no presente protocolo, são conjugados diretamente a um anticorpo secundário acoplado a um fluoróforo, eliminando, assim, a necessidade de incubar o anticorpo primário com um anticorpo secundário. Esta abordagem simplifica e encurta o processo de imunomarcção, uma vez que não há a etapa de incubação de anticorpo secundário nem etapas de lavagem. Os anticorpos conjugados também são menos onerosos. Além de GFAP e NeuN, 4', 6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) é usado. DAPI tem uma coloração azul-fluorescente com alta afinidade para DNA, e tem sido comumente usado como contracoloração nuclear.

**Figura 2 – Seção coronal do córtex sensório-motor clareado, e estruturas neurais identificadas por imunofluorescência**



**Fonte:** Lopez Gross (2018).

**Nota:** (A) Seção coronal do córtex sensório-motor sem os lipídios, removidos pelo clareamento. Uma vez que o tecido é clareado, ele pode seguir para imunomarcção (ou seja, Etapa 4), seguido por posteriores sessões de clareamento e homogeneização do IR com TDE (Etapa 5 e B), resultando em imagem 3D (Etapa 6 e C). (C) A imagem 3D mostra um tecido cortical de 1 mm de espessura evidenciando dentro da camada I: a pia-máter, composta por NeuN + núcleos de forma plana (vermelho), os limites da glia identificados como uma camada contínua de células GFAP + astrogliais de alta intensidade; a camada cortical I é caracterizada por uma rica rede de processos GFAP +, enquanto as camadas II / III mostram um número significativamente maior de núcleos NeuN + e células GFAP + esparsas.

### Etapa 5: Homogeneização do índice de refração (IR)

Os tecidos são imersos em uma solução para homogeneização do índice de refração, como as soluções *FocusClear*, glicerol ou solução de 2,2'-tiodietanol (TDE) por várias razões:

1. para aumentar ainda mais a transparência óptica do tecido, uma vez que, apesar do processo de clareamento, pode ainda haver dispersão de luz devido à distribuição heterogênea de proteínas e complexos de ácido nucleico;
2. um tecido cerebral transparente imerso em uma solução com mesmo IR que seu IR interno o fará parecer invisível;

3. combinar o IR interno do tecido clareado ao do meio de montagem do microscópio e à objetiva do microscópio aumentará ainda mais a profundidade de penetração da luz de excitação do microscópio durante a geração de imagens e fornecerá uma melhor qualidade de imagem (RICHARDSON; LICHTMAN, 2015). A incompatibilidade de IR pode resultar em erros ópticos (MANSUROV, 2019).

A objetiva do microscópio de fluorescência *light-sheet* Z1 (Carl Zeiss, Jena, Alemanha) tem um IR de 1,45, que é adequado para a imagem de tecido clareado em alta resolução. *FocusClear* é uma solução de imersão recomendada no protocolo CLARITY original e, em particular, para seções de tecido espesso, como o cérebro de um camundongo inteiro. *FocusClear* (RI ~ 1,45) tem sido evidenciado para fornecer a transparência óptica ideal e profundidade de imagem máxima (TOMER et al., 2014). No entanto, é uma solução extremamente cara. Outras soluções mais acessíveis com um RI de ~ 1,45, como glicerol 87%*m* (TOMER et al., 2014) e 63% 2,2'-thiodiethanol (TDE) (COSTANTINI et al., 2015; JENSEN; BERG, 2017) também podem ser usadas, mas apenas para cortes finos de tecido (<1-2 mm de espessura) ou para uma profundidade de imagem pequena (CLARITY TECHNIQUES, 20–). Vale ressaltar que, nesta fase, o tecido encolhe, e este encolhimento pode compensar a expansão do tecido induzida pelo clareamento (COSTANTINI et al., 2015; EPP et al., 2015).

### Etapa 6: Aquisição da imagem

Os tecidos clareados permitem a penetração da luz através de todo o tecido espesso e intacto. Esta luz excita células e moléculas marcadas com fluoróforos, cujos sinais podem ser capturados com uma câmera para produzir imagens 3D de grandes populações de biomoléculas e células com complexa citoarquitetura medindo de milímetros a centímetros, ou mesmo todo o órgão intacto (por exemplo, cérebro de camundongo). Esses dados podem ser posteriormente usados para análises qualitativas e quantitativas em neuroanatomia. No entanto, a obtenção de imagens de tecidos espessos tem sido associada a alguns desafios, incluindo a aquisição de uma enorme quantidade de dados de imagens 3D em alta resolução e alta velocidade.

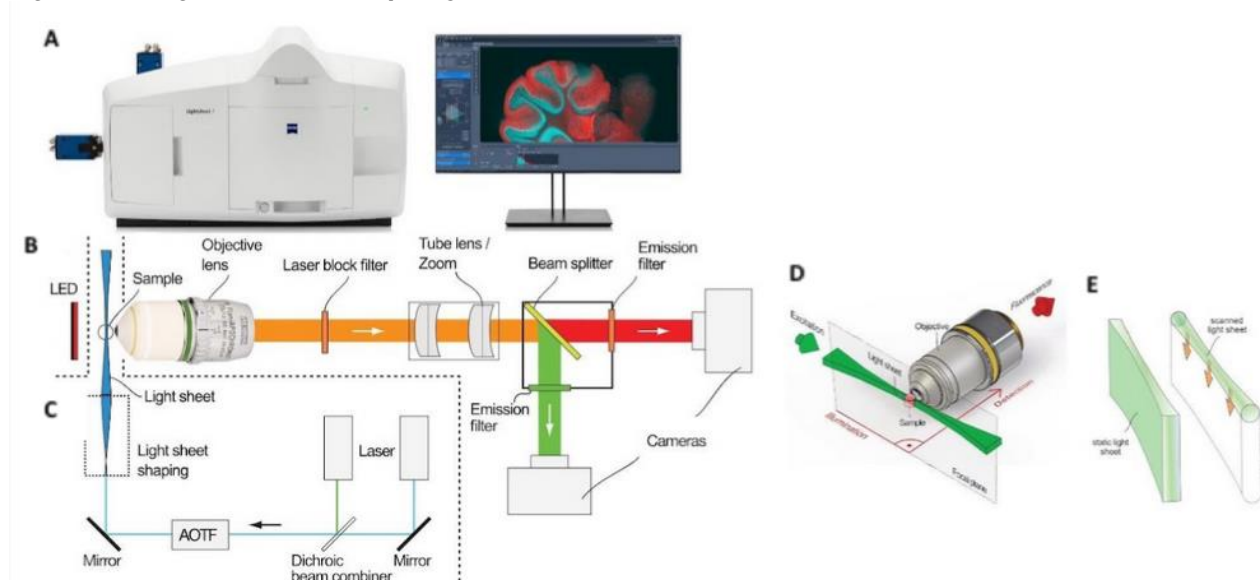
Os microscópios confocais convencionais e de dois fótons podem produzir imagens 3D de alta resolução, mas eles escaneiam volumes de amostra ponto a ponto, o que é um processo lento e, para grandes volumes, pode consumir muito tempo. Por exemplo, a aquisição de imagens de todo o cérebro de um camundongo pode levar vários dias. A aquisição por tempo prolongado das imagens pode ser muito onerosa e correr o risco de fotodegradação da amostra

(HANS-ULRICH et al., 2007; SHELSHOW; HUISKEN, 2013; STEFANIUK et al., 2016; TOMER et al., 2014).

Essas limitações foram parcialmente resolvidas com a introdução do microscópio de fluorescência *light-sheet* (LSFM) (Carl Zeiss, Jena, Alemanha) (Figura 3), que pode explorar melhor o potencial inerente ao tecido clareado. O microscópio *light-sheet* escaneia os volumes de amostra plano a plano com alta resolução espacial e temporal, resultando em imagens 3D rápidas de células e biomoléculas dentro de volumes de tecido espessos. Como a aquisição da imagem é rápida, os custos de digitalização são significativamente mais baixos, e a fotodegradação é mínima (GLASER et al., 2018; GRADINARU et al., 2018; GREENBAUM et al., 2017; SHELSHOW; HUISKEN, 2013; SILVESTRI et al., 2016; STEFANIUK et al., 2016; TOMER et al., 2014).

No entanto, imagens pelo microscópio *light-sheet* às vezes podem conter artefatos óticos que aparecem como listras escuras. Essas listras podem ser causadas pela atenuação da luz devido aos elementos do tecido que absorvem ou espalham a luz ao longo da iluminação e/ou dos caminhos de detecção. Vários estudos oferecem métodos para minimizar tais artefatos (BECKER et al., 2008; EPP et al., 2015; MAYER et al., 2018; MILLER; ROTHSTEIN, 2016; SALILI; HARRINGTON; DURIAN, 2018; SANTI, 2011; YANG et al., 2014).

**Figura 3 - Imagens de microscópio *light-sheet***



**Fonte:** Gentilmente cedida por Dr. Olaf Selchow.

**Nota:** (A-C) *Layout* de um microscópio de fluorescência *light-sheet* Z.1. As lentes objetivas e o caminho do feixe de detecção são perpendiculares ao caminho do feixe de iluminação. A luz laser é formada em uma fina folha de luz. Esta iluminação excita apenas elementos marcados com fluorescência dentro do plano focal da objetiva de detecção que ilumina elementos marcados com fluorescência dentro do tecido. A iluminação pode ser de um ou dois lados. Todos os sinais fluorescentes são coletados em um detector baseado em câmera. (D-E) A folha de luz é gerada estaticamente usando uma lente cilíndrica ou dinamicamente por varredura de alta frequência de um feixe de laser.

## Etapa 7: Análise da imagem

O gerenciamento do enorme conjunto de dados e a capacidade de identificar, analisar e quantificar automaticamente esses conjuntos de dados que não podem ser feitos manualmente têm sido outro grande desafio com imagens de tecidos espessos em alta resolução. Isso requer grandes unidades externas de armazenamento e até mesmo infraestruturas em nuvem (por exemplo, Amazon S3) ou servidores privados para armazenamento e compartilhamento de dados. Eles também exigem computadores de alto desempenho (DEISSSSEROTH, 2016).

Novos *softwares* 3D, como Imaris<sup>4</sup> ou Arivis<sup>5</sup>, podem identificar automaticamente biomoléculas e células com autofluorescência ou imunofluorescência (por exemplo, neurônios, microglia, astroglia) e suas redes de projeção de longo alcance (mm-cm). Eles podem então quantificar automaticamente o número e o volume de moléculas e de células e seus arranjos anatômicos espaciais. Eles também podem fornecer informações sobre conexões, padrões de ramificação, largura e comprimentos de dendritos, área de superfície e volumes através de diferentes camadas ou regiões de um tecido espesso. No entanto, o longo tempo de processamento de dados pode durar horas e requerer computadores de alto desempenho e alta tecnologia, e grandes quantidades de espaço de armazenamento na forma de um servidor pessoal ou infraestruturas em nuvem para armazenamento e compartilhamento de dados (DODT et al., 2007; GRADINARU et al., 2018; SILVESTRI et al., 2016; STEFANIUK et al., 2016, 2021; TOMER et al., 2014). Para obter mais detalhes sobre o microscópio *light-sheet*, consulte as seções 5 e 6.



### POR QUE SERÁ FEITO?

Técnicas de imuno-histoquímica convencionais, juntamente com métodos de imagem de fluorescência, têm sido usadas há décadas para a visualização de alta resolução de células e biomoléculas em seções finas (até 100  $\mu\text{m}$ ) de tecidos moles e duros (LIN; PRICHARD, 2015).

<sup>4</sup> OXFORD INSTRUMENTS. **Imaris**. [S.l.]: Oxford Instruments, 2021. Disponível em: <https://imaris.oxinst.com/>. Acesso em: 8 out. 2021.

