

TÉCNICA DE CLAREAMENTO DO JEJUNO DE RATOS SUBMETIDOS A ISOLAMENTO SOCIAL

André Luiz Rezini Gasparro Sevilha (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Lídia Rodrigues Cicero (Coorientador), Juliana Vanessa Colombo Martins Perles (Orientador). E-mail: ra126879@uem.br.

Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Biológicas, Maringá, PR.

Morfologia/Histologia

Palavras-chave: Sistema Nervoso Entérico; iDisco; Clareamento de tecido

RESUMO

Métodos inovadores, como o clareamento iDISCO+, permitiram a visualização tridimensional do TGI, melhorando diagnósticos. O objetivo deste trabalho foi padronizar a técnica iDISCO+ para pesquisa e aplicação futura em diagnósticos. O estudo investigou o trato gastrointestinal (TGI) e seu controle pelo sistema nervoso entérico (SNE), incluindo os plexos mioentérico e submucoso, com β -tubulina III como marcador de inervação. Foram usados 2 ratos Wistar albinos: um animal controle e outro do grupo isolamento social. O jejuno de cada animal foi coletado para realização da técnica de clareamento iDISCO+ e imunohistoquímica para β -tubulina III. A técnica iDISCO+ clareou os tecidos intestinais, permitindo a imunomarcação de β -tubulina III. Problemas técnicos no microscópio confocal limitaram a análise tridimensional. Apesar dos desafios, o estudo destacou a viabilidade do clareamento para visualização da estrutura nervosa do TGI. Estudos futuros são necessários para aprimorar a metodologia e aprofundar a compreensão do SNE e suas implicações na saúde gastrointestinal.

INTRODUÇÃO

O trato gastrointestinal (TGI) é composto por quatro camadas: mucosa, submucosa, bicamada muscular e túnica serosa. O sistema nervoso entérico (SNE), constituído por neurônios e células da glia, controla funções do TGI, organizando-se em plexos, incluindo os ganglionados, plexos mioentérico e submucoso (FURNESS, 2012). A β -tubulina, presente no citoesqueleto, é usada como marcador em técnicas de imunohistoquímica de inervação entérica (HENDERSHOT, 2007). Técnicas histológicas 2D limitavam a compreensão do SNE e do TGI. Recentemente, métodos como o clareamento têm surgido para superar limitações das técnicas tradicionais, tornando o tecido mais transparente e permitindo a passagem de laser, o que melhora a precisão diagnóstica em biópsias, possibilitando a visualização tridimensional. A escolha do método de clareamento,

como o iDISCO+ depende de fatores como clareamento desejado, compatibilidade com imunomarcção, preservação da integridade morfológica, complexidade e custo, além da disponibilidade de microscopia confocal (BOSSOLANI, et al., 2019). Estudos indicam associação entre fatores psicológicos e distúrbios gastrointestinais funcionais (KOLOSKI et al., 2012). No entanto, pesquisas sobre o impacto de estresse psicológico no SNE e no TGI são limitadas. Assim, o objetivo deste estudo foi padronizar a técnica de clareamento em cortes intestinais para futuras pesquisas e diagnósticos.

MATERIAIS E MÉTODOS

Obtenção dos grupos de estudo

Foram seguidos os princípios éticos da Sociedade Brasileira De Ciência Em Animais De Laboratório SBCAL e obtida a aprovação da CEUA (protocolo 4462180216) da Universidade Estadual de Maringá (UEM). O estudo utilizou 2 ratos adultos machos Wistar albinos do Biotério Central da UEM. Esses animais foram divididos em animais controle (C) e isolamento social (IS). Os animais foram transferidos aos 21 dias para o Biotério Setorial e submetidos ao isolamento por estresse por 15 dias, onde foram acondicionados individualmente em caixas de propileno (30X20X13cm), sendo manipulados apenas para a manutenção padrão de limpeza e troca de caixa de acordo com as normas do biotério.

Coleta do material e processamento para preparado total e clareamento

Aos 39 dias, os animais foram anestesiados e eutanasiados. Realizou-se a celiotomia, coleta do jejuno e fixação em paraformaldeído 4%. Os jejunos foram incubados, lavados, armazenados e cortados (~1 cm²) para clareamento. Outra amostra (1 cm²) foi microdissecada para imunohistoquímica do plexo mioentérico.

Clareamento do material

O método iDISCO+ usa incubações em tetraidrofurano variando em diclorometano e éter dibenzil para clarear as amostras (~2hr). Por fim, as amostras foram armazenadas em solução de éter benzílico após clareamento (BOSSOLANI et al., 2019).

Imunohistoquímica para β -tubulina III em preparado total de membrana e no tecido clareado

Para marcação de β -tubulina III, cortes intestinais foram lavados 2x por 10 minutos com PBS + Triton X-100 0,5%, seguindo para etapa de bloqueio, feita por 2h em solução de PBS+ (Triton X-100 0,5% + BSA 2% + soro de burro 10%). Posteriormente, as amostras foram incubadas com anticorpo primário mouse anti- β -tubulina III (1:200) por 72h em solução de Triton X-100 0,5% + BSA 2% + soro de burro 2%. Após a incubação do anticorpo primário foram feitas 3 lavagens por 5 minutos cada com PBS + Triton X-100 0,5%. Por fim, foi feita a incubação com anticorpo secundário Alexa Fluor 488 Donkey anti-mouse (1:500) por 2h na mesma solução do anticorpo primário. Outras 3 lavagens de 5 minutos foram feitas com PBS. Com as amostras microdissecadas foram montadas lâminas com glicerol tamponado 10% como meio de montagem.

