

## **RESUMO**

A técnica de tecido nervoso incorporado em celoidina (substância química derivada da nitrocelulose) apresenta diversas vantagens comparadas ao método da embebição em parafina e gelatina. Ao ser incorporada, a celoidina permite o endurecimento do tecido, firmando a substância ao redor, servindo assim, como suporte no micrótomo durante o corte e evita que o tecido fragmente durante a desidratação e coloração, mantendo sua integridade. Por este motivo, o presente trabalho tem por objetivo padronizar e implementar a técnica de processamento de tronco encefálico e hemisférios com metodologia baseada em celoidina para ambientes com alta temperatura, para estudos de estereologia e correlação entre imagem e histologia. Fragmentos de tecido nervoso foram fixados, desidratados e embebidos em celoidina, depois cortados em micrótomo de deslizamento e finalmente corados. Após a realização de vários testes com troncos encefálicos e hemisférios, pode-se concluir que o protocolo estabelecido com a desidratação e o processamento foram satisfatórios, definindo assim o protocolo padrão da técnica para tronco encefálico e hemisfério.

## **INTRODUÇÃO**

Celoidina é uma substância química derivada da nitrocelulose, utilizada para embebição de material a ser examinado em microscopia. Além disso, é também usada para fabricação de outros materiais como plásticos, filmes fotográficos e peças anatômicas (Borba, 2004).

Este material ao ser incorporado permite o endurecimento do tecido, firmando a substância ao redor. Serve como suporte no micrótomo e não permite giros e flutuações durante o corte, assim como, evita que o tecido fragmente durante a desidratação e coloração, mantendo sua integridade (Heinsen et al., 2000).

Estudos mostram que o encéfalo embebido na celoidina apresenta várias vantagens comparadas ao encéfalo embebido em gelatina ou parafina. A principal vantagem é a não infiltração da substância no tecido, ou seja, melhor preservação da citoarquitetura do mesmo (Heinsen et al., 2000). Quando o material é incorporado em celoidina não necessita de altas temperaturas para o corte e coloração como utilizadas em parafina ou gelatina (Miguel-Hidalgo and Rajkowska, 1999).

A espessura do corte também é diferente entre as três formas de embebição, sendo que em parafina os cortes são finos se comparados aos outros métodos, em gelatina a variação da espessura limita-se entre 500 e 700µm, enquanto na celoidina o tecido pode ser cortado entre 50 e 500µm, facilitando o processamento para diversas técnicas utilizadas em estudos que envolvem contagem de neurônios (estereologia) além de evitar a desfragmentação do tecido. Além disso, os outros métodos (gelatina e parafina) penetram no tecido e precisam sofrer processos para a remoção dessas substâncias antes da coloração, o que causa deformação visível no formato das áreas a serem estudadas, comprometendo estudos histológicos, principalmente os que envolvem reconstrução tridimensional para visualização completa da estrutura (Heinsen et al., 2000).

## **OBJETIVOS**

- Otimizar a técnica de embebição em celoidina para condições ambientais diferentes do previamente descrito;
- Implementar esta técnica para o processamento de tronco encefálico e hemisférios humano para estudos de correlação entre imagem, histologia e estereologia.

## **METODOLOGIA**

Os tecidos foram coletados de acordo com o protocolo do BEHGEEC, descrito por (Grinberg et al., 2007). Para os testes, foram utilizados fragmentos de tecido retirado de encéfalos utilizados em outros projetos já em desenvolvimento, coletados durante autópsias no Serviço de Verificação de Óbitos da Capital da FMUSP (SVOC-FMUSP). Depois de coletados, os tecidos foram fixados e imersos em paraformol 8%, onde ficaram por pelo menos 120 dias.

