

Universidade Federal do Rio de Janeiro
Centro de Ciências da Saúde
Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho
Programa de Pós-Graduação MP Formação para Pesquisa Biomédica

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO PROFISSIONAL

**ANÁLISE DO USO DO ISOPROPANOL EM ESTUDOS
MORFOLÓGICOS E MOLECULARES DE EMBRIÕES DE
*XENOPUS LAEVIS***

Carolina Batista

Orientadora: Valéria de Mello Coelho

2017

CAROLINA BATISTA

**ANÁLISE DO USO DO ISOPROPANOL EM ESTUDOS MORFOLÓGICOS E
MOLECULARES DE EMBRIÕES DE *XENOPUS LAEVIS***

**Dissertação de Mestrado Profissional
apresentada ao Programa de Pós-
graduação MP Formação para a Pesquisa
Biomédica (Biofísica), Instituto de Biofísica
Carlos Chagas Filho, como parte do
requisito necessário à obtenção do grau
de Mestre em Formação para a Pesquisa
Biomédica.**

Orientadora: Valéria de Mello Coelho

2017

Carolina Batista

Análise do uso do isopropanol em estudos morfológicos e moleculares de embriões de *Xenopus laevis*.

Orientadora: Valéria de Mello Coelho

Dissertação submetida ao Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho da Universidade Federal do Rio de Janeiro visando à obtenção do grau de mestre em Formação para a Pesquisa Biomédica.

Aprovada por:

Prof^a Dra Valéria de Mello Coelho

Prof^a Associada do Instituto de Ciências Biomédicas - UFRJ

Prof^a Dra Flávia Carvalho Alcantara Gomes

Prof^a Titular do Instituto de Ciências Biomédicas - UFRJ

Dra. Grasiella Ventura Matioszek

Bióloga do Instituto de Ciências Biomédicas - UFRJ

Dr. Rômulo Sperduto Dezone

Biólogo Pós-Doutor na Universidade do Grande Rio - Unigranrio

Revisor:

Prof^a Dra. Camila Hochman-Mendez

Prof^o Substituta do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho - UFRJ

Suplente interno:

Prof^a Daniela Uziel Rozental

Prof^a Adjunta do Instituto de Ciências Biomédicas - UFRJ

Suplente externo:

Prof^o Felipe Leite de Oliveira

Prof^o Adjunto do Instituto de Ciências Biomédicas - UFRJ

*A todos que embarcaram comigo
nessa doce loucura de um segundo mestrado...*

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, que sempre me ensinaram que estudar nunca é demais. Afinal, só estudando é que descobrimos o quanto sabemos pouco.

Ao meu marido, por não me deixar desistir mesmo nos períodos difíceis que passei de saúde durante esta empreitada.

À minha orientadora, prof^a Valéria de Mello Coelho, por continuar nesta empreitada comigo, mesmo o projeto desviando-se do original. Conte sempre comigo.

A todos os componentes da banca. Obrigada pelo tempo dedicado a correção e sugestões a este trabalho.

Ao Instituto de Biofísica pela oportunidade de fazer um Mestrado Profissional para eu me atualizar profissionalmente.

Aos meus chefes, prof^a Flávia Gomes e prof^o José Garcia por me permitirem fazer este mestrado, confiando que esta empreitada não prejudicaria minha rotina nos laboratórios.

Ao Laboratório de Embriologia dos Vertebrados, Unidade de Multiusuários de Histotécnicas, Unidade de Microscopia Confocal e Laboratório de Neuroplasticidade, todos do ICB, por estarem sempre a disposição para me ajudar.

Aos meus amigos do Mestrado Profissional. Durante todo o período nos ajudamos, pois o sucesso de um é o sucesso de todos. Agradecimento especial à Mestre Noêmia pelas belíssimas imagens que ela me ajudou a fazer.

A todos meus colegas de trabalho, alunos do LNBC e LEV. Estarei sempre a disposição para ajudá-los, pois ciências sem partilha do conhecimento não faz sentido.

*“Nem toda hora
é obra
Nem toda obra
é prima
Algumas são mães
Outras irmãs
Algumas
clima”*
Paulo Leminski

RESUMO

Batista, Carolina. Análise do uso do isopropanol em estudos morfológicos e moleculares de embriões de *Xenopus laevis*. Rio de Janeiro, 2017.

A biologia do desenvolvimento compreende a embriologia, área que investiga os mecanismos do desenvolvimento e sua origem genética em diversas espécies animais a partir da fusão do gameta masculino e feminino. Dentre os diversos modelos animais empregados em tais estudos, estão os anfíbios da espécie *Xenopus laevis* que produzem grande quantidade de ovos a cada fertilização. O desenvolvimento aquático de *X. laevis* favorece a manipulação dos embriões nos primeiros estágios, os quais apresentam grande quantidade de vitelo em suas células dificultando, assim, a realização de análises morfofisiológicas a partir de secções histológicas. Neste estudo, interessamo-nos por avaliar o uso de fixadores à base de isopropanol em comparação com fixadores padrões, incluindo: MEMFA, formalina tamponada 10%, paraformaldeído 4%, solução de Carnoy e solução de Bouin. Além disso, avaliamos o processamento histológico com isopropanol sem utilizar xileno, o que diminui toxicidade e resíduos ao meio ambiente. Quanto às dimensões dos embriões nos estágios de clivagem, observamos que os fixadores à base de isopropanol, isopropanol com ácido acético (IA) ou isopropanol com ácido acético e formalina (IFA), não sofreram alterações em comparação com os embriões vivos ou aqueles submetidos aos fixadores padrões. O uso de IA e IFA na fixação e isopropanol no processamento histológico propiciou melhor qualidade das análises histológicas dos embriões de *X. laevis*, como visualizados por coloração com hematoxilina e eosina, azul de toluidina ou pela marcação com DAPI. Diferente de todos os outros fixadores testados, o uso de isopropanol, IA ou solução de Carnoy como fixadores para posterior extração de RNA de embriões previamente emblocados em Paraplast®, propiciou eficiente rendimento do produto extraído. Porém, houve amplificação do gene de referência EF1 α somente quando utilizou-se isopropanol ou IA, o que confirmou a integridade do RNA extraído. Na análise dos embriões de *X. laevis* por microscopia eletrônica de varredura, os fixadores IA, IFA e solução de Carnoy, diferente de todos os outros avaliados, permitiram a visualização dos embriões sem a necessidade da retirada da membrana vitelínica que os envolve. Nossos dados mostram pela primeira vez que fixadores à base de isopropanol, incluindo IA e IFA, são opções eficazes para posteriores análises histológicas e moleculares de embriões de *X. laevis* nos primeiros estágios do desenvolvimento.

ABSTRACT

Batista, Carolina. Analysis of the use of isopropanol in morphological and molecular studies of *Xenopus laevis* embryos. Rio de Janeiro, 2017.

Developmental biology comprises embryology, area that investigates the mechanisms of development and its genetic origin in several animal species, from the fusion of the male and female gametes. Among several animal models used in such studies are the amphibians of the *Xenopus laevis* species that produce large numbers of eggs after each fertilization. The aquatic development of *X. laevis* favors the manipulation of embryos in the early stages, which present a large amount of vitelinic vesicles in their cells, thus making it difficult to perform morphophysiological analyzes from histological sections. In this study, we are interested in evaluating the use of isopropanol-based fixatives compared to standard fixatives, including: MEMFA, formalin solution, paraformaldehyde solution, Carnoy's solution and Bouin's solution. In addition, we evaluated the histological processing with isopropanol without using xylene, which reduces toxicity and residues to the environment. Regarding the size of embryos in the cleavage stages, we observed that isopropanol, isopropanol with acetic acid (IA) or isopropanol with acetic acid and formalin (IFA) fixatives were not altered in comparison with live embryos or those submitted to standard fixatives. The use of IA and IFA in fixation and isopropanol alone in histological processing provided better quality of the histological analyzes of *X. laevis* embryos, as visualized by staining with hematoxylin and eosin, toluidine blue or by DAPI labeling. Unlike all other fixatives tested, the use of isopropanol or IA or Carnoy's solution as fixatives for subsequent extraction of RNA from embryos previously embedded in Paraplast®, provided an efficient concentration of the product extracted. However, there was amplification of the reference gene EF1 α only when isopropanol or IA was used, which confirms the integrity of the RNA extracted. In the analysis of the *X. laevis* embryos by scanning electron microscopy, the fixatives IA, IFA and Carnoy's solution, unlike all the others evaluated, allowed visualization of the embryos without the need of removing the surrounding yolk membrane. Therefore, our data show for the first time that isopropanol-based fixatives, including IA and IFA, are effective options for further histological and molecular analyzes of *X.laevis* embryos in the first stages of development.

SUMÁRIO

| | | |
|-------|--|----|
| 1 | Introdução | 17 |
| 1.1 | O desenvolvimento embrionário: aspectos gerais do desenvolvimento de <i>Xenopus laevis</i> | 19 |
| 1.2 | Preparação de amostras para análises histológicas..... | 22 |
| 1.2.1 | Agentes utilizados na fixação histológica..... | 23 |
| 1.2.2 | O processamento histológico..... | 31 |
| 1.3 | Análise de material histológico..... | 32 |
| 1.4 | Resíduos químicos em histologia..... | 35 |
| 2 | Justificativa | 37 |
| 3 | Objetivos | 38 |
| 3.1 | Objetivo geral..... | 38 |
| 3.2 | Objetivos específicos..... | 38 |
| 4 | Metodologia | 40 |
| 4.1 | Embriões..... | 40 |
| 4.2 | Fixação química..... | 40 |
| 4.3 | Embriões clarificados..... | 41 |
| 4.4 | Tipo de processamento histológico..... | 41 |
| 4.4.1 | Processamento histológico tradicional com etanol/xileno..... | 42 |
| 4.4.2 | Processamento histológico com isopropanol..... | 43 |
| 4.4.3 | Processamento histológico para microscopia eletrônica de varredura... | 44 |
| 4.5 | Colorações histológicas..... | 46 |
| 4.5.1 | Coloração com hematoxilina e eosina..... | 46 |
| 4.5.2 | Coloração com eosina..... | 47 |
| 4.5.3 | Coloração com azul de toluidina..... | 48 |
| 4.6 | Fluorescência com DAPI..... | 49 |
| 4.7 | Microscopias..... | 49 |
| 4.8 | Extração de RNA e RT-qPCR..... | 50 |
| 4.9 | Análise de dados..... | 51 |

| | | |
|----------|---|-----------|
| 5 | Resultados | 52 |
| 5.1 | Fixadores à base de isopropanol foram eficazes em preservar a morfologia dos embriões de <i>Xenopus laevis</i> | 51 |
| 5.2 | Uso do isopropanol no processamento histológico preserva embriões de <i>Xenopus laevis</i> nos primeiros estágios do desenvolvimento..... | 62 |
| 5.3 | Os fixadores com isopropanol são alternativas à fixação de embriões de <i>Xenopus laevis</i> destinados para análises histológicas..... | 66 |
| 5.4 | Embriões fixados corados com DAPI apresentaram marcação para autofluorescência dos corantes citoplasmáticos eosina e azul de toluidina..... | 72 |
| 5.5 | Embriões inteiros fixados com isopropanol preservam a integridade para visualização em microscopia confocal..... | 76 |
| 5.6 | Embriões fixados em solução com isopropanol e sem formalina preservam RNA..... | 79 |
| 5.7 | Embriões fixados em IA ou IFA não precisam ter o cório removido para observação por MEV..... | 81 |
| 6 | Discussão | 87 |
| 7 | Conclusão | 95 |
| | Referências | 96 |
| Anexo A | Soluções fixadoras e tampões | 105 |
| Anexo B | Corantes histológicos e marcadores fluorescentes | 107 |

Lista de figuras

| | |
|--|----|
| Figura 1: Semelhanças e diferenças entre diferentes embriões de vertebrados à medida que avançam no desenvolvimento..... | 18 |
| Figura 2: Clivagem na fase inicial do desenvolvimento de <i>Xenopus</i> | 20 |
| Figura 3: Ciclo de vida do <i>Xenopus laevis</i> | 21 |
| Figura 4: Fixação com formaldeído promove ligação cruzada entre proteínas..... | 26 |
| Figura 5: Desenho experimental..... | 39 |
| Figura 6: Processamento histológico tradicional, com etanol e xileno..... | 43 |
| Figura 7: Processamento histológico com isopropanol..... | 44 |
| Figura 8: Processamento histológico com isopropanol..... | 46 |
| Figura 9: Embriões de <i>Xenopus laevis</i> , nos estágios iniciais do desenvolvimento, não apresentaram alteração morfológica quando fixados em soluções com formaldeído em sua composição..... | 53 |
| Figura 10: Embriões de <i>Xenopus laevis</i> , nos estágios iniciais do desenvolvimento, fixados com agentes com isopropanol na composição não apresentaram alteração em sua forma..... | 54 |
| Figura 11: Embriões de <i>Xenopus laevis</i> , nos estágios iniciais do desenvolvimento, sofrem alterações morfológicas quando submetidos a fixadores com etanol..... | 57 |
| Figura 12: Diâmetro dos embriões de <i>Xenopus laevis</i> nos estágios de clivagem..... | 60 |
| Figura 13: Cortes histológicos dos embriões de <i>Xenopus laevis</i> processados utilizando protocolo tradicional (etanol e xileno) ou com isopropanol..... | 63 |
| Figura 14: Secções de embriões fixados em PFA 4% e coradas em HE..... | 67 |
| Figura 15: Secções de embriões processados com isopropanol e fixados com agentes com isopropanol na composição..... | 68 |
| Figura 16: Secções de embriões com processamento histológico em protocolo tradicional (etanol/xileno) e corados com azul de toluidina..... | 70 |
| Figura 17: Processamento histológico com isopropanol apresentou coloração de distinção de estruturas em embriões fixados em formalina 10%, IA e IFA..... | 71 |
| Figura 18: Secções de embriões de <i>Xenopus laevis</i> com marcação específica para DAPI..... | 73 |

| | |
|---|----|
| Figura 19: Secções de embriões de <i>Xenopus laevis</i> com marcação específica para DAPI e eosina..... | 74 |
| Figura 20: Secções de embriões de <i>Xenopus laevis</i> com marcação específica para DAPI e azul de toluidina..... | 75 |
| Figura 21: Embriões corados com eosina e visualizados em microscopia confocal..... | 77 |
| Figura 22: Embriões fixados, corados com azul de toluidina e observados em microscopia confocal..... | 78 |
| Figura 23: Fixadores com ácido acético, na ausência ou presença de isopropanol, preservam RNA de embriões emblocados para procedimentos histológicos..... | 79 |
| Figura 24: Amplificação de EF1 α das amostras de RNA extraídas de embriões emblocados em resina Paraplast®..... | 80 |
| Figura 25: MEV de embriões de <i>Xenopus laevis</i> fixados nos agentes controles..... | 82 |
| Figura 26: MEV de embriões de <i>Xenopus laevis</i> fixados em solução de Carnoy..... | 84 |
| Figura 27: MEV de embriões de <i>Xenopus laevis</i> fixados em IA..... | 85 |
| Figura 28: MEV de embriões de <i>Xenopus laevis</i> fixados em IFA..... | 86 |

Lista de tabelas

| | |
|---|----|
| Tabela 1: Composição das soluções fixadoras utilizadas para análise histológica de embriões de <i>Xenopus laevis</i> | 25 |
| Tabela 2: Ação de fixadores e sua aplicação na preservação de embriões de <i>Xenopus laevis</i> | 30 |
| Tabela 3: Análise semi-quantitativa dos embriões de <i>Xenopus laevis</i> no período de clivagem..... | 58 |
| Tabela 4: Diâmetro dos embriões de <i>Xenopus laevis</i> em diferentes fases embrionárias do período de clivagem..... | 61 |
| Tabela 5: Visualização de estruturas celulares após análise de coloração por HE dos cortes histológicos de embriões de <i>Xenopus laevis</i> | 64 |
| Tabela 6: Visualização de estruturas celulares após análise de coloração por azul de toluidina dos cortes histológicos de embriões de <i>Xenopus laevis</i> | 65 |
| Tabela 7: Ação de fixadores e sua aplicação na preservação de embriões de <i>Xenopus laevis</i> | 94 |

Lista de siglas e abreviaturas

| | |
|---|--|
| Ar | Argônio |
| Ca(NO₃)₂·4H₂O | Nitrato de cálcio tetrahidratado |
| CHCl₃ | Clorofórmio |
| CH₃COOH | Ácido acético glacial |
| C₂H₆O | Etanol |
| C₃H₈O | Isopropanol |
| C₄H₁₁NO₃ | Tris(hidroximetil)aminometano |
| C₆H₃N₃O₇ | Ácido pícrico |
| DAPI | 4',6-diamidino-2-fenilindol dihidroclorato |
| DEPC | Dietilpirocarbonato |
| DNA | Ácido desoxirribonucleico (do inglês, deoxyribonucleic acid) |
| EF1α | Fator 1- α de alongamento |
| EGTA | Ácido aminopolicarboxílico |
| HE | Hematoxilina e eosina |
| He/Ne | Hélio/Neônio |
| H₂O | Água |
| H₂O₂ | Peróxido de hidrogênio |
| IA | Isopropanol + Ácido acético |
| IBCCF | Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho |
| ICB | Instituto de Ciências Biomédicas |
| IFA | Isopropanol + Formalina + Ácido acético |
| KAl(SO₄)₂ | Alúmen de potássio |
| KCl | Cloreto de potássio |
| KH₂PO₄ | Fosfato de potássio monobásico |
| MEMFA | MOPS + EGTA + MgSO ₄ + Formalina |
| MEV | Microscopia eletrônica de varredura |
| MgSO₄ | Sulfato de Magnésio |
| MgSO₄·7H₂O | Sulfato de magnésio heptahidratado |

| | |
|--|---|
| MOPS | Ácido 3-(N-morfolino)propanolsulfônico |
| Na₂B₄O₇ | Borato de sódio |
| NaCl | Cloreto de sódio |
| NaH₂PO₄ | Fosfato de sódio monobásico |
| Na₂HPO₄ | Fosfato de sódio dibásico |
| NH₄Al(SO₄)₂·12H₂O | Sulfato de alumínio e amônio |
| PBS | Tampão fosfato |
| PFA | Paraformaldeído |
| RNA | Ácido ribonucleico (do inglês, ribonucleic acid) |
| RT-qPCR | Reação em cadeia da transcriptase reversa em tempo real |
| UFRJ | Universidade Federal do Rio de Janeiro |
| UMH | Unidade Multiusuários de Histotécnica |
| USP | Universidade de São Paulo |

1 INTRODUÇÃO

A biologia do desenvolvimento animal compreende a embriologia, sendo esta a ciência que investiga os mecanismos do desenvolvimento e sua origem genética para as diversas espécies animais (IRIE; SEHARA-FUJISAWA, 2007). A embriologia engloba ainda o estudo do desenvolvimento completo de um animal a partir do zigoto. O zigoto é a célula originada da fusão dos gametas masculino e feminino após a fecundação (MANDARIM, 2013).

Para a compreensão do complexo processo de desenvolvimento e de sinalização celular envolvida durante o período de embriogênese, há diversos estudos multidisciplinares que utilizam diferentes modelos de invertebrados e vertebrados. Dentre os modelos de invertebrados e vertebrados mais utilizados destacamos: *Drosophila melanogaster* (mosca da fruta), *Xenopus sp.* (anfíbio), *Brachydanio rerio* (peixe-zebra), *Gallus gallus domesticus* (galinha) e *Mus musculus* (camundongo). Esta comparação é possível devido a presença de mecanismos de desenvolvimento altamente conservados entre as espécies. Isso é o que auxilia na compreensão dos processos que regulam o desenvolvimento embrionário humano (IRIE; SEHARA-FUJISAWA, 2007) (Figura 1).

Os zigotos de mamíferos são os mais difíceis de estudar porque são os menores do reino animal (GILBERT, 2010; apud MAGLI *et al.*, 2012) e por terem desenvolvimento placentário, sendo, portanto, de difícil manipulação. Além disso, os zigotos de mamíferos são produzidos em número reduzido quando comparados aos de anfíbios, por exemplo. Mesmo com o desenvolvimento de técnicas de fertilização *in vitro*, os embriões de mamíferos são implantados em fêmeas até o estágio de blástula, o que torna importante o aprimoramento de técnicas e estudos em outros modelos (ZECH *et al.*, 2005; PRADOS *et al.*, 2012). Outrossim, os zigotos de anfíbios apresentam todo o desenvolvimento aquático, o que facilita ainda mais as observações.