<sup>5</sup> ARIVIS AG. **Imaging platform solution**. Germany: Arivis AG, 2021. Disponível em: <https://www.arivis.com/>. Acesso em: 8 out. 2021.



No entanto, esses métodos têm várias desvantagens:

1. exigem muito trabalho;
2. exigem o corte de seções de microns de espessura;
3. têm a característica de que, apesar das seções consecutivas de cortes histológicos, apenas um certo número de seções pode ser incluído na imunomarcagem;
4. têm um limite no número de marcadores de proteína, uma vez que a imunocoloração de mais de 2-3 marcadores de proteínas requer a imunomarcagem de outras seções histológicas para diferentes marcadores;
5. permitem apenas imagens e análises 2D de alta resolução de células e moléculas em uma região de interesse relativamente pequena dentro das seções de tecido fino. Consequentemente, uma grande quantidade de dados é perdida em métodos convencionais, sendo também impossível obter imagens 3D de complexas moléculas biológicas, células e redes, como as de projeções de células neuronais e gliais que se estendem por alguns milímetros ou mesmo centímetros dentro de um tecido cerebral inteiro;
6. embora incluam métodos que utilizam todas as seções de tecido para reconstrução 3D, eles são relativamente de alto custo e envolvem uma análise complexa de várias imagens de seções finas; algumas das quais muitas vezes são perdidas durante o processamento ou excluídas devido à distorção, ao dobramento, à compressão, ao alongamento ou rasgo (GLEAVE et al., 2013; PICHAT et al., 2018). Por essas várias razões, eles são geralmente limitados a volumes muito pequenos (microns) de tecidos.

Desde o século XVIII, os cientistas têm procurado novos métodos para superar as limitações dos métodos de imagem convencionais e permitir a imagem 3D de seções espessas de tecido ou de um tecido totalmente preservado, órgão ou até mesmo um organismo inteiro. No entanto, duas limitações principais da imunomarcagem e da imagem de tecidos espessos são:

1. a penetração limitada de macromoléculas, como marcadores fluorescentes nas camadas profundas, e
2. a falta de transparência do tecido. Werner Spalteholz, em 1914, foi um dos primeiros cientistas a desenvolver um método que tornou todo o tecido do coração humano opticamente transparente (YANG et al., 2014). No entanto, ao longo da última década ou mais, houve um rápido avanço nesses métodos que tornam os tecidos moles opticamente transparentes, junto com um rápido desenvolvimento de microscópios sofisticados e *softwares* que podem adquirir

e analisar automaticamente uma grande quantidade de dados coletados em 3D como imagens de tecidos espessos intactos (ver seções 1 e 5).

Os métodos de clareamento têm várias vantagens.

1. eliminam a necessidade de seccionar tecidos;
2. eliminam a necessidade de montar tecidos seccionados em lâminas;
3. permitem que as amostras de tecido clareadas sejam armazenadas por meses em uma solução salina;
4. facilitam a penetração profunda de macromoléculas, como marcadores fluorescentes;
5. também permitem a detecção de várias biomoléculas e biomarcadores dentro do tecido.

Uma vez que a imunomarcação é geralmente limitada a quatro biomarcadores de cada vez, e uma vez que o tecido clareado não é montado em lâminas, o tecido clareado pode ser facilmente submetido a várias rodadas de remoção de anticorpos e assim realizados imunoenaios com diferentes fluoróforos que absorvem e emitem luz em diferentes espectros de luz visível. Isso permite a múltipla imunomarcação, além dos limites de separação espectral e subsequente detecção de múltiplas biomoléculas e biomarcadores dentro do mesmo tecido (Figura 2) (MILLER; ROTHSTEIN, 2016; TOMER et al., 2014).

Dessa forma, os métodos de clareamento que têm a capacidade de ver através do tecido e de criar imagens de todo um tecido espesso ganharam popularidade significativa para a visualização 3D de alta resolução, não apenas de células únicas inteiras e biomoléculas dentro de um tecido intacto inteiro, mas também de padrões de projeção e relações espaciais de células e redes, como vias neurais, redes neurais e gliais e vasculatura, bem como distribuição global de proteínas, biomoléculas e seus conjuntos em órgãos inteiros ou em todo um organismo. Por exemplo, esses métodos podem ser usados para a visualização 3D de completos padrões de projeção de axônios neuronais e a distribuição de conexões sinápticas dentro de um cérebro inteiro, uma maxila inteira ou um corpo inteiro (Figuras 1 e 2) (CHUNG; DEISSEROTH, 2013; EPP et al., 2015; YANG et al., 2014).



## ONDE SERÁ FEITO?

Embora este capítulo se concentre no clareamento e na imagem de um tecido cerebral de mm de espessura em ratos, geralmente os métodos de clareamento podem ser aplicados a diferentes tipos de tecido (por exemplo, conectivo, epitelial, muscular, ósseo, dentes e tecidos nervosos) dentro de diferentes tecidos internos (como cérebro, coração, pâncreas, pulmão, baço, intestino, fígado, testículos, folículos ovarianos, rins e glândula adrenal) e órgãos externos (por exemplo, braços, pernas, mandíbulas, dentes) de vertebrados (por exemplo, roedores, primatas não humanos e humanos) e invertebrados (por exemplo, peixe-zebra, drosófila e mosca da fruta) (EPP et al., 2015; FENG et al., 2017; GREENBAUM et al., 2017; GUO; ZHENG; ZHANG, 2021; HONG et al., 2019; HU et al., 2017; LEE et al., 2014; MARTÍNEZ-LORENZANA et al., 2021; NECKEL et al., 2016; PHILLIPS et al., 2016; ROBERTS et al., 2016; SPENCE et al., 2014; TIAN; YANG; LI, 2021; ZHANG, 2014, 2018a, 2018b, ). Desse modo, diferentes métodos foram testados em diferentes tipos de tecido (Quadro 1).

Como observado acima, os métodos de clareamento podem ser aplicados a tecidos de diferentes espessuras que variam de microns a um órgão inteiro ou mesmo a um animal inteiro. Além disso, esses métodos têm sido utilizados não apenas em tecidos obtidos de indivíduos saudáveis, mas também em tecidos obtidos de indivíduos doentes, incluindo animais com diferentes condições médicas, como câncer, doença de Parkinson e doença de Alzheimer (CHEN et al., 2019; CORA et al., 2019; CRONAN et al., 2015; DAI et al., 2020; FANOUS et al., 2020; FENG et al., 2017; GULDNER; ZHANG, 2015; HANS-ULRICH et al., 2007; LIU et al., 2016; MARTÍNEZ-LORENZANA et al., 2021; MILLER; ROTHSTEIN, 2016; MUNTIFERING et al., 2018; PARRA-DAMAS; SAURA, 2020; ROBERTS et al., 2016; SINDHWANI et al., 2016; SPENCE et al., 2014; TYSON; AKHTAR; ANDREAE, 2019; UEDA et al., 2020; VIGOUROUX; BELLE; CHÉDOTAL, 2017; WEBER et al., 2019; ZHANG et al., 2018b).



## QUANDO SERÁ FEITO?

Métodos convencionais de imuno-histoquímica, juntamente com técnicas de imagem confocal, permaneceram um padrão-ouro para visualização 2D de alta resolução de biomarcadores em seções finas (até 100  $\mu\text{m}$ ) de tecidos moles e duros. Isso se deve principalmente à sua disponibilidade, à relativa simplicidade e aos custos acessíveis. No entanto,

mesmo a glândula pineal, o menor órgão do corpo dos mamíferos, tem um diâmetro de ~ 7.000  $\mu\text{m}$  em humanos e de ~ 2.500  $\mu\text{m}$  em camundongos. Além disso, muitas células em mamíferos são maiores do que 100  $\mu\text{m}$ , e algumas redes celulares e conjuntos de proteínas podem abranger vários milímetros. Por exemplo, o diâmetro de um soma neuronal cortical em humanos varia entre ~ 4  $\mu\text{m}$  nos neurônios menores e mais de 100  $\mu\text{m}$  nos neurônios maiores; o comprimento das árvores dendríticas das células piramidais varia entre 1000 - 7000  $\mu\text{m}$  e a sua largura é de 100 - 300  $\mu\text{m}$ ; e os axônios corticais intra-hemisféricos em humanos podem se estender ~ 40.000  $\mu\text{m}$  (ou seja, 40 mm). Além disso, os axônios dos neurônios piramidais podem se estender desde o córtex motor até o tronco cerebral ou a medula espinhal (ou seja, mais de 1.000.000.000  $\mu\text{m}$  em humanos). Mesmo em camundongos, os axônios dos neurônios intra-hemisféricos podem se estender ~ 3.000  $\mu\text{m}$  lateral e 12.000  $\mu\text{m}$  verticalmente (ASANUMA; PRESS, 1989; BRAITENBERG; SCHÜZ, 2013; GAREY, 1999; JIANG et al., 2020; KANDEL et al., 2012). Portanto, os métodos de clareamento tornaram-se uma ferramenta necessária para a imagem 3D de estruturas e funções de estruturas intactas espessas ou inteiras, evitando, assim, a perda de informações inerentes ao corte de tecido com métodos convencionais.

Conforme discutido na seção 1 sobre "O quê", vários métodos estão disponíveis para a clareamento de tecidos. Cada método tem suas vantagens e desvantagens (ver Quadro 1) que devem ser consideradas ao selecionar o método apropriado. Conforme discutido na seção 3 em 'Onde' e na seção 7 em 'Quanto', esses métodos de clareamento têm sido extensivamente usados na pesquisa biomédica para explorar biomarcadores e mecanismos biológicos envolvidos na saúde, na evolução de doenças e no desenvolvimento de terapias.



## POR QUEM/COM O QUE SERÁ FEITO?

Esta seção foi adaptada do protocolo CLARITY original e descreve os diferentes reagentes, soluções, ferramentas e equipamentos usados para perfusão, clareamento, imunomarcção, imagem e análise de células e biomoléculas em um tecido cerebral de rato. Os Quadros 2 a 4 e a Tabela 1 listam o arsenal/armamentário, reagentes e soluções necessários para a preparação de tecidos, clareamento, imunomarcção e imagem. As soluções podem ser preparadas com antecedência, exceto a solução de hidrogel, que deve ser preparada imediatamente antes da perfusão. Observe que a Seção 1, "O que", a qual descreve as funções da solução de clareamento, e a seção 6, "Como", que descreve o protocolo passo a passo.

