

Protocolo Histológico de Preparação de Nervos para Microscopia Eletrônica de Transmissão

Histologic Protocol for Preparation of Peripheral Nerves for Transmission Electron Microscopy

Carlos Augusto Carvalho de Vasconcelos^{1†}, Valéria Paula Sassoli Fazan^{2†}, Kenneth Charles Moore[†], Marcelo Moraes Valença¹*

RESUMO

A microscopia eletrônica de transmissão é ferramenta útil na realização de investigações de nervos, humanos, tanto em condições normais, quanto na presença de neuropatias. Modelos experimentais de neuropatias têm sido cada vez mais úteis na elucidação dos processos fisiopatológicos que acometem os nervos comprometidos e, assim, a utilização da microscopia eletrônica de transmissão tem apresentado papel fundamental no entendimento desses processos. A utilização de modelos animais se faz necessária pois tentamos reproduzir em laboratório a forma mais original desses achados clínicos. Dessa forma, é de extrema importância a obtenção de material biológico o mais íntegro e intacto possível, sem perder suas características originais. A presente revisão demonstra uma das metodologias possíveis para a obtenção de material biológico, particularmente de nervos, com eficácia e bom uso da microscopia eletrônica para os estudos dos modelos experimentais de neuropatias.

PALAVRAS-CHAVE: Nervos sensitivos e motores, processamento histológico, sistema nervoso periférico, microscopia eletrônica de transmissão.

¹Departamento de Neuropsiquiatria, Divisão de Neurologia e Neurocirurgia. Programa de Pós-Graduação em Neuropsiquiatria e Ciências do Comportamento, Universidade Federal de Pernambuco, 50.670-901, Recife, Brasil.

[†]Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami – LIKA/UFPE, Setor de Microscopia Eletrônica. *E-mail: cacv@ufpe.br

²Departamento de Cirurgia e Anatomia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Av. Bandeirantes, 3.900, 14.049-900, Ribeirão Preto SP, Brasil. [†]Central Microscopy Research Facility, The University of Iowa, 85 Eckstein Medical Research Building, Iowa City, IA, 52241, USA.

ABSTRACT

The transmission electron microscopy is a valuable tool for the investigation of peripheral nerves either under normal conditions or in the presence of peripheral neuropathies. Experimental models of neuropathies are useful in the elucidation of the physiopathological steps of the diseases and transmission electron microscopy techniques play an important role in this process. The use of experimental models is mandatory once there is a need for reproducing in the laboratory the clinical findings in their most original form possible. Thus, the obtainment of a well preserved and intact biological material is crucial. The present review discuss one of the possible methods for the obtainment of a biological material of good quality, particularly nerves, to be investigated under transmission electron microscopy in order to study experimental models of peripheral neuropathies.

KEY WORDS: Sensitive and motor peripheral nerves, histological processing, peripheral nervous system, transmission electron microscopy.

1. INTRODUÇÃO

A divisão do sistema nervoso humano é baseada na sua topografia: o sistema nervoso central (cérebro e medula espinal, o chamado neuro-eixo) e o sistema nervoso periférico (12 pares de nervos cranianos, 31 pares de nervos espinais ou raquidianos, plexos autonômicos, gânglios e as terminações nervosas livres). Atualmente o sistema nervoso entérico foi incluído nessa classificação, chamado de um “pequeno cérebro”, contendo uma quantidade de neurônios igual a da medula espinhal (Bear et al., 2008). O sistema nervoso do rato é semelhante ao humano, uma diferença macroscópica é que enquanto a medula espinal humana se estende até o início da região lombar, a do rato quase alcança o sacro. Em termos de comparação, a medula espinal do rato é proporcionalmente mais extensa que a humana. A origem de todos os nervos cranianos do rato se dá em nível da medula oblonga ou bulbo, o que facilita sua identificação e coleta, sendo o rato, portanto, um excelente modelo experimental para

investigação de neuropatias (Varejão et al, 2004; Jerônimo et al., 2005; Vasconcelos et al., 2009).