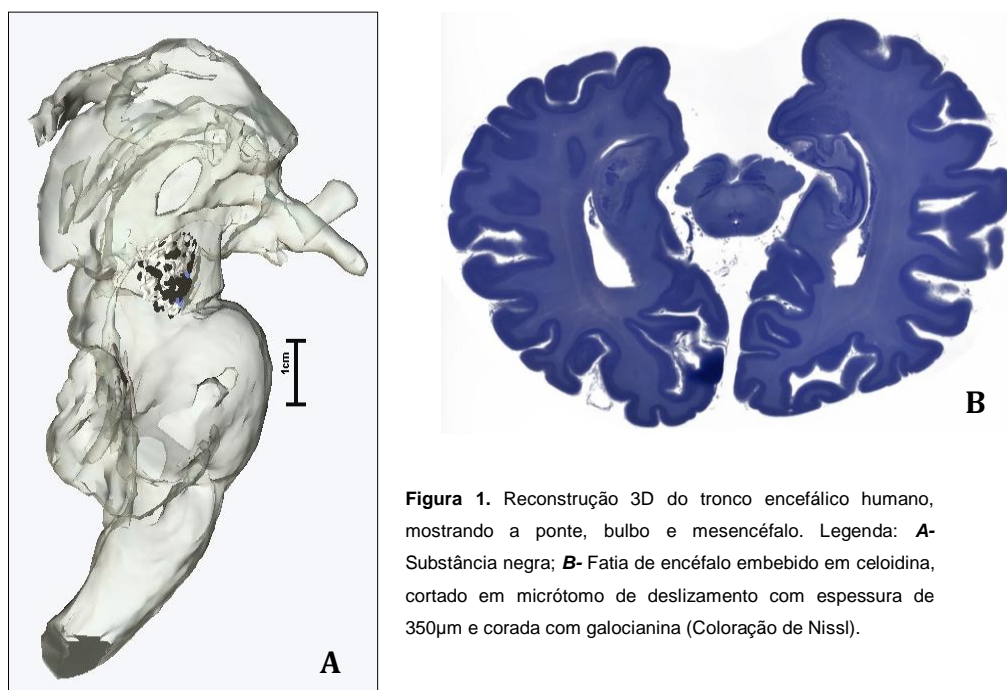
A partir deste momento, o protocolo realizado foi específico para o presente projeto. Os fragmentos de tecido encefálico foram desidratados em concentrações graduais de etanol (de 70% a 96%) e depois colocados em recipientes transparentes para embebição em celoidina 8%. Em seguida, o recipiente foi colocado em dessecador ligado conectado em bomba à vácuo (600mb) por aproximadamente 48 horas (dependendo do tamanho do tecido e da temperatura).

Após retirado do dessecador, o recipiente foi colocado em caixa de vidro, junto a uma placa de petri com clorofórmio, que deve ser mantida fechada. Após isso, a celoidina foi endurecida pelos vapores liberados do clorofórmio e durante esse processo, o bloco ficou opaco e se retraiu das paredes do recipiente. O tempo de ocorrência deste processo depende do tamanho da amostra do tecido encefálico a ser embebido (Heinsen et al., 2000).

Após o endurecimento do material, as bordas do bloco foram cortadas o mais rente possível ao tecido, com cuidado para não haver nenhuma perda de material biológico.

Este bloco com tecido foi colado na base de micrótomo de deslizamento, com celoidina 8% e umedecido em etanol 70% para endurecimento final por 4 horas. Após a colagem do bloco na base do micrótomo, o mesmo foi seccionado em fatias com espessuras que variam de 50 a 400 $\mu$ m que são armazenadas em álcool 70%, para posterior coloração (Heinsen et al., 2000). Ao final do processo de corte, as fatias deverão passar por dois processos de coloração: metade das fatias coradas com galocianina (coloração de Nissl) e a outra metade com imunohistoquímica (Alho, 2014).

A reconstrução tridimensional do encéfalo é realizada a partir da obtenção das imagens de Tomografia Computadorizada, Ressonância Magnética e as colorações das fatias (galocianina e imunohistoquímica), métodos descritos por (Heinsen *et al.*, 2004; Grinberg e Heinsen, 2007) (Figura 1).



**Figura 1.** Reconstrução 3D do tronco encefálico humano, mostrando a ponte, bulbo e mesencéfalo. Legenda: **A-** Substância negra; **B-** Fatia de encéfalo embebido em celoidina, cortado em micrótomo de deslizamento com espessura de 350 $\mu$ m e corada com galocianina (Coloração de Nissl).

