

Parte II – Protocolos e métodos de trabalho em doença de Chagas experimental

17. Coleta e processamento de órgãos e tecidos para avaliação da infecção

Tania C. Araújo-Jorge
Solange L. de Castro
(Orgs.)

SciELO Books / SciELO Livros / SciELO Libros

JORGE, TCA., and CASTRO, SL., orgs. *Doença de chagas: manual para experimentação animal* [online]. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2000. 368 p. Antropologia e Saúde collection. ISBN 85-85676-75-2. Available from SciELO Books <<http://books.scielo.org>>.

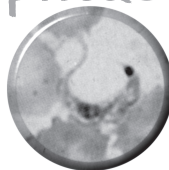


All the contents of this work, except where otherwise noted, is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 3.0 Unported.

Todo o conteúdo deste trabalho, exceto quando houver ressalva, é publicado sob a licença Creative Commons Atribuição - Uso Não Comercial - Partilha nos Mesmos Termos 3.0 Não adaptada.

Todo el contenido de esta obra, excepto donde se indique lo contrario, está bajo licencia de la licencia Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-CompartirIgual 3.0 Unported.

Capítulo 17



Coleta e Processamento de Órgãos e Tecidos para Avaliação da Infecção

Andréa Pereira de Souza, Suzana Côrte-Real Faria, Cláudia M. L. M. Coutinho,
Maria de Nazaré C. Soeiro & Claude Pirmez

O estudo dos tecidos dos animais infectados é um campo extremamente amplo e passível de diferentes aplicações. As primeiras grandes descobertas a respeito da doença de Chagas aguardaram as análises histopatológicas meticolosas dos dez primeiros casos letais que Carlos Chagas diagnosticou e enviou a Gaspar Vianna, publicadas em 1911; desde então lesões em modelos experimentais correspondentes às lesões humanas têm sido muito estudadas (ver Capítulo 9).

As principais aplicações são no estudo histopatológico clássico de cortes parafinados corados para observação em microscopia óptica, no estudo citopatológico por microscopia eletrônica e no estudo imunopatológico por técnicas especiais de imunocitoquímica. Descreveremos aqui os protocolos mais comumente utilizados.

O cuidado especial que se deve ter é quanto ao manuseio do animal infectado pois, além do sangue ser potencialmente infectivo para o pesquisador e o técnico, os demais líquidos corporais e os tecidos também podem conter parasitas viáveis que contaminam as soluções de lavagem nas quais se processam os tecidos até sua fixação. Portanto, todas as normas de segurança devem ser seguidas à risca (ver Capítulo 8).

A análise macroscópica do animal e dos órgãos coletados deve ser cuidadosa. O mau *estado geral* do animal caracteriza-se por apatia, perda de peso e pêlos, gengivite ulcerada, palidez das mucosas, dispnéia e edema generalizado. A *autópsia* revela edema do tecido subcutâneo e derrame líquido, claro e transparente, nas cavidades pericárdica, pleural e abdominal (ascite). Pode-se *analisar estes líquidos* quanto à presença de formas tripomastigotas do *Trypanosoma cruzi*, após concentração por microhematócrito ou por hemocultura. A pesagem e observação do volume dos órgãos, sobretudo baço e coração, revelam sua congestão e, ao corte, as cavidades átrio-ventriculares podem apresentar nítidos sinais de dilatação e presença ocasional de trombos.

17.1 Coleta e Processamento de Órgãos para Microscopia Óptica

17.1.1 Coleta para histologia convencional em parafina

Material

- equipamento de proteção para o trabalho com *T. cruzi* (ver Capítulo 8)
- câmara de anestesia com clorofórmio ou éter (vidro com tampa larga e algodão no fundo)
- placa de cortiça (para a fixação do animal)
- solução salina fisiológica para lavagem dos órgãos
- álcool a 70%
- placa de Petri com solução salina para a lavagem
- pipetas Pasteur para troca da salina de lavagem
- recipientes de descarte de líquidos e de carcaças com as devidas soluções desinfectantes
- solução fixadora (formalina 10% ou fixador de Millonig-Rosman)
- tesoura de ponta afiada
- pinças anatômica e dente de rato
- pinça de relojoeiro
- recipiente para a fixação do material

Procedimento

- colocar o camundongo na câmara de anestesia;
Obs: para o sacrifício dos animais existe uma tendência crescente à substituição da anestesia por éter ou clorofórmio pela decaptação ou asfixia com CO₂, que parecem ser mais indolores.
- fixá-lo na placa de cortiça, em cruz (cuidado com as agulhas usadas para fixar os animais: os acidentes de laboratório mais freqüentes ocorrem pela manipulação inadequada de agulhas);
- aplicar jatos de álcool a 70% no corpo do animal antes de dissecá-lo;
- abrir primeiramente a pele do animal e em seguida o peritônio (uma pinça para cada revestimento);
- retirar os órgãos evitando seu pinçamento ou esmagamento;
- lavar os órgãos com solução salina, pois excesso de sangue e de muco na sua superfície formam um filme protetor, impedindo uma penetração adequada do fixador;
- recortar o órgão em fatias delgadas para que o fixador penetre rápida e homogênea. A espessura depende muito do material a ser processado, bem como do fixador de escolha (poder de penetração e velocidade de difusão deste);
Obs: o cérebro deve ser fixado por inteiro e somente depois clivado. Por outro lado, as peças devem ser pequenas (1 a 2 mm de espessura) sempre que se empregue um fixador pouco penetrante (ex. ácido ósmico), mas podem ter de 0,5 a 1 cm quando se utilizam fixadores com maior poder penetração (ex. formol, Bouin, Zenker). O importante é assegurar-se que o fixador atue de maneira uniforme sobre toda a peça, sendo aconselhável evitar-se que a peça fique apoiada no fundo do frasco (colocar uma camada de cerca de 1 cm de algodão no fundo do frasco, ou mantê-la suspensa no frasco amarrando com um fio). O tempo mínimo de fixação varia muito conforme a peça e o tipo de fixador, e não há limite máximo para fixação; o tecido pode permanecer por tempo indeterminado até seu processamento. O material deve ser colocado em um recipiente que permita que o volume do líquido fixador seja de dez a vinte vezes maior que o do espécime.
- para se calcular o índice cardíaco, o coração deve ser pesado e fixado *in totum*. O índice pode ser calculado a partir da relação percentual entre o peso do coração e o peso do animal [(peso do coração/peso corporal) x 100].

17.1.2 Coleta para histoquímica em cortes congelados obtidos em criostato

Material

- tubos de criopreservação ou formas para congelamento
Obs: existem no mercado formas de vários tamanhos, descartáveis; pode-se também preparar forminhas cilíndricas de papel laminado usando como forma a extremidade arredondada de uma pipeta ou de um tubo de ensaio, a depender do diâmetro do órgão ou tecido a ser congelado, e adaptá-las dentro de tubos de congelamento; outra opção é a embalagem plástica de comprimidos.
- material de dissecação idêntico ao usado para coleta para histopatologia convencional; todo o material que receberá os órgãos a ser congelados (placas de Petri, salina, etc.) deverá estar em banho de gelo
- crioprotetor (*optimal cutting temperature compound* - OCT)
- cuba (garrafa térmica) com nitrogênio (N₂) líquido ou com gelo seco

Procedimento

- remover o órgão inteiro como descrito no item 17.1.1 e lavar em salina gelada, drenar o excesso de salina e clivar o órgão em fragmentos de 2 a 3 mm de espessura (a largura vai depender da forma);
Obs: órgãos pequenos como *timo* não precisam ser clivados; emblocar em posição anatômica com a face externa para baixo; órgãos maiores como *baço* e *figado* devem ser cortados transversalmente e emblocados com a face do corte voltada para baixo; órgãos de tamanho médio como *coração* ou *rim* devem ser cortados longitudinalmente (partir em duas metades) e emblocados em posição anatômica, com a face externa voltada para baixo.
- colocar o pedaço do tecido no molde apropriado com a face de corte voltada para baixo e cobrir com crioprotetor (OCT, Ames Co., Elkhart, Indiana);
- tampar o tubo e congelar em N₂ líquido;
- cortar em criostato. Para iniciar os cortes deve-se esperar que a temperatura do tecido equilibre com a temperatura do criostato (-25 a -30°C), caso contrário, será difícil a obtenção de cortes finos;
Obs: o tecido pode ser estocado a longo prazo em freezer a -70°C ou em N₂ líquido, ou a curto prazo em freezer a -20°C. Usar gelo seco ou N₂ líquido para transportar o tecido do freezer para o criostato, para evitar descongelamento. Terminados os cortes, cobrir a face exposta do tecido emblocado com uma gota de OCT, congelar, e guardar. Esse procedimento evita o ressecamento do tecido no freezer ou N₂ líquido.