**Quadro 2 - Armamentário para preparação de tecidos**

Armamentário	Uso
Bomba peristáltica de perfusão	Perfusão transcardíaca do animal usando soro fisiológico e solução de hidrogel
Refrigerador 4° C	Armazenamento de soluções de perfusão-infusão
Beker 2 L	Mistura de soluções
Cilindros graduados 1, 10, 25, 100, 250 mL	Medida das soluções
Suporte, espátula	Pesagem dos pós
Agitador magnético (2)	Mistura adequada das soluções preparadas

**Fonte:** Elaboração dos autores.

**Quadro 3 - Armamentário para clareamento de tecidos**


Armamentário	Uso
Vibratom	Seccionar tecidos
Refrigerador 4° C	Armazenamento de solução de clareamento
Incubator 37-55° C	Incubação do tecido durante a polimerização de hidrogel e clareamento de tecido para agilizar o processo clareamento
Recipientes de garrafão 5-10 L	Armazenamento de soluções de clareamento e de lavagem
Becker 2 L	Mistura de soluções
2 x 5 L beakers	Mistura de soluções
25, 100, 250 & 1000 ml graduated cylinders	Mistura de soluções
Papel, espátula	Pesagem dos pós
Agitador magnético (2)	Mistura adequada das soluções preparadas; Aquecimento para dissolver Triton
pHmetro	Determinar o pH da solução de ácido bórico e da solução de clareamento durante a preparação e durante a limpeza
Agitadores	Agitador de tecido nas soluções de clareamento e lavagem
Tanque de nitrogênio ou gás CO	Substituição de oxigênio durante a degaseificação
Bomba de vácuo	Degaseificação do oxigênio do recipiente antes da polimerização do hidrogel
Canister de dessecação com duas saídas	Conexão de gás / vácuo
Cartucho de dessecação	Cartucho para vasilha para conter amostras
Refractômetro	Verificar se o índice de refração do meio de montagem corresponde ao índice de refração da objetiva do <i>light-sheet</i> (ou seja, 1,45)

**Fonte:** Elaboração dos autores.

**Quadro 4 - Soluções e reagentes para clareamento de tecidos**

Solução/ Quantidade por rato/ Uso	Ingredientes (todas as soluções e seus ingredientes líquidos são armazenados a 4°C)	Empresa
<b>Solução de PBS</b> - 200 mL por rato Infusão-perfusão e despigmentação	1X PBS – 200 mL	Life Technologies
<b>Solução de Hidrogel</b> - 250 mL por rato - 200 mL perfusão - 50 mL armazenamento/fixação Fixação de tecido e formação da malha de tecido em hidrogel	Água deionizada – 131.25 mL 40% Acrilamida - 25 mL 2% Bis-Acrilamida (2% v/v) – 6.25 mL 16% Paraformaldeído – 62.5 mL VA-044 Iniciador – 0.625 g 10X PBS - 25 mL	Bio-Rad EM Sciences WAKO BioShop
<b>Solução de clareamento</b> - 10 L Remove lipídio do tecido	Ácido bórico – 12.366 g Água deionizada – 200 mL Hidróxido de sódio (NaOH) - Ajustar pH para 8,5 Dodecilsulfato de sódio (SDS) × - 4% w/v – 40 mg Água deionizada – até 1 L	BioShop BioShop Invitrogen
<b>Solução de PBST</b> PBS + Triton 1. Lavagem e remoção das micelas na solução de clareamento 1 L 2. Armazenamento dos tecidos (com Azida) - 50 mL por cérebro	PBS 1X - 50 mL Triton-X 100 0.1% v/v – 0,05mL Azida sódica - 0.1% w/v – 0,05 gr	Life Technologies BioShop Sigma
<b>Solução de BBT</b> Tampão borato + Triton X-100 - 1 L Diferente do PBST pode reduzir a coloração de fundo	Ácido bórico – 12,5g × Água deionizada - 1L Hidróxido de sódio (NaOH) - Ajustar pH para 8,5 Triton-X 100 0,1% - 1 mL Azida sódica 0,1% w/v - 1 g	BioShop BioShop BioShop Sigma
<b>Óleo mineral</b> Evita o contato do oxigênio com a solução de hidrogel, o que pode impedir a polimerização do monômero - 500 mL	Óleo mineral <i>Light Hi-Pu Grade WT</i>	VWR
<b>30% 2,2'-Thiodiethanol (TDE) ×</b> ou tiodetanol? - 100 mL (para 4 cérebros) <b>63% TDE ×</b> - 100 mL (para 4 cérebros) Homogeneização do pindice de refração e clareamento	100% TDE – 30 mL PBS 1X – 70 mL 100% TDE – 63 mL PBS 1X 37mL	Sigma Life Technologies Sigma Life Technologies

**Fonte:** Lopez Gross (2018).

**Nota:**  A formalina e a acrilamida são produtos químicos tóxicos e irritantes. **×** Dodecilsulfato de sódio (SDS), ácido bórico e TDE são produtos químicos irritantes, e a solução de hidrogel é tóxica. Portanto, todas as etapas experimentais que utilizam esses produtos químicos devem ser realizadas em uma capela com equipamento de proteção individual adequado (ou seja, luvas, jaleco, óculos de segurança, máscara facial e sapatos fechados).

**Tabela 1 - Anticorpos para imunomarcação**

Anticorpo	Alvo	Empresa	Nº catálogo	Excitação de comprimento de onda (nm)	Emissão de comprimento de onda (nm)	Concentração/ 500 µL PBST
GFAP Alexa Fluor® 488 Conjugate	Filamentos astrogliais	Sigma	MAB3402X	493 (Verde)	519 (Green)	1:70 7,1 µL
NeuN clone A60 Alexa Fluor® 555 Conjugate	Núcleo neuronal	Sigma	MAB377A5	555 (Vermelho)	565 (Vermelho)	1:70 7,1 µL
DAPI Dicloridrato de 4,6-diamidino-2- fenilindol	Núcleo de todas as células	AAT Bioquest	17510 (AAT)	356 (Azul)	461 (Azul)	1:70 7,1 µL

**Fonte:** Lopez Gross (2018).

**Nota<sup>1</sup>:** 1X PBS para Perfusão

**Nota<sup>2</sup>:** 1X PBS pode ser adquirido como uma solução pronta preparada ou a partir de 10X PBS diluindo 1 porção de solução 1X PBS (por exemplo, 100 mL) com 9 porções (isto é, 900 mL) de água destilada. A solução de PBS usada para perfusão animal é armazenada a 4° C (ou seja, em uma geladeira ou em um recipiente com gelo na capela). O PBS para soluções de clareamento pode ser armazenado em temperatura ambiente.

### Preparação da solução de hidrogel

A solução de hidrogel deve ser preparada na hora e imediatamente antes da perfusão para evitar sua polimerização. Todos os ingredientes da solução de hidrogel (ver Quadro 4) são armazenados a 4° C; são retirados da geladeira um por vez durante a preparação da solução e devolvidos à geladeira imediatamente após o uso. A solução é preparada em um béquer dentro de um recipiente cheio de gelo que, por sua vez, é posicionado em um agitador magnético.

### Preparação da solução de PBST

Para preparar PBST, adiciona-se 1 mL (0,1%) de Triton X-100 a 999 mL de solução 1X PBS e mistura-se em um agitador por pelo menos ½ hora. Para armazenamento prolongado de tecido cerebral, adiciona-se 1g de azida de sódio e armazene a 4° C. Transfere-se a solução para um frasco marcado com o nome da solução, data de preparação e data de validade. Armazenar em temperatura ambiente.

### **Observações:**

1. Triton é uma solução viscosa e, portanto, leva tempo para encher a pipeta Eppendorf com Triton.
2. É melhor preparar solução de PBST fresca e não armazenar por mais de 2 semanas em temperatura ambiente; pode ser armazenado por um pouco mais tempo a 4° C.

### **Preparação da solução de clareamento**

Uma grande quantidade de solução de clareamento é usada para clarear o tecido e, portanto, é razoável preparar um grande volume de solução. O Quadro 4 fornece as quantidades para um volume total de 10L de solução de clareamento. Se preparar quantidades menores, as quantidades devem ser ajustadas de acordo com os volumes desejados.

É melhor preparar primeiro a solução SDS, porque pode demorar alguns minutos para que o SDS se dissolva. Durante este tempo, a solução de ácido bórico é preparada. Enche-se um recipiente de 5L com 3L de água desionizada e 200 g de SDS e continua-se mexendo com um agitador magnético na capela. Observe que a adição de SDS aumenta o volume da solução em cerca de 25%.

Em um béquer de 2L, coloca-se 61,83 g de ácido bórico em um volume de água desionizada 1L e agita-se em um agitador. Utiliza-se um medidor de pH e lentamente adiciona-se (1-2 mL de cada vez) NaOH para ajustar o pH a 8,5 (total aproximado de 20-30 mL de NaOH para 1L de solução). Observe que a adição de ácido bórico também aumenta o volume da solução. Quando o pH 8,5 for alcançado, transfere-se a solução para um recipiente de 5 L com solução SDS e adiciona-se água desionizada até 5L; mistura-se e armazena-se em temperatura ambiente. Rotule o recipiente com o nome, conteúdo e data da solução.

### **Preparação dos anticorpos conjugados**

Os anticorpos vêm em pequenos frascos e podem ser armazenados a -20° C por alguns meses ou a 4° C por apenas algumas semanas, ou mesmo a 4° C por maior tempo, dependendo do fabricante. Não é recomendado descongelar e congelar os anticorpos várias vezes. Para os anticorpos que precisam ser armazenados a -20° C, portanto, a prática recomendada é centrifugar cada frasco de anticorpo na chegada para garantir que todo o material seja puxado para o fundo do frasco e, em seguida, alíquotar pequenas quantidades (por



exemplo, 5  $\mu$ L) em pequenos frascos e armazenar a  $-20^{\circ}$  C até o dia do experimento de imunohistoquímica.

No dia do experimento de imunohistoquímica, diluem-se os anticorpos com PBST para a concentração desejada (por exemplo, 1: 100, 1:70, 1:50). Por exemplo, de acordo com a Tabela 5, para cada amostra de cérebro, para uma concentração de 1:70 de anticorpos diluídos, misturam-se 7,1  $\mu$ L de anti-GFAP conjugado com Alexa Fluor® 488, 7,1  $\mu$ L de anti-NeuN conjugado com Alexa Fluor® 555, 7,1  $\mu$ L de DAPI e 487,7  $\mu$ L de PBST para um total de 500  $\mu$ L (0,5 mL). Cobre-se o frasco firmemente com folha de alumínio para proteger os anticorpos de fluorescência da luz e evitar o desbotamento (fotobranqueamento) dos fluoróforos. Centrifuga-se o frasco, e o armazena a  $4^{\circ}$  C.

### Preparação da solução de imersão em TDE

Deve-se preparar soluções frescas de 30% e 63% (vol / vol) TDE em 1X PBS (TDE / PBS). Adicionam-se 30 mL (para solução de 30%) ou 63 mL (para solução de 63%) a 70 mL ou 37 mL de solução PBS 1X, respectivamente. Mexe-se bem. Verifica-se o pH e certifica-se de que está a 7,5 ou use HCl ou NaOH para ajustar o pH, conforme apropriado. Verifica-se o IR da solução de imersão de 63% TDE, e certifica-se de que corresponde ao da objetiva de imagem do *light-sheet* (ou seja, 1,33 – 1,58). Coloca-se uma gota da solução sobre a janela de vidro do refratômetro (Foto 1). O IR aparecerá na tela digital.

Foto 1 – Imagens de refratômetro e objetiva de microscópio *light-sheet*



Fonte: Lopez Gross (2018).

**Nota:** Refratômetro (A) é usado para garantir que o IR da solução de imersão TDE corresponda ao da objetiva de detecção usada para a aquisição de imagem, como a objetiva de detecção CLARITY 20x *light-sheet* (B) que tem um IR = 1,45. A objetiva tem um colar de ajuste de RI (seta) que permite pequenos ( $\pm$  0,03) ajustes de IR.

#### Quadro 5 - Armamentário e materiais para microscopia *light-sheet* de tecido transparente

Microscópio de fluorescência <i>light-sheet</i> para imagens 3D de tecido transparente espesso
Luvas
Papel KimTech
Espátula em forma de colher
Bisturi
Pinça
Cola super forte
Amostra de tecido clareada armazenada em uma solução de índice de refração
Refractômetro
Seringa de 30 mL preenchida com 30 mL de meio de imagem TDE 63% (ver Tabela 1) e anexada a um tubo transparente que é anexado ao microscópio <i>light-sheet</i>
Câmara Clarity 20X com janelas de vidro limpas

**Fonte:** Elaboração dos autores.



### COMO SERÁ FEITO?

Esta seção descreve os protocolos passo a passo para preparar e clarear tecidos cerebrais de ratos com 2 mm de espessura por meio do método CLARITY original e para a subsequente marcação imunológica e imagem de núcleos neuronais e corpos e processos celulares astrogliais. Todos os procedimentos descritos nesta seção foram adaptados do Protocolo CLARITY desenvolvido pelo Laboratório de Karl Deisseroth na Universidade de Stanford (EUA) (DEISSSSEROTH, 2016; HSUEH et al., 2017) (CLARITY TECHNIQUES, 20--). Como descrito por Lopes Gross Thesis (LOPEZ GROSS, 2018), algumas modificações foram introduzidas para otimizar o clareamento do tecido e a imunomarcação de células astrogliais e de neurônios dentro do córtex motor primário orofacial de rato.