As características marcantes, principais e mais importantes para a manipulação histológica adequada dos tecidos em diferentes espécimes animais é a reprodução, em condições experimentais, do mesmo padrão em que se encontram os tecidos biológicos “*in vivo*”, ou seja, na forma natural. Para isso a manipulação do tecido que se pretende estudar deve ser cuidadosa, com a tentativa de se controlar variáveis como o pH e a osmolaridade, evitando desnaturação, autólise tecidual ou até mesmo lesão macroscópica (Souza, 2007).

2. ESPÉCIMES E DISSECAÇÃO

Alguns animais de laboratório mais usados em experimentação e em modelos experimentais de neuropatias são: Camundongos (*Mus musculus*); Ratos (*Rattus norvegicus*); Cobaias (*Cavia porcellus*) e Coelhos (*Oryctolagus cuniculus*). A tabela abaixo classifica os mesmos.

ANIMAL	CAMUNDONGO	RATO	COBAIA	COELHO
FILO	<i>Chordata</i>	<i>Chordata</i>	<i>Chordata</i>	<i>Chordata</i>
SUB-FILO	<i>Vertebrata</i>	<i>Vertebrata</i>	<i>Vertebrata</i>	<i>Vertebrata</i>
CLASSE	<i>Mammalia</i>	<i>Mammalia</i>	<i>Mammalia</i>	<i>Mammalia</i>
ORDEM	<i>Rodentia</i>	<i>Rodentia</i>	<i>Rodentia</i>	<i>Lagomorpha</i>
FAMÍLIA	<i>Muridae</i>	<i>Muridae</i>	<i>Caviidae</i>	<i>Ochotonidae</i>
GÊNERO	<i>Mus</i>	<i>Rattus</i>	<i>Cavia</i>	<i>Oryctolagus</i>
ESPÉCIE	<i>Musculus</i>	<i>Norvegicus</i>	<i>Porcellus</i>	<i>Cuniculus</i>

São mamíferos de pequeno e médio porte, de fácil criação e manutenção em biotérios, com gestação geralmente rápida. Assim, podemos trabalhar com variáveis controladas, tais como tamanho da ninhada, gerações de filhotes, sexo, peso e idade. A dissecação para retirada dos fragmentos teciduais que se deseja estudar é geralmente cirúrgica, e deve se tomar extremo cuidado para não esmagar ou prensar o tecido a ser estudado, danificando assim a estrutura celular da amostra. O tecido nervoso é muito frágil quanto ao manuseio (Varejão 2003) e por isso, o desejável é que o mesmo seja fixado “*in locu*”, antes da sua dissecação e remoção do animal.

3. FIXAÇÃO

A fixação tem por objetivo a preservação das estruturas celulares, bem como a proteção das lesões decorrentes dos processos subsequentes do processamento histológico. Os fixadores podem ser físicos ou químicos. A fixação química é o procedimento de escolha para o preparo do tecido nervoso periférico. É o processo pelo qual é usada uma solução fixadora, através da perfusão intravascular ou da imersão do tecido “*in situ*”, ou após retirada rápida do animal. para tentar preservar o tecido na forma mais real possível “*in vivo*”, bem como a sua estrutura morfológica macro e microscópica, estabilizando e coagulando, camadas lipídicas, membranas e formando ligações intra e intermoleculares estáveis. A fixação física pode ser obtida submetendo-se a amostra a um congelamento rápido com nitrogênio líquido

(criofixação). Esta é comumente utilizada para reações imunohistoquímicas no sistema nervoso central. No caso de nervos periféricos, as soluções fixadoras são mais eficientes. São elas:

3.1 ALDEÍDO GLUTÁRICO (GLUTARAL-DEÍDO)

É a substância fixadora mais utilizada, preserva a cromatina, firma as ligações das pontes cruzadas das proteínas e não inibe a atividade enzimática nos tecidos, sendo utilizado em técnicas imuno-histoquímicas. É usado na concentração de 2,5%, diluído em tampão cacodilato de sódio 0,2 M. Apresenta custo elevado, porém para fixar nervo por imersão é excelente, como no caso do nervo auditivo do rato ou cobaia (Vasconcelos, 2005) ou de nervos muito pequenos (Fazan et. al., 1997, Fazan et al., 2001; Fazan et. al., 2002).