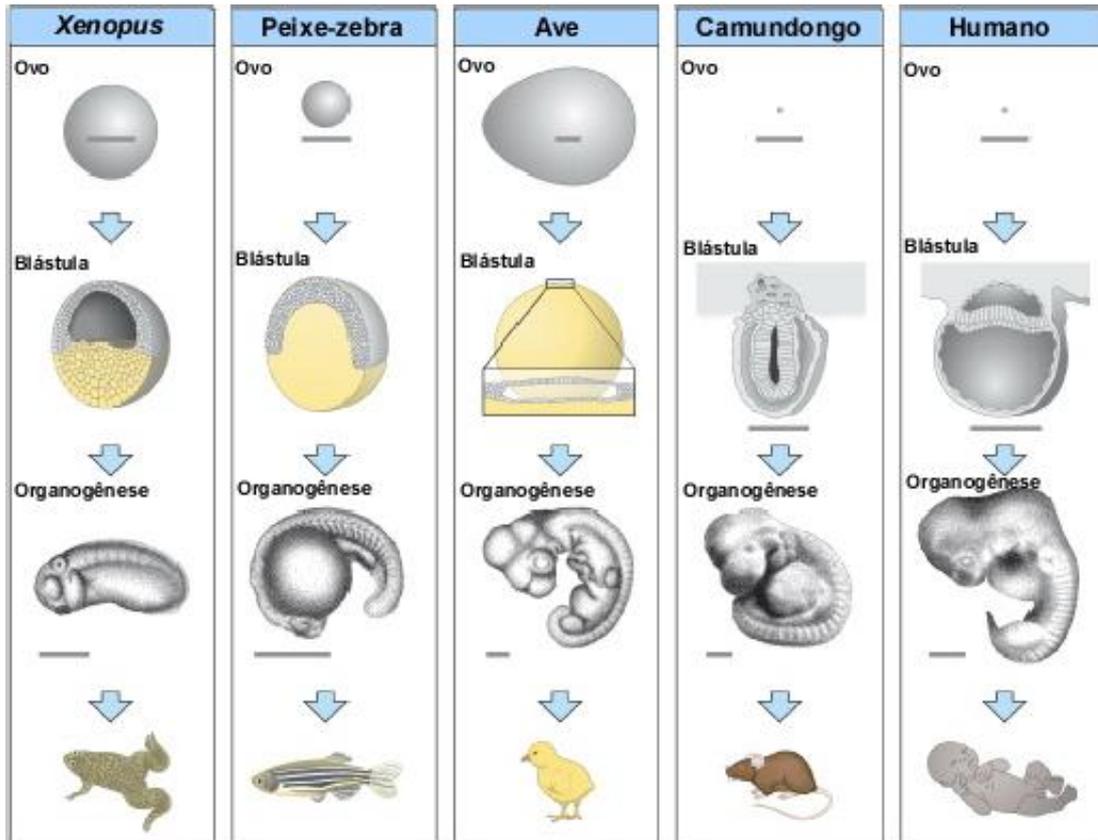


Figura 1: Semelhanças e particularidades de diferentes embriões de vertebrados à medida que avançam no desenvolvimento. Os mecanismos do desenvolvimento são conservados entre as espécies, o que permite a compreensão dos processos que ocorrem durante o desenvolvimento embrionário humano. Nesta imagem podemos ver que as estruturas iniciais são semelhantes, com diferença temporal para o aparecimento dessas. Conforme o avanço no período de desenvolvimento é que os embriões vão se diferenciando entre as espécies. Os ovos dos mamíferos são os mais difíceis de estudar porque são pequenos, de difícil manipulação *in vitro* (eles precisam ser implantados nas fêmeas até o estágio de blástula). Além disso, esses ovos são produzidos em pouca quantidade quando comparamos com anfíbios, por exemplo. Anfíbios produzem grande quantidade de ovos a cada fertilização, seu desenvolvimento é aquático, o que favorece a observação do desenvolvimento e a manipulação desses embriões. O infortúnio que podemos encontrar é que as células desses embriões apresentam grande quantidade de vitelo e uma pequena quantidade de citoplasma, o que pode dificultar algumas análises, como histológica. (Adaptado de STAVELEY, 2013)

Desde o século XVIII busca-se o aprimoramento das técnicas de microscopia para confirmar evidências evolutivas nas diversas filogenias. Técnicas de coloração eram as mais usadas para confirmar a homologia entre as espécies. Hoje existem técnicas mais sofisticadas para complementar os dados de coloração histológica, como análise da expressão de RNA mensageiro, por hibridização *in situ*, ou de proteínas, por imuno-histoquímica (HOLGER *et al.*, 2001; NETTO; SAAD; DYSERT, 2003).

1.1 O DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO: ASPECTOS GERAIS DO DESENVOLVIMENTO DE *XENOPUS LAEVIS*

Um dos modelos escolhidos na área da biologia experimental, no campo da biologia do desenvolvimento, é o anfíbio da espécie *Xenopus laevis* (SCHOENWOLF *et al.*, 2008). Além do tempo reduzido dos experimentos, devido à rapidez no desenvolvimento embrionário (progridem de ovo fecundado para girino, a fase larval, em aproximadamente quatro dias), esses anfíbios apresentam embriões de fácil manipulação, seus blastômeros são grandes e toleram manipulação cirúrgica (MANDARIM, 2013; SCHOENWOLF *et al.*, 2008). Pelo fato do *X. laevis* ser tetraplóide, fica difícil a utilização desta espécie para geração de animais transgênicos, usando para este fim a espécie *Xenopus tropicalis* (SCHOENWOLF *et al.*, 2008). Informações gerais e protocolos sobre a manipulação de *X. laevis* podem ser encontradas em Sive, Grainger e Harland (2010) e na Xenbase (<http://www.xenbase.org/>; BOWES *et al.*, 2008).

Durante a fertilização, o núcleo do óvulo se funde ao núcleo do espermatozóide, formando o zigoto. Segundo Gilbert (2010), a fertilização promove uma movimentação do citoplasma, que será importante na determinação dos eixos embrionários: ântero-posterior (cabeça-cauda), dorso-ventral e látero-lateral. Além disso, uma vez que a fertilização é concluída, moléculas necessárias para a clivagem das células são ativadas (Gilbert, 2010).

De modo geral, a embriogênese apresenta como processos fundamentais: clivagem, gastrulação, organogênese e maturidade, quando ocorre a gametogênese (GILBERT, 2010).

A clivagem compreende o ciclo celular com as fases S (síntese) e M (mitose) e sem as fases de crescimento G1 e G2 comumente observadas na divisão celular (ALBERTS *et al.*, 2007). São divisões mitóticas extremamente rápidas, após a fertilização, quando o citoplasma do ovo é dividido entre as pequenas células chamadas de blastômeros, que vão do estágio de duas células a uma mórula compacta composta de 8-16 células (CARLSON, 1998; DESAI *et al.*, 2000). Durante a clivagem, divisões mitóticas geram células cada vez menores que dividem o volume citoplasmático inicial. Por isso, não há variação no volume do ovo, apesar do aumento do número celular (GILBERT, 2010) (Figura 2).

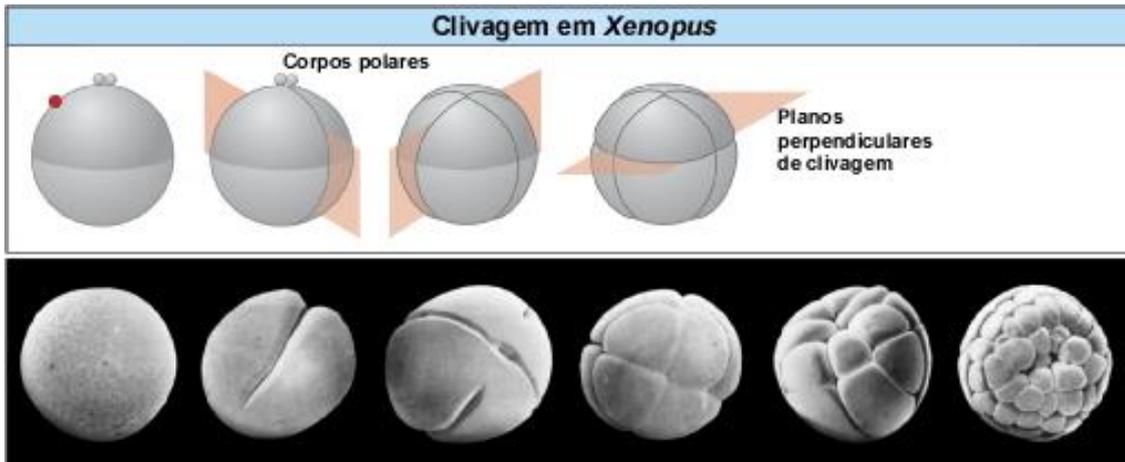


Figura 2: Clivagem na fase inicial do desenvolvimento de *Xenopus*. No painel superior, o círculo vermelho representa o local de entrada do espermatozóide no polo animal do óvulo, o que resulta na meiose completa e formação dos corpos polares, representados como círculos de cor cinza. Após fusão dos núcleos masculino e feminino, inicia-se a clivagem. A primeira clivagem ocorre após 90 minutos da fertilização. O polo vegetal corresponde à região que contém mais vitelo, que contém fatores e proteínas em maior concentração para o desenvolvimento do embrião. Marcações em cor rosa definem os planos de clivagem holoblástica radial deslocada, característico da espécie (GILBERT, 2010). No painel inferior, mostra-se fotografias de clivagem de *X. laevis* desde o zigoto até o estágio de mórula. (Adaptado a partir de STAVELEY, 2013)

No estágio de mórula, há a diminuição da velocidade mitótica dos blastômeros, que se movimentam e mudam suas posições em relação aos seus vizinhos. Inicia-se a compactação (fase de blástula) onde há uma maior aderência célula-célula e presença de junções comunicantes intercelulares (PRADOS *et al.*, 2012). O aumento da aderência intercelular tem um aumento progressivo com o tempo (ALIKANI, 2005) e é um processo ligado à ativação dos genes necessários para o processo de diferenciação celular (DESAI *et al.*, 2000). Em seguida, a formação da cavidade blastocele caracteriza o estágio de blástula.

É chamado de gastrulação, o processo no qual o embrião forma as três camadas germinativas: ectoderma, endoderma e mesoderma (CARLSON, 1998; GILBERT, 2010). Durante a reorganização e formação das camadas germinativas, as células interagem e formam tecidos e órgãos, que possuem células de mais de uma camada germinativa. Este processo de formação dos diferentes tecidos e órgãos é conhecido como organogênese (GILBERT, 2010). Após a organogênese, os embriões passam por fases de metamorfose até se tornarem sexualmente maduro (CARLSON, 1998) (Figura 3).

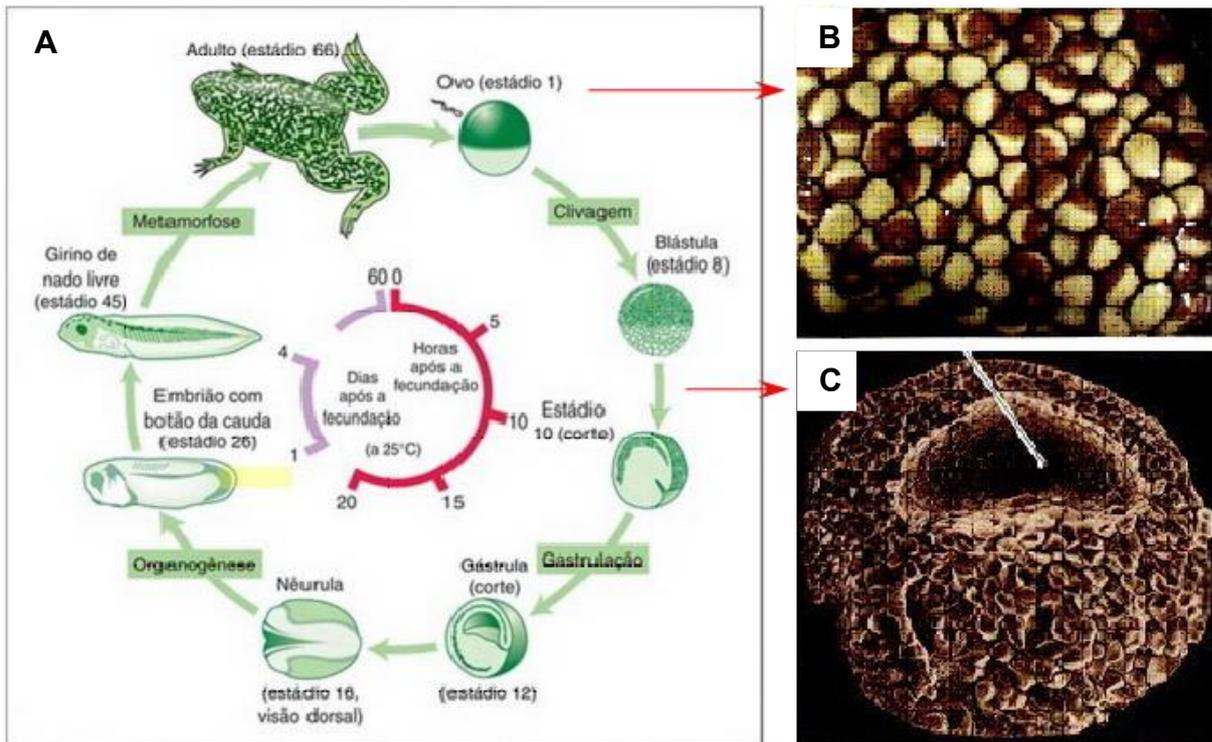


Figura 3: Ciclo de vida do *Xenopus laevis*. Em (A) observa-se as distintas fases do desenvolvimento embrionário de *X. laevis* e sua duração à temperatura ambiente. Em (B) ovos fertilizados (zigotos), nos quais o polo animal é o escuro e o polo vegetal é o claro. Em (C), secção de uma blástula mostrando a blastocele no polo animal (seta branca). (Adaptado a partir de SCHOENWOLF *et al.*, 2008; GILBERT, 2010)

Assim como em outras espécies animais, a clivagem em embriões de *Xenopus laevis* ocorre rapidamente e podemos relacionar esse fato à evolução, como uma adaptação para gerar um grande número de células o mais rápido possível para restaurar a relação somática entre o volume nuclear e o citoplasmático (IRIE; SEHARA-FUJISAWA, 2007; GILBERT, 2010). Os blastômeros, do polo animal se dividem mais rápido que os do polo vegetal, devido à maior quantidade de vitelo deste último (GILBERT, 2010). Neste sentido, o embrião de *X. laevis* tem um hemisfério pigmentado e outro não, o primeiro é o polo animal e o outro, o polo vegetal (GILBERT, 2010) (Figura 3B). O polo vegetal é onde se encontra o maior estoque de vitelo e contém células destinadas à formação de tecidos de origem endodérmica. O polo animal forma a blastocele e contribui para a formação de tecidos epitelial de revestimento e anexos e do sistema nervoso de girinos (GREEN, 1999; GILBERT, 2010; SIVE; GRAINGER; HARLAND, 2010).

A quantidade de vitelo e sua distribuição no ovócito e os fatores citoplasmáticos, que influenciam no ângulo e velocidade de formação do fuso mitótico são os fatores responsáveis por determinar os padrões de clivagem do

zigoto de *X. laevis* (SIVE; GRAINGER; HARLAND, 2010). Espécies que apresentam os ovócitos maiores (incluindo tubarões, répteis e aves) possuem a maior parte das células constituídas por vitelo e uma quantidade pequena de citoplasma concentrada em um dos polos (GILBERT, 2010). Essa grande quantidade de vitelo dificulta a fixação e análise de estruturas celulares durante o período inicial do desenvolvimento embrionário do animal.

As proteínas presentes no vitelo são a principal fonte de aminoácidos para o embrião; além disso, o vitelo também fornece outros nutrientes, incluindo fosfolipídeos, colesterol e fosfato (JORGENSEN *et al.*, 2009).

1.2 PREPARAÇÃO DE AMOSTRAS PARA ANÁLISES HISTOLÓGICAS

A fixação é a primeira etapa na preparação de amostras para análises histológicas e tem como finalidade estabilizar e preservar a organização celular (apud ROLLS, 2012a; HOWAT; WILSON, 2014), tendo influência em todas as etapas futuras do experimento.

Nenhum fixador é padrão ouro, perfeito para todos os tipos celulares, tecidos e uso em metodologias posteriores, visto que ocorre alteração da morfologia celular durante a fixação, com a perda de carboidratos, proteínas, lipoproteínas e lipídeos (ABRAHÃO *et al.*, 2004; HOWAT; WILSON, 2014). O ideal é que o produto final de tecidos ou células fixados, processados, seccionados, corados ou com marcação com anticorpos ou sondas, permitam a melhor visualização da microanatomia, a melhor representação estática da dinâmica de um tecido ou células vivas (ELTOUM *et al.*, 2001). Além disso, o fixador ideal deve permitir uma excelente coloração histológica, análises moleculares por imuno-histoquímica ou para isolamento de DNA ou RNA (ELTOUM *et al.*, 2001).

A qualidade da preservação dos componentes estruturais do tecido é determinada pela escolha de reagentes e o tempo de exposição a estes durante o processamento. Cada etapa do processamento tecidual é importante desde a aquisição da amostra e a determinação dos protocolos e reagentes apropriados, além coloração e análise final (DUARTE, 2009).

Segundo Junqueira e Carneiro (2013), os principais objetivos da fixação incluem: (1) inibição da autólise tecidual; (2) impedimento da atividade e proliferação bacteriana; (3) coagulação ou endurecimento do tecido; (4) preservação dos vários

componentes celulares ou teciduais e (5) melhora na diferenciação dos tecidos, para facilitar a observação desses ao microscópio.

Embora possamos definir alguns eventos químicos que ocorrem durante a fixação, a compreensão total deste processo está incompleta, pois os fixadores produzem uma série de mudanças nos tecidos e células, onde o ambiente é aquoso. Devido a esta característica aquosa é possível observar encolhimento, inchaço e/ou endurecimento dos componentes teciduais (ROLLS, 2012a). Durante o processamento tecidual, a peça histológica sofre ainda mais alterações porque esta é submetida a um ambiente que vai desidratá-la (ROLLS, 2012a).

1.2.1 Agentes utilizados na fixação histológica

A fixação, para preservação das estruturas e componentes celulares, pode ser obtida por meios químicos ou físicos (ELTOUM *et al.*, 2001; TIMM, 2005; CAPUTO; GITIRANA; MANSO, 2010; ROLLS, 2012a). Esses processos podem ser utilizados em associação para obtermos um melhor resultado, como, por exemplo, alterar a temperatura dos fixadores químicos (SCORSATO; TELLES, 2011). Neste estudo, a fixação química foi utilizada em conjunto com um meio de fixação física, pois os materiais biológicos imersos em agentes químicos foram mantidos a temperatura de 4°C até o processamento histológico.

A fixação química apresenta uma ampla variedade de substâncias e soluções fixadoras, com diferentes capacidades de penetração e sítios específicos de interação molecular e celular (ACTON; HARVEY; GROW, 2005). Ela pode dar-se por imersão do espécime no fixador (fixação por imersão), ou por perfusão pelo sistema vascular de órgãos inteiros do animal (ROLLS, 2012a).

Soluções fixadoras podem reunir vários agentes fixadores para que um supra a desvantagem de outro, buscando a melhor preservação dos elementos teciduais (CAPUTO; GITIRANA; MANSO, 2010). Um agente fixador pode ser dissolvido em água ou álcool ou, mais comumente, uma solução tampão para estabilizar o pH (CAPUTO; GITIRANA; MANSO, 2010).

Segundo Acton, Harvey e Grow (2005), os fixadores químicos podem ser classificados nos seguintes grupos: alcoóis, aldeídos, com mercúrio, com agentes oxidantes, e picratos. Os fixadores mais presentes em laboratórios de pesquisa são os aldeídos, como formaldeído, glutaraldeído e paraformaldeído (CAPUTO; GITIRANA; MANSO, 2010).

Outra classificação dos fixadores é através de sua ação: (1) desnaturante ou coagulante (como etanol, acetona, ácido acético e as soluções de Carnoy e Bouin), os quais resultam em uma malha permeável de filamentos de proteínas, formada a partir da despolimerização de proteínas teciduais, o que termina prejudicando a visualização de detalhes (ELTOUM *et al.*, 2001; apud AMARAL *et al.*, 2004; ROLLS, 2012a); (2) não-coagulante (como formalina e glutaraldeído), os quais formam extensas ligações cruzadas entre as moléculas do fixador e as macromoléculas do tecido, adquirindo o aspecto de um gel (AMARAL *et al.*, 2004; CAPUTO; GITIRANA; MANSO, 2010; HOWAT; WILSON, 2014).

Segundo Rolls (2012a), além das proteínas, os fixadores podem reagir quimicamente com outros componentes celulares, tornando-se ligado a esses por adição e formação de ligações transversais intermoleculares e intramoleculares. Essas ligações muitas vezes afetam a carga no local de fixação, o que pode ter um efeito sobre as características de coloração. Por exemplo, o tecido fixado com formaldeído colore fracamente com eosina porque o fixador reage extensivamente com grupos amino para formar pontes de metileno e, portanto, estes grupos não estão mais disponíveis para ligar as moléculas de corante de carga negativa, tais como aqueles de eosina (ROLLS, 2012a).

A escolha de um fixador deve levar em conta o material que será fixado, além do tempo e a sua velocidade de penetração no tecido, a finalidade do experimento, seu valor econômico e a segurança para a saúde de quem o vai manipular. Também é preciso levar em consideração a temperatura de fixação, o tamanho do espécime, o pH do fixador e sua osmolaridade (para detalhes, ROLLS, 2012b). A combinação de diferentes agentes fixadores é importante para que haja a inibição de efeitos indesejáveis de uma dada substância e a obtenção de mais de um tipo de componente celular preservado (CAPUTO; GITIRANA; MANSO, 2010).

A preservação da antigenicidade tornou-se uma consideração muito importante na escolha de um fixador. Métodos de recuperação de antígeno em imuno-histoquímica têm demonstrado que algumas das reações de fixação são reversíveis (GATTA *et al.*, 2012). Atualmente, além da preservação de proteínas, é preciso que os fixadores mantenham a integridade dos ácidos nucleicos das células, pois sempre foi importante analisar a expressão de RNAs mensageiros para compreensão do metabolismo celular (LI VIGNI *et al.*, 1999; GRIZZLE, 2001; BONIN *et al.*, 2005; COX *et al.*, 2006; FALCONI *et al.*, 2007).

Há distintos tipos de fixadores químicos empregados dependendo do tipo de estrutura celular alvo do estudo. Na tabela 1 temos a descrição de cada um dos fixadores químicos selecionados para o estudo em questão, baseado em dados da literatura. Assim, para *X. laevis* as soluções fixadoras mais utilizadas são: MEMFA, formaldeído tamponado a 10%, PFA 4%, solução de Bouin e solução de Carnoy (vide Tabela 2). O isopropanol é comumente utilizado para processamento histológico dos embriões de *Xenopus sp* (vide Tabela 2), mas não é descrito na literatura o seu uso como fixador, nem em combinação com outros agentes de ação fixadora.

Tabela 1: Composição das soluções fixadoras utilizadas para análise histológica de embriões de *Xenopus laevis* neste estudo.

| Agente Fixador | Composição |
|---------------------------|--|
| MEMFA | MOPS + EGTA+ MgSO ₄ + Formalina comercial |
| Formaldeído tamponado 10% | Formaldeído + H ₂ O + NaH ₂ PO ₄ + Na ₂ HPO ₄ |
| PFA 4% | PBS + NaCl + Paraformaldeído + H ₂ O |
| Solução de Bouin | Ácido pícrico + Formalina comercial + Ácido acético |
| Solução de Carnoy | Etanol + Clorofórmio + Ácido acético |
| IA | Isopropanol 99% + Ácido acético |
| IFA | Isopropanol 99% + Formalina comercial + Ácido acético |

O formaldeído é o agente mais utilizado em histologia, devido à capacidade de preservar peptídeos de proteínas celulares (ELTOUM *et al.*, 2001; TIMM, 2005; GATTA *et al.*, 2012; SANTOS *et al.*, 2012; ROLLS, 2012b). Apresenta como sinônimos: formol, formalina, metil aldeído, metileno glicol, óxido de metileno, metanal, formalida 40, morbicida, BFV, formalite, aldeído fórmico, Yde, Ivalon, Karsan, Lysoform, Oxometano e Oximetileno (INCA, 2016).