#### Etapa 1: Infusão-perfusão de monômero de hidrogel

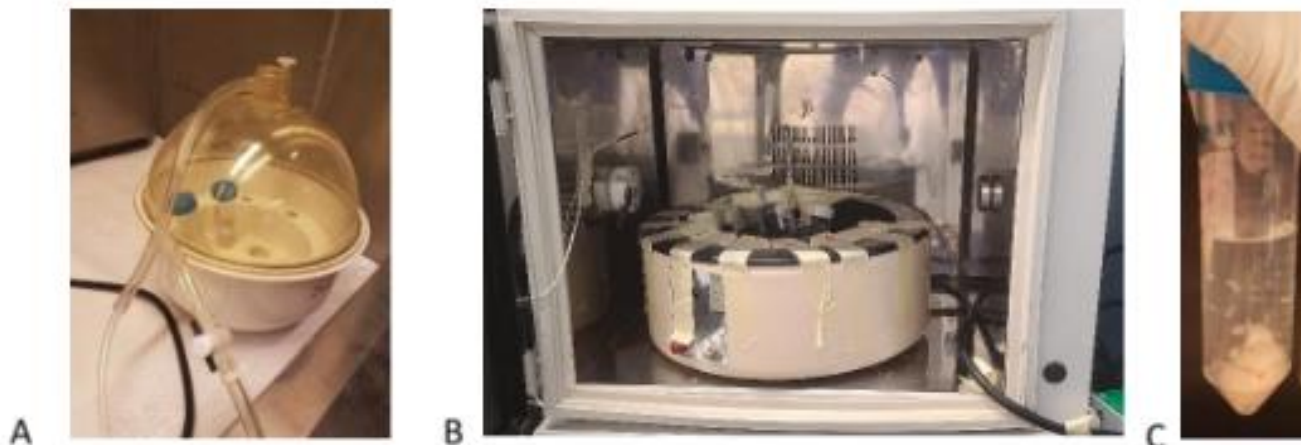
A infusão-perfusão do monômero de hidrogel é realizada sob anestesia geral profunda (cetamina 150 mg/kg e xilazina 10 mg/kg). O rato é colocado em posição supina em uma cama de gelo. O animal é então perfundido com 200 mL de solução de heparina-PBS a 10% gelada (4° C) (Quadro 4), seguido por 200 mL de monômero de hidrogel gelado (Quadro 4) administrado com uma bomba peristáltica a uma taxa de ~ 20 ml / min (~ 10 min). Em seguida, o cérebro é rapidamente retirado do crânio, colocado em um tubo falcon rotulado de 50 mL, coberto com ~ 25 mL de solução de hidrogel e imediatamente incubado a 4° C por ~ 7 dias, e não mais do que 2-3 semanas.

- O excesso de solução garante a difusão adequada do monômero no tecido.
- Curto tempo de trabalho e baixas temperaturas podem impedir a polimerização prematura do hidrogel.
- O iniciador térmico na solução de hidrogel é instável por longos períodos. Se o tempo de incubação for prolongado, a polimerização da acrilamida pode ocorrer, resultando na formação excessiva de poliacrilamida reticulada no tecido, que o tornará mais resistente ao clareamento.
- A duração da incubação da solução de hidrogel depende:
  - o Do tamanho da amostra. Amostras finas (por exemplo, 1-2 mm) requerem um tempo de incubação curto (por exemplo, 2-3 dias).
  - o Se a amostra foi perfundida ou não. O tecido perfundido requer um tempo de incubação mais curto.
  - o Se a amostra foi fixada anteriormente. A fixação aumenta a ligação de muitos locais de amina no tecido, reduzindo a ligação com os monômeros de acrilamida. Assim, o tempo de incubação é maior para permitir a difusão do monômero no tecido e encontrar locais de amina primária para ligação.

## **Etapa 2: Incorporação e hibridização de hidrogel no tecido**

Sabe-se que a polimerização do hidrogel é inibida pelo oxigênio. Portanto, para remover o oxigênio do contato com o hidrogel, o oxigênio é substituído por um gás inerte. O tubo é colocado em uma câmara de dessecação em uma capela e é conectado a um tanque de gás inerte (por exemplo, dióxido de carbono) e a uma bomba de vácuo. Um vácuo suga o oxigênio por ~ 20 minutos (ou seja, "desgaseificação") seguido por fluxo de gás inerte por ~ 3 minutos. Em seguida, o tubo Falcon é rapidamente selado com a tampa para evitar a reintrodução de oxigênio. Alternativamente, em vez de troca gasosa, o tubo falcon é preenchido com óleo mineral por pelo menos 20 mL acima do hidrogel (ZHENG; RINAMAN, 2016) (ver Quadro 4).

**Foto 2 –** Imagens de dessecador, incubadora e tubo Falcon com cérebro embebido em hidrogel polimerizado



**Fonte:** Acervo dos autores.

**Nota:** (A) Dessecador conectado ao gás inerte e a uma bomba à vácuo. (B) Tubo Falcon imerso em água quente dentro de uma incubadora, ambos a 37-45° C. (C) Tubo Falcon com o cérebro embebido em hidrogel polimerizado.

O tubo é então colocado em um banho-maria a 37° C em uma incubadora também a 37° C e incubado por 3-4 horas para facilitar a polimerização do hidrogel e geração de ligação da matriz do hidrogel. Uma vez que o hidrogel é solidificado, é removido da superfície do cérebro usando um lenço de papel (KIMTECH Science®, Kimberly-Clark) e armazenado em um tubo Falcon rotulado de 50 mL com 25 mL de solução PBST (ver Quadro 4) até que esteja pronto para clareamento. Alternativamente, o clareamento pode começar imediatamente após a hibridização.

Uma marca de incisão é feita no lado direito do cérebro para auxiliar na diferenciação entre os lados esquerdo e direito do cérebro durante a imagem. As características anatômicas macroscópicas do cérebro guiam para determinar a localização do córtex motor primário orofacial, correspondendo à localização do atlas de Swanson ~ 2 - 4 mm anterior a Bregma (ver Foto 3). As seções coronais de 2 mm de espessura contendo a região de interesse são cortadas com um vibratom (por exemplo, Modelo 3000, TPI, Missouri, EUA). Cada seção de 2 mm de espessura é armazenada em um tubo Falcon de 50 ml com 25 ml de solução PSBT (Quadro 4) até que esteja pronta para o clareamento passivo do tecido.

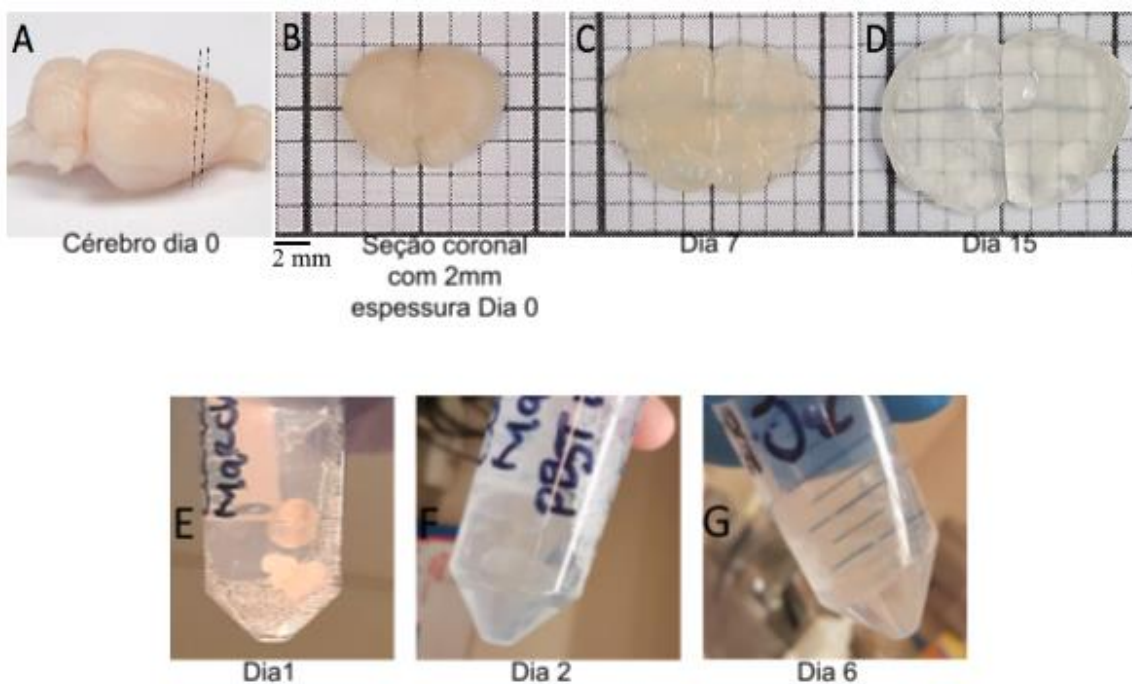
### Etapa 3: Clareamento do tecido

O clareamento do tecido pode ser realizado em todo o tecido cerebral intacto ou em seções cerebrais espessas (mm) ou finas ( $\mu\text{m}$ ). O PACT é realizado com uma solução clareadora (Quadro 4) contida em um tubo Falcon de 50 mL colocado em uma plataforma Rotator 3D (30

RPM, *Lab-Line*) em uma incubadora 37-40° C. A solução é substituída duas vezes durante os primeiros 2-3 dias para remover os excessos de formalina, iniciador e monômeros de hidrogel. Essas soluções devem ser coletadas e descartadas como lixo tóxico. Depois disso, a solução é substituída 1-2 vezes por dia ou em dias alternados até que o tecido pareça transparente. Essas soluções podem ser descartadas em uma pia. Quanto mais frequente for a substituição da solução, mais rápido será o clareamento. O clareamento de um tecido cerebral de rato com 2 mm de espessura, portanto, pode levar aproximadamente 15 dias.

O clareamento do tecido é verificado visualmente segurando o tubo Falcon contra a luz ou colocando o cérebro em uma grade de papel e observando o tecido completamente transparente (Foto 3).

**Foto 3 - Tecido cerebral antes, durante e após o clareamento com CLARITY**



**Fonte:** Adaptado da Tese de Lopez Gross (2018).

**Nota:** (A) Um cérebro inteiro após perfusão, coleta e incubação em solução de hidrogel. As linhas pontilhadas marcam a localização da seção transversal coronal de 2 mm de espessura através da região córtex sensório-motor orofacial do cérebro mostrada imediatamente após o corte. (B) e após 1 (E), 2 (F), 6 (G), 7 (C) e 15 (D) dias de clareamento passivo. Após 15 dias de clareamento passivo, o tecido parece transparente. Observe o aumento significativo no tamanho do cérebro devido ao aumento de volume que ocorre durante o clareamento. Adaptado da tese de Lopez Gross (2018).