3.2 TETRÓXIDO DE ÓSMIO (ÁCIDO ÓSMICO OU ÁCIDO PERÓSMICO)

Em microscopia eletrônica de transmissão é usado como um pós-fixador, encontrado na forma de cristais ou solução aquosa, altamente volátil e tóxico. Fixa e estabiliza extraordinariamente gorduras e fosfolípidos das membranas, formando um éster insolúvel. Oxida rapidamente e torna o material escuro devido às ligações com átomos de carbonos, não precipita proteínas. A penetração tecidual é pequena, daí a importância de se obter fragmentos bem seccionados e pequenos. Evidencia bem as mitocôndrias, membranas lipoprotéicas e

principalmente a bainha de mielina dos nervos. Para o manuseio desta substancia é obrigatório o uso de capela de exaustão e escuridão (Souza, 2007).

3.3 PARAFORMALDEÍDO (TRIOXIMETILENO) 4%

É um pó solúvel em água ligeiramente alcalino. Muito utilizado na microscopia de luz. Menos eficiente nas ligações das pontes cruzadas, porém possui uma fixação adequada às amostras. Podem ocorrer variações de pH na solução. Quando misturado ao glutaraldeído a 2,5% é formada a Solução de Karnovsky, muito utilizada para fixar nervo por perfusão intravascular e diminuir o custo do procedimento.

3.4 ACETATO DE URANILA

Em microscopia eletrônica de transmissão, o acetato de uranila é utilizado como meio de contraste, não exatamente um corante. Esta substância se fixa aos radicais fosfatos de vários tipos de moléculas, prende-se também aos grupos carboxilas e aminas livres, ela facilmente se precipita. O tratamento com uranila induz intensa extração de glicogênio citoplasmático. Outra solução bastante usada é o corante de Reynold's (citrato de chumbo), para aumentar o contraste das membranas à microscopia eletrônica de transmissão.

4. SOLUÇÕES TAMPÃO

Em microscopia eletrônica de transmissão é fundamental a manutenção e o controle do pH das soluções fixadoras. A eficiência do sistema tampão varia com o pH e a interferência ou não de outros fatores, como solubilidade, penetração tecidual, resistência à oxidação. Os diferentes sistemas tampões são utilizados para manter o controle de um determinado pH nas soluções fixadoras, etapas de lavagem do material, reações, entre outras (Souza, 2007). Principais são:

4.1 TAMPÃO CACODILATO DE SÓDIO

Seu pH de tamponamento encontra-se na faixa de pH de 6,4 a 7,4. Possui grande vantagem sobre os demais com relação à fixação de materiais biológicos pois permite a estocagem do material nessa solução por longos períodos de tempo, sem deteriorar.

4.2 TAMPÃO FOSFATO DE SÓDIO

É o mais fisiológico porque é encontrado nas células na forma de fosfatos inorgânicos e éster de fosfato. Não é tóxico e o pH desse tampão apresenta pouca variação em diferentes temperaturas.

4.3 TAMPÃO TRIS

Muito usados em técnicas citoquímicas, apresentam-se em duas formas: TRIS-Maleato e o TRIS-HCl. Abaixo do pH 7,5 possuem uma diminuída capacidade de tamponamento.

4.4 TAMPÃO ZWITERIÔNICOS

São aminas ou aminoácidos N-substituídos que funcionam como tampão para os íons hidrogênio dentro de um pH entre 6,15-8,35. Bom para cultura de células e pouco usado em microscopia eletrônica de transmissão pela apresentação de densidade citoplasmática bastante acentuada.