Análises qualitativas

A análise do tecido clareado e imunomarcado foi avaliada por meio da obtenção de imagens em microscopia confocal na objetiva de 20x.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Embora conduzido com animais isolados, este estudo focou na padronização da técnica de clareamento para análise tridimensional da parede intestinal. O método poderá ser aplicado em futuras investigações sobre o impacto do estresse psicológico e em outras doenças intestinais, enquanto as análises morfológicas no SNE serão abordadas em um outro estudo separado.

Antes de realizar a técnica de imuno-histoquímica no tecido clareado, foi feita imunofluorescência em preparado total de membrana para avaliar a eficiência da imunomarcagem da β -tubulina III. A marcação foi bem-sucedida, fornecendo evidências sólidas de sua presença no tecido. Esse tipo de marcação é amplamente utilizado como uma técnica de avaliação de atividades no SNE, devido à sua especificidade de marcação de neurônios e fibras nervosas, o que permite uma análise precisa das estruturas relacionadas ao sistema nervoso presente no tecido clareado (BOSSOLANI, et al., 2016).

A técnica iDISCO+ mostrou eficácia no clareamento do tecido e preservação de antigenicidade para imunomarcagem. Apesar de limitações no equipamento, estudos anteriores demonstraram análises tridimensionais viáveis (LIEBMANN, 2016). Contudo, desvantagens incluem uso de solventes orgânicos causando desidratação e encolhimento do tecido, bem como complexidade e demora. Apesar da imunomarcagem visível, a análise ficou inconclusiva devido a questões microscópicas. Abordagens aquosas superam tal inconveniente (BOSSOLANI, et al., 2016). Para confirmação da eficácia da técnica em órgãos do TGI são necessários mais estudos, assim como comparações com outras técnicas de clareamento e marcadores, buscando métodos mais

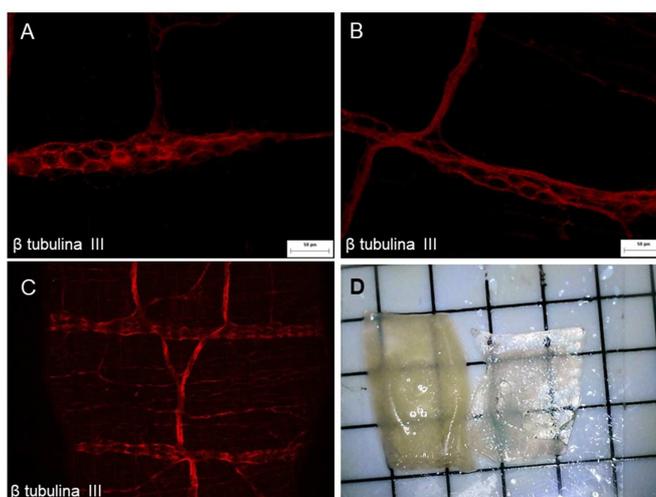


Figura 1: Fotomicrografias evidenciando a imunomarcação de β -tubulina III no plexo mioentérico. (A) grupo controle;(B) grupo isolamento social. (C). Fotomicrografia evidenciando a imunomarcação de β -tubulina III obtida após técnica de clareamento. (D) Imagens macroscópicas de amostras intestinais antes e depois da técnica de clareamento. Barra de escala 50 μ m.

CONCLUSÕES

Conclui-se que o método de clareamento foi eficaz, clareando e mantendo a imunorreatividade do tecido, confirmado através da marcação de β -tubulina III. Porém, a análise de imagens tridimensionais foi inconclusiva devido a problemas com o microscópio confocal.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à orientadora Juliana Vanessa Colombo Martins Perles e à coorientadora Lídia Rodrigues Cicero por toda colaboração, auxílio e oportunidade de aprendizado. Ao CNPq pela concessão da bolsa e à Universidade Estadual de Maringá.

REFERÊNCIAS

BOSSOLANI, G. D. P. et al. Comparative analysis reveals Ce3D as optimal clearing method for in toto imaging of the mouse intestine. **Neurogastroenterology & Motility**, v. 31, n. 5, p. e13560, 2019.

FURNESS, J. B. The enteric nervous system and neurogastroenterology. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, [S.L.], v. 9, n. 5, p. 286-294, 2012.

HENDERSHOT, Tyler J. et al. Expression of Hand2 is sufficient for neurogenesis and cell type-specific gene expression in the enteric nervous system. **Developmental dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists**, v. 236, n. 1, p. 93-105, 2007.

KOLOSKI, N. A. et al. The brain-gut pathway in functional gastrointestinal disorders is bidirectional: a 12-year prospective population-based study. **Gut**, v. 61, n. 9, p. 1284-1290, 2012.

LIEBMANN, Thomas et al. Three-dimensional study of Alzheimer's disease hallmarks using the iDISCO clearing method. **Cell reports**, v. 16, n. 4, p. 1138-1152, 2016.