## **DESENVOLVIMENTO**

Alguns projetos já desenvolvidos (Alho, 2011; Alho, 2012; Oliveira et al., 2012; Theofilas et al., 2014, entre outros) e em desenvolvimento (Alho, 2014) utilizam esta técnica de embebição de tecido nervoso em celoidina. No Brasil, a técnica está em fase de implantação e os pesquisadores dos trabalhos já em andamento tiveram o processamento do tecido realizado no laboratório da Universidade de Würzburg, na Alemanha com a colaboração do Prof. Heinsen. A implantação da técnica no país acarretará uma série de benefícios, dentre eles a redução na utilização dos recursos financeiros, e a diminuição do tempo necessário envolvendo envio do material para o exterior, assim como a redução dos riscos de danos durante o transporte do material. Assim, podemos obter resultados mais rápidos, melhorando o desenvolvimento de projetos que a usam para diagnósticos futuros.

## **RESULTADOS FINAIS**

### ***Tronco encefálico***

Foi utilizado um tronco encefálico desidratado em etanol de diversas graduações (70 %, 80% e 96%), como mostra a figura 2. Em recipiente de vidro, este tecido foi totalmente imerso em celoidina 4% (1700ml). Imediatamente muitas bolhas de ar se soltaram. O recipiente foi colocado no dessecador conectado em bomba a vácuo, que ficou ligado durante a noite. Na manhã seguinte desligou-se a bomba e adicionou mais 400ml de celoidina 4% (a celoidina 4% se concentra em 16%, e os excessos dos vapores de etanol e dietil éter se dissipam retirando as bolhas de ar), pois o volume já havia diminuído consideravelmente.

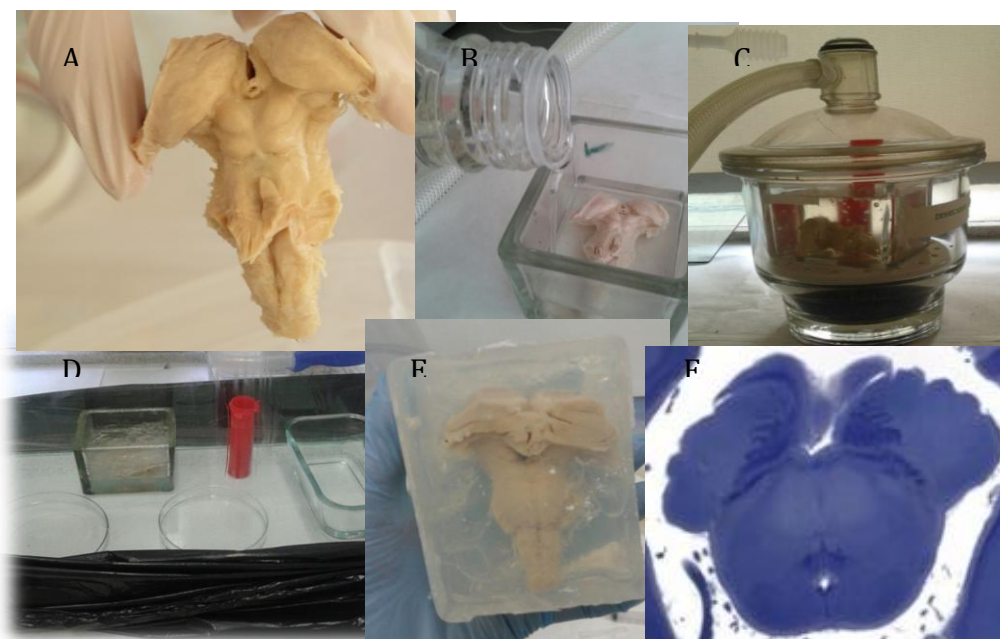
Aproximadamente 48 horas depois, pudemos observar que a celoidina já estava começando a endurecer. A bomba se manteve ligada durante seis dias, desligou-se e o material foi transferido para um aquário de vidro, com três placas de petri preenchidos com clorofórmio. Os vapores do clorofórmio devem endurecer a celoidina para que o material fique rígido o suficiente para ser cortado em micrótomo de deslizamento.