17.1.3. Processamento dos tecidos para microscopia óptica

17.1.3.1. Processamento de tecidos para histopatologia convencional por microscopia óptica

a. Desidratação e diafanização

Material

- tecidos fixados em formalina ou fixador de Millonig
- cestinhas para conter o material identificado
- álcool em concentrações crescentes (70, 80, 90% e absoluto)
- agente diafanizador: xilol e benzeno são mais freqüentemente utilizados

Procedimento

- após a fixação, remover o excesso de líquido fixador; para isso é necessário lavar em água corrente por um período de 30 min a 1h;

- passar os tecidos em soluções alcoólicas de concentrações crescentes, até o álcool absoluto, onde a água é totalmente removida. São seis banhos sucessivos de 1h cada, nas seguintes soluções: álcool 70, 80, 90%, álcool absoluto I, II e III;
- para diafanização, passar o material na solução diafanizadora absoluta (xilol), pois o álcool, como a água, não é miscível com a parafina, havendo assim, a necessidade de ser substituído por um reagente solvente da parafina. São mais três banhos sucessivos de 1h cada nas seguintes soluções: xilol I, II e III.

b. Infiltração e inclusão em parafina

Material

- parafina filtrada
- formas para a inclusão
- bico de Bunsen
- freezer para colocar o material incluído na forma
- estufa na faixa de 56 a 58°C para derreter a parafina
- pinça

Procedimento

- transferir o material do agente diafanizador para a parafina derretida, mantida suficientemente aquecida. A parafina com o ponto de fusão entre 56 e 58° é a desejada para os trabalhos de rotina. A parafina de inclusão deve ser nova e aquecida em torno de 5° acima do seu ponto de fusão. Para infiltração do material por parafina usam-se dois banhos sucessivos de 1h cada nas soluções parafina I e parafina II;
- a inclusão consiste em colocar, através de pinça aquecida, os tecidos previamente infiltrados, com a superfície clivada no fundo da forma preenchida com parafina derretida (solução de parafina III);
Obs: se a parafina de inclusão não for da marca Reagen, deve ser adicionada cera de abelha (aditivo). Outra opção é o uso de pastilhas da Merck; neste caso não há necessidade de adição de cera.
- depois da inclusão, as formas devem ser resfriadas no freezer ou chapa refrigerada; logo após são obtidos blocos com algumas pressões na forma.

c. Microtomia e montagem dos cortes na lâmina

Material

- micrótomo
- porta-bloco
- navalha bem amolada ou descartável
- banho-maria a 45°C
- pinça
- cubas de gelo
- lâminas bem limpas e desengorduradas
- albumina 30%
- pincel com cerdas macias

Procedimento

- montar o bloco no porta-bloco antes de seccioná-lo. A face do bloco a ser cortada deverá ser plana e conter bastante parafina para que se possa desbastá-la até chegar o tecido;
- regular o micrótomo em 5 mm, pois as secções com essa rotina são em geral satisfatórias;
- resfriar bem a superfície do bloco com um cubo de gelo antes de ser cortado, para evitar cortes ressecados;
- operar o micrótomo com movimentos delicados, contínuos e relativamente lentos, para se obter fitas de cortes uniformes;

- estender ou espalhar os cortes que se apresentam ligeiramente enrugados em uma cuba em banho-maria.

Para espalhar os cortes na lâmina faz-se o seguinte procedimento:

- colocar um segmento da fita de cortes, com auxílio de um pincel de cerdas macias, para flutuar na superfície da água aquecida (10°C abaixo do ponto de fusão da parafina);
- transferir ou “pescar” os cortes para as lâminas revestidas com albumina, que tem propriedades adesivas e propicia uma melhor fixação do corte na lâmina;
- colocar as lâminas em uma placa aquecida ou em estufa a 55°C, para a secagem da água e coagulação do filme-adesivo;
- manter o material à temperatura ambiente, protegido da poeira até a desparafinização.

d. Desparafinização e rehidratação

Material

- xilol absoluto
- álcool em diferentes concentrações (70, 80, 90% e absoluto)
- água destilada

Procedimento

- antes de corar os cortes, remover a parafina residual. Para isso, usualmente se emprega-se o xilol como solvente. As lâminas passam por banhos sucessivos de 3 min cada nas seguintes soluções: xilol I, II e III;
- se a solução corante a ser usada for aquosa, os cortes são hidratados por passagem seriada em soluções alcoólicas de concentrações decrescentes. Durante a reidratação dos cortes as lâminas não devem ser deixadas secas por completo. As lâminas passam por banhos sucessivos de 3 min cada nas seguintes soluções: álcool absoluto I, II e III, álcool 90% , 80%, 70% e água destilada.

e. Coloração por hematoxilina e eosina

Material

- hematoxilina de Harris
- eosina Y
- álcool clorídrico 1%
- água acética 1%
- álcool em diferentes concentrações (70, 80, 90% e absoluto)
- xilol absoluto

Procedimento

- a hematoxilina é aquosa, por isso deve-se mergulhar o material na água para que ocorra a oxidação. A hematoxilina de Harris cora regressivamente. O álcool clorídrico 1% serve para diferenciar o corte, pois a hematoxilina de Harris supercora o tecido. A água acética 1% serve para “segurar” a eosina no tecido. A seqüência de coloração é a seguinte: hematoxilina (15 min) → álcool clorídrico 1% (três mergulhos) → água corrente (até ficar violeta) → eosina (2,5 min) → água acética 1% (três mergulhos);
- o material deve ser desidratado em álcool, pois este remove a água e atua como um agente diferenciador em caso de excesso de corante. São banhos sucessivos de 3 min cada nas seguintes soluções: álcool 70, 80, 90%, álcool absoluto I, II e III;
- no clareamento, o xilol torna o tecido transparente. São banhos sucessivos de 3 min cada nas seguintes soluções: Xilol I, II e III.

f. Montagem dos cortes entre lâmina e lamínula

Material

- pinça
- bálsamo do Canadá
- lamínula (com o tamanho apropriado para o corte e bem limpa em solução sulfocrômica)

Procedimento

- retirar, cuidadosamente, sem estragar o tecido, uma lâmina do último banho de xilol, com o auxílio de uma pinça. Permitir um escoamento do excesso do xilol;
- manter a lâmina em uma posição moderadamente inclinada, colocar uma gota de bálsamo do Canadá próximo à borda do corte;
- colocar a lamínula de tamanho apropriado, em um ângulo próximo à borda da lâmina, e permitir que a mesma se deposite sobre o corte. Deve-se tomar cuidado para evitar a formação de bolhas de ar, presas entre a lâmina e lamínula. Caso isto ocorra, as bolhas podem ser retiradas, aplicando-se uma pressão leve sobre a lamínula, com o auxílio de uma pinça. Caso as bolhas persistam, recolocar a lâmina no banho de xilol e quando a lamínula for descolada, remontar o corte;
- após a montagem do corte entre a lâmina e a lamínula, a lâmina deve ser levada ao microscópio óptico a fim de verificar aparecimentos de “dentes”, “microdentes”, ressecamento e artefatos. A depender dos defeitos encontrados, um novo corte do bloco de parafina deverá ser feito.

17.1.3.2 Interpretação das lâminas

A análise histopatológica exige prática e conhecimento de histologia, a fim de que as características a serem observadas nos tecidos sejam bem destacadas. É essencial o conhecimento da histologia normal dos órgãos que serão estudados.