Assim que o cérebro parecer transparente, é colocado em um tubo Falcon contendo 50 mL de tampão fosfato borato triton (PBT) (Quadro 4). O tubo é colocado em uma plataforma giratória 3D (por exemplo, 30 RPM, *LAB-LINE*) em temperatura ambiente. O tampão remove as micelas de SDS e interrompe o processo de clareamento (SYED et al., 2017). O PBT é trocado

três vezes ao dia durante dois dias, e, a partir de então, os cortes são armazenados em solução de PBST a 4° C até a imunomarcagem do tecido.

#### Etapa 4: Imunomarcagem

Esta seção fornece um exemplo de imunomarcagem de proteínas específicas do citoesqueleto astrogliar e núcleos neuronais em seções coronais de 2 mm de espessura de hemisférios cerebrais de rato no nível do córtex sensório-motor primário orofacial.

Primeiro, cada concentração de anticorpo é otimizada para garantir uma imagem 3D ideal das proteínas marcadas (IMMUNOSTAINING, 2021). Para este fim, bem como para economizar material e tempo de incubação, é possível usar seções finas (por exemplo, 200 µm); cada uma imunologicamente marcada com uma concentração de anticorpo diferente (por exemplo, 1: 100, 1:70, 1:50).

Uma vez que a concentração de cada anticorpo é determinada (por exemplo, ver Tabela 1), a imunomarcagem das seções de 2 mm de espessura pode ser iniciada. As seções do cérebro são transferidas para novos tubos Falcon de 50 ml contendo 0,5 ml de anticorpos diluídos (ver seção 5). Os tubos Falcon são firmemente cobertos com folha de alumínio para proteger os anticorpos de fluorescência da luz e evitar o desbotamento (fotobranqueamento) dos fluoróforos. Em seguida, os tubos são colocados em plataforma giratória (a 30 RPM) e incubados a 37° C por 6 dias. As seções de tecido são então lavadas em PBST a 37° C durante 6 dias, procedendo as trocas de PBST duas vezes ao dia (por exemplo, 9h e 18h).

#### Etapa 5: Homogeneização do índice de refração (IR)

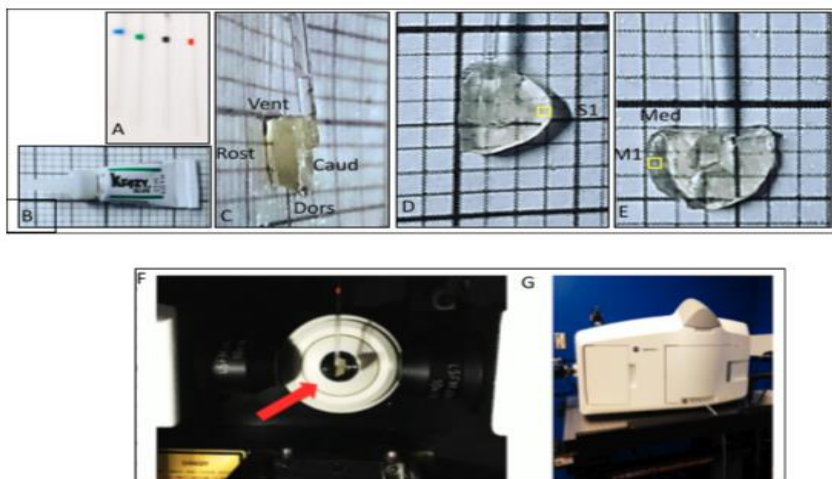
O tecido cerebral é imerso em **50 mL** de solução **30%** (vol / vol) de **TDE/PBS** em um tubo Falcon colocado em uma plataforma giratória 3D (30 RPM) a **37° C** e incubado até que sua região interna fique saturada com TDE, evidenciado pelo seu afundamento para o fundo do tubo (~ **1,5 h**). Em seguida, a seção é imersa em 50 mL de solução de **TDE/PBS** a **63%** (vol / vol) e colocada em uma plataforma giratória 3D (30 RPM) a 37° C até que a seção afunde no fundo do tubo (~ **1,5 h**). Quando a seção estiver completamente transparente (pode ter um leve tom amarelo), ela estará pronta para a imagem.

## Etapa 6: Aquisição da imagem

Um microscópio Zeiss *light-sheet* Z1 equipado com uma objetiva de detecção CLARITY 20x (Zeiss, detecção Objetivo Clr Plan-Neofluar 20x / 1.0 Corr nd = 1,45 ± 0,03 M32 85 mm) pode ser usado para aquisição de imagens (Foto 4). Antes da montagem e da imagem, usa-se o refratômetro (Foto 1) para verificar o IR da solução de imersão de montagem com 63% de TDE. Se houver uma pequena discrepância entre o IR da solução e o da objetiva, importante remover a objetiva de detecção CLARITY 20X do microscópio para ajustar o IR. Se o IR do meio de montagem for superior a 1,45 (por exemplo, 1,48), para compensar este valor de IR mais alto, portanto, é necessário ajustar o colar de correção de IR na objetiva para um valor menor (por exemplo, 1,42). Após esse procedimento, instalar a objetiva de volta no lugar.

As especificações a seguir podem ser usadas como exemplo ao configurar o microscópio *light-sheet* Zeiss Z1 para aquisição de imagem (Quadro 6, Foto 4). Deve-se anexar o capilar de montagem a uma seção coronal de um hemisfério cerebral de rato. A área de fixação deve estar distante da região de interesse e longe dos centros do plano de emissão de luz e da objetiva (ver Foto 4 para exemplo de montagem).

**Foto 4 – Sequência de preparação do tecido para visualização em microscópio *light-sheet***



**Fonte:** Adaptado da Tese de Lopez Gross (2018).

**Nota:** Seca-se a estrutura com tecido KimTech. Para obter imagens de uma região de interesse dentro das camadas 1-2 do córtex somatossensorial primário (S1) (ver quadrado amarelo em **D**); um capilar é colado à superfície caudal (Caud) - ventral (Vent) da seção (**C-D**). Para obter imagens da região de interesse dentro das camadas 1-2 do córtex motor primário (M1) (veja o quadrado amarelo em **E**); o capilar é colado à superfície caudal-medial (Med) da seção coronal (**E**). Coloca-se uma pequena quantidade de cola (**B**) na ponta de um capilar vermelho (**A**). Suavemente, sem muita pressão, prende-se o capilar à superfície caudal (ou seja, mais larga) da seção (**C**). Os capilares de vidro com a seção do cérebro são anexados ao microscópio Z1 de lâmina de luz Zeiss e posicionados na frente da câmera (seta vermelha) (**F**). (**G**) Visão externa do microscópio Z1 de lâmina luminosa Zeiss.

**Quadro 6 - Característica para microscópio Z1 *light-sheet* Zeiss a ser usado para a aquisição de uma imagem ~ 1 x 1 x 1 mm<sup>3</sup>**

Óptica de Detecção	20x/1.0 (CLARITY, RI=1.45)
Óptica de Iluminação	10x/0.2 x 2,5x/0.1 x 2
Lasers	405 nm (20mW), 488 nm (50 mW), 561 nm (20 mW), 638 nm (75 mW)
Câmera	pCO Edge 5.5 x 2
Dimensões máximas da amostra	10 x 10 x 20 (mm)
Campo de visão (20x)	439 x 439 (µm)
Programas	Zeiss Zen <i>Light-sheet</i> 2014
Computador e armazenamento	Computador de alta potência com um grande <i>random-access memory</i> (RAM)
Espaço de armazenamento de dados	Dependendo da área de varredura e do número de canais usados, um grande armazenamento externo é necessário; > 100 GB / digitalização
Armazenamento de amostra após digitalização	PBST à temperatura ambiente ou 40° C e protegido da luz

Fonte: Elaboração dos autores.

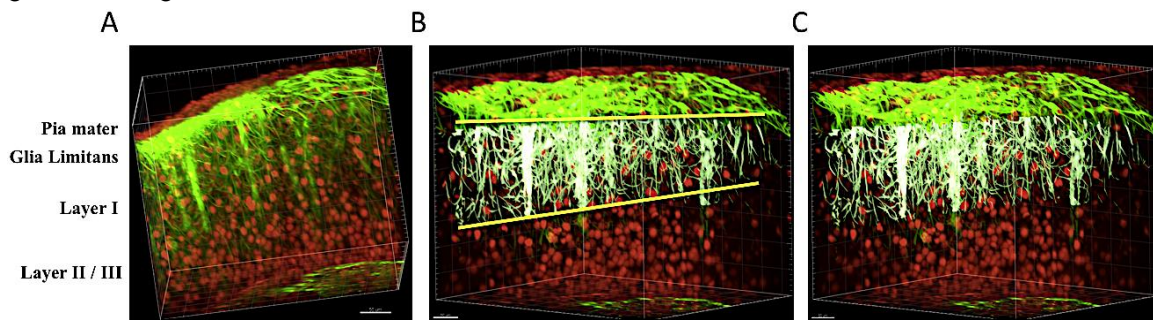
### Etapa 7: Análise da imagem

Vários *softwares* estão disponíveis para identificação automática, reconstrução 3D, análise e quantificação de características arquitetônicas e morfológicas das células e seus componentes (FEUCHTINGER; WALCH; DOBOSZ, 2016). Esta seção descreve o uso do *software* Imaris (OXFORD INSTRUMENTS, 2021), que é capaz de identificação, análise e quantificação automática de muitas características morfológicas. A seção abaixo usa estruturas filamentosas como exemplo para identificar e quantificar características morfológicas dos processos astrogliais. Imagens Z - *stacks* adquiridas com o microscópio *light-sheet* Z1 e salvas como arquivos Zen (.czi) são convertidas em arquivos Imaris (.ims) usando o aplicativo Imaris *File Converter* x64 9.0.1. Após a subtração do fundo e o limiar para o canal que corresponde ao anticorpo usado, a região de interesse é delimitada e cortada do volume completo da imagem adquirida.

O aplicativo *Filament Tracer* do Imaris é usado para identificar todos os processos astrogliais (Figura 4). O rastreamento é feito por algoritmo de limite baseado em um limite de intensidade absoluta de estruturas filamentosas GFAP + (processos). Dependendo do tamanho da amostra e do número de componentes identificados, a análise pode durar várias horas (por exemplo, 8 horas para fazer a varredura de processos astrogliais em um tecido cerebral de 1 mm de espessura).



**Figura 4 – Imagem 3D de tecido do córtex sensório-motor orofacial**



**Fonte:** Lopez Gross (2018).

**Nota:** (A) Imagem 3D de tecido cortical de 1 mm de espessura mostrando os recursos usados para selecionar a região de interesse dentro da camada I: a pia-máter, composta por NeuN + núcleos de forma plana (vermelho), os limites da glia identificados como uma camada contínua de GFAP + de alta intensidade células astrogliais (verdes); a camada cortical I é caracterizada por uma rica rede de processos GFAP +, enquanto as camadas II / III abaixo mostram um número significativamente maior de núcleos NeuN + e células GFAP + esparsas. (B) Ilustra a região de interesse dentro da camada I selecionada para análise morfométrica subsequente de processos GFAP +. A linha amarela inferior marca a borda aproximada entre a camada I e as camadas II / III. A linha amarela superior marca uma borda aproximada entre a camada I e os limitantes gliais. (C) O *software* Imaris mascarou os processos GFAP + (branco) dentro da região de interesse para análise morfométrica subsequente (LOPEZ GROSS, 2018).

O *software* Imaris é capaz de calcular e quantificar muitas características morfológicas das células (Quadro 7). Vários valores estatísticos são calculados automaticamente pelo *software* Imaris e compilados em uma planilha do Excel. O termo “filamento” é dado pelo *software* às estruturas filamentosas (processos astrogliais) (BITPLANE SCIENTIFIC SOLUTIONS, 2008). Volume da região de interesse na camada I; usado para posterior normalização do comprimento, área de superfície e volume dos processos astrogliais. Mudanças na complexidade da morfologia astroglial podem ser determinadas calculando a razão área/volume de superfície a partir dos dados fornecidos pelo *software*.