Importante frisar o descrito por Caputo, Gitirana e Manso (2010):

"O formaldeído comercial, um gás incolor, é comercialmente fornecido em solução na concentração de 37% ou 40%. Ao se preparar uma solução à base de formaldeído comercial a 10%, de fato a solução estará a 3,7% ou 4%; apesar disso, convencionou-se chamar essa solução de formalina, ou formaldeído a 10%... o paraformaldeído comercial tem sido recomendado para análise imuno-histoquímica. Na realidade, o formaldeído contém polímeros de paraformaldeído comercial, mas que só serão hidrolisados quando diluídos em água."

Como descrito, a formalina é um fixador não coagulante, ou seja, faz ligações cruzadas (do inglês, *cross-link*) com as biomoléculas teciduais (AMARAL *et al.*,

2004; LEUNG *et al.*, 2011), o que prejudica a reatividade em imuno-histoquímica (WERNER *et al.*, 2000; GRIZZLE, 2001); tem um grande poder de penetração nos tecidos e células, mas fixa-os lentamente (FOX *et al.*, 1985; WERNER *et al.*, 2000; ACTON; HARVEY; GROW, 2005); reage pouco com polissacarídeos (ABRAHÃO *et al.*, 2004).

Por causa das ligações cruzadas, os tecidos fixados com formalina precisam ter os antígenos recuperados através de um procedimento experimental conhecido como recuperação antigênica (LEUNG *et al.*, 2011; GATTA *et al.*, 2012; HOWAT; WILSON, 2014) (Figura 4). Vale destacar que fixadores que fazem ligação cruzada são os mais utilizados na rotina de microscopia eletrônica, como o glutaraldeído (GONÇALVES, 2016).

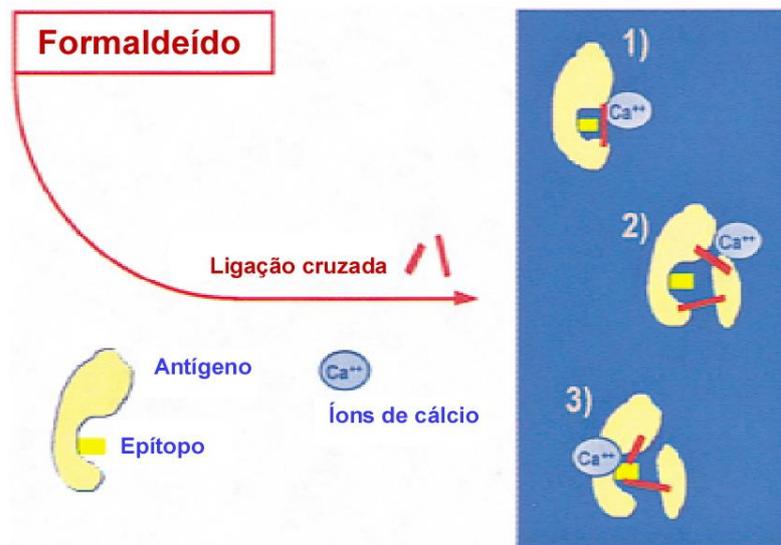


Figura 4: Fixação com formaldeído promove ligação cruzada entre proteínas. Essas ligações cruzadas atrapalham durante imuno-histoquímica, pois dificulta a ligação de anticorpos com o antígeno (1), entre duas ou mais moléculas (2), ou afeta a conformação do epítopo. (Adaptado de WERNER *et al.*, 2000)

Para uso em histologia, a formalina deve ser tamponada para evitar a formação do ácido fórmico, que pode prejudicar a qualidade da fixação e as futuras reações teciduais (FOX *et al.*, 1985; KIERNAN, 1999; SCORSATO; TELLES, 2011). O ácido fórmico pode se precipitar nos tecidos sob a forma de um pigmento de coloração marrom, sendo considerado um artefato (CAPUTO; GITIRANA; MANSO, 2010).

Devido a sua toxicidade (para detalhes, CAPUTO; GITIRANA; MANSO, 2010), alternativas ao formol são sempre analisadas. Assim, busca-se obter imagem

morfológica semelhante ou melhor da amostra preparada utilizando a formalina, além do emprego de métodos de coloração e moleculares (ACTON; HARVEY; GROW, 2005; BUESA, 2008; HOWAT; WILSON, 2014). Ademais, com o advento da biologia molecular, a formalina mostrou-se um fixador de baixa qualidade na preservação de DNAs e RNAs (LI VIGNI *et al.*, 1999; HOWAT; WILSON, 2014).

Assim como a formalina, o paraformaldeído é um fixador não coagulante: tem penetração rápida nos tecidos; promove reação covalente e cruzada entre moléculas, gerando uma malha insolúvel (AMARAL *et al.*, 2004).

Para *Xenopus laevis*, o fixador com base em formalina mais usado é o MEMFA, que é conhecido como padrão ouro para diferentes métodos de análises dos estudos que apresentam a espécie como modelo (BROOKS; WALLINGFORD, 2015). O problema do MEMFA é que ele não é indicado para técnicas que envolvem moléculas fluorescentes, pois ele influencia na perda de fluorescência do fluoróforo (BROOKS; WALLINGFORD, 2015). Outro fixador utilizado para a espécie, também com formalina na composição, é a solução de Bouin, recomendado para animais em fase embrionária (KAY; PENG, 1991; LI VIGNI *et al.*, 1999; BONIN *et al.*, 2005; ROLLS, 2012d; HOWAT; WILSON, 2014).

A solução de Bouin contém em sua composição o ácido pícrico, além de formalina e ácido acético (Tabela 1); tem características de desnaturantes, fazendo ligações cruzadas com proteínas teciduais (HOWAT; WILSON, 2014); não fixa carboidratos e lipídeos ou a maioria dos hidratos de carbono, mas é recomendado como componente de soluções fixadoras usadas para preservar o glicogênio (apud ABRAHÃO *et al.*, 2004; ROLLS, 2012d). A solução de Bouin pode hidrolisar ácidos nucleicos, por isso deve ser evitada se o alvo de observação for DNA ou RNA (TIMM, 2005). Além disso, esta solução tem baixa penetração tecidual, o que causa endurecimento apesar de não provocar retração ou distorção do material histológico. O ácido pícrico de sua composição pode gerar artefatos nas células e tecidos, pois esse, quando decomposto, pode precipitar e aglutinar proteínas formando picratos de proteínas (KAY; PENG, 1991; ABRAHÃO *et al.*, 2004; TIMM, 2005; KIERNAN, 2008; ROLLS, 2012c).

Uma substância presente em muitos fixadores é o ácido acético. Encontrado na solução de Bouin e na solução de Carnoy, por exemplo, o ácido acético é classificado como um fixador coagulante, eficaz na fixação de ácidos nucleicos, mas geralmente não fixa proteínas (ELTOUM *et al.*, 2001; KIERNAN, 2008; SANTOS *et*

al., 2012). Esse é adicionado em pequenas quantidades em diversos fixadores, além de Bouin, para hidrolisar proteínas, evitando artefatos de fixação, além de prevenir a perda de ácidos nucleicos (ABRAHÃO *et al.*, 2004; ROLLS, 2012c) e o encolhimento da peça histológica (HOWAT; WILSON, 2014).

A solução de Carnoy é um fixador desnaturante, coagulante de proteínas; tem ação rápida porque contém clorofórmio em sua composição; mais utilizado para observar estruturas celulares; preserva material nuclear, retém glicogênio, dissolve lipídeos; pode encolher e endurecer demais o tecido (PUCHTLER *et al.*, 1968; BUESA, 2008; SANTOS *et al.*, 2012; ROLLS, 2012d; HOWAT; WILSON, 2014; PEREIRA *et al.*, 2015). Entretanto, sua utilização por um período superior a 18h resulta na hidrólise de ácidos nucléicos e perda de RNA (KIERNAN, 1999).

O etanol é um fixador que causa grandes alterações estruturais em células e tecidos (GRIZZLE, 2009). Sendo um desnaturante de proteínas, substitui a água no ambiente de tecido e altera a estrutura terciária de proteínas e a sua solubilidade em água, causando encolhimento e endurecimento do tecido (BUESA, 2008; HOWAT; WILSON, 2014). Por vezes, o etanol é utilizado para preservar o glicogênio. Por outro lado, causa dificuldade de observação de detalhes nucleares e citoplasmáticos (SANTOS *et al.*, 2012; ROLLS, 2012c).

O etanol 70-100% precipita proteínas e enrijece muito o material histológico, por isso não obteve sucesso como substituto da formalina e paraformaldeído (GRIZZLE, 2009); o etanol a 95% é usado como um fixador para esfregaços de citologia (ELTOUM *et al.*, 2001). Com advento das técnicas de biologia molecular, observou-se boa qualidade de ácidos nucléicos em tecidos preservados com etanol 70% e 95% (COX *et al.*, 2006). Junto com o isopropanol, o etanol é utilizado em formulação de fixadores menos tóxicos (ROLLS, 2012c).

O isopropanol promove uma desidratação suave, além de encolher e endurecer menos a peça histológica do que alguns fixadores clássicos com formalina (LEUNG *et al.*, 2011). Assim como o etanol, é um agente coagulante de proteínas (WERNER *et al.*, 2000); usado no processo de coloração de lipídeos (VIKTOROV; PROSHIN, 2003). Protocolos apresentados em alguns estudos mostram o isopropanol também sendo usado no processamento histológico, substituindo não só o etanol como também o xileno (FALKEHOLM *et al.*, 2001). A literatura indica o isopropanol como um substituinte da solução de Carnoy quando há intenção de preservar ácidos nucléicos e cromossomos (VIKTOROV; PROSHIN,

2003), porém ele não deve ser usado puro (99%) como fixador por causa de sua lenta difusão pelo tecido (VIKTOROV; PROSHIN, 2003).

A ação de fixadores utilizados neste estudo e sua aplicação no embrião de *Xenopus laevis* estão destacadas na Tabela 2.

Tabela 2: Ação de fixadores e sua aplicação na preservação de embriões de *Xenopus laevis*.

| Agente Fixador | Efeito na fixação | Testado em <i>Xenopus laevis</i> | Referências |
|----------------------------------|---|---|---|
| MEMFA | Penetração tecidual; preserva ácidos nucleicos e proteínas; não é indicado para fluorescências. | Fixador padrão para diversas técnicas; muito indicado para os primeiros estágios do desenvolvimento embrionário. | BOWES <i>et al.</i> , 2008; SIVE; GRAINGER; HARLAND, 2010; BROOKS; WALLINGFORD, 2015. |
| FORMALDEÍDO TAMPONADO 10% | Penetra rapidamente nos tecidos; estabelece ligação cruzada com proteínas teciduais; não preserva ácidos nucleicos. | Utilizado na forma de MEMFA e em solução de Bouin; não preserva algumas estruturas celulares de <i>Xenopus</i> ; preserva componentes da matriz extracelular. | ELTOUM <i>et al.</i> , 2001; TIMM, 2005; GATTA <i>et al.</i> , 2012; SANTOS <i>et al.</i> , 2012; ROLLS, 2012b; AMARAL <i>et al.</i> , 2004; LEUNG <i>et al.</i> , 2011; HOWAT; WILSON, 2014. |
| PFA 4% | Penetração rápida nos tecidos; promove reação covalente e cruzada entre moléculas. | Indicado para imuno-histoquímicas e hibridização <i>in situ</i> . Pouco utilizado em <i>X. laevis</i> . | AMARAL <i>et al.</i> , 2004. |
| SOLUÇÃO DE BOUIN | Fixador coagulante; recomendado para fase embrionária de animais. | Em experimentos que precisam clarificar os embriões (imuno-histoquímica e hibridização <i>in situ</i> , por exemplo), é o fixador mais indicado porque o embrião fica menos pigmentado. | KAY; PENG, 1991; LI VIGNI <i>et al.</i> , 1999; BONIN <i>et al.</i> , 2005; TIMM, 2005; ROLLS, 2012d; HOWAT; WILSON, 2014. |
| SOLUÇÃO DE CARNOY | Desnaturante; ação rápida; preserva material nuclear, retém glicogênio, dissolve lipídeos; pode endurecer demais o tecido e encolhe-lo. | Indicado para imunofluorescência e para técnicas que precisam de integridade dos ácidos nucleicos. | PUCHTLER <i>et al.</i> , 1968; BUESA, 2008; SANTOS <i>et al.</i> , 2012; ROLLS, 2012d; HOWAT; WILSON, 2014; PEREIRA <i>et al.</i> , 2015. |
| ISOPROPANOL | Promove coagulação de proteínas; preserva bem estruturas nucleares. | Usado durante o processamento histológico, mas não é componente de nenhum fixador clássico de <i>Xenopus</i> . | VIKTOROV; PROSHIN, 2003; KURODA; WESSELY; DE ROBERTIS, 2004. |
| IA | Ácido acético ajuda o não encolhimento da amostra, além de evitar o endurecimento desta. | Não há dados na literatura de seu uso em <i>Xenopus</i> . | ABRAHÃO <i>et al.</i> , 2004. |
| IFA | Tecidos e as células não encolhem; preserva ácidos nucleicos e cromossomos. | Não há dados na literatura de seu uso em <i>Xenopus</i> . | VIKTOROV; PROSHIN, 2003. |

1.2.2 O processamento histológico

O processamento histológico é um processo que envolve soluções químicas que reagem com as amostras biológicas (DUARTE, 2009). Esse procedimento tem três etapas: desidratação, diafanização (clarificação) e impregnação (CAPUTO; GITIRANA; MANSO, 2010).

Após a fixação da peça histológica como o agente fixador de interesse, o material é submetido ao primeiro passo do processamento, a desidratação. Esta consiste na remoção da água dos tecidos, pois as substâncias previamente utilizadas para inclusão em parafina não se combinam homoganeamente com a água. A substância desidratante mais utilizada em histológica é o álcool etílico, pois produz bons resultados e possui baixo custo.

A diafanização visa remover completamente o álcool do interior dos tecidos. A remoção do álcool é de extrema importância, pois a parafina não se mistura homoganeamente com o álcool e, para isso, utiliza-se o xileno. A finalidade da diafanização é a infiltração do material histológico por um solvente da parafina ou de outra resina plástica a ser usada (exemplo: celoidina, goma arábica, parafina plástica, Paraplast®, polietileno glicol, parafina esterificada, carbovax) (DUARTE, 2009; CAPUTO; GITIRANA; MANSO, 2010).

A impregnação com parafina, ou resinas, elimina o xileno contido no material e garante a total penetração da parafina nos vazios deixados pela água e gordura, antes existentes no material (CAPUTO; GITIRANA; MANSO, 2010). Este processo serve também para preparar o material para ser seccionado, removendo o diafanizante e dando-lhe a consistência adequada para que possa ser cortado (JARDIM *et al.*, 2013).

O processamento dos tecidos possui variáveis que podem afetar consideravelmente os resultados do processo histológico. Dentre as variáveis, temos: condições de operação (manual ou equipamentos automático), temperatura, características e concentração dos reagentes utilizados e as propriedades químicas dos tecidos (CAPUTO; GITIRANA; MANSO, 2010).

O xileno (sinônimos: xilol, dimetil benzeno, metiltolueno) é o solvente orgânico mais usado e destina-se à completa retirada de água, álcool e da gordura que estiver presente no material. É um hidrocarboneto aromático amplamente utilizado como solvente na indústria e na tecnologia médica; é um gás incolor, que se

encontra naturalmente em petróleo e alcatrão fresco; no entanto, este solvente pode danificar as amostras de tecido (apud DUARTE, 2009).

Métodos de processamento histológico sem xileno foram desenvolvidos na segunda metade dos anos 90, com o intuito de redução de custos, menor tempo experimental e mais qualidade no ambiente de trabalho (FALKEHOLM *et al.*, 2001).

O isopropanol é um dos candidatos a substituir o xileno, sendo um líquido incolor, inflamável com um odor alcoólico característico; é completamente miscível com a maioria dos solventes, incluindo a água; é um agente desidratante, não utilizado frequentemente devido a sua lenta penetração nos tecidos, o que provoca um menor endurecimento.

O tecido e as células devem ficar protegidos dos efeitos do processamento tecidual, quando o corte for feito em tecido que sofreu inclusão em parafina, ou dos efeitos das baixas temperaturas, quando os cortes forem feitos em criostato. Independente do tipo de microtomia, as células devem manter reatividade a reagentes, anticorpos e sondas de ácidos nucleicos (ELTOUM *et al.*, 2001).

1.3 ANÁLISE DE MATERIAL HISTOLÓGICO

As análises de estruturas teciduais e celulares são comumente realizadas em células e tecidos fixados.

O material histológico é estudado com ajuda de microscópios. Para que ocorra a passagem do feixe de luz pelo tecido, este deve ser seccionado, pois a espessura delgada favorece a boa qualidade da imagem. Células vivas, camadas muito delgada de tecidos ou membrana transparente de animais vivos (por exemplo, *Xenopus laevis* nos estágios iniciais do seu desenvolvimento) podem ser observadas diretamente ao microscópio sem necessidade de seccioná-las (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013). As amostras precisam ser suficientemente finas para serem transparentes, possuírem contraste e permitir uma resolução eficiente de seus detalhes.

Para serem estudados ao microscópio, os cortes histológicos devem ser corados, pois a maioria dos tecidos são incolores. A maioria dos corantes se comporta como compostos ácidos ou básicos e tende a formar ligações eletrostáticas (salinas) com radicais ionizados dos tecidos (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013). Os componentes dos tecidos que se coram com corantes

básicos são chamados de basófilos, e os que apresentam afinidade por corantes ácidos são chamados acidófilos.

A hematoxilina e o azul de toluidina são exemplos de corantes básicos. Os principais componentes dos tecidos que ionizam e reagem com corantes básicos o fazem por conter ácidos na sua composição (ácidos nucleicos, glicosaminoglicanos e glicoproteínas ácidas) (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

A eosina é um exemplo de corante ácido. Estes coram principalmente o componentes acidófilos dos tecidos (mitocôndrias, grânulos de secreção, proteínas citoplasmáticas e colágeno) (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

Estruturas celulares e teciduais também podem ser visualizadas por corantes ou anticorpos fluorescentes (fluorescência e imunofluorescência). Uma outra maneira de evidenciar componentes de células, tecidos e estruturas inteiras (embriões nas fases iniciais do desenvolvimento, por exemplo) é sua impregnação por metais, como prata e ouro (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

Através da microscopia óptica de luz (microscopia de campo claro) é possível estudar preparações coradas, analisadas por conta da iluminação que atravessa o material. A resolução máxima deste tipo de microscopia é de 0,2 μm , o que permite a obtenção de boas imagens aumentadas de 1000 a 1500 vezes (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013). Importante frizar que a ampliação obtida em um microscópio é dada pelo produto entre o aumento da objetiva e o aumento da ocular (MANSO; MACHADO, 2010).

Na microscopia óptica de fluorescência analisa-se material histológico com estruturas marcadas com anticorpos ou corantes fluorescentes. Esta microscopia apresenta uma fonte de luz ultravioleta e filtros especiais que selecionam o comprimento de onda dos raios luminosos que atingem o espécime e os raios que este emite (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013). Os microscópios de fluorescência utilizam a luz como fonte de excitação. As substâncias fluorescentes, ao serem iluminadas por esta fonte, emitem luz em um comprimento de onda maior, ou seja, de menor energia (o comprimento de uma onda eletromagnética é inversamente proporcional à sua energia, ou seja, quanto menor a energia, maior o comprimento de onda) (diagrama de Jablonski) (detalhes em KIERNAN, 2008; MANSO; MACHADO, 2010).

Espécimes de grande espessura não devem ser vistos em microscópios de luz porque são vistos em focos simultâneos (devido a profundidade do foco), o que

causa a superposição da imagem (ver para detalhes, MANSO; MACHADO, 2010; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013). Para tais espécimes é recomendado o uso da microscopia confocal.

O microscópio confocal possui um conjunto de lentes que é capaz de focar um cone de luz (laser) em uma profundidade determinada da amostra a ser estudada. Como somente um plano focal muito delgado é visualizado de cada vez, é possível reunir as imagens e reconstruir diferentes planos focais (KIERNAN, 2008). A luz emitida pela amostra é direcionada pelo espelho dicróico para o filtro de emissão até chegar ao pinhole, um pequeno orifício capaz de separar apenas a luz proveniente do ponto focal, eliminando a luz emitida por pontos fora de foco e registrando somente luz dos pontos em foco, com a ajuda de um fotomultiplicador (METZ; FRANCHIN, 2014). Estes sinais gerados pelas fotomultiplicadoras são processados por um computador e assim imagens bidimensionais extremamente precisas podem ser construídas.

Além da microscopia óptica, temos a microscopia eletrônica, que envolve a de transmissão e a de varredura, esta última utilizada neste estudo. Esta microscopia se baseia na interação entre elétrons e componentes dos tecidos. Como, em geral, o objetivo do pesquisador ao utilizar o microscópio eletrônico de varredura é obter informações sobre a forma externa das amostras (embriões nos primeiros estágios de desenvolvimento, por exemplo), estas não são cortadas em fatias.

A microscopia eletrônica de transmissão se baseia na capacidade do feixe de elétrons de atravessar a amostra (resolução em torno de 3 nm), enquanto que na microscopia eletrônica de varredura (MEV) o feixe de elétrons percorre a superfície da amostra e fornece imagens tridimensionais das superfícies das células, tecidos, órgão, embriões e pequenas espécies animais, por exemplo; mostra somente a superfície do material. Em MEV, os elétrons interagem com uma camada muito delgada de metal previamente aplicada ao espécime e são refletidos pelos átomos do metal (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013); os elétrons são capturados por um detector que os transmite a amplificadores e outros dispositivos de forma que o sinal é finalmente projetado em um monitor, resultando em uma imagem em preto e branco.

1.4 RESÍDUOS QUÍMICOS EM HISTOLOGIA

Nos últimos anos a geração de resíduos químicos em instituições de ensino e pesquisa no Brasil passou a ser uma pauta importante de discussão (BORGES; ZAMORA; KUNZ, 2004; OLIVEIRA *et al.*, 2013).