A atenção do observador se concentra em identificar:

- ninhos de parasitas (células com amastigotas em proliferação, e a caracterização do tipo celular infectado)
- focos de infiltrados inflamatórios nos diferentes tecidos dos órgãos em estudo: presença de células polimorfo- ou mononucleares infiltrantes, sua distribuição topográfica na histologia característica do órgão e a composição citológica do infiltrado. O infiltrado pode ser focal, zonal, ou difuso e acúmulos de macrófagos podem até chegar a formar nódulos
- edema
- congestão vascular
- neurite
- necrose focal
- fibrose, hipertrofia e atrofia
- destruição (degeneração) tissular

Após a análise e descrição qualitativa das características histopatológicas encontradas nas lâminas, pode ser feita uma *análise quantitativa*, tanto do *parasitismo tissular* como da *inflamação tissular*. Nos dois casos pode-se analisar:

- a frequência percentual de encontro de ninhos e/ou de focos inflamatórios nos cortes de diferentes animais segundo o grupo experimental estudado
- o número de ninhos de parasitas e/ou de focos inflamatórios por unidade de área observada, expresso em números absolutos ou relativos, de uma a quatro cruzes
- o número de células componentes dos ninhos ou dos infiltrados
- as lesões fibrosas e inflamatórias podem ser graduadas numa escala de cruzes:

- + suave e focal
 - ++ moderadamente difusa e focal
 - +++ difusa severa
- as lesões inflamatórias podem também ser graduadas em extensão de inflamação:
 - 0 ausente
 - + rara e fraca
 - + ocasional e atenuada
 - ++ freqüente e intensa
 - +++ freqüente e muito intensa

17.1.4 Processamento de Tecidos para Imunohistoquímica em Cortes Congelados

O congelamento de órgãos para análises por microscopia óptica é indicado quando se pretende realizar reações imunohistoquímicas, tanto enzimáticas como de fluorescência. A vantagem deste procedimento em reação às técnicas histoquímicas convencionais é a preservação das moléculas, uma vez que os tecidos não passam por agressões físicas (altas temperaturas) ou químicas (uso de fixadores). A seguir apresentaremos os protocolos de preparo de soluções e de realização destas técnicas.

17.1.4.1 Revestimento das lâminas

Material

- lâminas
- gaze
- papel alumínio
- soluções de revestimento: poli-*L*-lisina 0,005% em tampão TRIS HCl 10 mM; ou gelatina 1% - alumen aquosa

Procedimento

- mergulhar *overnight* as lâminas em uma solução de éter:álcool absoluto (1:1);
 - secar bem com gaze;
 - no caso de gelatina, mergulhar rapidamente as lâminas; no caso de poli-*L*-lisina mergulhar por 15 min;
 - escorrer e deixar secar na posição vertical, no suporte de lâminas;
 - embrulhar em papel alumínio para proteger contra poeira (de dez em dez), identificar e datar por fora com cuidado para não tocar na superfície da lâmina;
- Obs: uma opção barata que também funciona é o uso de uma solução com cola plástica (tipo "Polar"): misturar um frasco pequeno de cola a 500 ml de água destilada, homogeneizando bem a solução, e mergulhar rapidamente as lâminas nesta solução, que pode ser usada várias vezes e deve ser guardada em geladeira.

17.1.4.2 Imunoperoxidase indireta em cortes congelados

Material

- tampão TRIS NaCl 0,05 M (salina tamponada com TBS), pH 7,6
- MgCl₂ 10 mM (solução de uso)
- solução de AEC (amino-etil carbazol) 8 mg/ml (solução substrato para peroxidase)
- solução de DAB (diamino benzidina) 6 mg/10ml de Tris 0,05M, pH 7,6

- PBS pH 7,2
- TRIS-HCl 0,1M pH 9,5
- tampão acetato 0,1M pH 5,2
- solução de H₂O₂ 3%

Procedimento para revelação com peroxidase

- obter corte no criostato e recolher em lâmina revestida;
 - secar à temperatura ambiente;
 - fixar em acetona 100% gelada por 10 min ou em PFA 2% em PBS por 3 min;
 - secar;
 - hidratar (banho em PBS por 10 min);
 - bloquear a peroxidase endógena com H₂O₂ 3% em PBS por 20 min;
 - bloquear com PBS-BSA 2,5% ou PBS-leite desnatado 10% por 10 min;
 - bloquear com PBS-soro normal de cabra 10% por 30 min a 1h;
 - incubar com o primeiro anticorpo por 60 a 120 min;
 - lavar em PBS três vezes por 5 min (em banho);
 - incubar com o segundo anticorpo (conjugado com peroxidase) por 60 min;
 - lavar em PBS três vezes 5 min (em banho);
 - revelar a peroxidase com AEC por 10 min ou DAB por 5 min;
 - lavar rapidamente em água corrente para bloqueio da reação;
 - fazer contracoloração com hematoxilina de Mayer por 1min;
 - lavar em água corrente por 10 min;
 - secar e montar em meio aquoso (gelatina) no caso de se usar AEC, ou alcoólico no caso de DAB (neste caso, as lâminas podem ser desidratadas, contracoloradas e montadas em meio convencional para histologia).
- Obs: o protocolo de fixação deverá ser inicialmente testado para cada tipo de tecido.

17.1.4.3 Imunocitoquímica com conjugados de fosfatase alcalina em cortes congelados

Material

- solução de lavagem: TBS pH 7,6
- TBS BSA 1% - adicionar 1g de BSA para cada 100 ml de TBS
- TBS leite desnatado 5% - adicionar 5 g de leite para cada 100 ml de TBS
- TBS soro normal 4% - adicionar 4 ml de soro para cada 100 ml de TBS
- soluções de (substrato para fosfatase alcalina): 5-bromo-4-cloro-3-inodolil fosfato/cloreto de nitro-blue tetrazolio em TBS, pH 9,5. O produto formado é azul, insolúvel em água
- meio de incubação para fosfatase alcalina: preparar as soluções estoques de: X-fosfato 50x, NBT-estoque 50 x, MgCl₂ 100 mM e TRIS-HCl 0,2M
- meio de incubação para fosfatase alcalina (solução de uso): X-fosfato 0,38 mM, NBT 0,41 mM, MgCl₂ 10 mM, em TRIS-HCl 0,2 M pH 9,5.

Procedimento

O protocolo geral é o mesmo usado para reação de imunoperoxidase, mas obedece a alguns cuidados específicos:

- todas as etapas devem ser feitas com TBS (salina tamponada com Tris) ao invés de PBS, para evitar artefatos pela presença do fosfato do PBS;
- podem ser usados dois sistemas de revelação, um para azul, com NBT e outro para vermelho, com *fast red*.

17.1.4.4 Montagem, contracoloração e contraste positivo para criocortes

Material

- meio de montagem: gelatina/glicerina
- hematoxilina de Mayer (solução estoque, para contracoloração de tecidos)

Procedimento

- diluir 10x;
- incubar 30 min;
- lavar até retirar todo o corante da água.

17.2 Coleta e Processamento de Órgãos para Microscopia Eletrônica de Transmissão

17.2.1 Coleta para Fixação de Rotina

A coleta do material é uma etapa importante onde devem ser levados em consideração fatores como tempo de retirada do órgão do corpo do animal e manutenção do órgão em solução fisiológica a baixa temperatura, objetivando evitar a autólise do material. Em seguida, o espécime deve ser fixado em solução fixadora previamente escolhida e com metodologia adequada. As diferenças da fixação para microscopia eletrônica em relação à descrita para microscopia óptica (item 17.1.1) são basicamente duas: o tamanho do fragmento clivado e o tipo de fixador.

No anexo 17.2 descrevemos os métodos de preparo dos tampões e fixadores utilizados em microscopia eletrônica.

Na preparação dos tecidos biológicos para observação ultra-estrutural é necessário fixá-los por métodos químicos ou estabilizá-los por métodos físicos (congelamento rápido), para que as estruturas celulares permaneçam de modo o mais próximo ao real. Os órgãos podem ser fixados ainda fazendo parte do organismo (por perfusão) ou o mais rapidamente possível; após a colheita cirúrgica o tecido é cortado em pequenos fragmentos de 1 mm de espessura e colocado imediatamente em solução fixadora tamponada (por imersão). O processo de fixação envolve reações químicas entre os componentes celulares (principalmente proteínas) e o fixador e serve para estabilizar as estruturas celulares. Um par conjugado de ácido-base age como tampão quando este sistema tende a resistir a uma modificação de pH de uma solução, quando se adiciona na mesma $[H]^+$ e $[OH]^-$. Diferentes sistemas de tampões são utilizados em microscopia eletrônica com a finalidade de se manter em um determinado pH nas soluções de fixação, de lavagem, de reações enzimáticas, etc.