**Quadro 7 - Característica para microscópio *light-sheet* Z1 Zeiss a ser usado para aquisição de imagem**

Área de Filamento	A soma das superfícies geradas de um tronco (cone truncado)
Comprimento do filamento (soma)	A soma do comprimento de todos os filamentos
Diâmetro médio do filamento	O diâmetro médio dentro de um filamento. Cada ponto de uma linha de filamento tem seu diâmetro medido individualmente. O diâmetro é medido como a distância mais curta da linha central às superfícies definidas pelo limite inferior
Volume do filamento	A soma do volume de todas as bordas (cones) que compõem um filamento
Retidão do filamento	$h$ = a distância entre dois pontos de ramificação. A retidão do filamento é $h$ por comprimento do filamento

**Fonte:** Elaboração dos autores.



## QUANTO TEM SIDO USADO NA PESQUISA?

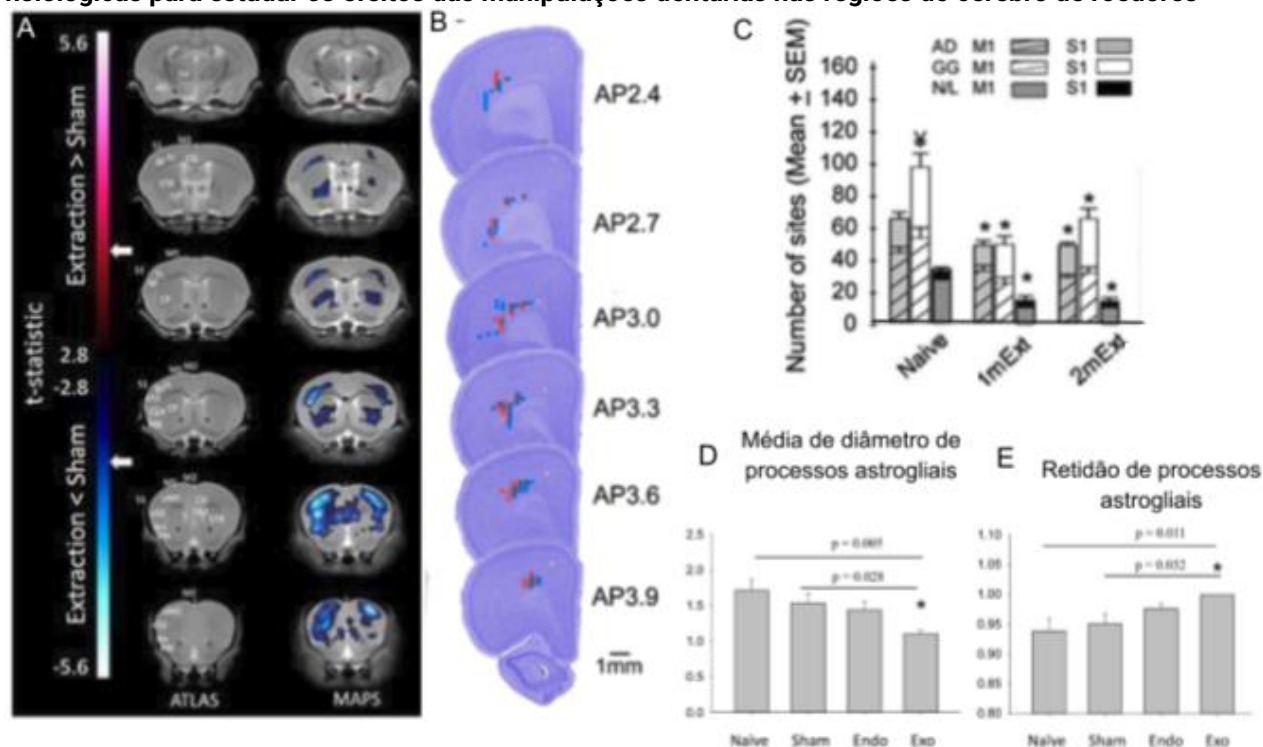
Métodos ópticos de clareamento de tecidos espessos e intactos, juntamente com anticorpos específicos ou imunomarcação baseada em genes de moléculas e proteínas e subsequente imagem 3D representam uma abordagem poderosa que tem sido usada extensivamente na pesquisa biomédica humana e animal para visualizar, caracterizar e quantificar características anatômicas e espaciais, assim como relações dentro de órgãos e tecidos saudáveis intactos (LIANG; LUO, 2021; LOPEZ GROSS, 2018; MILGROOM; RALSTON, 2016; PORTER; MORTON, 2020; TIAN; YANG; LI, 2021; ZHAO et al., 2021). A possibilidade de trabalhar em tecidos e órgãos inteiros intactos ou mesmo em todo o corpo de pequenos animais tem um significado particular em doenças, lesões, bem como para terapia e cura, e pode ser especialmente importante quando mudanças ocorrem em diferentes regiões de um órgão ou se estendem a regiões distantes. Essa possibilidade também pode ter importante significado clínico para o diagnóstico e prognóstico de doenças em humanos. Por exemplo, no caso de linfonodos metastáticos que contêm células cancerosas que se espalharam de um órgão distante do corpo, a capacidade de criar imagens e caracterizar todos os linfonodos com CLARITY pode ser crucial para o diagnóstico e prognóstico adequados de câncer com alta especificidade e sensibilidade (ALMAGRO et al., 2021). Ademais, sua importância é também elencada, pois permite uma avaliação imparcial completa das alterações anatômicas e biológicas que não podem ser alcançadas por métodos convencionais de histologia e imunohistoquímica (consulte também a seção 2 sobre essa explicação).

Os métodos de clareamentos e de imagem 3D são significativos quando combinados com técnicas macroanatômicas 3D não invasivas, como imagem de ressonância magnética funcional (fMRI) e imagem de ressonância magnética estrutural (sMRI), imagem por tensor de difusão (DTI) e tomografia por emissão de pósitrons (PET). Embora os métodos de imagem não invasivos possam fornecer uma imagem de todo o cérebro em um ponto do tempo, eles têm baixa resolução espacial e, além disso, podem fornecer apenas medidas indiretas da estrutura, orientação e função neuronal e não neuronal (CHENEY, 2002; ZATORRE; FIELDS; JOHANSENBERG, 2012). Em contraste, a imagem 3D *post-mortem* com CLARITY em tecidos cerebrais, por exemplo, pode não só validar achados baseados em ressonância magnética, mas também pode fornecer a capacidade de quantificar características celulares e moleculares, como o número e densidade de células neuronais e gliais, e orientação e distribuição de processos neuronais (MORAWSKI et al., 2018). Por exemplo, o DTI tem sido amplamente usado para mapear a orientação das fibras neuronais no cérebro de animais e humanos. No entanto, ele mede os

padrões de difusão molecular no tecido cerebral como uma medida da orientação neuronal. Portanto, CLARITY, imunomarcacão e imagem 3D de proteínas específicas da mielina podem fornecer informacões 3D sobre redes neuronais em tecidos intactos e, assim, fornecer interpretaçao complementar dos dados DTI (ASWENDT et al., 2017; LEUZE et al., 2021).

Relaçoes de estrutura-funçao dinâmicas e recíprocas fundamentam as bases de comportamento neuronais e não neuronais, como células gliais. Por exemplo, número, tamanho, arquitetura, morfologia e padrões de projeçao de neurônios individuais e conjuntos de neurônios, número e tipo de conexões sinápticas e propriedades de disparo neuronal e sua plasticidade determinam o processamento de informacões no sistema nervoso que, por sua vez, determina o comportamento e os níveis de funções como aprendizagem, memória e adaptaçao (DEISSEROTH, 2016a, 2016b). Uma vez que as redes e circuitos neurogliais podem abranger milímetros e centímetros (ASANUMA; PRESS, 1989; BRAITENBERG; SCHÜZ, 2013; GAREY, 1999; JIANG et al., 2020; KANDEL et al., 2012), estudar a relaçao estrutura-funçao é mais significativo quando a imagem 3D de órgãos ou de tecidos inteiros intactos é integrada e complementada com abordagens de pesquisa fisiológica ou comportamental. Um exemplo é mostrado na Figura 5.

**Figura 5 – Exemplo de análises integradas e complementares com base em imagens 3D e em abordagens fisiológicas para estudar os efeitos das manipulações dentárias nas regiões do cérebro de roedores**



**Fonte:** Adaptado e modificado de Avivi-Arber et al. (2015, 2017) e Awamleh et al. (2015).

**Nota:** (A) Estudo de imagem por ressonância magnética estrutural (sMRI). Mapas estatísticos t codificados por cores sobrepostos em sMRI de alta resolução de fatias coronais de um cérebro de camundongo. Cortes coronais na coluna esquerda mostram registros anatômicas. As regiões vermelhas têm maiores volumes de voxel em camundongos que receberam extração dentária do que em camundongos do grupo sham; as regiões azuis têm menores volumes de voxel em ratos submetidos à extração dentária. Os picos associados aos valores da estatística  $t < -3,53$  ou  $> 3,53$  são significativos em FDR = 5% (setas brancas). Por exemplo, a extração do dente está associada à diminuição do volume das áreas corticais sensório-motoras [adaptado com permissão de (AVIVI-ARBER et al., 2017)]. (B-C) Estudo eletrofisiológico. Mapas motores corticais. (B) Cada ponto colorido é um local de representação motora dos músculos da abertura bucal (digástrico anterior, DA) e/ou protrusão da língua (genioglosso, GG) no córtex sensório-motor orofacial esquerdo do rato. Os mapas de representação motora foram obtidos por meio de microestimulação elétrica sistemática do córtex e registro da atividade eletromiográfica evocada dos músculos. Qualquer local a partir do qual a estimulação elétrica pudesse evocar atividade eletromiográfica em um músculo foi definido como um local de representação motora para aquele músculo. Os mapas são sobrepostos nas hemisseções coronais coradas de Nissl do hemisfério esquerdo nos planos ântero-posterior (AP) 2,4, 2,7, 3,0, 3,3, 3,6 e 3,9 mm anterior ao Bregma. A extração dentária induziu diminuições significativas nas representações motoras dos músculos da mandíbula (AD) e da língua (GG) dentro dos córtices motor primário (M1) e somatossensorial (S1) (C) [Adaptado com permissão (AVIVI-ARBER et al., 2015)]. (D-E) Estudo de imagens 3D com CLARITY. As análises de imagem revelaram diferenças significativas no diâmetro médio (D) e retidão (E) de processos astrogliais em camundongos que receberam extração dental (Exo) ou terapia endodôntica (Endo) em comparação com camundongos normais e camundongos recebendo operação sham; os dados de diâmetro são apresentados como médias de grupo e SEM, e os dados de retidão são apresentados como medianas de grupo e SEM (LOPEZ GROSS, 2018). Esses achados fisiológicos e de imagem de neuroplasticidade e glioplasticidade podem estar relacionados aos processos neurais subjacentes à maneira como os indivíduos se adaptam à perda e às manipulações dentárias; além disso, a neuroplasticidade cortical pode ser dependente da integridade funcional da astróglia, uma vez que o bloqueio da enzima glutamina sintetase dos astrócitos pode reverter a neuroplasticidade no córtex sensório-motor de roedores induzida por estimulação dentária aguda (AWAMLEH et al., 2015).