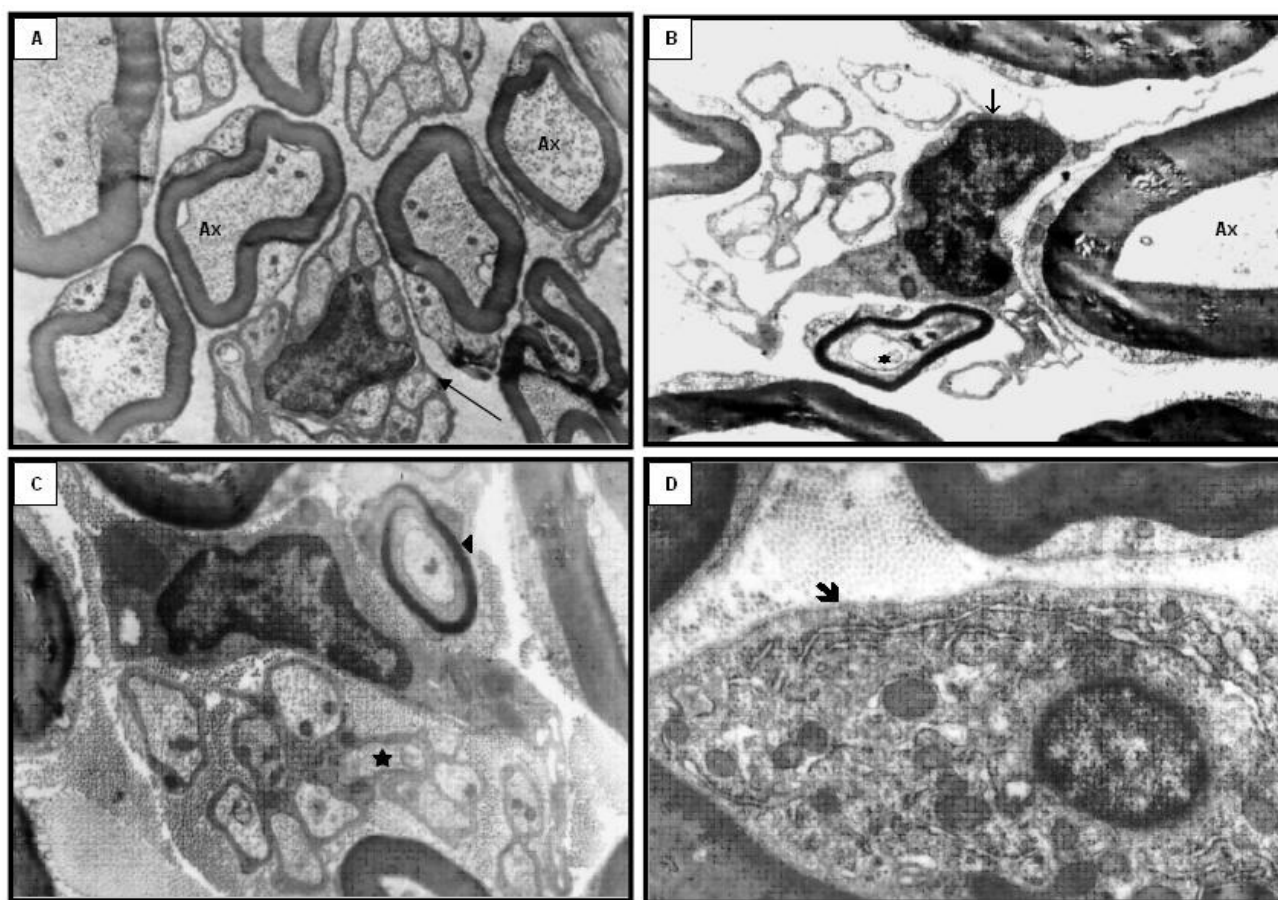
5. DESIDRATAÇÃO, INCLUSÃO, ULTRA-MICROTOMIA E CONTRASTAÇÃO

Uma das técnicas de desidratação pode ser realizada com acetona 50% por 20 minutos, seguida de acetona 70% por mais 20 minutos. O material pode ficar "over night" nessa solução ou o procedimento pode seguir com acetona 90% por 20 minutos e terminar com acetona 100% em 3 trocas de 15 minutos cada. Pode ser também usado etanol, dependendo do tipo de resina que será utilizada para o procedimento de inclusão. A infiltração ou inclusão/emblocamento pode ser feita