Material

- o mesmo utilizado para cortes em criostato
- glutaraldeído (GA) 2,5% em tampão cacodilato de sódio-HCl 0,1 M
- tetróxido de ósmio (OsO_4) a 1% em tampão cacodilato de sódio-HCl, 0,1M

Procedimento

- retirar do órgão e lavá-lo rapidamente com solução salina fisiológica gelada;
- imergir o espécime na solução fixadora de GA a 2,5% em tampão cacodilato de sódio a 0,1M, contendo ou não sacarose a 3,5%, pH 7,2 a 4°C, e se for necessário recortar em fragmentos de no máximo 1 mm³. A fixação deve-se processar no mínimo por 1h;
- lavar em solução de tampão cacodilato 0,1 M, pH 7,2 a 4°C;
- lavar 3x em tampão para a retirada do excesso de fixador;

Obs: nessa etapa pode-se estocar o material para posterior processamento.

- lavar o material por 2x em tampão;
- pós-fixar com solução de OsO₄ a 1% em tampão cacodilato 0,1 M pH 7,2 por 1h em temperatura ambiente e no escuro;
- lavar 3x com o mesmo tampão.

17.2.2 Processamento de rotina

Após a fixação do material de modo apropriado para o processamento por microscopia eletrônica, procede-se à desidratação, infiltração e inclusão em resinas para rotina ou especiais para preservação de epitopos imunossensíveis.

A *desidratação* total do tecido é indispensável se a inclusão for feita em resinas não hidrossolúveis, porém deverá ser rápida e progressiva, a fim de ser preservada a estrutura celular. Utilizando-se resinas hidrossolúveis a desidratação não precisa ser total, estas resinas são polimerizadas mesmo com a presença de pequena quantidade de água na célula. Os solventes orgânicos mais utilizados são acetona, álcool e metanol.

A *infiltração* ocorre com uma gradual substituição do agente desidratante pela resina escolhida. Ela é realizada por diminuição gradual e contínua da concentração do solvente proporcionalmente ao aumento da concentração do meio de inclusão.

A *inclusão* consiste em uma completa impregnação do tecido com a resina, pura durante 4 h ou durante à noite. Após esse período o espécime é emblocado em formas ou cápsulas especiais com uma nova resina. Para que aconteça a polimerização com as resinas epoxi é necessário que esta ocorra a 60°C. Com as resinas hidrossolúveis a polimerização ocorre a baixa temperatura sob luz ultravioleta (UV).

Material

- soluções dos agentes desidratantes (solventes orgânicos): séries de acetona, etanol e metanol a 15, 30, 50, 70 e 90%
- resina Epoxi (Epon 812)

Procedimento

- coletar e fixar o material;
- desidratar com série crescente do agente desidratante (30, 50, 70 90 e 100%), durante 10 min cada etapa, sendo que a 100% devem ser feitas três trocas de 10 min cada;
- retirar o agente desidratante substituindo por uma solução do agente desidratante e resina (v/v). Os fragmentos devem ser infiltrados nesta solução durante 18 h a 4°C em frasco bem fechado;
- incluir os espécimes com resina epoxi em cápsulas de gelatina ou em formas próprias, a 60°C, e deixar polimerizar em estufas apropriadas durante 72 h;
- obter cortes ultrafinos em ultramicrótomo, pescar em grades de cobre e acondicionar em placas de Petri pequenas;
- contrastar com solução de acetato de uranila 2% em água por 10 min em placas protegidas da luz e em solução de citrato de chumbo por 3 min;
- observar o material em microscópio de transmissão e fotografar;
- os negativos são revelados e as fotomicrografias são então realizadas. A interpretação qualitativa dos cortes (características do tecido a serem observadas) é feita em fotomicrografias de alta qualidade.

17.2.3 Coleta e fixação de material para incluir em resina lowicryl

Material

- PBS e TBS
- tampão cacodilato de sódio-HCl, 0,2 M
- 4 % PFA
- 0,1-0,5 % GA
- 0,2-1 % ácido pícrico

Procedimento

- retirar do órgão e lavá-lo rapidamente com solução salina fisiológica gelada;
- fixar em PFA 4% + glutaraldeído 0,1 a 0,5% + 0,2 a 1% ácido pícrico em tampão cacodilato 0,1 M + sacarose 3,5 % por 1h a 4°C.

17.2.4 Processamento de material para inclusão em lowicryl

Material

- solução de cloreto de amônia a 50 mM em TBS
 - soluções dos agentes desidratantes (solventes orgânicos): séries de etanol ou metanol a 15, 30, 50, 70 e 90%
 - resina Lowicryl K4M
- Obs: o Lowicryl é neurotóxico.

Procedimento

- lavar 3x por 10 min em tampão cacodilato 0,1 M + sacarose 3,5%;
- lavar 1x em TBS;
- incubar em cloreto de amônia 50 mM em TBS durante 30 min a 4°C para bloquear grupos aldeídicos reativos;
- lavar 4x em TBS;
- desidratar o material em séries crescentes de álcool (metanol ou etanol) por 10 min em cada solução: 30, 50 (a 4°C), 70 e 90% por 10 min a 20°C. Quando o material estiver em suspensão, deve-se cortar o sedimento em metanol 90% ou etanol 90% a -20°C;
- infiltrar o material com Lowicryl e agente desidratante nas seguintes proporções:
 metanol 90%/Lowicryl (1:1) (-20°C) *overnight*
 metanol 90%/Lowicryl (1:2) (-20°C) *overnight*
 Lowicryl puro por 48 h a -20°C
- incluir em cápsulas de gelatina e deixar polimerizar por 5 dias sob luz UV a -20°C. Em seguida, colocar o material à temperatura ambiente ainda sob luz UV por 2 dias;
- obter cortes ultrafinos e colocar sobre grades de níquel (sem contrastar).

17.2.5 Protocolo de imunocitoquímica em cortes de lowicryl

Material

- TBS 0,1M
- cloreto de amônia 50 mM
- TBS/BSA 1%/Tween 1%
- anticorpo específico
- proteína A complexada a ouro coloidal
- acetato de uranila 2% em água

Procedimento

- lavar com TBS 0,1M;
- incubar com cloreto de amônia 50 mM por 30 min para inativar grupamentos aldeídicos reativos;
- incubar 3x por 10 min em TBS/BSA 1%/Tween 1% (BSA para bloquear sítios de ligação inespecífica);
- incubar com o primeiro anticorpo por 1h a 37°C (determinar previamente a concentração do anticorpo);
- lavar com TBS/BSA 1%/Tween 1% - 3x 10 min;
- incubar com a proteína A-ouro coloidal diluída 1:10 por 30 min à temperatura ambiente (a concentração da proteína pode variar);
- lavar com TBS/BSA 1%/ Tween 1% - 2x 5 min;
- lavar com H₂O_{ddd} - 3x 10 min;
- contrastar por 5 min com citrato de chumbo ou por 20 min com acetato de uranila;
- lavar com H₂O_{ddd} e deixar secar;
- guardar as grades em ambiente seco com sílica gel.

17.2.6 Coleta do órgão, fixação, infiltração e obtenção de cortes congelados

Material

- o mesmo utilizado para cortes em criostato (conforme citado anteriormente)
- suportes especiais para criocongelamento e crioultramicrotomia
- 4% PFA em PBS

Procedimento

- logo após a abertura do animal, banhar o órgão em PFA para fixação;
- retirar o órgão;
- fragmentar o órgão imerso em PFA a 4% (cortes de no máximo 1 mm³);
- fixar os fragmentos PFA 4 % por 1h;
- infiltrar com sacarose a 4°C, em banhos sucessivos de 1h cada em soluções de concentração crescente de sacarose (0,5, 1,25, 1,5, 1,7, 1,9 e 2,3 M). Nesta última o material deve ficar toda a noite sob agitação
- colocar o fragmento no suporte juntamente com uma gota de sacarose 2,3 M;
- congelar em N₂ líquido;
- cortar o fragmento congelado em crio-ultramicrotomo. Os cortes são retirados direto da navalha, com o auxílio de uma pinça especial com anel de borracha. Deixa-se secar o anel com sacarose, recolhe-se os cortes que são então depositados na grade e deixados para secar alguns minutos;

Obs: o método pode ser adaptado para o congelamento de células isoladas para corte em crio-ultramicrotomo, incluindo-se as células em gelatina antes da infiltração com sacarose, com o seguinte protocolo:

- fixar as células em 0,5% GA + 2% PFA em PBS pH 7,4 ou 4% PFA por 1h;
- lavar 3x em PBS (10 min/vez);
- emblocar em gelatina 2 a 10% em PBS a 37°C por 30 min;
- centrifugar a 4°C por 30 min;
- cortar em pequenos fragmentos;
- deixar por 2 h à temperatura ambiente em glicina 50 mM em PBS para bloquear grupos aldeídos;
- impregnar em sacarose (crioprotetor): sacarose 0,6 a 2,3 M em PBS pH 7,4 (mínimo de 3 a 6 h).