O aquário foi mantido vedado por um dia, depois foi aberto para que o excesso de líquido formado ao redor do bloco fosse retirado. Preencheu-se as placas de petri com mais clorofórmio, já que o mesmo evapora, e em seguida o

aquário foi novamente vedado. Por mais três dias, esse procedimento foi realizado novamente. Após 24 horas, o bloco já opaco e seco foi retirado do recipiente. Na superfície do mesmo apresentava um pouco de bolhas, por isso, com uma faca cortamos todas as bordas. O bloco foi mantido umedecido em outro recipiente com álcool 70% até o dia do corte.

Para o corte, o bloco foi colado na base do micrótomo no sentido mesencéfalo/ponte e foi desbastado até chegar ao nível do tecido. Depois de nivelado, o bloco foi seccionado em fatias de 350µm. As fatias foram colocadas em recipiente com álcool 70%, sendo que entre cada cinco fatias, um pedaço de papel filtro numerado foi colocado para mantê-las na ordem até o dia da coloração. Cada secção foi fotografada com uma câmera digital para reconstrução tridimensional do tronco.

Para o teste foram coradas algumas fatias com a coloração de Nissl (galocianina).



**Figura 2.** Passos do emblocamento de celoidina. Legenda: **A-** Tronco encefálico desidratado; **B-** Embebição em celoidina 8%; **C-** Recipiente colocado no dessecador conectado em bomba à vácuo; **D-** Recipiente colocado em aquário com placas de petri preenchidas com clorofórmio; **E-** Bloco de celoidina endurecido; **F-** Fatia do corte em micrótomo.

### ***Hemisférios***

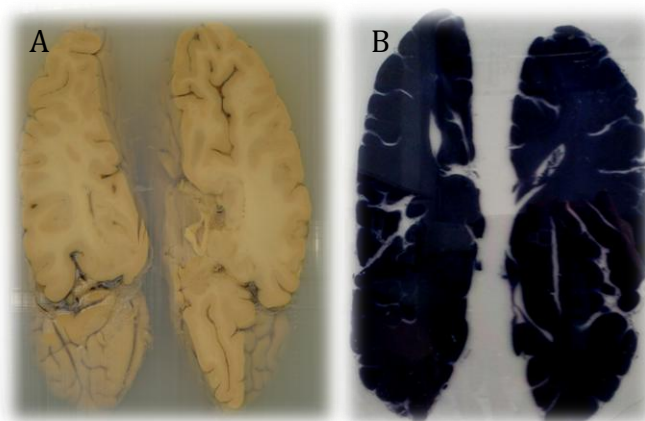
Foram utilizados dois hemisférios, que foram desidratados em concentrações graduais de álcool (70 %, 80% e 96%), aproximadamente uma semana em cada álcool.

Depois de desidratado, os hemisférios ficaram embebidos por aproximadamente uma semana na celoidina 2% (2 litros) para que a substância pudesse infiltrar nos ventrículos. Os tecidos foram transferidos para um recipiente de acrílico com diversos orifícios tampados com parafusos, onde foi adicionado mais 2 litros de celoidina 8%.

O recipiente foi colocado no dessecador conectado em bomba a vácuo que ficou ligado por 8 dias, porém, diariamente a bomba era desligada para que pequenos cortes fossem feitos na película que se formavam na superfície do bloco, isso facilitava a saída de bolhas de ar.

Com o bloco já um pouco endurecido, o recipiente foi transferido para um aquário de vidro com placas de petri preenchidas com clorofórmio para o completo endurecimento. O aquário foi mantido vedado por 18 dias, mas, assim como no dessecador o aquário era aberto diariamente para tirar o excesso de clorofórmio do bloco e preencher as placas de petri com mais clorofórmio. Além disso, conforme o bloco ia se tornando rígido removíamos uma fileira de parafusos do recipiente de acrílico, acelerando o tempo de endurecimento.