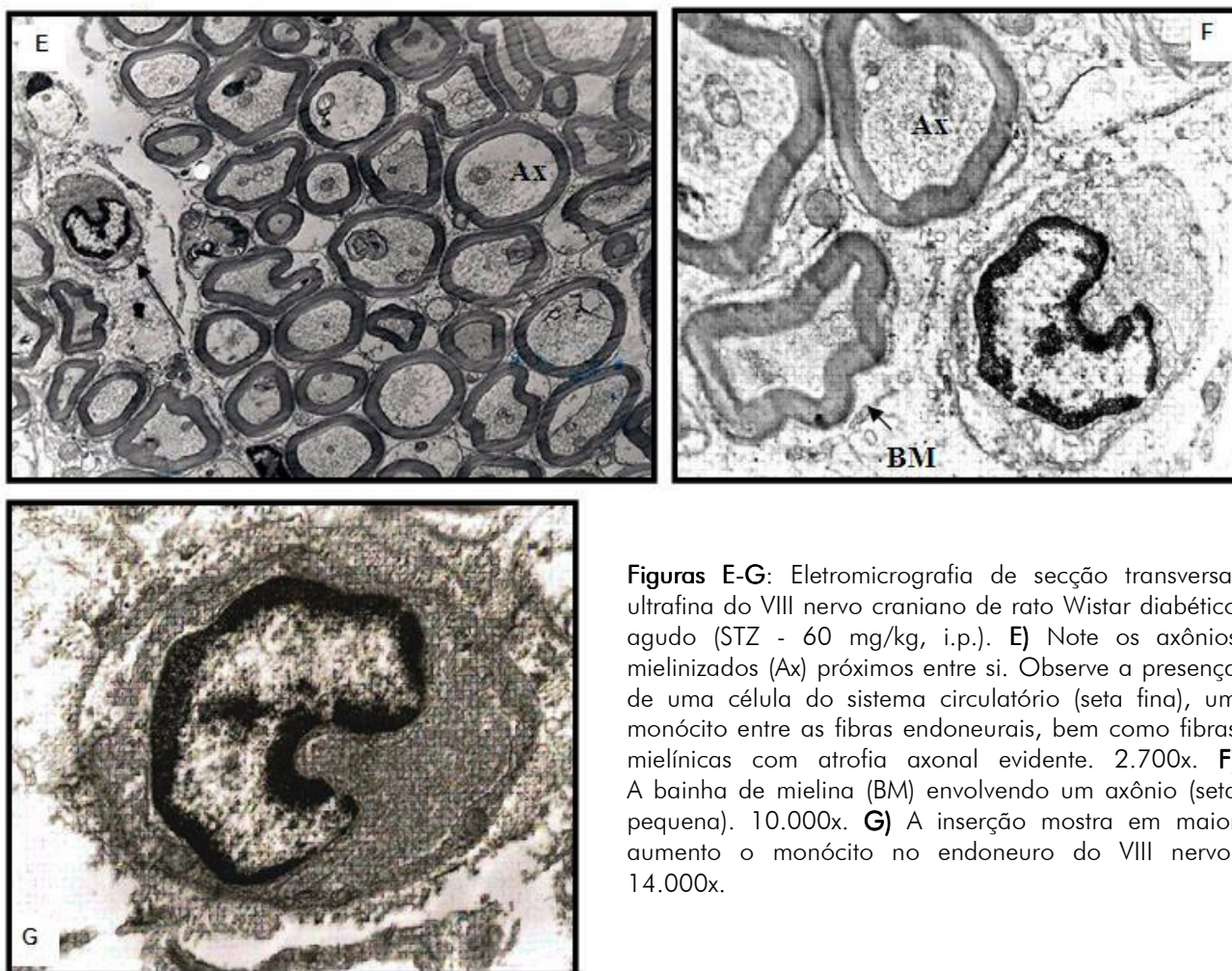
com EPON 812® - EMS/USA. Na microtomia, os cortes transversais semifinos dos nervos são realizados com navalhas de vidro, numa espessura que pode variar de 0,5 a 1,0 μm . O material obtido é corado com azul de toluidina a 1% e, montados entre lâmina e lamínula, pode ser observado em microscopia de luz. Para a ultramicrotomia, os cortes ultrafinos são realizados numa espessura entre 50 e 80 nm e são montados

em grades de cobre, para observação na microscopia eletrônica de transmissão. Esses cortes são contrastados com acetato de uranila a 5% por 1 hora, envolto por papel alumínio, pois é a solução é fotossensível. Em seguida, utiliza-se a solução de citrato de chumbo por 5 minutos, lavando, em seguida, em água destilada 3 vezes por 10 minutos.