**Suporte financeiro:** Os métodos e resultados relatados aqui foram financiados pela Faculdade de Odontologia Bertha Rosenstadt Fund, Fundação para Endodontia da Associação Americana de Endodontistas, Fundação Alpha Omega do Canadá, Academia Canadense de Endodontia, Fundo de Doação de Shimon Friedman e Calvin Torneck e o Fundo de Educação do International College of Prosthodontists. Dra. Hellíada Chaves foi financiada pelo Programa CAPES-PRINT, projeto número 88887.311924 / 2018-00, Governo Brasileiro.

## REFERÊNCIAS

- ALMAGRO, Jorge *et al.* Tissue clearing to examine tumour complexity in three dimensions. **Nature Reviews Cancer**, July 2021.
- ANDO, Kunie *et al.* Inside Alzheimer brain with CLARITY: senile plaques, neurofibrillary tangles and axons in 3-D. **Acta Neuropathologica**, v. 128, n. 3, p. 457-459, 2014.
- ASANUMA, H.; PRESS, R. The motor cortex. **Clinical Neurophysiology**, v. 19, n. 5, p. 427, 1989.
- ASWENDT, Markus *et al.* Whole-Brain microscopy meets in vivo neuroimaging: techniques, benefits, and limitations. **Molecular Imaging and Biology**, v. 19, n. 1, p. 1-9, 2017.
- AVIVI-ARBER, Limor *et al.* Long-term neuroplasticity of the face primary motor cortex and adjacent somatosensory cortex induced by tooth loss can be reversed following dental implant replacement in rats. **Journal of Comparative Neurology**, v. 523, n. 16, p. 2372-2389, 2015.
- AVIVI-ARBER, Limor *et al.* Widespread volumetric brain changes following tooth loss in female mice. **Frontiers in Neuroanatomy**, v. 10, p. 1-13, Jan. 2017.
- AWAMLEH, L. *et al.* Decreased face primary motor cortex (face-M1) excitability induced by noxious stimulation of the rat molar tooth pulp is dependent on the functional integrity of face-M1 astrocytes. **Experimental Brain Research**, v. 233, n. 4, p. 1261-1272, 2015.
- BASTRUP, Joakim; LARSEN, Peter H. Optimized CLARITY technique detects reduced parvalbumin density in a genetic model of schizophrenia. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 283, p. 23-32, 2017.
- BECKER, K. *et al.* Ultramicroscopy: 3D reconstruction of large microscopical specimens. **Journal of Biophotonics**, v. 1, n. 1, p. 36-42, 2008.
- BERNAL, L. *et al.* Immunostaining in whole-mount lipid-cleared peripheral nerves and dorsal root ganglia after neuropathy in mice. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1-10, 2019.
- BITPLANE SCIENTIFIC SOLUTIONS. **Imaris V. 6.1.0**: reference manual. Zurich: Birplane Scientific Solutions, 2008. Disponível em: [http://www.bitplane.com/download/manuals/ReferenceManual6\\_1\\_0.pdf](http://www.bitplane.com/download/manuals/ReferenceManual6_1_0.pdf). Acesso em: 8 out. 2021.
- BRAITENBERG, Valentino; SCHÜZ, Almut. **Cortex**: statistics and geometry of neuronal connectivity. [S.l.]: Springer Berlin Heidelberg, 2013.
- BRENNAN, Cinzia *et al.* New technical approaches for 3D morphological imaging and quantification of measurements. **Anatomical Record**, v. 303, n. 10, p. 2702-2715, 2020.
- CHENEY, Paul D. Electrophysiological methods for mapping brain motor and sensory circuits. In: TOGA, Arthur W.; MAZZIOTTA, John C. (ed.). **Brain mapping**: the methods. 2nd. ed. New York: Academic Press: Elsevier Science (USA), 2002. p. 189-226.

CHEN, Yi *et al.* Three-dimensional imaging and quantitative analysis in CLARITY processed breast cancer tissues. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1-13, Apr. 2019.

CHUNG, Kwanghun; DEISSEROTH, Karl. CLARITY for mapping the nervous system. **Nature Methods**, v. 10, n. 6, p. 508-513, June 2013.

CHUNG, Kwanghun *et al.* Structural and molecular interrogation of intact biological systems. **Nature**, v. 497, n. 7449, p. 332-337, May 2013.

CLARITY RESOURCE CENTER. Disponível em: <http://clarityresourcecenter.org/>. Acesso em: 14 out. 2021.

CLARITY TECHNIQUES. **Clarity wiki**. [S.l.]: Clarity Techniques, [20-]. Disponível em: [http://wiki.claritytechniques.org/index.php/Main\\_Page](http://wiki.claritytechniques.org/index.php/Main_Page). Acesso em: 14 out. 2021.

CORA, Virginia *et al.* A cleared view on retinal organoids. **Cells**, v. 8, n. 5, p. 1-12, 2019.

COSTANTINI, Irene *et al.* A versatile clearing agent for multi-modal brain imaging. **Scientific Reports**, v. 5, n. 9808, p. 1-9, 2015.

CRONAN, Mark R. *et al.* Clarity and pact-based imaging of adult zebrafish and mouse for whole-animal analysis of infections. **DMM Disease Models and Mechanisms**, v. 8, n. 12, p. 1643-1650, Dec. 2015.

DAHL, Doris; BIGNAMI, Amico. Effect of sodium dodecyl sulfate on the immunogenic properties of the glial fibrillary acidic protein. **Journal of Immunological Methods**, v. 17, n. 3-4, p. 201-209, 1977.

DAI, Zhenfeng *et al.* Novel imaging and related techniques for studies of diseases of the central nervous system: a review. **Cell and Tissue Research**, v. 380, n. 3, p. 415-424, 2020.

DEISSEROTH, Karl. Form meets function in the brain: observing the activity and structure of specific neural connections. *In*: KENNEDY, Henry; VAN ESSEN, David C.; CHRISTEN, Yves (ed.). **Micro-, meso- and macro- connectomics of the brain**. Switzerland: Springer Nature, 2016a. p. 19-29.

DEISSSSEROTH, Karl. A look inside the brain. **Scientific American**, v. 315, n. 4, p. 30-37, 2016b.

DODT, Hans-Ulrich *et al.* Ultramicroscopy: three-dimensional visualization of neuronal networks in the whole mouse brain. **Nature Methods**, v. 4, n. 4, p. 331-336, 2007.

DUAN, Wei *et al.* Novel insights into NeuN: from neuronal marker to splicing regulator. **Molecular Neurobiology**, v. 53, n. 3, p. 1637-1647, 2016.

ENG, Lawrence F.; GHIRNIKAR, Roopa S.; LEE, Yuen L. Glial fibrillary acidic protein: GFAP-thirty-one years (1969-2000)\*. **Neurochemical Research**, v. 25, n. 9, p. 1439-1451, 2000.

EPP, Jonathan R. *et al.* Optimization of CLARITY for clearing whole-brain and other intact organs. **eNeuro**, v. 2, n. 3, p. 1-15, May/June 2015. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4586927/>. Acesso em: 8 out. 2021.

FANOUS, Michael *et al.* Quantifying myelin content in brain tissue using color Spatial Light Interference Microscopy (cSLIM). **PLoS ONE**, v. 15, n. 11, p. 1-13, Nov. 2020. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0241084>. Acesso em: 8 out. 2021.

FENG, Yi *et al.* CLARITY reveals dynamics of ovarian follicular architecture and vasculature in three-dimensions. **Scientific Reports**, v. 7, p. 1-13, Mar. 2017.

FEUCHTINGER, Annette; WALCH, Axel; DOBOSZ, Michael. Deep tissue imaging: a review from a preclinical cancer research perspective. **Histochemistry and Cell Biology**, v. 146, n. 6, p. 781-806, 2016.

GARCÍA-CABEZAS, Miguel Á. *et al.* Mirror trends of plasticity and stability indicators in primate prefrontal cortex. **European Journal of Neuroscience**, v. 46, n. 8, p. 2392-2405, Oct. 2017.

GAREY, Laurence. Book reviews. **Journal of Anatomy**, v. 194, n. 1, p. 153-157, Jan. 1999. Book review: BRAITENBERG, V.; SCHÜZ, A. **Cortex: statistics and geometry of neuronal connectivity**. 2nd. ed. Berlin: Springer, 1998.

GLASER, Adam K. *et al.* Light-sheet microscopy for slide - free non- destructive pathology of large clinical specimens. **Nature Biomedical Engineering**, v. 1, n. 7, p. 1-22, 2018.

GLEAVE, Jacqueline A. *et al.* A method for 3D immunostaining and optical imaging of the mouse brain demonstrated in neural progenitor cells. **PLoS ONE**, v. 8, n. 8, p. 1-12, 2013. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0072039>. Acesso em: 8 out. 2021.

GRADINARU, Viviana *et al.* Hydrogel-tissue chemistry: principles and applications. **Annual Review Biophysics**, v. 20, n. 47, p. 355-376, 2018.

GREENBAUM, Alon *et al.* Bone CLARITY: clearing, imaging, and computational analysis of osteoprogenitors within intact bone marrow. **Science Translational Medicine**, v. 26, n. 9, p. 1-10, Apr. 2017.

GULDNER, Ian H.; ZHANG, Siyuan. A journey to uncharted territory: New technical frontiers in studying tumor-stromal cell interactions. **Integrative Biology (United Kingdom)**, v. 7, n. 2, p. 153-161, 2015.

GUO, Z.; ZHENG, Y.; ZHANG, Y. CLARITY techniques based tissue clearing: types and differences. **Folia Morphologica**, p. 1-27, Feb. 2021. Disponível em: [https://journals.viamedica.pl/fovia\\_morphologica/article/view/FM.a2021.0012/54793](https://journals.viamedica.pl/fovia_morphologica/article/view/FM.a2021.0012/54793). Acesso em: 8 out. 2021.

GUSEL'NIKOVA, V. V; KORZHEVSKIY, D. E. NeuN as a neuronal nuclear antigen and neuron differentiation marker. **Acta Naturae**, v. 7, n. 2, p. 42-47, 2015.

HANS-ULRICH, Dodt *et al.* Ultramicroscopy: three-dimensional visualization of neuronal networks in the whole mouse brain. **Nature methods**, v. 4, n. 4, p. 331-336, Apr. 2007.

HONG, Sujung *et al.* 3D cellular visualization of intact mouse tooth using optical clearing without decalcification. **International Journal of Oral Science**, v. 11, n. 3, p. 1-8, 2019.



HSUEH, Brian *et al.* Pathways to clinical CLARITY: volumetric analysis of irregular, soft, and heterogeneous tissues in development and disease. **Scientific Reports**, v. 7, n. 5899, p. 1-16, 2017.

HU, Wei *et al.* Three-dimensional reconstruction of the vascular architecture of the passive CLARITY-cleared mouse ovary. **Journal of Visualized Experiments**, v. 2017, n. 130, p. 1-7, Dec. 2017.

HUANG, Jiaguo *et al.* A cationic near infrared fluorescent agent and ethyl-cinnamate tissue clearing protocol for vascular staining and imaging. **Scientific Reports**, v. 9, n. 521, p. 1-13, Dec. 2019.

IMMUNOSTAINING. [S.l.: s.n.], 2021. Disponível em:  
<http://wiki.claritytechniques.org/index.php/Immunostaining#>. Acesso em: 8 out. 2021.

JENSEN, Kristian H. R.; BERG, Rune W. Advances and perspectives in tissue clearing using CLARITY. **Journal of Chemical Neuroanatomy**, v. 86, p. 19-34, 2017.

JENSEN, Kristian H. R.; BERG, Rune W. CLARITY-compatible lipophilic dyes for electrode marking and neuronal tracing. **Scientific Reports**, v. 6, n. 32674, p. 1-10, 2016.

JIANG, Sigi *et al.* Anatomically revealed morphological patterns of pyramidal neurons in layer 5 of the motor cortex. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 1-10, 2020.