17.2.7 Processamento dos criocortes incluídos em sacarose para imunocitoquímica

Material

- soluções crescentes de sacarose e de polivinil pirolidina (PVP; Sigma/Peso Molecular 10.000) em PBS pH 7,4
0,5% Sacarose + 20% PVP
1,25% Sacarose + 20% PVP
1,5% Sacarose + 20% PVP
1,7% Sacarose + 20% PVP
1,9% Sacarose + 20% PVP
2,3% Sacarose + 20% PVP
- soro fetal bovino (SFB)
- glicina 0,12%
- PBS-glicina 0,12%
- proteína A-ouro coloidal
- acetato de uranila 2% em água

Procedimento

As grades são transferidas para gotas de PBS sobre uma fita de parafilme. Todas as etapas são feitas a temperatura ambiente:

- incubar os cortes em PBS com 10% de SFB contendo 0,12% de glicina (para reduzir as ligações inespecíficas de anticorpos);
- diluir o anticorpo em PBS contendo 5% de SFB e 0,12% de glicina e incubar a amostra durante 30-60 min. Os anticorpos devem ser centrifugados sempre por 1min antes do uso, com a finalidade de remover agregados. Como controle, incubar os cortes pelo mesmo período de tempo, sem o anticorpo, no tampão (PBS/glicina);
- lavar 4x em PBS com 0,12% de glicina, num total de 15 min;
- diluir a proteína A complexada com ouro coloidal em PBS com 5% SFB + 0,12% de glicina (usar diluição 1:10). Após as lavagens, incubar os controles e os cortes tratados com o anticorpo, por 30 min, com a proteína A-ouro coloidal;
- lavar 6x em PBS com 0,12% de glicina num total de 20 min;
- lavar em água destilada 4x num total de 10 min. Esta etapa é importante para remover os íons fosfatos antes da reação com acetato de uranila;
- incubar em acetato de uranila a 3% pH 7,0-7,5 por 5 min;
- lavar em água destilada 2x num total de 1 min (as etapas 7 e 8 podem ser omitidas);
- contrastação final em metil celulose com 3% de acetato de uranila aquosa (nove partes de metil celulose mais uma parte de ouro). Esta solução fica em gelo e as grades são colocadas nesta solução por 10 min;
- recolher a grade com uma alça, remover o excesso de metil celulose e secar ao ar.

17.3 Coleta e Processamento de Tecidos para Hibridização

A hibridização é uma técnica que permite a detecção e/ou visualização de DNA ou RNA celular em cortes de tecidos, células em suspensão, preparações cromossomiais e ácidos nucleicos imobilizados em suportes sólidos. Esta técnica baseia-se no fato que fragmentos de ácidos nucleicos (DNA ou RNA) marcados com elementos isotópicos ou não isotópicos (sondas) irão hibridizar ácidos nucleicos (DNA ou RNA) celulares sob condições apropriadas de temperatura, força iônica e pH, formando híbridos estáveis.

As primeiras hibridizações foram feitas com ácidos nucleicos (extraídos e purificados) imobilizados em membranas de celulosas. Embora desta maneira seja possível identificar diferentes classes de DNA (Southern) ou RNA (Northern) pelo tamanho dos fragmentos hibridizados com as seqüências de sonda complementares (*antisense*), não há informações sobre a distribuição de seqüências específicas em células individuais. A hibridização *in situ* introduzida na década de 60 permite a demonstração morfológica do DNA e do RNA celular em cortes de tecidos, células em suspensão e preparações cromossomiais.

Uma das vantagens da hibridização *in situ* em relação à imunocitoquímica convencional é que na hibridização revela-se o verdadeiro sítio de síntese de uma determinada proteína enquanto por imunocitoquímica somente é possível revelar a presença do peptídeo. Hoje a hibridização representa um dos principais instrumentos de pesquisa nas mãos de morfologistas, principalmente nos diagnósticos patológicos. Ao contrário do DNA que é estável, o mRNA é extremamente lábil, sendo *in vivo* continuamente sintetizado e degradado. Devido a sua meia-vida extremamente curta, deve-se minimizar possíveis degradações com ribonucleases congelando ou fixando os tecidos imediatamente após sua excisão cirúrgica.

Cuidados para o trabalho com RNA

- toda vidraria e plásticos utilizados devem ser *RNAse free*. Para isso as vidrarias e o material cirúrgico são esterilizados em forno por 5 h a 200°C e os plásticos e outros objetos não esterilizáveis em forno devem ser incubados *overnight* com H₂O tratada com DEPC (dietil pirocarboneto 0,1%, incubando *overnight*). Ponteiras e tubos para microcentrífuga virgens devem ser autoclavados;
- todas as soluções devem ser preparadas com água tratada por DEPC e posteriormente autoclavadas. Durante todas as etapas o operador deve utilizar luvas;
- os tubos de plástico que serão usados na extração devem ser resistentes a fenol e clorofórmio.

Diferentes metodologias são descritas para a preparação do material a ser utilizado em hibridizações feitas em membranas ou *in situ*. A escolha do processamento a ser usado deve visar a boa preservação do material biológico que mantém detalhes da sua morfologia (no caso da hibridização *in situ*), além da retenção dos ácidos nucleicos-alvo com boa exposição das suas seqüências. Temos entre elas:

Hibridização *in situ*

- fixação do tecido, imediatamente após sua obtenção, com paraformaldeído (PFA) 4% e em seguida imersão em solução de sacarose. Após este tratamento, congelar o tecido em N₂ líquido até corte em criostato. Os cortes devem ser aderidos a lâminas revestidas com poli-L-lisina;
- congelamento dos tecidos em N₂ líquido, imediatamente após sua obtenção, corte do tecido em criostato, adesão dos cortes em lâminas revestidas e fixação com PFA 4% (10 min). Após a fixação os cortes podem ser estocados a -70°C até a reação de hibridização. Neste protocolo é possível processar simultaneamente parte do material para extração total do ácido nucleico e hibridização em membranas de celulose, mas há perda na manutenção da morfologia;
- obtenção do tecidos e fixação imediata em PFA 4%, desidratação progressiva em etanol, incubação em xilol e inclusão em parafina. Os cortes obtidos por microtomia devem ser aderidos a lâminas revestidas;
- alguns autores sugerem que após a fixação, as preparações podem ser estocadas indefinidamente em etanol 70% a 4°C permitindo o processamento de amostras de uma cinética experimental ao mesmo tempo.

Fixadores

- pode-se utilizar PFA, PFA acrescido de glutaraldeído ou solução de Bouin. A escolha irá depender diretamente do tipo de tecido, do tipo e do tamanho da sonda;
- durante a fixação ocorre *cross-linking* entre as proteínas e carboidratos das células e os aldeídos dos fixadores. Por isso, dependendo do fixador escolhido, às vezes se faz necessário o uso de diferentes tratamentos para facilitar o

acesso da sonda ao ácido nucléico. Os tratamentos mais freqüentes empregam o uso de enzimas (pronase, proteinase K), a acetilação de grupamentos amino (reduzindo ligações eletrostáticas não específicas), e o uso de detergentes (Triton X100).