A sociedade atual tem se preocupado com o meio ambiente e com a qualidade do seu ambiente de trabalho. As universidades não podem ignorar sua posição como geradora de resíduos, pois isto fere seu papel como avaliadora do impacto dos resíduos de outras instituições e seu papel em pesquisar meios menos danosos ao ambiente (JARDIM, 1998).

Oliveira e colaboradores (2013) descrevem da seguinte forma resíduos perigosos:

“Resíduo perigoso é definido pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos como qualquer resíduo que em razão da sua quantidade, concentração, características físicas, químicas ou infecciosas, pode causar ou contribuir consideravelmente para o aumento na mortalidade, provocar um aumento no número de casos de doenças graves irreversíveis ou incapacitantes reversíveis, ou ainda representar um risco substancial atual ou potencial à saúde humana e ao meio ambiente quando tratada, armazenada, transportada, descartada ou gerenciada de forma inadequada.”

Na Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), o descarte de resíduos químicos se dá semestralmente, e tem sua coordenação centralizada pela decania da Instituição, que contrata uma empresa especializada na retirada, acondicionamento, transposte, neutralização e descarte apropriado dos resíduos.

Técnicas de preservação de tecidos e procedimentos histológicos geram grandes volumes de resíduos químicos e alguns de seus tradicionais reagentes podem ser substituídos ou terem seu uso limitado para a geração de menores quantidades de resíduos.

O formaldeído, um dos agentes mais usados para fixação de tecidos, é um produto químico com potencial carcinogênico e mutagênico (CHECKOWAY *et al.*, 2012; JIA *et al.*, 2014; COSTA *et al.*, 2015). Como descrito pela Sociedade Brasileira de Patologia (2010), o profissional se intoxica quando se expõe aos vapores do formaldeído e quando há contato do agente com a pele, olhos e mucosas.

O xileno oferece risco em todo seu processo, desde sua produção a seu uso nos laboratórios (CAZARI *et al.*, 2013). Tanto o líquido quanto seu vapor é danoso a homem e ao meio ambiente. Seu vapor tóxico leva ao risco de explosão quando de altas temperaturas e quando o resíduo líquido entra em contato com o solo ele pode contaminar o lençol freático (OKAMOTO *et al.*, 2010). A contaminação de

profissionais é a mais comum, Cazari e colaboradores (2013) descreve os principais efeitos causados pela contaminação aguda e crônica do solvente: cefaléia, tontura, náusea, vômito, perda de apetite, dermatites e prejuízos à visão, fígado e audição.

O etanol e o isopropanol são álcoois que causam danos à saúde quando ingeridos (CHURCH; WITTING, 1997). Segundo as normas de gerenciamento de resíduos da Universidade de São Paulo (USP) (LASSALI *et al.*, 2003), ambos resíduos podem ser descartados diretamente na pia.

O ácido acético é um líquido aquoso, sem coloração e de odor forte que, além de produzir vapores, é incompatível com oxidantes fortes, ácido nítrico, peróxido de sódio e bases fortes. Seu vapor é irritante para o nariz e garganta, se inalado pode causar tosse, náusea, vômito ou dificuldade respiratória. O ácido acético glacial tem poder corrosivo, podendo destruir tecidos animais, mas é usado em aplicações tópicas quando diluído (COSTA; FELLI; BAPTISTA, 2012).

O ácido pícrico é um pó explosivo com venda controlada pelas forças armadas. Para seu uso em histologia ele já deve ser adquirido em solução de Bouin (FORTI; ALCAIDE, 2011).

Esses problemas tem levado a comunidade científica a buscar novos compostos para substituição desses agentes ou que pelo menos seu uso seja menos frequente (KUNHUA *et al.*, 2012). O isopropanol tem se mostrado como uma boa alternativa ao não uso de xileno (SIVE; GRAINGER; HARLAND, 2010). O isopropanol é considerado levemente tóxico caso seja ingerido e pode causar lesões na córnea ou na pele caso seja absorvido.

Todos os resíduos químicos devem ser descartados, como orientado em seus rótulos e fichas de biossegurança, sendo entregues a empresas especializadas em dar seu fim.

Todos os resíduos dos fixadores utilizados neste trabalho foram acondicionados em garrafas de vidro com até 80% do volume ocupado. Os vidros foram armazenados em local sem umidade até o descarte promovido pela decania do CCS/UFRJ, realizado em janeiro de 2017.

2 JUSTIFICATIVA

Embriões de *Xenopus laevis* são os mais utilizados em estudos de embriologia. É o principal modelo para buscar a compreensão dos estágios iniciais do desenvolvimento. Devido à grande quantidade de vitelo presente no meio intracelular, torna-se muito difícil a obtenção de secções histológicas para análises diversas.

Segundo a literatura, somente nos estágios de blástula é que encontramos alguns estudos com secções histológicas (MORRIS *et al.*, 2007; HASLAM *et al.*, 2013); nos estágios anteriores os embriões são estudados somente em técnicas feitas em embrião inteiro.

Os fixadores utilizados nesses estudos apresentam em comum o formaldeído e pouco se sabe sobre a eficácia de fixadores sem esse composto na preservação de embriões *Xenopus laevis*. Neste estudo, interessamo-nos por avaliar o uso do isopropanol, menos tóxico que o formaldeído para o manipulador e o meio ambiente, para realização de análises morfológicas e moleculares posteriores, incluindo extração de RNA e imuno-histoquímica de embriões nos primeiros estágios do desenvolvimento.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Analisar o efeito do isopropanol como agente fixador ou durante o processamento histológico de embriões de *Xenopus laevis* nos primeiros estágios do desenvolvimento.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

(1) Avaliar a integridade e morfologia dos embriões de *X. laevis* utilizando isopropanol como agente fixador livre ou em solução com baixa concentração de formalina. Avaliar a integridade e a morfologia dos embriões de *X. laevis* utilizando isopropanol em substituição a etanol e xileno durante o processamento histológico.

(2) Avaliar a qualidade do RNA isolado de embriões de *X. laevis* fixados com isopropanol.

(3) Avaliar o emprego do isopropanol para analisar a integridade ultraestrutural da superfície dos embriões de *X. laevis*.

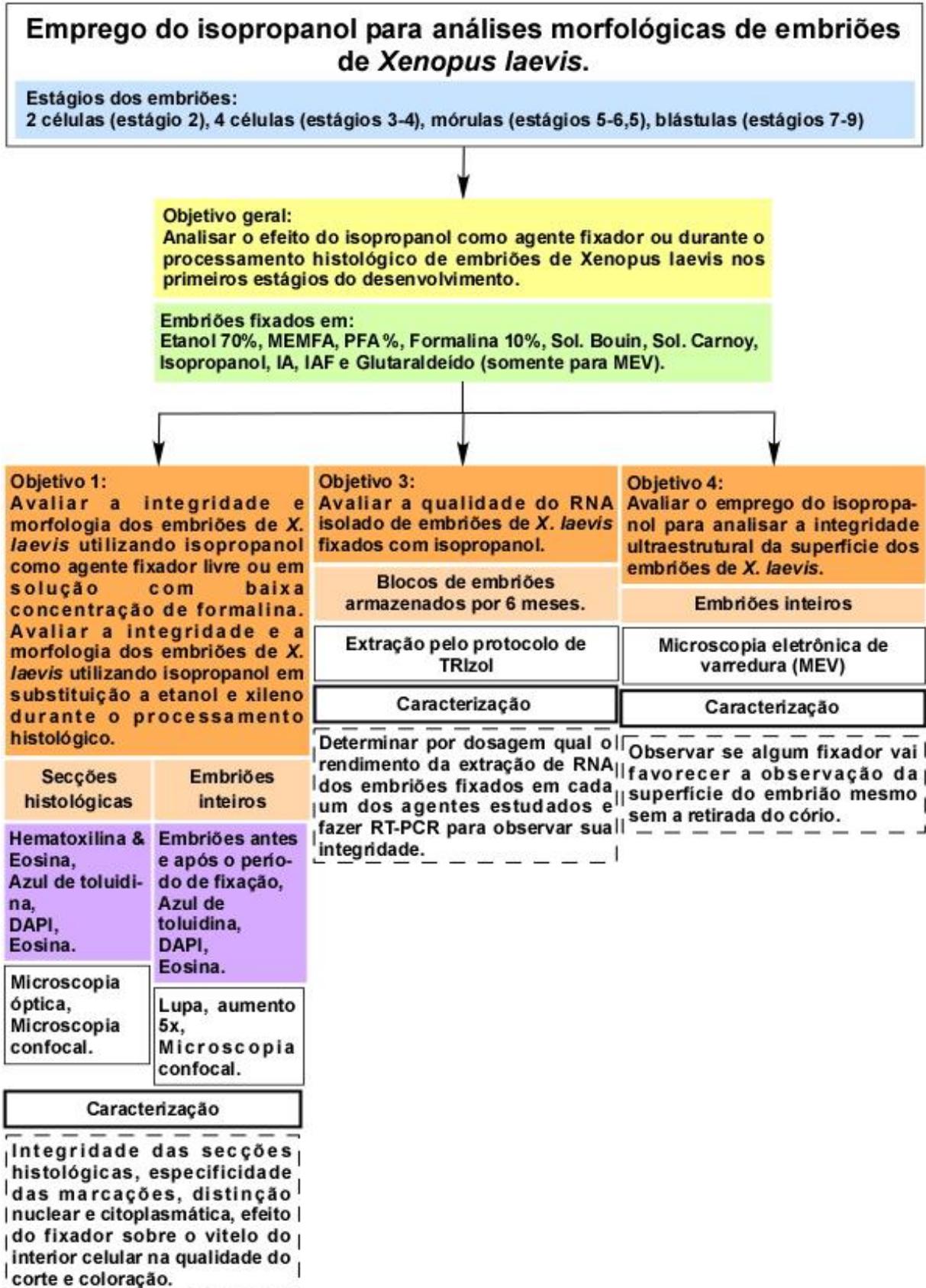


Figura 5: Desenho experimental.

4 METODOLOGIA

4.1 EMBRIÕES

Foram utilizados embriões nos estágios de duas células até blástulas de *Xenopus laevis*, gentilmente cedidos pelo Laboratório de Embriologia de Vertebrados (ICB-UFRJ), coordenado pelo professor José Garcia Ribeiro Abreu Júnior.

O procedimento de fertilização realizado no Laboratório de Embriologia dos Vertebrados seguindo o protocolo descrito por Sive, Grainger e Harland (2010).

Os embriões utilizados no estudo incluem os seguintes estágios: 2 células, 4 células, mórula (estágios 5-6,5) e blástula (estágios 7-9) (vide Xenbase (BOWES *et al.*, 2008) <<http://www.xenbase.org/>>).

Foram utilizados um total de 360 embriões para microscopia óptica e confocal, divididos entre os 9 fixadores testados para obtenção de secções histológicas e aqueles que foram analisados inteiros. Além desses, 60 embriões foram destinados a microscopia eletrônica de varredura, divididos entre 10 fixadores.

4.2 FIXAÇÃO QUÍMICA

Os embriões foram mantidos em tampão Steinberg 1x, a temperatura ambiente ou em estufa a 4°C, para seu desenvolvimento (SIVE; GRAINGER; HARLAND, 2010). Assim que atingiram os estágios de interesse, os embriões foram lavados em tampão fosfato 1x (PBS) por 10 minutos antes de serem colocados em 10 ml de solução fixadora. Para estudo, foram selecionados os fixadores que fazem parte da rotina de laboratórios e já utilizados no modelo em questão. Os fixadores utilizados no estudo, como descritos nas Tabelas 1 e 2 da introdução, foram: MEMFA, formalina tamponada 10%, PFA 4%, solução de Bouin, solução de Carnoy, isopropanol com ácido acético (IA), isopropanol com formalina e ácido acético (IFA), além dos embriões colocados diretamente no etanol 70% e no isopropanol 99%. O tempo de fixação foi de 72h, a 4°C. O tampão utilizado para lavagem dos embriões na retirada destes do fixador foi o PBS.

Os protocolos de preparação de soluções tampões e fixadoras estão no ANEXO A.

Os sais, alcoóis e xileno usados foram da marca VETEC (São Paulo, Brasil). O glutaraldeído foi da marca Sigma Aldrich (São Paulo, Brasil).

Embriões vivos e fixados foram fotografados sob luz da lupa Leica S8AP0, com câmera Leica DFC290 HD. O programa Leica LAS AF Lite, Informer Technologies Inc foi utilizado para capturar as imagens.

4.3 EMBRIÕES CLARIFICADOS

Após o período de fixação e captura de imagens dos embriões, estes foram clarificados em tampão PBS/H₂O₂ para que o pigmento dos animais não influenciasse na coloração (metacromasia) (DENT; POLSON; KLYMKOWSKY, 1989) (protocolo no ANEXO A). Foram clarificados um total de 360 embriões.

Para despigmentar os embriões, após a retirada do fixador, estes foram tratados em: (1) PBS, por 10 minutos, duas vezes; (2) Tampão PBS/H₂O₂, 12 horas, a 4°C; (3) PBS, por 10 minutos. Posteriormente, realizou-se a preparação para histologia ou fluorescência.

Foram separados um total de 288 embriões para microtomia. Os embriões foram colocados em cassetes plásticos de histologia identificados a lápis, e submetidos a processamento histológico tradicional ou com isopropanol (VIKTOROV; PROSHIN, 2003).

Os alcoóis e xileno usados foram da marca VETEC (São Paulo, Brasil). A resina Paraplast® foi da marca Sigma Aldrich (São Paulo, Brasil).

As lâminas, lamínulas e cassetes plásticos utilizados foram da marca Kasvi (Paraná, Brasil).

A central de inclusão TEC-2800, a placa refrigerada, o micrótomo 820 SPENCER e o banho-maria BH-05 utilizados para preparo do material histológico foram da marca Lupetec (São Paulo, Brasil).

4.4 TIPOS DE PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO

Neste estudo, realizamos dois tipos de processamento histológico em resina: com xileno (processamento tradicional) e sem xileno (processamento com isopropanol), para posterior observação através de microscopia óptica de luz.

Um terceiro protocolo de processamento foi realizado somente para obtenção de imagens através de MEV.

4.4.1 Processamento histológico tradicional com etanol/xileno

Foram feitos quatro blocos histológicos para cada um dos fixadores estudados. Em cada bloco foram colocados quatro embriões, um em cada estágio embrionário estudado, um total de 16 embriões por fixador.

Na rotina de processamento histológico tradicional (Figura 6), a desidratação foi feita com gradientes de álcool etílico, e a clarificação (remoção do álcool impregnado na peça histológica) com banhos de xileno.

A impregnação da amostra foi feita com a resina Paraplast® Líquida (56-60°C).

O protocolo de processamento tradicional seguiu a seguinte sequência: etanol 70%, etanol 80%, etanol 90%, etanol 100% (três vezes), xileno I, xileno II, xileno III, Paraplast® I e Paraplast® II. Não há diferença entre os banhos de xileno I, II e III, mas é importante mais de um banho para a retirada do álcool do tecido. Entre os banhos de Paraplast® I e II também não há diferença, mas o Paraplast® I fica mais impuro por causa do xileno.

Durante o processamento, os cassetes com embriões foram submersos em cada uma das soluções ou reagentes por 10 minutos.

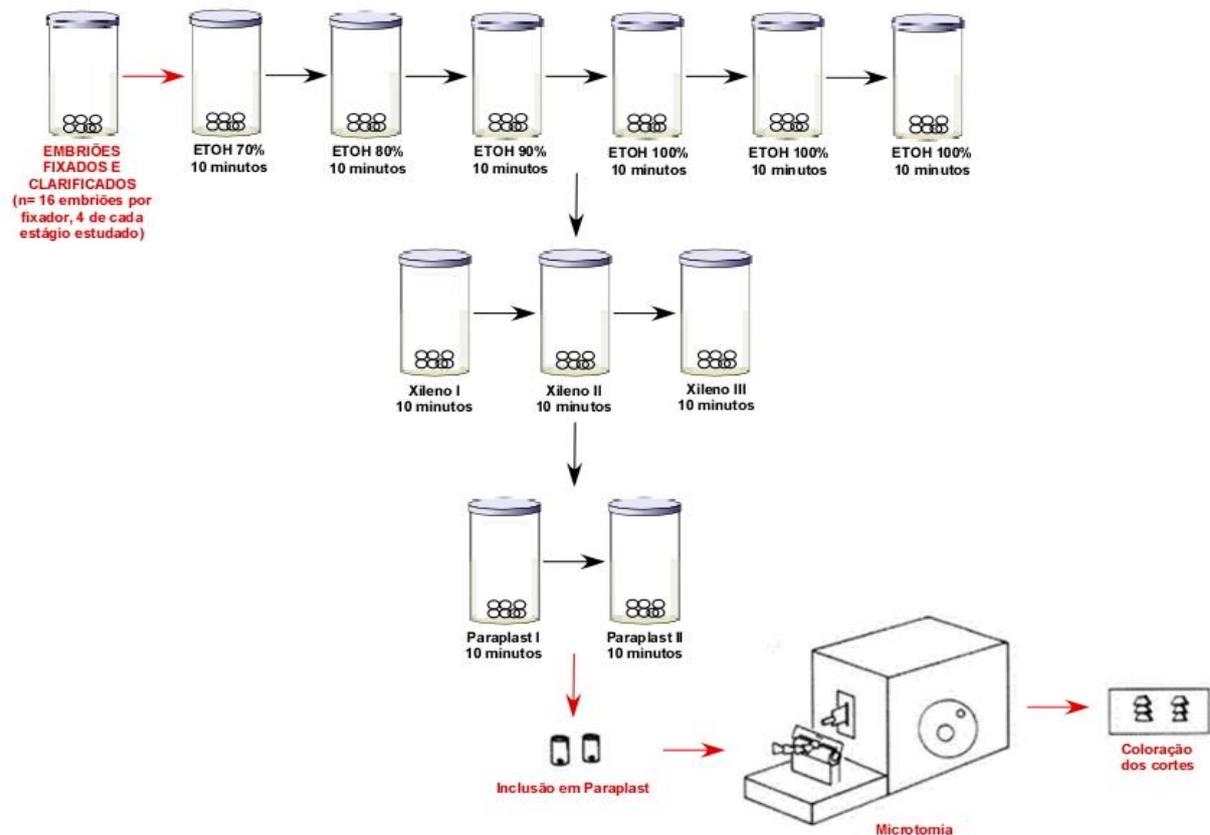


Figura 6: Processamento histológico tradicional, com etanol e xileno. Para o processamento com etanol e xilol, os embriões fixados e clarificados foram imersos em sucessivos banhos de etanol para desidratação dos embriões e em seguida em banhos de xilol para a diafanização, retirada de todo o álcool do tecido. Em seguida os embriões foram impregnados em paraplast e emblocados na mesma. Os blocos foram seccionados em micrótomo na espessura de 5 μ m.

4.4.2 Processamento histológico com isopropanol

Para esse processamento também foram feitos quatro blocos histológicos para cada um dos fixadores estudados. Em cada bloco foram colocados quatro embriões, um em cada estágio embrionário estudado, um total de 16 embriões por fixador.

O protocolo aplicado para processamento histológico com isopropanol foi realizado conforme Viktorov & Proshin (2003), porém com alterações de tempo baseando-se no protocolo de Sive, Grainger e Harland (2010) (Figura 7). Assim, utilizou-se: isopropanol I 99% (10 minutos); isopropanol II 99% (15 minutos), isopropanol III 99% (20 minutos), isopropanol IV 99% (1h40), Paraplast® I (40 minutos) e Paraplast® II (10 minutos). É importante ressaltar que neste protocolo, não há o processo de clarificação pelo xileno, o que torna o procedimento menos tóxico.

Após a última imersão em Paraplast®, os embriões em resina foram incluídos também em resina Paraplast® para formação do bloco em forma de metal, na central de inclusão. Então, os blocos com as amostras foram resfriados em placa refrigerada, e mantidos a -20°C até serem cortados na espessura de $5\ \mu\text{m}$, em micrótomo. Os cortes foram coletados em lâminas de vidro lavadas com etanol 70%. O banho-maria para coleta dos cortes de embrião foi mantido na temperatura de 50°C .

O processamento histológico foi feito na Unidade Multiusuário de Histotécnicas do ICB, da UFRJ (UMH/ICB/UFRJ).

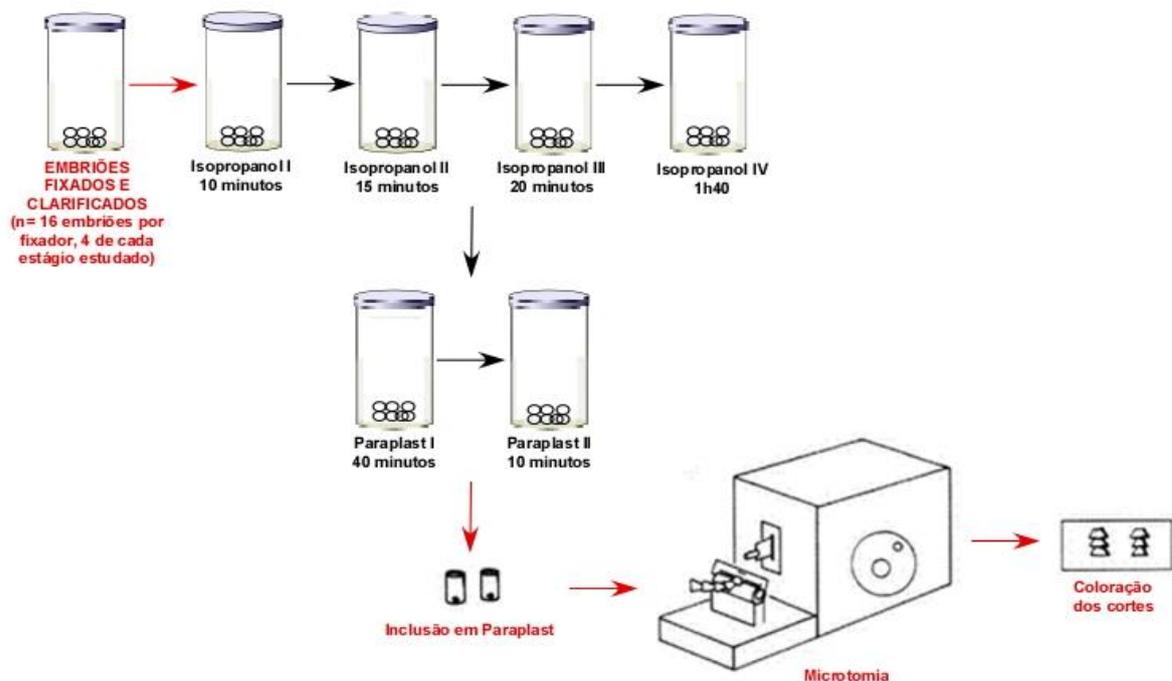


Figura 7: Processamento histológico com isopropanol. No processamento com isopropanol, os embriões fixados e clarificados foram imersos em banhos de isopropanol, impregnados em paraplast e emblocados também na resina. Os blocos também foram seccionados em micrótomo na espessura de $5\ \mu\text{m}$.