KANDEL, Eric *et al.* **Principles of neural science**. 5th ed. [S.l.]: McGraw-Hill Publishing, 2012.

KE, M.eng-Tsen; FUJIMOTO, Satoshi; IMAI, Takeshi. SeeDB: A simple and morphology-preserving optical clearing agent for neuronal circuit reconstruction. **Nature Neuroscience**, v. 16, n. 8, p. 1154-1161, 2013.

KIM, Kee K.; ADELSTEIN, Robert S.; KAWAMOTO, Sachiyo. Identification of neuronal nuclei (NeuN) as Fox-3, a new member of the Fox-1 gene family of splicing factors. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 45, p. 31052-31061, 2009.

LEE, Hyunsu *et al.* Improved application of the electrophoretic tissue clearing technology, CLARITY, to intact solid organs including brain, pancreas, liver, kidney, lung, and intestine. **BMC Developmental Biology**, v. 14, n. 1, p. 1-7, 2014.

LEUZE, C. *et al.* Comparison of diffusion MRI and CLARITY fiber orientation estimates in both gray and white matter regions of human and primate brain. **NeuroImage**, v. 228, p. 117692, Mar. 2020.

LIANG, Xiaohan; LUO, Haiming. Optical tissue clearing: illuminating brain function and dysfunction. **Theranostics**, v. 11, n. 7, p. 3035-3051, 2021.

LIN, Fan; PRICHARD, Jeffrey. **Handbook of practical immunohistochemistry**: frequently asked questions. 2nd. ed. New York: Springer New York, 2015.

LIU, A. K. L. *et al.* Bringing CLARITY to the human brain: visualization of Lewy pathology in three dimensions. **Neuropathology and Applied Neurobiology**, v. 42, n. 6, p. 573-587, 2016.

LOPEZ GROSS, Jacqueline. **Astroglial plasticity within the rat orofacial primary motor cortex induced by endodontic treatment versus tooth extraction**. 2018. 78 f. Thesis (Master of Science in Endodontics) - University of Toronto, [Toronto], 2018.

MANSUROV, Nasim. **What is spherical aberration?** [S.l.]: Photography Life, 2019. Disponível em: <https://photographylife.com/what-is-spherical-aberration>. Acesso em: 8 out. 2021.

MARTÍNEZ-LORENZANA, Guadalupe *et al.* CLARITY with neuronal tracing and immunofluorescence to study the somatosensory system in rats. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 350, Feb. 2021.

MAYER, Jürgen *et al.* Attenuation artifacts in light sheet fluorescence microscopy corrected by OPTiSPIM. **Light: Science and Applications**, v. 7, n. 1, p. 1-13, 2018.

MILGROOM, Andrew; RALSTON, Evelyn. Clearing skeletal muscle with CLARITY for light microscopy imaging. **Cell Biology International**, v. 40, n. 4, p. 478-483, Apr. 2016.

MILLER, Sean J.; ROTHSTEIN, Jeffrey D. Astroglia in thick tissue with super resolution and cellular reconstruction. **PLoS ONE**, v. 11, n. 8, p. 1-11, 2016. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0160391>. Acesso em: 8 out. 2021.

MIYAWAKI, A. Optical clearing of biological tissue with scaleA2. **Materials and Methods**, v. 1, n. 188, Sept. 2020.

MORAWSKI, Markus *et al.* Developing 3D microscopy with CLARITY on human brain tissue: towards a tool for informing and validating MRI-based histology. **NeuroImage**, v. 182, p. 417-428, Nov. 2018.

MULLEN, R. J.; BUCK, C. R.; SMITH, A. M. NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates. **Development**, v. 116, n. 1, p. 201-211, 1992.

MUNTIFERING, Michael *et al.* Clearing for deep tissue imaging. **Current Protocols Cytometry**, v. 86, n. 1, p. 1-33, 2018.

NECKEL, Peter H. *et al.* Large-scale tissue clearing (PACT): technical evaluation and new perspectives in immunofluorescence, histology, and ultrastructure. **Scientific Reports**, v. 6, p. 1-13, Sept. 2016.

OXFORD INSTRUMENTS. **Imaris Packages**. [S.l.]: Oxford Instruments, 2021. Disponível em: <https://imaris.oxinst.com/packages>. Acesso em: 8 out. 2021.

PARRA-DAMAS, Arnaldo; SAURA, Carlos A. Tissue clearing and expansion methods for imaging brain pathology in neurodegeneration: from circuits to synapses and beyond. **Frontiers in Neuroscience**, v. 14, p. 1-12, Oct. 2020.

PHILLIPS, Jonathan *et al.* Development of passive CLARITY and immunofluorescent labelling of multiple proteins in human cerebellum: understanding mechanisms of neurodegeneration in mitochondrial disease. **Scientific Reports**, v. 6, p. 1-12, May 2016.

- PICCHAT, Jonas *et al.* A survey of methods for 3D histology reconstruction. **Medical Image Analysis**, v. 46, p. 73-105, May 2018.
- PORTER, Demisha D. L.; MORTON, Paul D. Clearing techniques for visualizing the nervous system in development, injury, and disease. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 334, p. 108594, Jan. 2020.
- RENIER, Nicolas *et al.* IDISCO: a simple, rapid method to immunolabel large tissue samples for volume imaging. **Cell**, v. 159, n. 4, p. 896-910, Nov. 2014.
- RENIER, Nicolas *et al.* Mapping of brain activity by automated volume analysis of immediate early genes. **Cell**, v. 165, n. 7, p. 1789-1802, 2016.
- RICHARDSON, Douglas S.; LICHTMAN, Jeff W. Clarifying tissue clearing. **Cell**, v. 62, p. 246-257, 2015.
- ROBERTS, Dustin G. *et al.* Optical clearing of the mouse central nervous system using passive CLARITY. **Journal of Visualized Experiments**, v. 2016, n. 112, p. 1-9, 2016.
- SALILI, S. M.; HARRINGTON, M.; DURIAN, D. J. Note: eliminating stripe artifacts in light-sheet fluorescence imaging. **Review of Scientific Instruments**, v. 89, n. 3, p. 1-4, 2018.
- SANTI, Peter A. Light sheet fluorescence microscopy: A review. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v. 59, n. 2, p. 129-138, 2011.
- SCHWARZ, Martin K. *et al.* Fluorescent-protein stabilization and high-resolution imaging of cleared, intact mouse brains. **PLoS ONE**, v. 10, n. 5, p. 1-26, 2015. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0124650>. Acesso em: 9 out. 2021.
- SEE-THROUGH brains. [S.l.: s.n.], 2013. 1 vídeo (4min16s). Publicado pelo canal Nature Video. Disponível em: <https://www.youtube.com/watch?v=c-NMfp13Uug>. Acesso em: 8 out. 2021.
- SELCHOW, Olaf; HUISKEN, Jan. **Light sheet fluorescence microscopy and revolution 3D analyses of live specimens**. [S.l.: s.n.], 2013. Disponível em: [https://www.zeiss.com/content/dam/Microscopy/Products/imaging-systems/Lightsheet%20Z1/photonic\\_intl\\_2013\\_01\\_044\\_HiRes.pdf](https://www.zeiss.com/content/dam/Microscopy/Products/imaging-systems/Lightsheet%20Z1/photonic_intl_2013_01_044_HiRes.pdf). Acesso em: 8 out. 2021.
- SILVESTRI, Ludovico *et al.* Clearing of fixed tissue: a review from a microscopist's perspective. **Journal of Biomedical Optics**, v. 21, n. 8, p. 1-9, Aug. 2016.
- SINDHWANI, Shrey *et al.* Exploring passive clearing for 3D optical imaging of nanoparticles in intact tissues. **Bioconjugate Chemistry**, v. 28, n. 1, p. 253-259, 2017.
- SPENCE, Roy D. *et al.* Bringing CLARITY to gray matter atrophy. **NeuroImage**, v. 101, p. 625-632, Nov. 2014.
- STEFANIUK, Marzena *et al.* Light-sheet microscopy imaging of a whole cleared rat brain with Thy1-GFP transgene. **Scientific Reports**, v. 6, n. 28209, p. 1-9, 2016.

STEFANIUK, Marzena *et al.* A whole-brain imaging-based systems approach to understand origin of addiction in binge-like drinking model. **Neuroscience**, p. 1-38, Mar. 2021. Preprint. Disponível em: <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2021.02.17.431586v2.full.pdf>. Acesso em: 9 out. 2021.

SYED, Abdullah Muhammad *et al.* Three-dimensional imaging of transparent tissues via metal nanoparticle labeling. **Journal of the American Chemical Society**, v. 139, n. 29, p. 9961-9971, 2017.

TIAN, Ting; YANG, Zaoyang; LI, Xiaoguang. Tissue clearing technique: recent progress and biomedical applications. **Journal of Anatomy**, v. 238, n. 2, p. 489-507, 2021.

TOMER, Raju *et al.* Advanced CLARITY for rapid and high-resolution imaging of intact tissues. **Nature Protocols**, v. 9, n. 7, p. 1682-1697, 2014.

TYSON, Adam L.; AKHTAR, Ayesha M.; ANDREAE, Laura C. Optimisation and validation of hydrogel-based brain tissue clearing shows uniform expansion across anatomical regions and spatial scales. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1-10, Dec. 2019.

UEDA, Hiroki R. *et al.* Tissue clearing and its applications in neuroscience. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 21, n. 2, p. 61-79, 2020.

VIGOUROUX, Robin J.; BELLE, Morgane; CHÉDOTAL, Alain. Neuroscience in the third dimension: shedding new light on the brain with tissue clearing. **Molecular Brain**, v. 10, n. 1, p. 1-10, 2017.

WEBER, Maura T. *et al.* CLARITY reveals a more protracted temporal course of axon swelling and disconnection than previously described following traumatic brain injury. **Brain Pathology**, v. 29, n. 3, p. 437-450, 2019.

YANG, Bin *et al.* Single-cell phenotyping within transparent intact tissue through whole-body clearing. **Cell**, v. 158, n. 4, p. 945-958, Aug. 2014.

YU, Tingting *et al.* Elevated-temperature-induced acceleration of PACT clearing process of mouse brain tissue. **Scientific Reports**, v. 7, n. 38848, p. 1-10, 2017.

ZATORRE, Robert J.; FIELDS, R. Douglas; JOHANSEN-BERG, Heidi. Plasticity in gray and white: neuroimaging changes in brain structure during learning. **Nature Neuroscience**, v. 15, n. 4, p. 528-536, 2012.

ZHANG, Lin-Yuan *et al.* CLARITY for high-resolution imaging and quantification of vasculature in the whole mouse brain. **Aging and Disease**, v. 9, n. 2, p. 262-272, 2018.

ZHANG, Ming-Dong *et al.* Neuronal calcium-binding proteins 1/2 localize to dorsal root ganglia and excitatory spinal neurons and are regulated by nerve injury. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 111, n. 12, p. E1149-E1158, Mar. 2014.

ZHANG, Wenli *et al.* Skeletal muscle CLARITY: a preliminary study of imaging the three-dimensional architecture of blood vessels and neurons. **Cell Journal**, v. 20, n. 2, p. 132-137, 2018.

ZHAO, Jiajia *et al.* Current Status of tissue clearing and the path forward in neuroscience. **ACS Chemical Neuroscience**, v. 12, n. 1, p. 5-29, 2021.

ZHENG, Huiyuan; RINAMAN, Linda. Simplified CLARITY for visualizing immunofluorescence labeling in the developing rat brain. **Brain Structure and Function**, v. 221, n. 4, p. 2375-2383, May 2016.



UNIVERSIDADE  
FEDERAL DO CEARÁ



ISBN: 978-65-00-33160-8