Northern blot

- a extração dos ácidos nucléicos de tecidos deve ser feita logo após sua retirada ou, quando não for possível, o tecido deve ser imediatamente congelado e estocado em N₂ líquido ou a -70°C até sua extração;
- no caso de células cultivadas em monocamadas ou em suspensão, lavar as células 3x com PBS (livre de cálcio e magnésio) gelado, adicionando-se em seguida a solução desnaturante e mantendo-as a 4°C. A monocamada deve ser removida do substrato com auxílio de um *rubber policeman* virgem (*RNAse free*) e em seguida processada. Geralmente utilizam-se 100 µl de solução D por 10⁶ células ou 1,8 ml de solução D (ver Anexo 17.3) para cada placa de cultura cujo diâmetro é de 10 cm;
- após a extração e precipitação, os ácidos nucléicos são submetidos a uma eletroforese (geralmente gel de agarose) e transferidos para membranas de celulose ou náilon;
- os ácidos nucléicos podem então ser hibridizados (com uma prévia etapa de bloqueio) e revelados, dando informações quantitativas e qualitativas sobre sua expressão;
- o controle da viabilidade do RNA extraído pode ser feito pela observação das bandas do rRNA de 28S, 18S e 5S que devem estar nítidas e visíveis em géis corados por brometo de etídio;

Obs: a solução de extração (solução desnaturante) é em geral uma combinação de agentes desnaturantes, detergentes e inibidores de RNAses. Atualmente, é mais comum a utilização de soluções comerciais tais como Trizol (Gibco-BRL) e Tri-reagent (Molecular Research Center).

Escolha da sonda

Outra etapa importante das hibridizações se refere à escolha do tipo de sonda, sua marcação e sensibilidade do método utilizado para revelação do seu sinal. Em princípio tanto sondas de DNA ou RNA podem ser utilizadas para localizar seqüências de RNA ou DNA. Cada sonda tem vantagens e desvantagens e sua escolha vai depender da experiência pessoal em técnicas de biologia molecular, acesso e meios para clonagem das sondas e do tipo de seqüência a ser analisada.

As sondas podem ser de DNA fita dupla ou simples, de RNA e de oligonucleotídeos. As sondas de cDNA (DNA complementar à seqüência de um mRNA) de fita dupla são ainda as mais usadas, embora tenham a desvantagem de após serem desnaturadas poderem se realinhar competindo com a hibridização do ácido nucléico em estudo. A difusão da sonda e sua especificidade tem relação direta com o seu tamanho. Em geral para hibridização *in situ* utilizam-se sondas de RNA de 50-200 nucleotídeos e sondas de DNA de 400-600 nucleotídeos. A concentração da sonda também é um fator muito variável mas recomenda-se para hibridizações *in situ* 0,5 ng/ml para sonda de RNA e 1 ng/ml para sonda de DNA.

As sondas podem ser marcadas por meios isotópicos e não isotópicos. Devido à sua alta sensibilidade ainda se utilizam os primeiros. A escolha do tipo de radioisótopo dependerá do nível de resolução necessário em cada investigação. Filmes de auto-radiografia podem ser suficientes para se detectar ácidos nucléicos imobilizados em membranas ou em tecidos mas não em nível celular. Para este tipo de resolução são apropriados I¹²⁵, P³² e S³⁵. Entretanto, se for necessária uma resolução em nível celular deve-se escolher H³ ou S³⁵ e as lâminas devem ser revestidas com uma emulsão fotográfica líquida seguida de revelação. Em *Northern blots* em geral utilizam-se sondas marcadas com P³². Problemas devido à alta periculosidade, pouca estabilidade da sonda e longo tempo de revelação estimulam cada vez mais o uso de sondas não radioativas. A marcação das sondas por elementos não isotópicos incluem o sistema de biotina-avidina, sistema de fluorocromos e de sistemas enzimáticos.

Metodologia de hibridização

Deve-se levar em consideração alguns fatores durante a escolha da metodologia: a temperatura, a força iônica, a solução de bloqueio, a concentração de sonda e o tempo de hibridização.

A formamida (desestabilizador de dupla hélice) que permite uma diminuição da temperatura de hibridização (quanto mais alta a temperatura, maior é a tendência de desestabilizar os híbridos sonda-ácido nucléico-alvo, o que pode contribuir para um menor ruído) e o dextran sulfato (fator de exclusão de volume) são reagentes que, de um modo geral, sempre fazem parte de protocolos de hibridização.

As preparações são quase sempre incubadas em soluções de bloqueio, visando reduzir o *background* ou ruído. Estas soluções geralmente contêm ácidos nucléicos não específicos (para DNA usa-se esperma de salmão, e para RNA o tRNA) e uma solução de bloqueio (solução de Denhardt) que contém Ficoll, PVP (poli-vinil-pirrolidina) e BSA (albumina bovina).

A temperatura ótima de hibridização é extremamente variada levando-se em conta o tipo de sonda, o tamanho, a natureza de nucleotídeos, etc. Em geral se recomenda 42°C para sondas de DNA, 50-55°C para RNA e 37°C para oligonucleotídeos.

Como controles para teste da especificidade da hibridização destacamos tratamentos dos espécimes com RNAses ou DNAses, utilização de sondas não homólogas, utilização de sondas de RNA *sense*, ausência de sonda, etc.

A seguir descreveremos uma metodologia utilizada para análise de mRNA (utilizando sondas isotópicas de cDNA) imobilizadas em membranas de náilon (Lorent et al., 1994).

17.3.1 Northern Blot

Extração de RNA de tecidos

- obter o órgão e congelar e estocar em N₂ líquido ou a -70°C caso não vá ser processado imediatamente;
- extrair com solução desnaturante (solução D) (em geral 1 g tecido/10 ml de solução D) (ver Anexo 17.3);
- transferir para tubo de polipropileno e adicionar sequencialmente, misturando gentilmente por inversão, acetato de sódio 2 M pH 4,0 (1/10 do volume), fenol saturado (1 volume) e clorofórmio + 4% álcool isoamílico (0,2 volume). Agitar vigorosamente por 10 s e incubar no gelo por 15 min;
- separar a fase aquosa da orgânica, através de centrifugação a 39.000 g por 20 min a 4°C;
- adicionar à fase aquosa contendo o RNA volume igual de isopropanol e incubar por 1h a -20°C para precipitar o RNA;
- coletar o RNA por centrifugação (3.300xg por 20 min a 4°C);
- incubar o sedimento (rico em RNA) novamente com solução D e precipitar com isopropanol sob as mesmas condições;
- centrifugar novamente, desprezar o sobrenadante e lavar o sedimento por 3x com etanol 75%;
- secar o sedimento a temperatura ambiente e ressuspender em formamida (100%) ou água tratada com DEPC, no menor volume possível, estocando a -70°C;
- calcular a concentração do RNA total por espectrofotometria (260 nm).

Obs: para quantificar o RNA no espectrofotômetro, diluir 2 µl de RNA em 600 µl de H₂O+DEPC. No tubo controle negativo, adicionar o mesmo volume somente de formamida (2 µl) à H₂O e em outro tubo acrescentar 2 µl de extrato total de DNA. Quanto menor for a contaminação de proteínas e DNA na preparação, mais próximo a 2 deve ser a relação entre 260/280 nm. A leitura de 280 nm é para proteínas e a de 260 nm para ácidos nucléicos. Cada DO₂₆₀ significa 40 µg/ml de RNA. Com este método obtém-se aproximadamente de cada garrafa de cultura de 90 mm cerca de 100/200 µg de RNA.

Eletroforese e transferência

- desnaturar o RNA a 70-100°C por 10 min em solução A (ver Anexo 17.3);
- utilizar 10 µg/ml do RNA total por *slot*. Não esquecer de aplicar, também, um padrão de peso molecular. Géis de 1% de agarose são apropriados para moléculas de RNA maiores do que 1 kb e 1,4% para menores de 1 kb;
- preparar o gel de agarose com 6% formaldeído (ver Anexo 17.3) e realizar a corrida por 5 h a 60V em uma vez

tampão MOPS (ver Anexo 17.3);

- fazer gráfico com os valores do \log_{10} do tamanho das espécies de RNA (padrão) contra a distância migrada e utilizar a curva resultante para cálculo do tamanho das espécies de RNA detectadas pela hibridização após a transferência do gel para a membrana de náilon;
- após a eletroforese, transferir o RNA, por capilaridade, para uma membrana de náilon (Amersham, UK) em tampão 10X SSPE (ver anexo 17.3);
- fixar o RNA à membrana tratando-o por 20 min a 80°C, seguido por *UV-cross-linking* por 45 s (Stratalinker 1800, Stratagene, Heidelberg, Alemanha) ou por 3 min em transiluminador de UV;
- guardar a membrana a -20°C até a etapa de hibridização.