4.4.3 Processamento histológico para microscopia eletrônica de varredura

Para MEV, seis embriões foram fixados em cada um dos agentes estudados, totalizando 60 embriões.

Além dos fixadores testados durante todo o estudo, utilizamos o glutaraldeído tipo 2 a 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7.2, como fixador padrão da técnica (DE SOUZA, 2011). Para esta microscopia, os embriões não foram clarificados.

Seguimos o seguinte protocolo de preparação do material (Figura 8): (1) após retirar o material da solução fixadora, as amostras foram lavadas três vezes em PBS; (2) Etanol 50%, 10 minutos; (3) Etanol 70%, 10 minutos; (4) Etanol 90%, 10 minutos; (5) Etanol 100%, 10 minutos; (6) Etanol 100%, 10 minutos; (7) Etanol 100%, 10 minutos.

Para observação do material, este deve sofrer uma secagem pelo método do ponto crítico, para substituir a água presente nas células por um gás (normalmente, CO₂) (GONÇALVES, 2016). Os embriões foram colocados no suporte metálico do aparelho de ponto crítico, com etanol 100%. Após 2 horas no equipamento do ponto crítico, os embriões foram retirados delicadamente do suporte em que estavam os mesmos foram colocados sobre o suporte do microscópio (“stubs”) com fita de carbono, a qual ajuda na condutividade de elétrons.

Tendo em vista a pouca condutividade e emissão de elétrons de amostras biológicas, foi feita a metalização dessas com uma fina camada de ouro (2nm) por 5 minutos. Por fim, o material foi levado para análise no MEV.

Todo o procedimento de pré-microscopia foi realizado no Laboratório Herta Mayer (IBCCF, UFRJ), sob supervisão da técnica MSc. Noêmia Rodrigues Gonçalves.

Os equipamentos utilizados para o processamento do material para MEV foram os seguintes: aparelho de ponto crítico da LEICA EM CPD 300 (Wetzlar, Alemanha), metalização das amostras no equipamento Balzers Union FL-9496 (Lichtenstein).

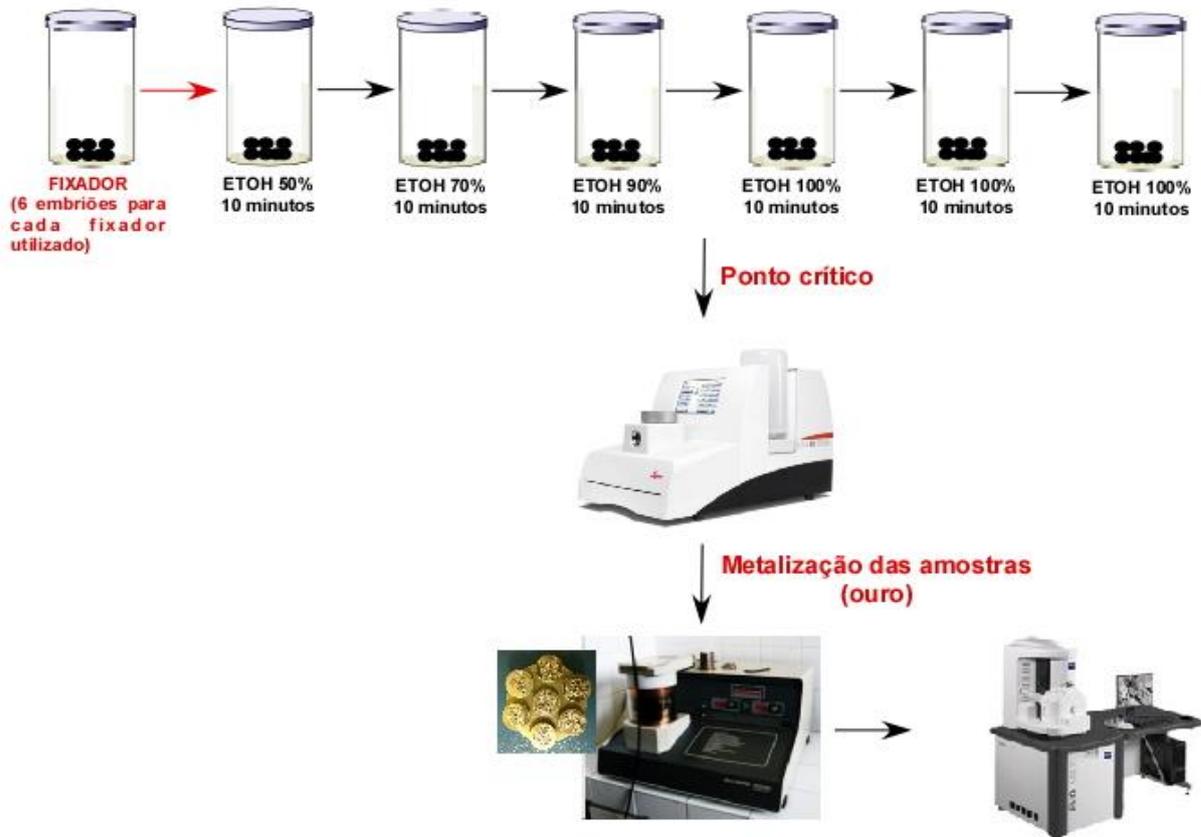


Figura 8: Processamento histológico com isopropanol. Embriões fixados nos agentes já testados e aqueles fixados em glutaraldeído foram processados para esta microscopia. Após o fixador, embriões foram submetidos a banhos de etanol para completa desidratação; foram levados ao aparelho de ponto crítico, onde troca-se o resto da água presente na peça por CO_2 ; e por fim, os embriões foram metalizados com uma fina camada de ouro, devido à baixa condutividade de material biológico.

4.5 COLORAÇÕES HISTOLÓGICAS

As colorações histológicas foram feitas em cortes de embriões inteiros em diferentes estágios de desenvolvimento, como explicado na sessão 4.1.

Realizou-se coloração histológica com hematoxilina e eosina (HE) ou azul de toluidina. Embriões inteiros foram corados para eosina e azul de toluidina.

O protocolo de preparação de cada solução corante utilizado encontra-se no ANEXO B.

Os sais e corantes usados foram da marca VETEC (São Paulo, Brasil).

4.5.1 Coloração com hematoxilina e eosina

A coloração hematoxilina e eosina foi feita em secções de embriões. Foram utilizados 12 embriões, três de cada estágio, em três blocos diferentes de cada um dos fixadores e três lâminas de cada um dos blocos.

Para coloração dos cortes de embriões (5 µm) em lâminas de vidro, realizou-se: (1) banhos de xileno para retirada da resina impregnada na amostra; (2) banhos de etanol em concentração decrescente para hidratação (100-70%); (3) coloração com corantes; (4) desidratação do tecido em banhos de etanol com concentração crescente (70-100%); (5) diafanização do tecido em xileno para retirar todo o álcool; (6) selagem das lâminas com lamínulas na presença de resina. Para cada passo foram utilizados 200 ml de reagentes e solução de corantes.

A sequência e o tempo em cada etapa foram os seguintes: (1) Xileno I, 10 minutos; (2) Xileno II, 5 minutos; (3) Xileno III, 5 minutos; (4) Etanol 100%, 2 minutos; (5) Etanol 90%, 2 minutos; (6) Etanol 80%, 2 minutos; (7) Etanol 70%, 2 minutos; (8) H₂O destilada, 2 minutos; (9) Hematoxilina, 5 minutos; (10) H₂O corrente, 5 minutos; (11) Eosina, 10 minutos; (12) H₂O destilada, 1 minuto; (13) Etanol 70%, 2 minutos; (14) Etanol 80%, 2 minutos; (15) Etanol 90%, 2 minutos; (16) Etanol 100%, 2 minutos; (17) Xileno I, 2 minutos; (18) Xileno II, 2 minutos; (19) Xileno III, 2 minutos; (20) Cobrir corte com resina Entellan®, 100 µl; (21) Colocar lamínula e deixar secar por, pelo menos, 2 horas.

As lâminas com amostras coradas com HE foram analisadas através de microscopia óptica.

4.5.2 Coloração com eosina

Embriões inteiros e secções histológicas foram corados com eosina para visualização em microscópio confocal, com o *laser* de Ar no comprimento de onda de 488 nm.

Secções histológicas foram coradas seguindo o seguinte protocolo: (1) Xileno I, 10 minutos; (2) Xileno II, 10 minutos; (3) Xileno III, 10 minutos; (4) Etanol 100%, 3 minutos; (5) Etanol 90%, 3 minutos; (6) Etanol 70%, 3 minutos; (7) H₂O destilada, 5 minutos; (8) PBS, 10 minutos; (9) PBS, 10 minutos; (10) Eosina, 10 minutos; (11) DAPI (20 mg/l), 5 minutos; (12) PBS, 10 minutos; (13) Glicerol 70% para fechar as lâminas com lamínulas e esmalte, usado para selar a lâmina e o glicerol não vazarem. Note que as secções tiveram as estruturas nucleares marcadas com DAPI.

Embriões inteiros foram corados respeitando o seguinte protocolo: (1) lavagem com etanol 100% para retirada do fixador; (2) hidratação dos embriões (etanol 100-70%); (3) coloração com eosina e desidratação com álcool (70-100%);

(4) imersão em glicerol 70% (7 ml glicerol + 3 ml H₂O destilada). Os embriões foram guardados em tubos de 2 ml (do tipo eppendorf) até visualização ao microscópio.

A sequência e o tempo em cada banho foram os seguintes: (1) Etanol 100%, 5 minutos; (2) Etanol 100%, 5 minutos; (3) Etanol 90%, 5 minutos; (4) Etanol 80%, 5 minutos; (5) Etanol 70%, 5 minutos; (6) H₂O destilada, 5 minutos; (7) Eosina, 20 minutos; (8) H₂O destilada, 5 minutos; (9) Etanol 70%, 5 minutos; (10) Etanol 80%, 5 minutos; (11) Etanol 90%, 5 minutos; (12) Etanol 100%, 5 minutos; (13) Glicerol 70%, 1.5 ml (meio para preservar o material e garantir a visualização no microscópio).

Os embriões foram gentilmente colocados, junto com o glicerol 70%, em placas de petri contendo uma lamínula em sua base (μ -Dish 35 mm, Ibidi, Planegg/Martinsried, Alemanha), para visualização em microscopia confocal. Para evitar que os embriões se deslocassem na placa, uma lamínula foi colocada sobre os mesmos.

A coloração de embrião inteiro foi feita em quatro embriões de cada um dos fixadores, sendo um de cada estágio. Para coloração de secções foram utilizados 12 embriões, três de cada estágio, em três blocos diferentes de cada um dos fixadores. Para coloração para visualização em microscopia óptica, foram utilizadas três lâminas de cada um dos blocos.

4.5.3 Coloração com azul de toluidina

A coloração com azul de toluidina foi realizada em embriões inteiros ou em secções histológicas de embriões (KURTH; HAUSEN, 2000).

Para coloração das lâminas com cortes dos embriões (5 μ m), foi realizada a mesma sequência que aquela aplicada na sessão 4.6.1, com as devidas particularidades do corante. A sequência e o tempo em cada banho foram os seguintes: (1) Xileno I, 10 minutos; (2) Xileno II, 5 minutos; (3) Xileno III, 5 minutos; (4) Etanol 100%, 2 minutos; (5) Etanol 90%, 2 minutos; (6) Etanol 80%, 2 minutos; (7) Etanol 70%, 2 minutos; (8) H₂O destilada, 2 minutos; (9) Azul de toluidina 0,1%, 20 minutos; (10) Etanol 95%, 2 minutos; (11) Etanol 100%, 2 minutos; (12) Xileno I, 5 minutos; (13) Xileno II, 5 minutos; (14) Xileno III, 5 minutos; (15) Corte foi coberto com 100 μ l de resina Entellan®; (16) Lamínula foi colocada sobre o material e foi aguardado um prazo de, pelo menos 2 horas antes de serem levadas ao microscópio óptico para garantir que o Entellan® estivesse seco.

Para visualização de embriões inteiros e secções marcadas com azul de toluidina em microscopia confocal, foram utilizados os protocolos da marcação para eosina, trocando somente o corante e o *laser* de HeNe, no comprimento de onda de 543 nm. Os protocolos estão descritos na sessão 4.6.2.

A coloração de embrião inteiro foi feita em quatro embriões de cada um dos fixadores, sendo um de cada estágio. Para coloração de secções foram utilizados 12 embriões, três de cada estágio, em três blocos diferentes de cada um dos fixadores. Para coloração para visualização em microscopia óptica, foram utilizadas três lâminas de cada um dos blocos, e para visualização em microscopia confocal, 1 lâmina de cada bloco.

4.6 FLUORESCÊNCIA COM DAPI

Para marcação das secções histológicas com DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol dihidroclorato) (Molecular Probes, Oregon, Estados Unidos), os cortes foram hidratados para serem usados em protocolos de fluorescência, a seguir: (1) Xileno I, 10 minutos; (2) Xileno II, 10 minutos; (3) Xileno III, 10 minutos; (4) Etanol 100%, 3 minutos; (5) Etanol 90%, 3 minutos; (6) Etanol 70%, 3 minutos; (7) H₂O destilada, 5 minutos; (8) PBS, 10 minutos; (9) PBS, 10 minutos; (10) DAPI (20 mg/l), 5 minutos; (11) PBS, 10 minutos; (12) Glicerol 70% para fechar as lâminas com lamínulas e esmalte.

Para captura de imagens, foi utilizada a microscopia óptica de fluorescência.

Algumas secções marcadas com DAPI foram contra-coradas ou com eosina ou com azul de toluidina, em protocolo descrito na sessão 4.6.2, e visualizadas em microscópio confocal. Para visualização de marcação com DAPI, o *laser* de diodo, no comprimento de onda de 405 nm.

A coloração de secções foi feita em duas lâminas de cada um dos blocos com dos fixadores estudados. Foram utilizadas amostras de três blocos, com um total de 12 embriões, três de cada estágio.

4.7 MICROSCOPIAS

Utilizamos três tipos de microscopia: 1) óptica de luz, onde o microscópio óptico utilizado foi o Zeiss Axio Imager A1, do Laboratório de Neuroplasticidade (ICB). O programa para captura de imagens foi o Axio Vision Rel. 4.8; 2) confocal, onde o microscópio Leica TCS SP5 AOBS, e programa de computador de análise

LAS_AF 2.4; 3) eletrônica de varredura, utilizando o microscópio EVO MA 10, Zeiss. A preparação das amostras e as imagens foram feitas com orientação da técnica responsável do Laboratório Herta Mayer (IBCCF, UFRJ), MSc. Noemia Rodrigues Gonçalves.

4.8 EXTRAÇÃO RNA E RT-qPCR

A extração de RNA foi feita em embriões emblocados em resina Paraplast® e armazenados a temperatura ambiente por seis meses. Foram utilizados três blocos de cada fixador e em cada bloco havia quatro embriões (um embrião de cada um dos estágios estudados). Para tal procedimento, não foi feita a distinção de processamento dos embriões, pois para a extração é importante que haja uma grande quantidade de embriões por amostra (SIVE; GRAINGER; HARLAND, 2010). Portanto, para cada amostra de extração foram misturados os blocos de processamento em etanol/xileno e isopropanol de cada um dos fixadores.

Os embriões foram retirados de seus blocos e colocados em tubos de 2ml devidamente identificados. Foi feito o processo de retirada da resina e a hidratação das amostras: (1) Xileno, 15 minutos, 60°C; (2) Etanol 100%, 10 minutos; (3) Etanol 90%, 10 minutos; (4) Etanol 70%, 10 minutos; (5) H₂O_{DEPC}, 10 minutos.

Após a hidratação foi aplicado protocolo de extração de RNA com reagente TRIzol: (1) TRIzol, 500 µl, 10 minutos, temperatura ambiente; (2) Adição de 250 µl de clorofórmio; (3) Centrifugação das amostras por 15 minutos, 4°C, 14000 rpm; (4) Coleta do sobrenadante para novo tubo; (5) Adição de 300 µl de isopropanol, 10-12h, -20°C; (5) Centrifugação das amostras por 20 minutos, 4°C, 14000 rpm; (6) Descarte do sobrenadante e adição de 300 µl de etanol 70%; (6) Centrifugação das amostras por 10 minutos, 4°C, 9000 rpm; (7) Descarte do sobrenadante e, assim que o pellet foi seco, foi adicionado 12 µl de H₂O_{DEPC}. Ao final da extração as amostras foram dosadas em nanodrop, considerando o grau de pureza das amostras entre 1,7 e 1,9.

Para a produção de cDNA, foi utilizado o protocolo do kit SuperScript® VILO™, que parte de 1 µg de RNA de cada amostra.

Para analisar a integridade do RNA, foi feito RT-qPCR do gene de referência EF1α (fator 1-α de alongamento), na concentração de 5 µM. Para cada amostra foram utilizados: 5 µl de SYBR®, 0.5 µl do primer sense, 0.5 µl do primer antisense, 3 µl de H₂O_{DEPC}, 1 µl da amostra diluída (1 µl de cDNA em 9 µl de H₂O_{DEPC}). A

reação de amplificação foi realizada no equipamento QuantiStudio 7, em protocolo configurado no equipamento.

As sequências do par de primers de EF1 α utilizado para RT-qPCR, desenhado no programa Primer 3 (National Institutes of Health, Estados Unidos), foram: sentido, 5'-CCTGAACCCAGGCCAGATTGGTG-3'; antisenso 5'-GAGGGTAGTTCAGAGAAGTCTCCACG-3'.

Para extração de RNA foi utilizado o reagente TRIzol e H₂O_{DEPC} da marca Thermo Fisher Scientific (Massachusetts, Estados Unidos). A dosagem do RNA extraído foi feita no Nanodrop 2000 Espectrofotômetro da Thermo Fisher Scientific (Massachusetts, Estados Unidos). A centrifugação das amostras foi feita em centrífuga de bancada com rotor de tubo para 2 ml da Eppendorf (Hamburgo, Alemanha).

Para a produção de DNA complementar (cDNA) foi utilizado o kit SuperScript® VILO™ da marca Thermo Fisher Scientific (Massachusetts, Estados Unidos). O RT-PCR em tempo real foi feito no equipamento QuantStudio 7 Real-Time PCR System, da Thermo Fisher Scientific (Massachusetts, Estados Unidos). Para a reação foram utilizados tampão SYBR®, H₂O_{DEPC} da Thermo Fisher Scientific (Massachusetts, Estados Unidos) e primers para amplificação das amostras da marca IDT (Califórnia, Estados Unidos).

4.9 ANÁLISE DE DADOS

As imagens capturadas dos embriões pós-período de fixação foram analisadas em ImageJ (NIH, Maryland, Estados Unidos) para medida de diâmetro dos mesmos. Os números obtidos foram salvos em planilha Excel (Microsoft Office 2010) e os gráficos foram obtidos no programa GraphPad Prism 5.0.

As imagens e reconstruções da microscopia confocal foram analisadas em Fiji (NIH, Maryland, Estados Unidos).

As imagens capturadas em lupa e em microscopia foram organizadas e, quando necessário, tiveram brilho e contrastes corrigidos no programa Canvas 11 (ACD System International Inc., Flórida, Estados Unidos).

O RT-qPCR foi analisado no programa QuantStudio™ Real-Time PCR Software v1.1 (Califórnia, Estados Unidos).

5 RESULTADOS

Embriões de *Xenopus laevis*, nos primeiros estágios do desenvolvimento (de 2 blastômeros a blástula), foram expostos aos diferentes agentes fixadores por 72 horas a 4°C. Ressaltamos que em experimentos com a fixação a temperatura ambiente não foi possível a captura de embriões íntegros após o processamento histológico (n=36).

Ao final do período de fixação, observamos a forma dos embriões e possíveis alterações em relação aos embriões vivos nos mesmos estágios do desenvolvimento (análise qualitativa) e quanto à medida de seus diâmetros (análise semi-quantitativa).

Foram fotografados somente alguns embriões para a análise qualitativa e semi-quantitativa, em um total de 48 embriões de 2 células, 84 embriões de 4 células, 68 mórulas e 57 blástulas.

5.1 FIXADORES À BASE DE ISOPROPANOL FORAM EFICAZES EM PRESERVAR A MORFOLOGIA DOS EMBRIÕES DE *XENOPUS LAEVIS*

Após a fixação, os embriões foram fotografados em lupa, em aumento de 5 vezes. Ao compararmos os embriões fixados com os controles vivos (Figura 9), observou-se que os fixadores tradicionais ao modelo do estudo não prejudicam a forma dos embriões, sendo eles MEMFA (Figura 9E-H), solução de Bouin (Figura 9I-L), formalina 10% (Figura 9M-P) e PFA 4% (Figura 9Q-T). Importante destacar que há presença de formaldeído na composição desses fixadores eficazes na manutenção da morfologia.