6. ELETROMICROGRAFIAS



Figuras A-D: Eletromicrografias de secções transversais ultrafinas do nervo isquiático de ratos Wistar controles e diabéticos agudos (STZ - 60 mg/kg, i.p.). A) Note os axônios mielinizados (Ax) no grupo controle. Observe a presença de fibras amielínicas com sua célula de Schwann e núcleo bem evidente (seta fina). 8.000x. B) No grupo diabético um macrófago não ativado (seta pequena) emite seus pseudópodes entre as fibras mielínicas. Note a presença de um vacúolo no axoplasma de uma fibra mielínica fina (asterisco). 8.000x. C) A imagem mostra desmielinização de uma fibra mielínica fina (cabeça de seta) e um possível espessamento da membrana basal das fibras amielínicas (estrela) no grupo diabético. Note a presença do macrófago entre as fibras nervosas. 10.000x. D) Célula de Schwann (seta curta) com seu núcleo proeminente e muitas organelas citoplasmáticas no grupo diabético (citoplasma da célula de Schwann reativo). 14.000x.



Figuras E-G: Eletromicrografia de secção transversal ultrafina do VIII nervo craniano de rato Wistar diabético agudo (STZ - 60 mg/kg, i.p.). **E)** Note os axônios mielinizados (Ax) próximos entre si. Observe a presença de uma célula do sistema circulatório (seta fina), um monócito entre as fibras endoneurais, bem como fibras mielínicas com atrofia axonal evidente. 2.700x. **F)** A bainha de mielina (BM) envolvendo um axônio (seta pequena). 10.000x. **G)** A inserção mostra em maior aumento o monócito no endoneuro do VIII nervo. 14.000x.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os procedimentos aqui descritos são utilizados de rotina no preparo de nervos para avaliação em nível de microscopia eletrônica de transmissão, mostrando resultados satisfatórios. As estruturas endoneurais se apresentam preservadas de maneira que pode-se observar as estruturas de interesse em alta resolução.

8. AGRADECIMENTOS

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq.

9. REFERÊNCIAS

- Bear, MF; Connors, BW; Paradiso, MA. Neurociências - Desvendando o Sistema Nervoso. Porto Alegre, 2008: Ed. ArtMed, 896p, 3ª Edição.
- Fazan, VP; Salgado, HC; Barreira AA. A descriptive and quantitative light and electron microscopy study of the aortic depressor nerve in normotensive rats. Hypertension. 1997 Sep;30(3 Pt 2):693-8.
- Fazan, VP; Ma, X; Chapleau, MW; Barreira, AA. Qualitative and quantitative morphology of renal nerves in C57BL/6J mice. Anat Rec. 2002 Dec 1;268(4):399-404.

- Jerônimo, A; Jerônimo, CA; Rodrigues Filho, AO; Sanada, LS; Fazan, VP. Microscopic anatomy of the sural nerve in the postnatal developing rat: a longitudinal and lateral symmetry study. *J Anat.* 2005 Jan;206(1):93-9.
- Salgado, HC; Fazan Júnior, R; Fazan, VP; Da Silva, VJ; Barreira, AA. Arterial baroreceptors and experimental diabetes. *Ann N Y Acad Sci.* 2001 Jun;940:20-7.
- Souza, W. Técnicas de Microscopia Eletrônica Aplicadas às Ciências Biológicas. Sociedade Brasileira de Microscopia e Microdiálise/SBMM, Rio de Janeiro, 2007, 1:1-357.
- Varejão, ASP. Regeneração do nervo periférico: recuperação funcional num modelo experimental. Tese de Doutorado. Área: Neurociências da Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Vila Real, Portugal, 2003, 302p.
- Varejão, ASP; Melo-Pinto, P; Meek, MF; Filipe, VM; Bulas-Cruz, J. Methods for the experimental functional assessment of rat sciatic nerve regeneration. *Neurol Res* 2004, 26:186-194.
- Vasconcelos, CAC; Barreira, AA. Síndrome de Landry-Guillain-Barré-Strohl, neurite alérgica experimental e o comprometimento do VIII par de nervo craniano. *Neurobiologia* 2003, 66:37-42.
- Vasconcelos, CAC. Aspectos descritivos e quantitativos da anatomia macroscópica e microscópica do nervo vestibulo-coclear de cobaias. Dissertação de Mestrado. Área de concentração: Neurologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP, 2005.
- Vasconcelos, CAC, Fazan VPS, Valença MM. Neuropatia Diabética, Desnutrição e Sistema Nervoso. *Neurobiologia* 2009, 72:129-136.