Obs 1: a cuba de eletroforese deve ser limpa com detergente, lavada com água, seca com etanol e incubada com um volume de H₂O₂ a 3% por 10 min à temperatura ambiente. Em seguida lavar abundantemente com H₂O₂-DEPC. Deve-se também pré-incubar a cuba (com os pentes) com H₂O₂-DEPC, *overnight* antes da eletroforese

Obs 2: como os vapores de formol são tóxicos, as soluções contendo este fixador devem ser manuseadas em capelas de exaustão, utilizando-se luvas. O brometo de etídeo é mutagênico e tóxico e somente deve ser manuseado com luvas e as suas soluções devem ser adequadamente descontaminadas.

Marcação da sonda

Para marcação isotópica ou não isotópica da sonda utilizar protocolo indicado pelo fabricante.

Hibridização

- incubar as membranas em solução de pre-hibridização (ver anexo 17.3) por 7 h a 42°C e em seguida *overnight* nesta mesma solução acrescentando 10% dextran sulfato e a sonda marcada já desnaturada (2×10^6 cpm/ml);
- recuperar a solução e guardar a -20°C (para ser utilizada para nova hibridização);
- lavar a membrana por três vezes rapidamente com SSPE 0,3X/0,5 % SDS, lavar por 1h a 60°C com SSPE 0,3X/0,5 % SDS (200 ml);
- após as lavagens, checar o sinal com um contador Geiger (caso seja sonda isotópica) e expor a membrana um filme de raio X com intensificador a -70°C;
- após revelação, o filme pode ser analisado por um programa de densitometria.

Obs 1: a temperatura e o conteúdo da soluções de hibridização e de pós-hibridização variam (dependendo da natureza da sonda, tamanho, natureza de suas bases); desta forma as condições de stringência devem ser determinadas para cada tipo de sonda e ácido nucléico a ser estudado. A solução citada acima foi utilizada para ensaios de revelação de mRNA para proteína sérica $\alpha 2$ -macroglobulina utilizando sonda isotópica de cDNA (50bp)

Obs 2: para reutilizar a membrana de náilon para outras hibridizações, ela deve ser previamente incubada com uma solução com 0,5% de SDS 40 mM Tris pH 7,8 por 15 min a 80°C e em seguida mantida a -20°C.

Anexo 17.1

Soluções para Imunohistoquímica

1. Soluções fixadoras

Formalina a 10% em PBS

Fixador de Milloning-Rosman

Fosfato de sódio anidro dibásico	18,4 g
Ácido fosfórico (H_3PO_4) ou difosfórico	1,68 g
Água destilada	900 ml
Formaldeído Merck	100 ml

- dissolver o sal com água destilada e depois acrescentar o ácido fosfórico
- deixar esfriar acrescentar o formaldeído
- corrigir o pH se necessário para 7,3-7,4 com solução de NaOH

2. Solução de gelatina para revestimento de lâminas

Gelatina	1 g
Alúmem de cromo	0,005 g
H ₂ O	100 ml

- aquecer a 60-70°C para dissolver

3. Soluções e tampões para reações de imunohistoquímica com peroxidase

PBS (25X): uso para reações de peroxidase

NaCl	180 g
K ₂ HPO ₄ anidro	188 g
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	33 g
H ₂ O deionizada	qsp 1000 ml

Tampão TRIS NaCl 0,05 M (salina tamponada com TBS)

Solução A: TRIS 0,5M 10X pH 7,6	
Tris base 0,5M	30,28 g
H ₂ O _{dd}	500 ml
Solução B: NaCl 10X 1,5M	
NaCl	43,83 g
H ₂ O _{dd}	500 ml
Tampão 0,05 M pH 7,6	
Solução A	50 ml
Solução B	50 ml
H ₂ O _{dd}	400 ml

TRIS-HCl 0,2M pH 9,5

Solução A: TRIS 0,8 M	
TRIS	24,23 g
H ₂ O _{dd}	1000 ml
Solução B: HCl 0,2N	
HCl ¹	0,73g
H ₂ O _{dd}	100 ml
Tampão 0,2 M pH 9,5	
Solução A	25 ml
Solução B	até pH 9,5
H ₂ O _{dd}	100 ml

¹densidade específica: 1,19**Tampão acetato 0,1M pH 5,2**

Solução A	
Acetato de sódio (CH ₃ COONa.3H ₂ O) 0,1M	13,6 g
H ₂ O _{dd}	1000 ml
Solução B	
Ácido acético glacial 0,1N	575 ml
H ₂ O _{dd}	1000 ml
Tampão 0,1 M pH 5,2	
Solução A	79
Solução B	21

AEC (amino-etil carbazol) (substrato para peroxidase)

Solução estoque AEC	
AEC	120 mg
N, N, dimetilformamida	15 ml
Solução trabalho¹	
AEC estoque	0,5 ml
Tampão acetato	9,5 ml
H ₂ O ₂ 3 %	50 µl

¹misturar bem**DAB (diamino benzidina) (substrato para peroxidase)**

Solução de uso DAB¹	
DAB	6 mg
Tampão Tris 0,05M, pH 7,6	10 ml
H ₂ O ₂ 3 %	100 ml

¹preparar no momento de usar. Evitar inalação ou contato direto com a pele; a solução deve ser filtrada se ocorrer precipitação**4. Soluções para reações de fosfatase alcalina**

- solução de lavagem: TBS 0,05 M pH 7,6 (o mesmo usado em reações para peroxidase)
- TBS/BSA 1%
- TBS/leite desnatado 5%
- TBS/soro normal 4%

Soluções estoque para fosfatase alcalina

X-fosfato 50X 19 mM¹	
X-fosfato (5-Bromo-4-cloro-3-indolil fosfato)	7 mg
DMF (dimetilformamida)	1 ml
NBT 50X 20,5 mM¹	
NBT (cloreto de nitro-blue tetrazólio)	16,7 mg
DMF	1 ml
MgCl₂ 100 mM	
MgCl ₂ .6H ₂ O	0,95 g
H ₂ O	100 ml

¹preparar alíquotas de 200 µl e congelar

Meio de incubação para fosfatase alcalina

	conc. final (mM)	
TRIS-HCl 0,2M pH 9,5	9 ml	
X-fosfato 19 mM	200 ml	0,38
NBT 20,5 mM	200 ml	0,41
MgCl ₂ 100 mM	1 ml	10

- dissolver primeiro X-fosfato e NBT em dimetilformamida 70%

Obs: o produto formado é azul, insolúvel em água

5. Meio de montagem para lâminas com cortes congelados

Gelatina	10 g
H ₂ O _{dd}	60 ml
Glicerina	70 ml
Fenol líquido	1 ml

- misturar a gelatina com a água, aquecer para dissolver (banho-maria, placa ou direto no fogo)
- adicionar glicerina e fenol

6. Soluções para contracoloração de criocortes

Hematoxilina de Mayer (solução estoque)	
Hematoxilina (cristais)	1 g
H ₂ O _{dd}	1000 ml
Iodato de sódio	0,2 g
Alúmem de amônia ou potássio	50 g
Ácido cítrico	1 g
Hidrato de cloral	50 g

- dissolver a hematoxilina em água, usando aquecimento, se necessário
- adicionar o iodato de sódio e o sulfato de alumínio
- misturar até que o sulfato de alumínio esteja completamente dissolvido
- adicionar o ácido cítrico e o hidrato de cloral
- guardar em vidro apropriado. Evitar usar logo após o preparo

Obs: a cor final é violeta avermelhada

Anexo 17.2

Soluções para microscopia eletrônica

1. Tampões para microscopia eletrônica

Tampão fosfato 0,1M

Solução A (fosfato monossódico) 0,2 M	
NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O (PM 156)	15,6 g
H ₂ O _{ddtd}	qsp 100 ml
Solução B (fosfato dissódico) 0,2 M	
Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O (PM 358)	35,8 g
H ₂ O _{ddtd}	qsp 100ml
Tampão 0,1 M pH 7,2	
Solução A	28 ml
Solução B	72 ml
H ₂ O _{ddtd}	100 ml
Tampão 0,1 M pH 7,4	
Solução A	19 ml
Solução B	81 ml
H ₂ O _{ddtd}	100 ml

Tampão cacodilato de sódio-HCl 0,1M

Solução estoque de cacodilato 0,2 M	
Na(CH ₃) ₂ AsO ₂ ·3H ₂ O (PM 214)	42,8 g
H ₂ O _{ddtd}	qsp 100 ml
Tampão cacodilato 0,2M	
Solução estoque 0,2M	
HCl 0,2 N	gotejar até atingir o pH desejado
Tampão cacodilato 0,1 M pH 7,2	
Solução estoque	50 ml
HCl 0,2M	4,2 ml
H ₂ O _{ddtd}	qsp 100 ml
Tampão cacodilato 0,1 M pH 7,4	
Solução estoque	50 ml
HCl 0,2N	2,7 ml
H ₂ O _{ddtd}	qsp 100 ml

2. Soluções de fixadores

- glutaraldeído (GA) (HOC.(CH₂)₃.COH) é comercializado em soluções nas concentrações de 25% e 50%;
- paraformaldeído (PFA) (CH₂O)_n (trioximetileno), um polímero do formol, é comercializado em pó;
- tetróxido de ósmio (OsO₄), comercializado puro, cristalizado, em ampolas de 0,25 g a 5 g.