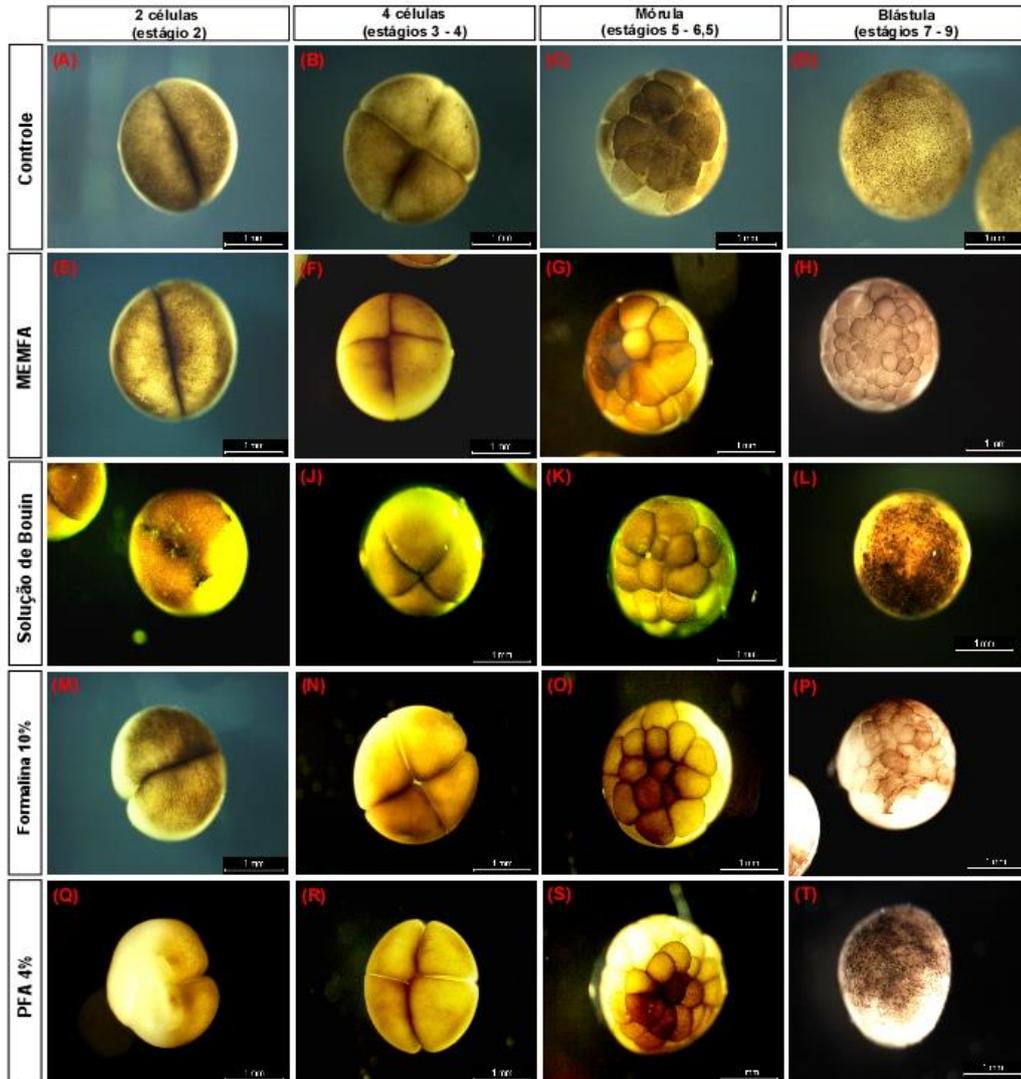


Figura 9: Embriões de *Xenopus laevis*, nos estágios iniciais do desenvolvimento, não apresentaram alteração morfológica quando fixados em soluções com formaldeído em sua composição. (A-D) Embriões vivos, controle para morfologia do período de clivagem e suas fases. (E-H) Embriões fixados em MEMFA. (I-L) Embriões fixados em solução de Bouin. (M-P) Embriões fixados em formaldeído 10%. (Q-T) Embriões fixados em PFA 4%. Barra de escala: 1 mm.

Assim como os fixadores tradicionais ao modelo (MEMFA, Bouin, formalina 10% e PFA4%), as análises morfológicas dos embriões fixados com agentes com isopropanol na composição mostraram que este fixador preserva a forma dos embriões (Figura 10). Embriões fixados em IA (Figura 10E-H) foram os que apresentaram melhor resultado morfológico quando comparados aos vivos (Figura 10A-D). Não houve indícios de retração ou turgidez de qualquer um dos polos dos embriões. Enquanto no estágio de 2 células, o uso do IFA promoveu turgidez dos embriões (Figura 10I). Nos estágios de mórula a blástula, IFA manteve a forma dos embriões (Figura 10J-L).

Em todos os estágios embrionários vemos que, comparado aos fixadores e embriões vivos, o isopropanol 99% promove retração dos embriões devido à perda de líquido e rompe sua membrana coriônica (Figura 10N), mas não os deforma (Figura 10M-P).

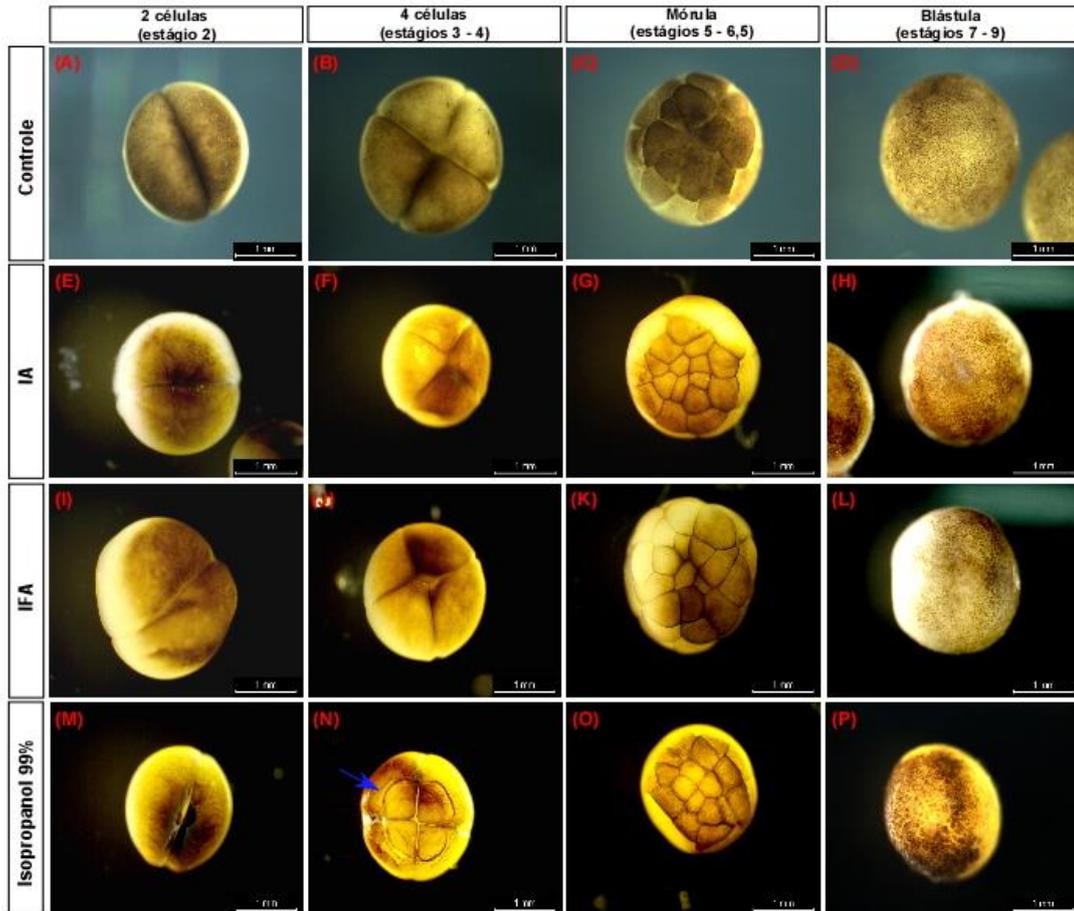


Figura 10: Embriões de *Xenopus laevis*, nos estágios iniciais do desenvolvimento, fixados com agentes com isopropanol na composição, não apresentaram alteração em sua forma. (A-D) Embriões vivos, controle para morfologia do período de clivagem e suas fases. (E-H) Embriões fixados com IA. (I-L) Embriões fixados em IFA. (M-P) Embriões fixados em isopropanol 99% apresentaram alteração morfológica, ficaram menores que os controles e podem apresentar rompimento da membrana coriônica (seta azul em N). Barra de escala: 1 mm.

Conforme mostramos na Figura 11, fixadores à base de álcool etílico não preservam bem a morfologia dos embriões. Os embriões que foram imediatamente colocados no etanol 70% apresentaram alterações morfológicas (Figura 11E-L). A fixação em solução de Carnoy mostra que no estágio de 2 células promove perda de líquido, deixando-as disformes, principalmente no polo vegetal (Figura 11I). No estágio de 4 células, os embriões fixados com etanol 70% ou solução de Carnoy mostram alterações, incluindo separação das células e rompimento da membrana coriônica (Figuras 11F, J). No estágio de mórula, não foram visualizadas alterações aparentes (Figuras 11C, G, K). Por outro lado, blástulas fixadas em solução de Carnoy parecem menores (Figura 11L).

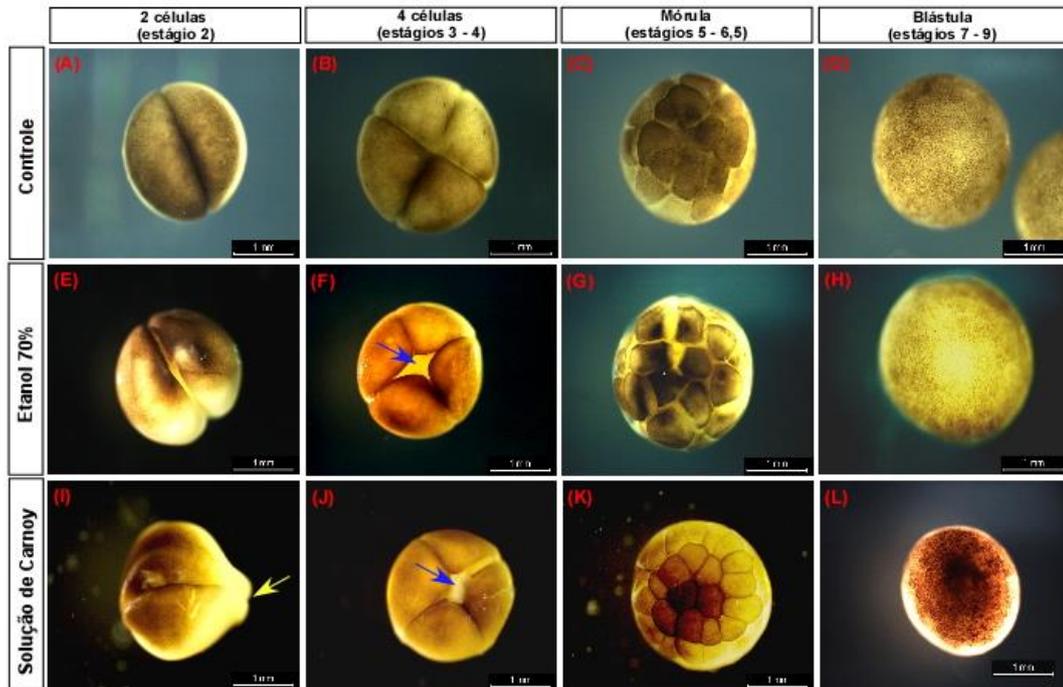


Figura 11: Embriões de *Xenopus laevis*, nos estágios iniciais do desenvolvimento, sofrem alterações morfológicas quando submetidos à fixadores com etanol. (A-D) Embriões vivos, controle para morfologia do período de clivagem e suas fases. (E-H) Embriões que foram imediatamente imersos em etanol 70%. (I-L) Embriões fixados em solução de Carnoy. Houve separação das células no embriões de 4 células (seta azul em F e J). Perda do formato redondo nos embriões de duas células, como perda de líquido mais intensa no polo vegetalivo (seta amarela em I). Barra de escala: 1 mm.

Segundo análises morfométricas realizadas no programa Image J, a média do diâmetro dos embriões vivos utilizados em nossos experimentos foi de $2,28 \pm 0,09$ mm nos estágios correspondentes ao período de clivagem (do estágio de 2 células até blástula). Em relação aos embriões vivos, não houve alteração significativa no tamanho dos embriões fixados com MEMFA, Bouin, PFA4% e Formalina 10% nos diferentes estágios de desenvolvimento (Tabela 3). O isopropanol 99% demonstrou uma significativa retração dos embriões em relação ao controle. Por outro lado, IA e IFA não tiveram alteração significativa nos distintos estágios embrionários avaliados.

Tabela 3: Análise semi-quantitativa dos embriões de *Xenopus laevis* no período de clivagem.

| Fixadores | Média \pm Desvio Padrão (SD) (mm) |
|---|-------------------------------------|
| Controle - Embriões vivos | $2,3 \pm 0,09$ |
| Etanol 70% | $2,3 \pm 0,11$ |
| MEMFA | $2,2 \pm 0,09$ |
| PFA 4% | $2,1 \pm 0,02$ |
| Formalina 10% | $2,1 \pm 0,09$ |
| Solução de Bouin | $2,1 \pm 0,03$ |
| Solução de Carnoy | $2,1 \pm 0,12$ |
| Isopropanol 99%* | $1,9 \pm 0,04$ |
| IA (Isopropanol + Ácido acético) | $2,1 \pm 0,05$ |
| IFA (Isopropanol + Formalina + Ácido acético) | $2,3 \pm 0,10$ |

* $P < 0,05$

Em embriões de 2 células, somente o isopropanol 99% alterou significativamente ($p < 0,05$) o diâmetro dos embriões, os quais retraíram em relação ao controle, os embriões vivos, e aqueles fixados com os agentes químicos tradicionais para a espécie (Figura 12A) (Tabela 4).

Embriões de 4 células retraíram significativamente quando fixados com isopropanol. Houve retração em relação aos embriões vivos, ao etanol 70%, ao Carnoy e aos 2 fixadores com isopropanol (Figura 12B) (Tabela 4). Houve diferença estatisticamente significativa entre o tamanho de embriões IA e IFA em relação ao isopropanol 99%.

Assim como nos estágios anteriores, a fixação com isopropanol retraiu os embriões em relação ao controle com embriões vivos e em relação aos fixadores etanol 70%, MEMFA, Carnoy e IFA (Figura 12C) (Tabela 4). Ao contrário do isopropanol 99%, o IFA indicou embriões acima do tamanho daqueles apresentados

pelos fixadores PFA 4% e IA. Embriões fixados em solução de Bouin, IA e IFA apresentam variação em seus tamanhos.

Em blástulas (Figura 12D), os embriões vivos só não tiveram o tamanho alterado quando comparados aos fixados em etanol 70% e em IFA. Embriões fixados em IFA ficaram com tamanho estatisticamente diferente em relação aos outros fixadores, menos o IA (Tabela 4). Nesse período do desenvolvimento os embriões fixados ficaram com diâmetros similares que aqueles dos dois estágios de desenvolvimento embrionário anteriores.

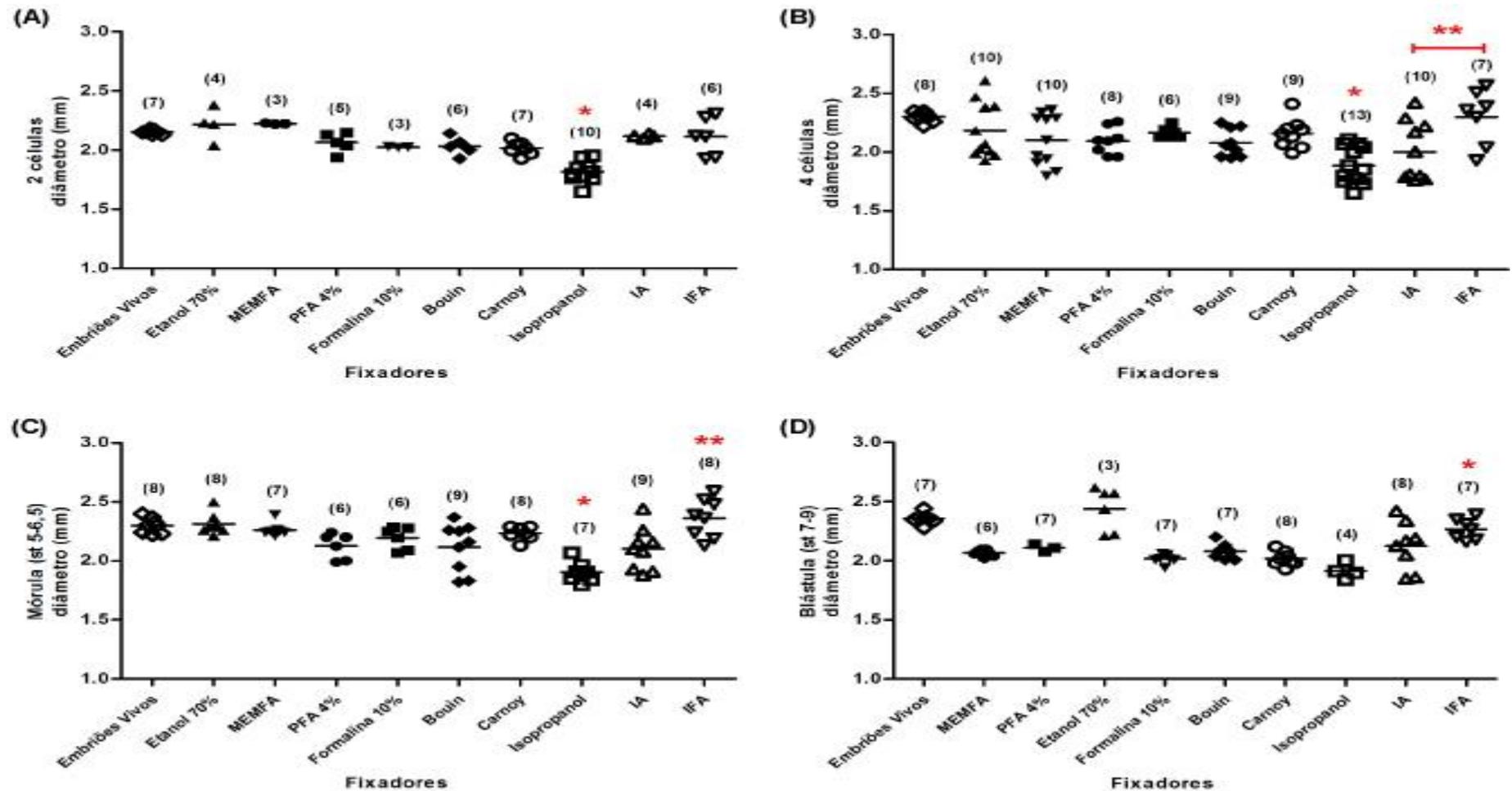


Figura 12: Diâmetro dos embriões de *Xenopus laevis* nos estágios de clivagem. (A) Embriões de 2 células fixados em isopropanol apresentam diâmetro menor quando comparado aos embriões vivos e os fixados com as substâncias em estudo, além dos tradicionais fixadores da espécie. $P < 0,05$. (B) Embriões de 4 células fixados com isopropanol 99% diminuiu o tamanho, com diferença estatística em relação aos embriões vivos e ao etanol 70%, Carnoy, IA e IFA; diferença estatística entre o tamanho de embriões fixados com IA e com IFA. $*P < 0,05$, $**P < 0,05$. (C) Em mórula, o isopropanol 99% encolheu os embriões em relação ao controle vivo e em relação ao etanol 70%, MEMFA, Carnoy e IFA. IFA indicou embriões acima do tamanho daqueles fixadores com PFA 4% e IA. $*P < 0,05$, $**P < 0,05$. (D) Blástulas fixadas em IFA mantiveram o tamanho de blástulas vivas. $*P < 0,05$ (Teste de Tukey).

Como apontado nos gráficos anteriores, a análise das médias dos embriões de cada estágio correspondente a clivagem, em cada um dos fixadores analisados, indicam que houve pouca variação no tamanho, dentro de um mesmo fixador (Tabela 4). Blástulas em etanol 70% indicam turgidez dentro do próprio grupo de embriões, enquanto que as fixadas em MEMFA encolhem bastante na comparação dentro do grupo.

Tabela 4: Diâmetro dos embriões de *Xenopus laevis* em diferentes fases embrionárias do período de clivagem.

| Fixador | 2 células | 4 células | Mórula | Blástula |
|-------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| | Média ± SD (mm) |
| Controle-Embriões vivos | 2,1 ± 0,09 | 2,3 ± 0,04 | 2,3 ± 0,07 | 2,3 ± 0,04 |
| Etanol 70% | 2,2 ± 0,14 | 2,2 ± 0,24 | 2,3 ± 0,09 | 2,4 ± 0,18* |
| MEMFA | 2,2 ± 0,00 | 2,1 ± 0,22 | 2,3 ± 0,06 | 2,1 ± 0,03* |
| PFA 4% | 2,1 ± 0,08 | 2,1 ± 0,11 | 2,1 ± 0,19 | 2,1 ± 0,03* |
| Formalina 10% | 2,0 ± 0,00 | 2,2 ± 0,05 | 2,2 ± 0,09 | 2,0 ± 0,04* |
| Solução de Bouin | 2,0 ± 0,07 | 2,1 ± 0,12 | 2,1 ± 0,20 | 2,1 ± 0,07* |
| Solução de Carnoy | 2,0 ± 0,06 | 2,1 ± 0,12 | 2,3 ± 0,13 | 2,0 ± 0,06* |
| Isopropanol 99% | 1,8 ± 0,09* | 1,9 ± 0,15* | 1,9 ± 0,09* | 1,9 ± 0,07* |
| IA | 2,1 ± 0,16 | 2,0 ± 0,25* | 2,1 ± 0,18 | 2,1 ± 0,20* |
| IFA | 2,1 ± 0,16 | 2,3 ± 0,23 | 2,4 ± 0,16 | 2,3 ± 0,09 |

*P<0,05 em relação ao controle embriões vivos do mesmo estágio.

Após a captura de imagens dos embriões fixados, estes foram separados para análises histológicas.

Para microtomia em parafina ou em resina Paraplast® a peça histológica sofreu o processamento histológico, com a retirada de toda a água de sua constituição. Nos embriões de nosso estudo, testamos se o processamento com isopropanol, um solvente de lipídeos, seria tão eficaz quanto o protocolo tradicional com etanol e xileno em seu protocolo. A ausência de xileno no protocolo em teste também o torna menos tóxico, o que é excelente ao manipulador e ao ambiente.

5.2 USO DO ISOPROPANOL NO PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO PRESERVA EMBRIÕES DE *XENOPUS LAEVIS* NOS PRIMEIROS ESTÁGIOS DO DESENVOLVIMENTO

Antes dos processamentos histológicos, os embriões foram clarificados para que o pigmento desses não prejudicasse as colorações histológicas através da metacromasia, que é a mudança de cor dos corantes.