Após aproximadamente 16 dias no aquário, o bloco foi removido do recipiente, cortado as bordas e colocado novamente no aquário, porém, sem recipiente, pois ainda havia regiões um pouco amolecidas. Depois de totalmente rígido o bloco foi colocado em outro recipiente umedecido com álcool 70% até o momento do corte. O mesmo foi seccionado em fatias de 400 $\mu$ m de espessura no micrótomo de deslizamento, totalizando 242 fatias e depois coradas com a coloração de Nissl (galocianina) (Figura 3).



**Figura 3.** **A-** Bloco de celoidina com hemisférios; **B-** Lâmina dos hemisférios corada com galocianina.

## **CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Após a realização de vários testes com troncos encefálicos e hemisférios, pôde-se concluir que o resultado foi como o esperado, seguindo a metodologia descrita.

A temperatura ambiente é, obviamente, o principal fator que pode acelerar ou retardar o processamento do bloco. Porém, notou-se também que as alterações de umidade e diferença no tamanho do tecido também são de extrema importância.

Mesmo com esses fatores sendo levados em consideração, pode-se dizer que a celoidina tem diversas vantagens se comparada a parafina para a embebição de tecido nervoso (Heinsen et al., 2000) em alguns tipos de estudos.

O protocolo estabelecido com a desidratação e o processamento foram satisfatórios, definindo assim o protocolo padrão da técnica para tronco encefálico e hemisfério.

## **REFERÊNCIAS**

Alho, A.T.D.L. (2011). Caracterização da substância negra humana durante o envelhecimento. In Programa de Fisiopatologia Experimental (São Paulo, Universidade de São Paulo), p. 145.

Alho, A.T.D.L. (2014). Validação histológica de imagens em alta resolução do núcleo pedunculopontino (PPN). In Laboratório de fisiopatologia no envelhecimento (Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo).

Alho, E.J.L. (2012). Dreidimensionaler digitaler stereotaktischer Atlas des menschlichen Zwischenhirns: Zytoarchitektonik im Verbund mit Magnetresonanztomographie (MRT). In Klinik und Poliklinik für Psychiatrie, Psychosomatik und Psychotherapie (Würzburg, Germany, Würzburg University), p. 60.

Borba, F.S. (2004). Dicionário UNESP do português contemporâneo. UNESP, ed.

Bruce-Gregorios, J., 2006, Histopathologic techniques.

Grinberg, L.T., Ferretti, R.E., Farfel, J.M., Leite, R., Pasqualucci, C.A., Rosemberg, S., Nitrini, R., Saldiva, P.H., Filho, W.J., and Group, B.A.B.S. (2007). Brain bank of the Brazilian aging brain study group - a milestone reached and more than 1,600 collected brains. *Cell Tissue Bank* 8, 151-162.

Grinberg, L. T.; Heinsen, H. Computer-assisted 3D reconstructions of the human substantia nigra - a tool for neurodegenerative studies. 8th International meeting on AD/PD. Salzburg 2007.

Heinsen, H., Arzberger, T., and Schmitz, C. (2000).Celloidin mounting (embedding without infiltration) - a new, simple and reliable method for producing serial sections of high thickness through complete human brains and its application to stereological and immunohistochemical investigations.*JChemNeuroanat* 20, 49-59.

Heinsen, H. et al. 3D reconstruction of celloidin-mounted serial sections. *Acta Neuropathologica*, v. 374, 2004.

Miguel-Hidalgo, J.J., and Rajkowska, G. (1999).Immunohistochemistry of neural markers for the study of the laminar architecture in celloidin sections from the human cerebral cortex. *J Neurosci Methods* 93, 69-79.

Oliveira, K.C., Nery, F.G., Ferreti, R.E., Lima, M.C., Cappi, C., Machado-Lima, A., Polichiso, L., Carreira, L.L., Ávila, C., Alho, A.T., *et al.*(2012). Brazilian psychiatric brain bank: a new contribution tool to network studies. *Cell Tissue Bank* 13, 315-326.

Theofilas, P., Polichiso, L., Wang, X., Lima, L.C., Alho, A.T., Leite, R.E., Suemoto, C.K., Pasqualucci, C.A., Jacob Filho, W., Heinsen, H., *et al.* (2014). A novel approach for integrative studies on neurodegenerative diseases in human brains.*JNeurosciMethods*.