Solução estoque de PFA

- aquecer 100 ml de H₂O_{ddtd}, adicionar 8 g de PFA e deixar hidratar por 2-3 min;
- aquecer a solução em torno de 60-80°C, sob agitação, em capela de exaustão por 15-30 min;
- adicionar uma-duas gotas de NaOH 1N, para clarear a solução;
- deixar esfriar e conservar em geladeira em frasco hermeticamente fechado;

Obs: esta solução pode ser feita em várias concentrações em geral na faixa de 2 a 8%.

Solução estoque de tetróxido de ósmio 2%

- colocar 25 ml H_2O_{ddd} em um frasco âmbar e reservar;
- lavar bem uma ampola de OsO_4 500 mg, cortá-la com diamante e quebrá-la;
- colocar os cristais de OsO_4 juntamente com os fragmentos da ampola e colocar dentro do frasco com os 25ml H_2O_{ddd} ;
- deixar o OsO_4 dissolver durante uma noite a temperatura ambiente;
- conservar o frasco contendo a solução a 2% envolvido com papel alumínio na geladeira.

Solução fixadora de GA 2,5%	
Solução estoque GA 25%	1 ml
Tampão cacodilato 0,1 M pH7,2	9 ml
Solução fixadora de PFA%	
Solução estoque PFA 8%	5 ml
Tampão cacodilato-HCl 0,2M	5 ml
Solução fixadora de OsO_4 1%	
Solução estoque OsO_4 2%	5 ml
Tampão cacodilato-HCl 0,2M	5 ml

3. Agentes desidratantes

- os mais utilizados em técnicas de microscopia eletrônica são os solventes orgânicos acetona, álcool e metanol;
- os agentes desidratantes são diluídos em H_2O_{ddd} nas concentrações de 15, 30, 50, 70 e 90% e conservados em geladeira.

4. Resinas

As mais utilizadas para rotina em microscopia eletrônica de transmissão são as resinas Epoxi (Epon, Araldite e Spurr) com polimerização a 60°C.

As resinas Lowicryl (K4M e HM20) com polimerização a -20°C sob luz ultravioleta e as resinas London (LR-White e LR-Gold) são mais usadas em estudos onde precisam ser preservados os sítios antigênicos das estruturas celulares.

Preparo da resina Epon

- colocar em uma proveta bem limpa 25 ml de Epon 812;
- adicionar 17 ml de MNA;
- misturar durante 3 min sem formar bolhas;
- adicionar 32 gotas de DMP-30 e continuar misturando por 30 min a temperatura ambiente

Obs: a resina já pronta deve ser colocada em recipiente bem fechado e conservada no congelador da geladeira. Ela não deve permanecer fora da refrigeração devido à polimerização começar a ocorrer mesmo a temperatura ambiente. Para ser usada ela deve ser retirada com antecedência para o descongelamento.

5. Polivinil pirolidina (PVP - 10) para criocortes

PVP-10	3 g
H_2O	2,4 ml
Na_2CO_3 1,1 M	0,6 ml
Sacarose 2,3 M	7 ml

- misturar e deixar secar por uma noite na geladeira (solução estável por poucas semanas a 4°C)
- antes do uso adicionar 10% de volume de H_2O destilada ou 0,1 M tampão fosfato (solução não estável)

Anexo 17.3

Soluções para uso em hibridização

Solução D¹

Isotiocianato de guanidina	11,81 g
Citrato de sódio 75mM pH 7,0	8,33 ml
Sarcosil 10%	1,25 ml
H ₂ O-DEPC	completar para 25 ml

¹Chomczynski et al. 1987.

- dissolver a 65°C;
- acrescentar 7,2 ml de 2-mercaptoetanol por ml de solução (180 ml para 25 ml);
- concentrações finais: isotiocianato de guanidina 4M; citrato de sódio 25mM, sarcosil 0,5% p/v; e 2-mercaptoetanol 0,1M.

Solução A¹

10 mg de RNA em formamida	10 ml
Formamida deionizada	2,5 ml
GLB 2,5 mg/ml	3 ml
H ₂ O-DEPC	2,5 ml
Formaldeído 37%	4 ml
Brometo de etídeo 5 mg/ml	0,5 ml
Tampão MOPS 10X pH 8,0	2,5 ml

¹Lorent et al., 1994

- concentrações finais: formamida 50%, formaldeído 6%, brometo de etídeo 0,1 mg/ml, MOPS 1X.

Tampão SSPE 20X

Cloreto de sódio	175,3 g
Fosfato de sódio NaH ₂ PO ₄ . 2H ₂ O	31,2 g
EDTA 0,5M pH 8,0	40 ml
H ₂ O-DEPC	800 ml

- ajustar o pH para 7,4 e completar o volume para 1 litro
- adicionar 1 ml de DEPC, homogenizar, incubar *overnight* e autoclavar.
- concentrações finais: cloreto de sódio 3M, fosfato de sódio 0,2M, EDTA 0,02M.

Solução de pré-hibridização

SSPE 20X	12,5 ml
Denhardts ¹ 100X	2,5 ml
SDS 10%	2,5 ml
Formamida	25 ml
DNA de salmão desnaturado 10 mg/ml	500 ml
heparina 10 mg/ml	250 ml
H ₂ O-DEPC	6,75 ml

¹2% PVP, 2% BSA, 2% Ficoll-400

- concentrações finais: SSPE 5X, Denhardts 5X, SDS 0,5%, formamida 50%, DNA 100 mg/ml, heparina 50 µg/ml

Gel de agarose 1%

Agarose	1 g
MOPS 10X	10 ml
H ₂ O-DEPC	75 ml

- aquecer até dissolução da agarose
- manter em banho a 60°C por 10 min e acrescentar 17 ml de formaldeído (37%)
- misturar bem

Tampão MOPS 10x pH 7,0

3-(morpholene) propane-sulfonic acid	41,86 g
Acetato de sódio 3M pH 7,0	16,6 mg
EDTA 0,5M pH 8,0	20 ml
H ₂ O-DEPC	900 ml

- ajustar o pH para 7,0, completar o volume para 1 litro com H₂O-DEPC
- adicionar 1 ml de DEPC, homogenizar, incubar *overnight* e autoclavar
- concentrações finais: MOPS 0,2 M, acetato de sódio 0,05 M, EDTA 0,01 M.

GLB 2,5 mg/ml

Azul de bromofenol	50 mg
Glicerol	10 ml
H ₂ O-DEPC	10 ml

H₂O-DEPC

DEPC	1 ml
H ₂ O-DEPC	1000 ml

- homogenizar bem, incubar *overnight* à temperatura ambiente e autoclavar

Referências Bibliográficas

- CHOMCZYNSKI, P. & SACCHI, N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidiniumthiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry* 162:156-159, 1987.
- LORENT, K.; OVERBERGH, L.; VAN LEUVEN, F. & VAN DEN BERGHE, H. Distribution of mRNA coding for α -2-macroglobulin, the murinoglobulins, the α -2-macroglobulin receptor and the α -2-macroglobulin receptor associated protein during mouse embryogenesis and in adult tissues. *Differentiation* 55:213-223, 1994.