Os embriões foram processados pelo método tradicional, com banhos de etanol e xileno, e no método com isopropanol, sem xileno. As secções desses foram coradas em hematoxilina e eosina (HE) e em azul de toluidina. Obtivemos cortes histológicos com distinção entre o citoplasma e estruturas nucleares nos dois tipos de processamento e em todos os estágios embrionários analisados. Porém, os resultados foram distintos em cada fixador, processamento e coloração.

O processamento dos embriões com isopropanol mostrou-se mais eficaz do que o tradicional (etanol e xileno), permitindo visualização de estrutura nuclear além das vesículas de vitelo, presentes no citoplasma celular (Figura 13).

As secções obtidas e coradas foram classificadas da seguinte forma: (-) não observadas; (citoplasma) para cortes que não descolaram das lâminas, mas a coloração não ficou específica, não houve distinção entre a hematoxilina e a eosina e os tons diferentes do azul de toluidina, característicos do corante; (núcleo + citoplasma) para aqueles em que conseguimos identificar estruturas nucleares, apesar da grande quantidade de vitelo em vesículas intracelulares (Tabelas 5 e 6).

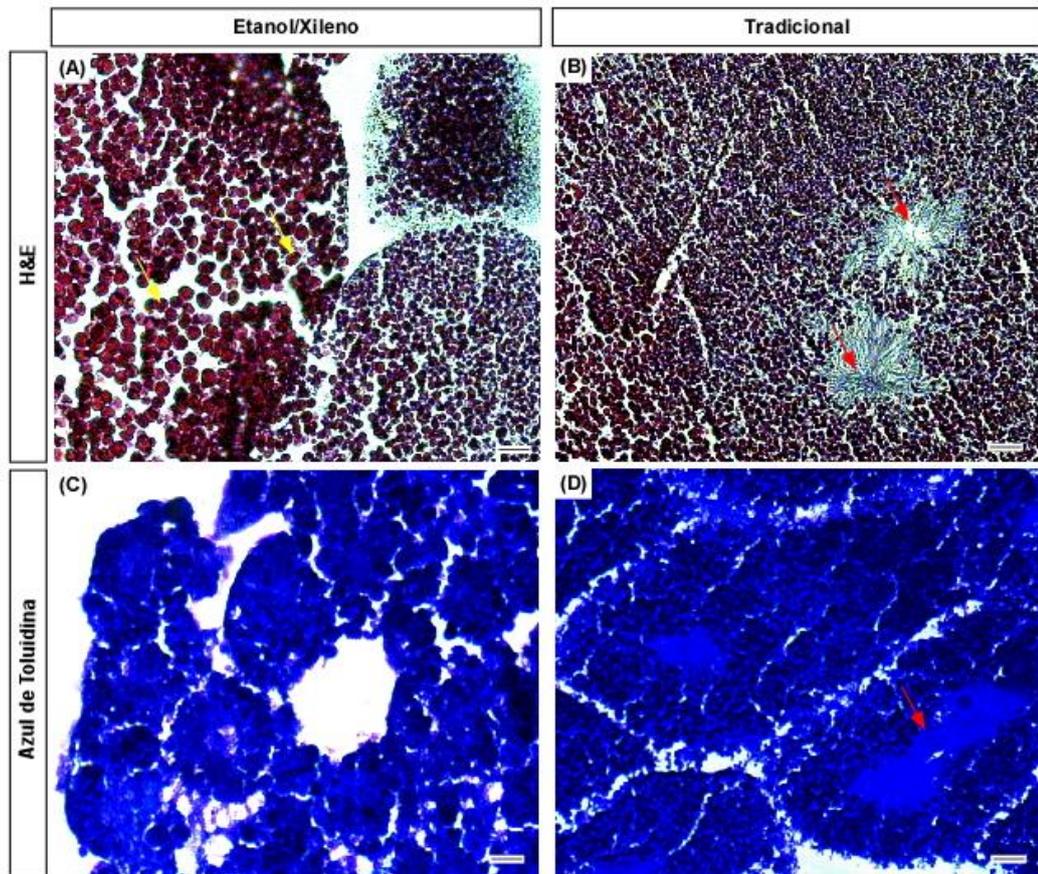


Figura 13: Cortes histológicos dos embriões de *Xenopus laevis* processados utilizando protocolo tradicional (etanol e xileno) ou com isopropanol. Coloração em cortes de mórulas (A, B) e em blástulas (C, D) fixadas com IFA e corados com HE (A, B) ou azul de toluidina (C, D). No processamento tradicional (A, C) todo corte fica prejudicado pelas vesículas de vitelo intracelular (seta amarela em A). Note que no processamento com isopropanol (B, D) é possível distinguir estruturas nucleares marcadas com hematoxilina e no azul de toluidina (setas vermelhas em B e D). Aumento 400x. Barra de escala: 20 μ m. Total de 16 embriões por fixador, para cada processamento estudado.

Tabela 5: Visualização de estruturas celulares após análise de coloração por HE dos cortes histológicos de embriões de *Xenopus laevis*.

| | Processamento | 2 células | 4 células | Mórula | Blástula |
|------------------------------|----------------------|------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| Controle (Etanol 70%) | Tradicional | - | Citoplasma | - | - |
| | Isopropanol | - | - | - | - |
| MEMFA | Tradicional | - | - | - | - |
| | Isopropanol | - | - | - | - |
| PFA 4% | Tradicional | citoplasma | Citoplasma | citoplasma | citoplasma |
| | Isopropanol | citoplasma | Citoplasma | citoplasma | citoplasma |
| Solução de Bouin | Tradicional | - | - | - | - |
| | Isopropanol | - | - | citoplasma | - |
| Solução de Carnoy | Tradicional | - | - | citoplasma | - |
| | Isopropanol | - | - | - | - |
| Formalina 10% | Tradicional | - | - | - | - |
| | Isopropanol | - | Citoplasma | - | citoplasma |
| Isopropanol | Tradicional | citoplasma | Citoplasma | citoplasma | citoplasma |
| | Isopropanol | - | - | - | - |
| IA | Tradicional | - | - | - | - |
| | Isopropanol | citoplasma | núcleo + citoplasma | núcleo + citoplasma | núcleo + citoplasma |
| IFA | Tradicional | - | - | - | - |
| | Isopropanol | citoplasma | Citoplasma | núcleo + citoplasma | núcleo + citoplasma |

Para a análise de embriões processados, seccionados e corados, os cortes histológicos foram classificados considerando os seguintes critérios: Secções que descolaram das lâminas partes ou inteiras (-); Cortes com coloração não-específica devido à grande quantidade de vitelo em vesículas intracelulares (citoplasma); Cortes em que se identificou estruturas nucleares, apesar da grande quantidade de vitelo em vesículas intracelulares (núcleo+citoplasma). Para embriões de 2 células não houve resultado satisfatório.

Tabela 6: Visualização de estruturas celulares após análise de coloração por azul de toluidina dos cortes histológicos de embriões de *Xenopus laevis*.

| | Processamento | 2 células | 4 células | Mórula | Blástula |
|------------------------------|----------------------|------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| Controle (Etanol 70%) | Tradicional | Citoplasma | núcleo + citoplasma | núcleo + citoplasma | núcleo + citoplasma |
| | Isopropanol | - | - | - | - |
| MEMFA | Tradicional | - | - | - | - |
| | Isopropanol | - | - | - | - |
| PFA 4% | Tradicional | citoplasma | núcleo + citoplasma | núcleo + citoplasma | núcleo + citoplasma |
| | Isopropanol | citoplasma | citoplasma | citoplasma | citoplasma |
| Solução de Bouin | Tradicional | citoplasma | citoplasma | citoplasma | citoplasma |
| | Isopropanol | citoplasma | citoplasma | citoplasma | citoplasma |
| Solução de Carnoy | Tradicional | - | núcleo + citoplasma | - | núcleo + citoplasma |
| | Isopropanol | citoplasma | - | - | - |
| Formalina 10% | Tradicional | - | - | citoplasma | - |
| | Isopropanol | citoplasma | núcleo + citoplasma | núcleo + citoplasma | núcleo + citoplasma |
| Isopropanol | Tradicional | - | - | - | - |
| | Isopropanol | - | - | - | - |
| IA | Tradicional | - | - | - | - |
| | Isopropanol | citoplasma | citoplasma | núcleo + citoplasma | núcleo + citoplasma |
| IFA | Tradicional | - | - | núcleo + citoplasma | citoplasma |
| | Isopropanol | citoplasma | núcleo + citoplasma | citoplasma | núcleo + citoplasma |

Para a análise de embriões processados, seccionados e corados, os cortes histológicos foram classificados considerando os seguintes critérios: Secções que descolaram das lâminas partes ou inteiras (-); Cortes com coloração não-específica devido à grande quantidade de vitelo em vesículas intracelulares (citoplasma); Cortes em que se identificou estruturas nucleares, apesar da grande quantidade de vitelo em vesículas intracelulares (núcleo+citoplasma). Para embriões de 2 células não houve resultado satisfatório.

5.3 OS FIXADORES COM ISOPROPANOL SÃO ALTERNATIVAS À FIXAÇÃO DE EMBRIÕES DE *XENOPUS LAEVIS* DESTINADOS PARA ANÁLISES HISTOLÓGICAS

Na maior parte dos fixadores, os cortes histológicos corados para HE não resistiram ao processo de coloração, como observados nas tabelas 5. Independente do tipo de processamento e estágios embrionários, os cortes histológicos de embriões expostos direto no etanol 70% e fixados em MEMFA, solução de Carnoy, solução de Bouin, formalina 10%, ficaram em condições muito ruins, com secções que soltaram das lâminas por inteiro ou pedaços, e as partes que sobraram não coraram especificamente (Tabela 5). Importante destacar que as lâminas para coleta das secções não foram tratadas com gelatina ou poli-L-lisina, foram somente lavadas em etanol 70%, pois lâminas tratadas não são indicadas se as secções serão destinadas à coloração, visto que podem ficar manchadas pelos corantes, o que pode prejudicar as análises.

O isopropanol 99% retira grande quantidade de lipídeos presente nas vesículas celulares, deixando espaços vazios no citoplasma das células durante o processamento com isopropanol. No processamento tradicional, os cortes não apresentaram tais espaços, mas também não foi possível identificar estruturas coradas especificamente pela hematoxilina.

Salienta-se que os embriões de duas células são os mais difíceis de obter secções em todas as amostras com distintos fixadores testados.

Nas análises de secções coradas para HE tivemos que, dentre os fixadores tradicionais para o modelo de estudo, somente PFA 4% apresentou cortes com distinção na coloração de estruturas nucleares e citoplasma, em ambos os processamentos (Figura 14). Observou-se estruturas nucleares bem marcadas pela hematoxilina (setas vermelha em A e B).

Nas secções de embriões fixados em IA e IFA podemos identificar células em divisão, quando o processamento foi feito em isopropanol e coloração HE (Figura 15) (setas em A e B).

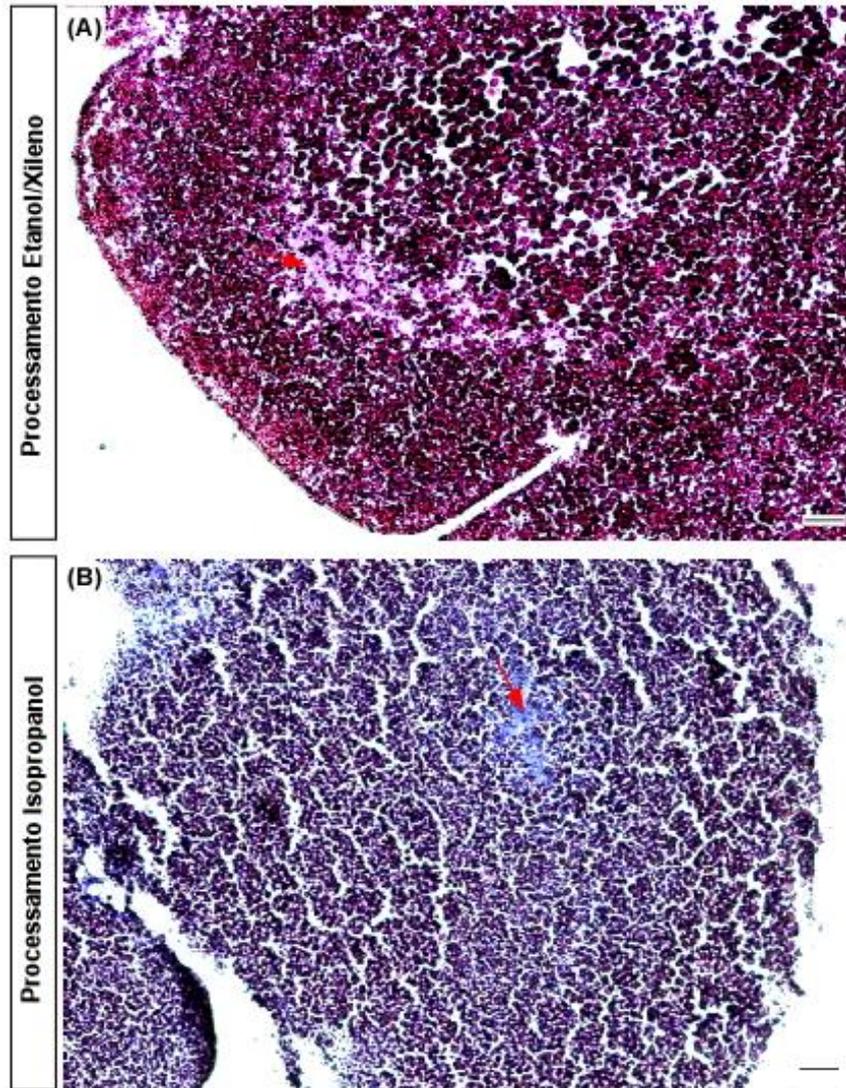


Figura 14: Secções de embriões fixados em PFA 4% e coradas em HE. Não houve diferença no resultado da coloração de HE das secções processadas em método tradicional **(A)** e o com isopropanol. **(B)**. Observe a clara marcação com hematoxilina do material nuclear **(seta vermelha em A e B)**. Aumento 400x. Barra de escala: 20 μ m. Número de embriões = 3 de cada um dos estágios utilizados, para um total de 12 embriões.

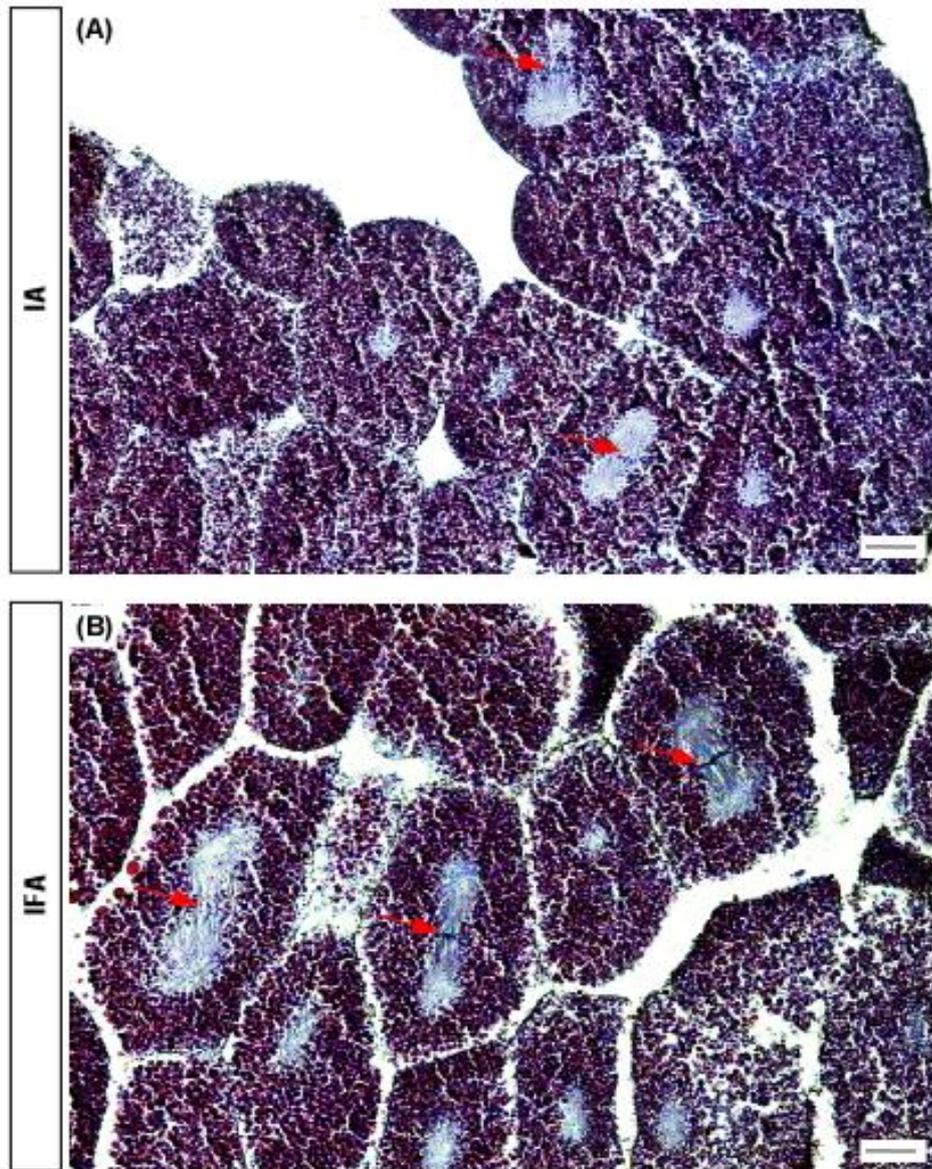


Figura 15: Secções de embriões processados com isopropanol e fixados com agentes com isopropanol na composição. (A) A fixação em IA permitiu coloração histológica com identificação de estruturas celulares. Blástula com detalhes de divisão celular (setas vermelha). **(B)** Embriões fixados em IFA apresentam coloração histológica com distinção de estruturas quando processados em isopropanol. Blástula com detalhes de divisão celular melhor destacados que em outros fixadores, com setas vermelha indicam região de divisão celular. Aumento 400x. Barra de escala: 20 μ m. Número de embriões por fixador = 3 de cada um dos estágios utilizados, para um total de 12 embriões.

Para coloração em azul de toluidina, os embriões processados em isopropanol apresentaram mais cortes com melhor distinção de coloração entre citoplasma e estrutura nuclear, do que aquelas de embriões processados em protocolo com etanol e xileno (Tabela 6).

Assim como o observado na coloração de HE, os embriões com pior resultado são os de duas células, devido à grande quantidade de vitelo.

Embriões processados utilizando o protocolo tradicional apresentaram coloração com diferentes tons de azul, estruturas nucleares destacadas e citoplasma repleto de vesículas vitelínicas, quando fixados em etanol 70% (Figura 16A), PFA 4% ou solução de Carnoy (Figura 16B).

Cortes de embriões fixados em formalina 10% (Figura 17A), IA (Figura 17B) ou IFA (Figura 17C) apresentaram núcleos e estruturas nucleares com coloração distinta a do citoplasma quando o material histológico foi processado em isopropanol.

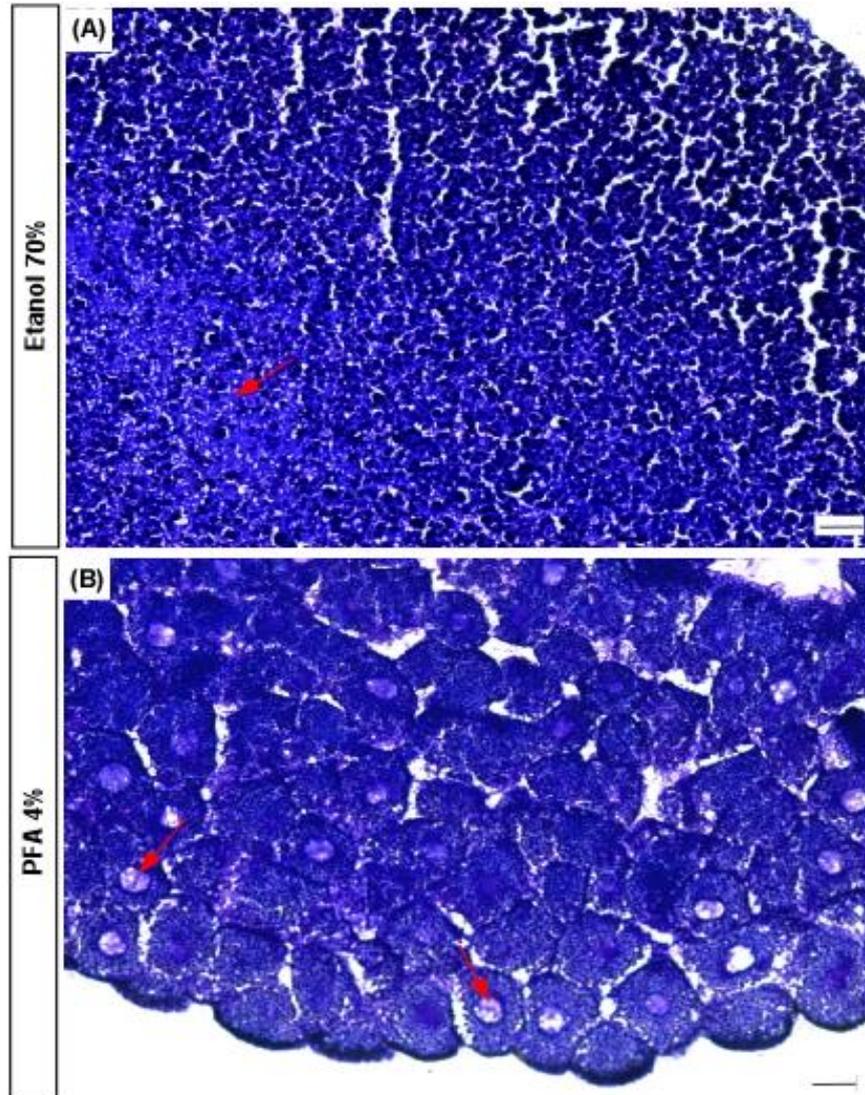


Figura 16: Secções de embriões com processamento histológico utilizando protocolo tradicional (etanol/xileno) e corados com azul de toluidina. Embriões que foram colocados imediatamente em etanol 70% **(A)** e aqueles fixados em PFA 4% **(B)** e slução de Carnoy apresentaram coloração por azul de toluidina com possível distinção das estruturas nucleares (**setas em vermelho**). **(A)** Secção de embrião de 4 células; **(B)** Secção de embrião no estágio de mórula. Aumento de 400x. Barra de escala: 20 μ m. Número de embriões por fixador = 3 de cada um dos estágios utilizados, para um total de 12 embriões.

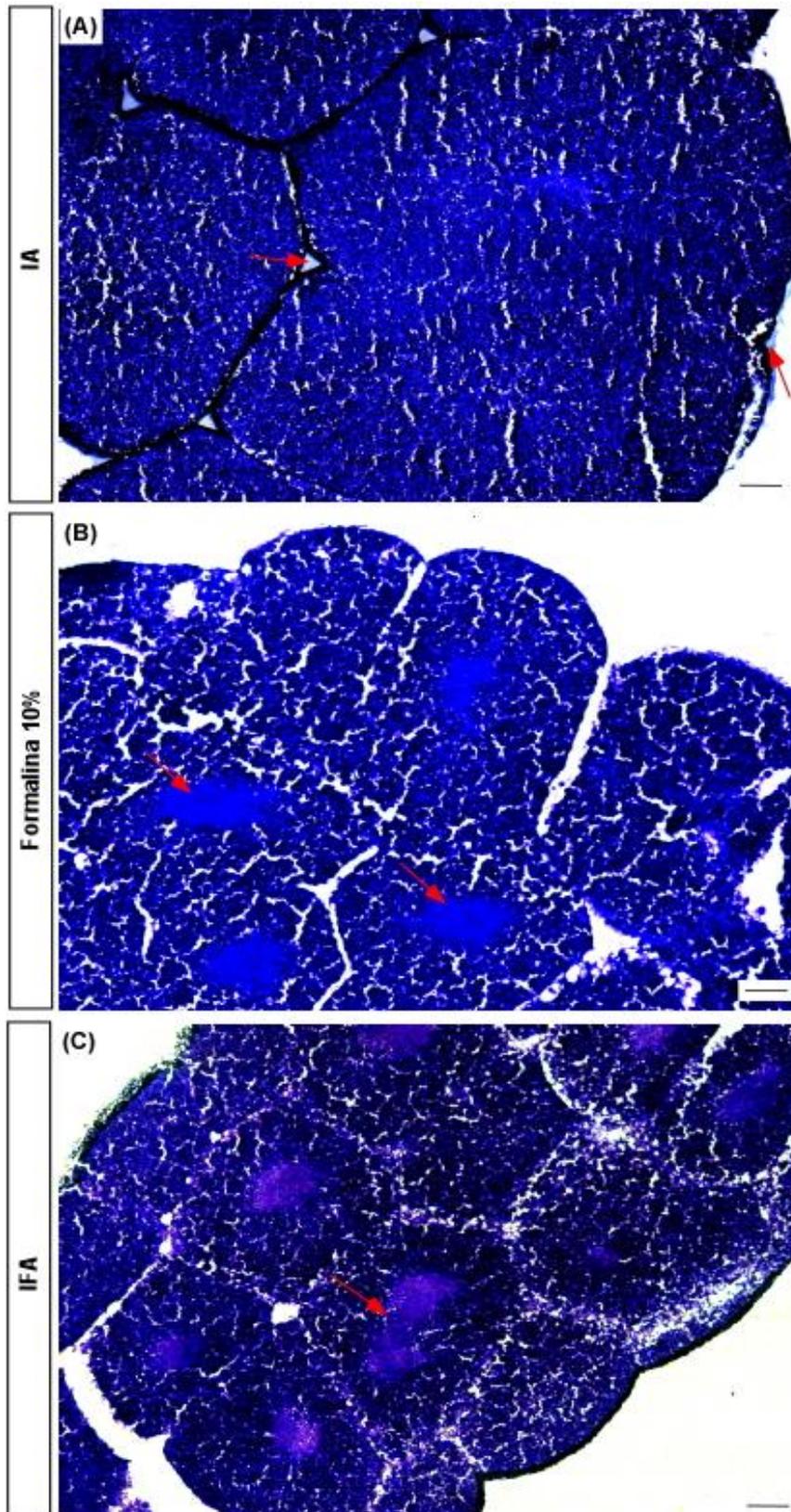


Figura 17: Processamento histológico com isopropanol apresentou coloração de distinção de estruturas em embriões fixados em formalina 10%, IA e IFA. É possível identificar células em divisão (seta vermelha em B e C). (A) Secção de mórula fixada em IA. (B) Blástula fixada em formalina 10%. (C) Blástula fixada em IFA. Aumento de 400x. Barra de escala: 20 μ m. Número de embriões por fixador = 3 de cada um dos estágios utilizados, para um total de 12 embriões.

5.4 EMBRIÕES FIXADOS CORADOS COM DAPI APRESENTARAM MARCAÇÃO PARA AUTOFLUORESCENCIA DOS CORANTES CITOPLASMÁTICOS EOSINA E AZUL DE TOLUIDINA

Para avaliarmos a influencia do uso de distintos fixadores em marcações com fluorescência, secções de embriões de *X. laevis* foram submetidas a diferentes protocolos para marcação nuclear com DAPI.

Houve marcação específica de material nuclear nos cortes de embriões fixados em MEMFA, PFA4%, solução de Carnoy, IA e IFA, sem distinção de processamento (Figura 18). Entretanto a marcação de secções fixadas em solução de Bouin foi fraca.

As propriedades fluorescentes da eosina e do azul de toluidina foram utilizadas como contra-coloração ao núcleo marcado com DAPI. Para captura de autofluorescência dos corantes, as imagens foram feitas em microscopia confocal.

Para ambos corantes, não obtivemos êxito na coloração em embriões fixados com etanol 70%, MEMFA ou formalina 10%.

Nas marcações de embriões fixados em solução de Carnoy, IA, IFA e PFA 4% (Figura 19) foi possível observar a marcação nuclear e citoplasmática. Nas secções de embriões fixados em solução de Bouin a autofluorescência do corante citoplasmático foi fraca.

Uma alternativa à contra-coloração com eosina, caso não tenha acesso ao corante, é o azul de toluidina quando os embriões estiverem fixados em solução de carnoy, IA ou em IFA. Na figura 20 temos um exemplo de marcação em secções de embriões fixados em solução de Carnoy.

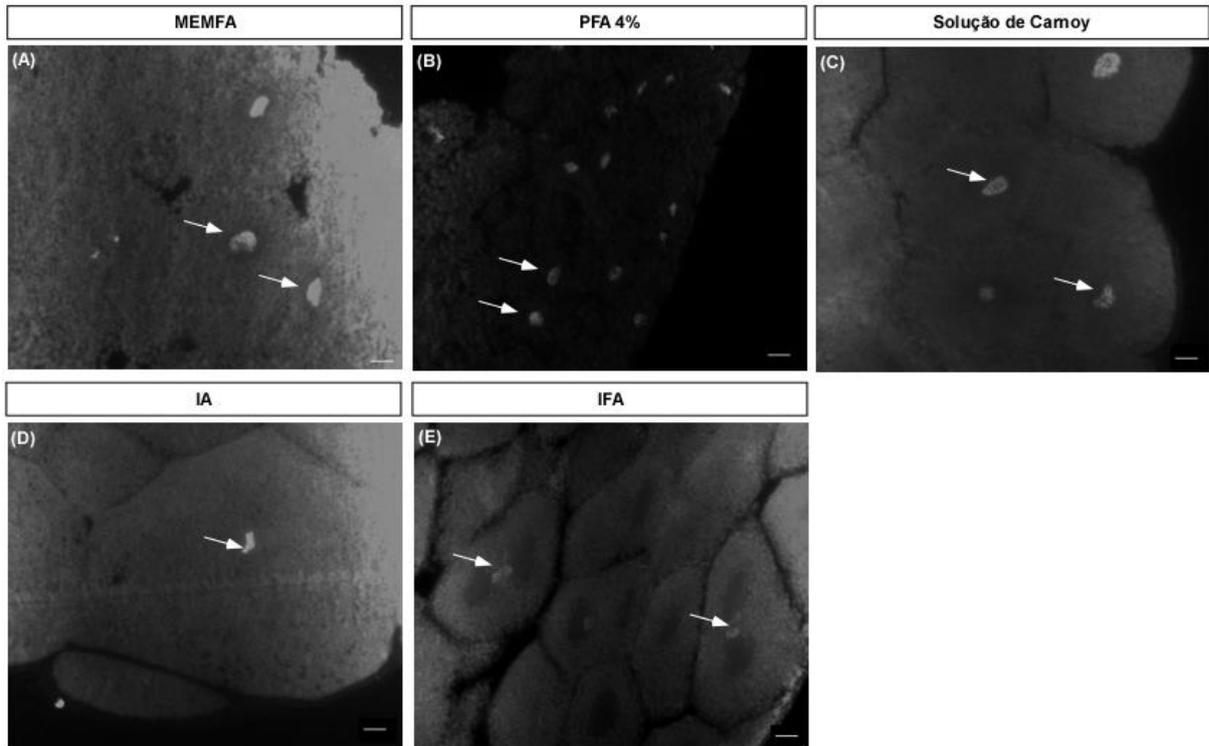


Figura 18: Secções de embriões de *Xenopus laevis* com marcação específica para DAPI. A especificidade na marcação para DAPI foi observada em fatias de embriões fixadas em MEMFA (A), PFA 4% (B), Carnoy (C), IA (D) e IFA (E). Aumentos de 400x. Barra de escala: 20 μ m. Número de embriões por fixador = 3 de cada um dos estágios utilizados, para um total de 12 embriões.

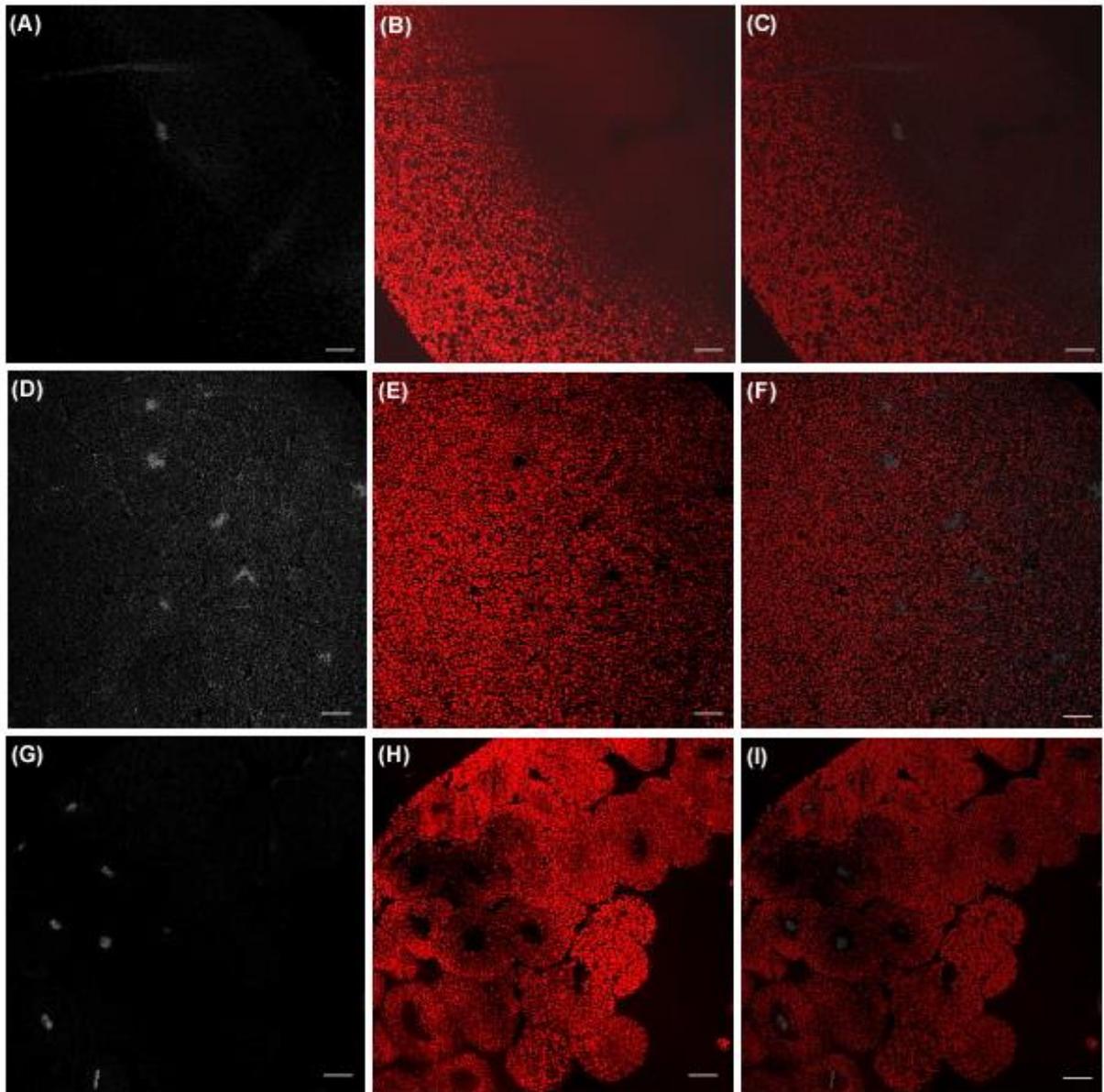


Figura 19: Secções de embriões de *Xenopus laevis* com marcação específica para DAPI e eosina. (A-C) Embrião de 4 células fixado em solução de Carnoy; **(D-F)** Mórula fixada em IA **(G-I)** Blástula fixada em IFA. Em **(A, D, G)** marcação nuclear com DAPI; **(B, E, H)** marcação citoplasmática com eosina; **(C, F, I)** dupla marcação com DAPI e eosina. Aumentos de objetiva de 40x. Barra de escala: 20 μ m. Número de embriões por fixador = 3 de cada um dos estágios utilizados, para um total de 12 embriões.

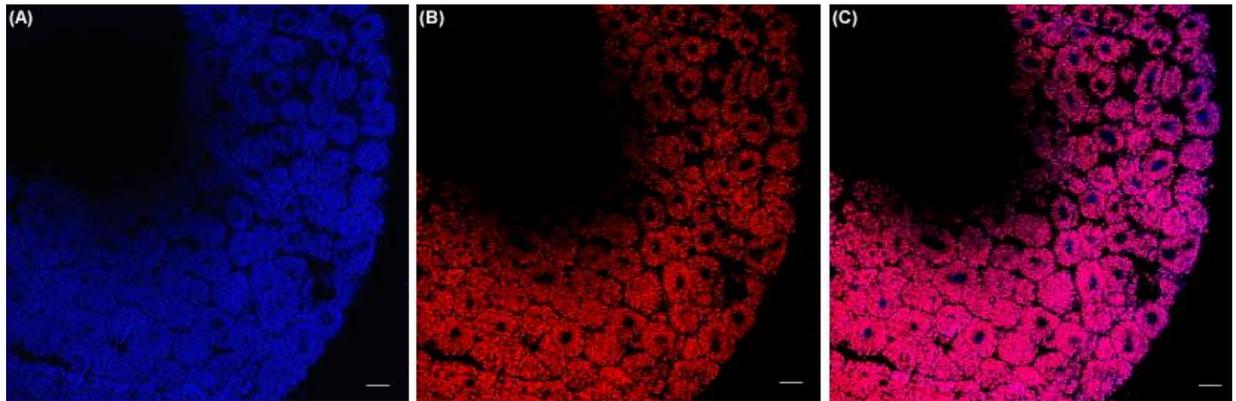


Figura 20: Secções de embriões de *Xenopus laevis* com marcação específica para DAPI e azul de toluidina. (A-C) Blástula fixada em solução de Carnoy. Em (A) marcação nuclear com DAPI; (B) marcação citoplasmática com azul de toluidina; (C) dupla marcação. Aumentos em objetiva de 40x. Barra de escala: 20 μm . Número de embriões por fixador = 3 de cada um dos estágios utilizados, para um total de 12 embriões.

5.5 EMBRIÕES INTEIROS FIXADOS COM ISOPROPANOL PRESERVAM A INTEGRIDADE PARA VISUALIZAÇÃO EM MICROSCOPIA CONFOCAL

Para observarmos os embriões por inteiro, corantes naturalmente fluorescentes foram utilizados para capturas de imagens e reconstrução em microscopia confocal. Embriões inteiros foram corados com eosina (Figura 21) e azul de toluidina (Figura 22). Alguns embriões também foram corados com DAPI, mas não obtivemos resultados porque a superfície do embrião fica com marcação inespecífica (utilizamos um embrião de cada fixador).

Na coloração com eosina de embriões fixados com MEMFA, Formalina 10% e PFA 4%, independente do estágio estudado, o corante saiu do tecido ou após a lavagem com etanol 70% ou no meio de preservação do material (glicerol 70%). Embriões expostos em etanol 70% não coraram por completo. Mesmo com a clarificação, ainda foi possível encontrar resíduos do pigmento, o que deixou o tecido muito escuro para a passagem do *laser* do microscópio. A solução de Bouin foi a única com a qual obtivemos imagens, porém a imagem apresenta uma coloração turva e com grande quantidade de artefatos.

Além dos embriões fixados em solução de Carnoy (Figura 21G e H), os fixadores IFA (Figura 21C e D) e IA (Figura 21E e F) mostraram-se alternativas de fixação para coloração do citoplasma e células bem definidas.

Os espaços vazios encontrados nos cortes histológicos de embriões fixados em isopropanol foram igualmente identificados na superfície de embriões inteiros (Figura 21A e B). Em maior aumento, observou-se vesículas de vitelo que ocupavam o citoplasma celular (B).

O azul de toluidina é uma opção à coloração com eosina. Não corou embriões que foram colocados direto no etanol 70% e os fixados em solução de Carnoy e IA. A marcação com azul de toluidina ficou fraca nos embriões fixados em MEMFA, formalina 10%, IFA. Autofluorescência do corante foi observada em embriões fixados em solução de Bouin, PFA 4% e em isopropanol 99% (Figura 22).

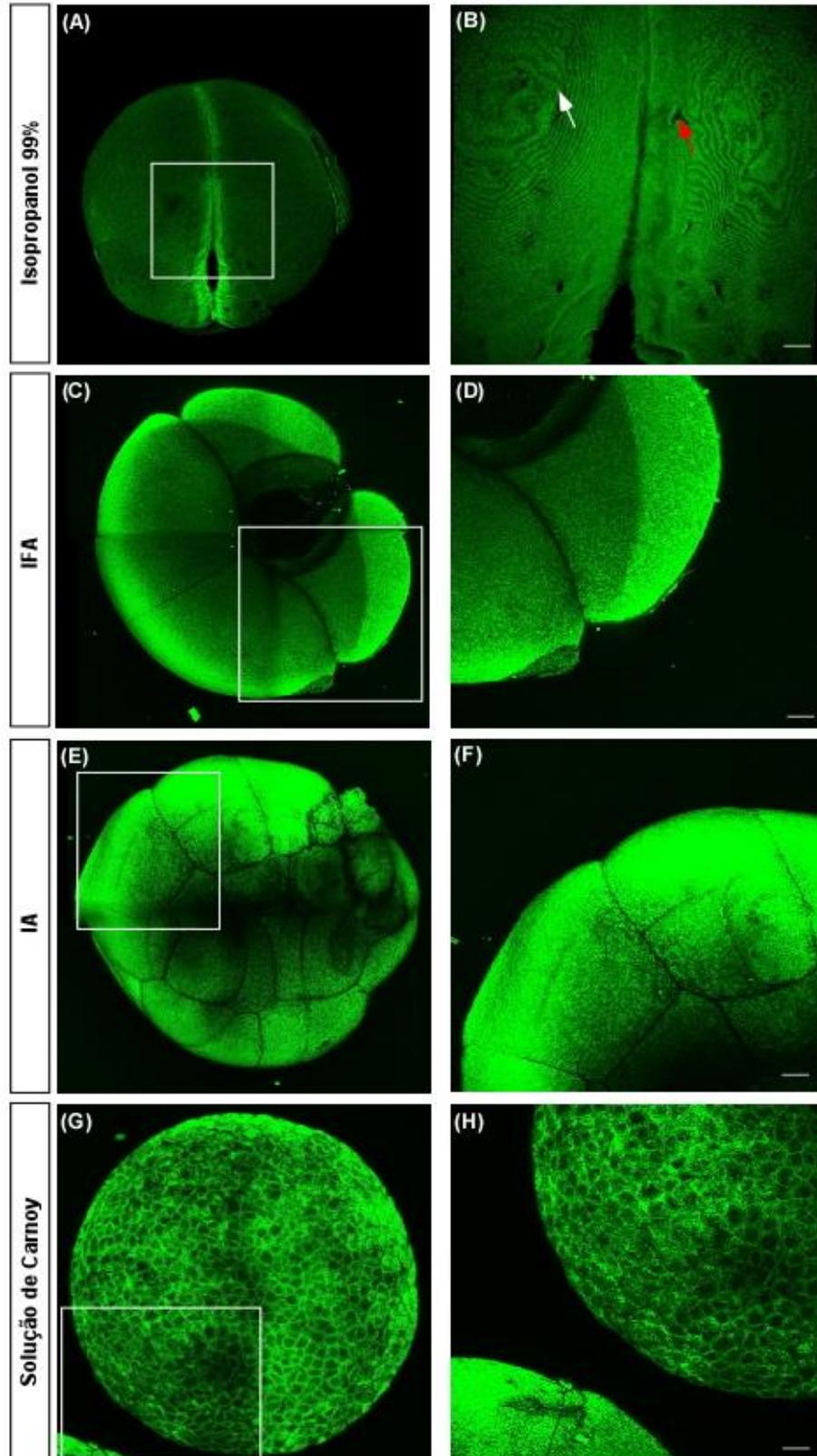


Figura 21: Embriões corados com eosina e visualizados em microscopia confocal. (A, B) Embrião de 2 células fixado em isopropanol. **(C, D)** Embrião de 4 células fixado em IFA. **(E, F)** Mórula fixada em IA. **(G, H)** Blástula fixada em Carnoy. **(A, C, E, G)** Montagens de imagens de objetiva de 20x. **(B, D, F, H)** Imagem de objetiva de 20x a partir das regiões delimitadas (em branco) nas imagens em A, C, E, G. Todos os embriões fixados em isopropanol 99% apresentaram buracos na superfície (setas vermelha em H) e vesículas de vitelo (setas brancas em H). Barra de escala: 20 μ m. Número de embriões por fixador = 4; 1 em cada estágio estudado.

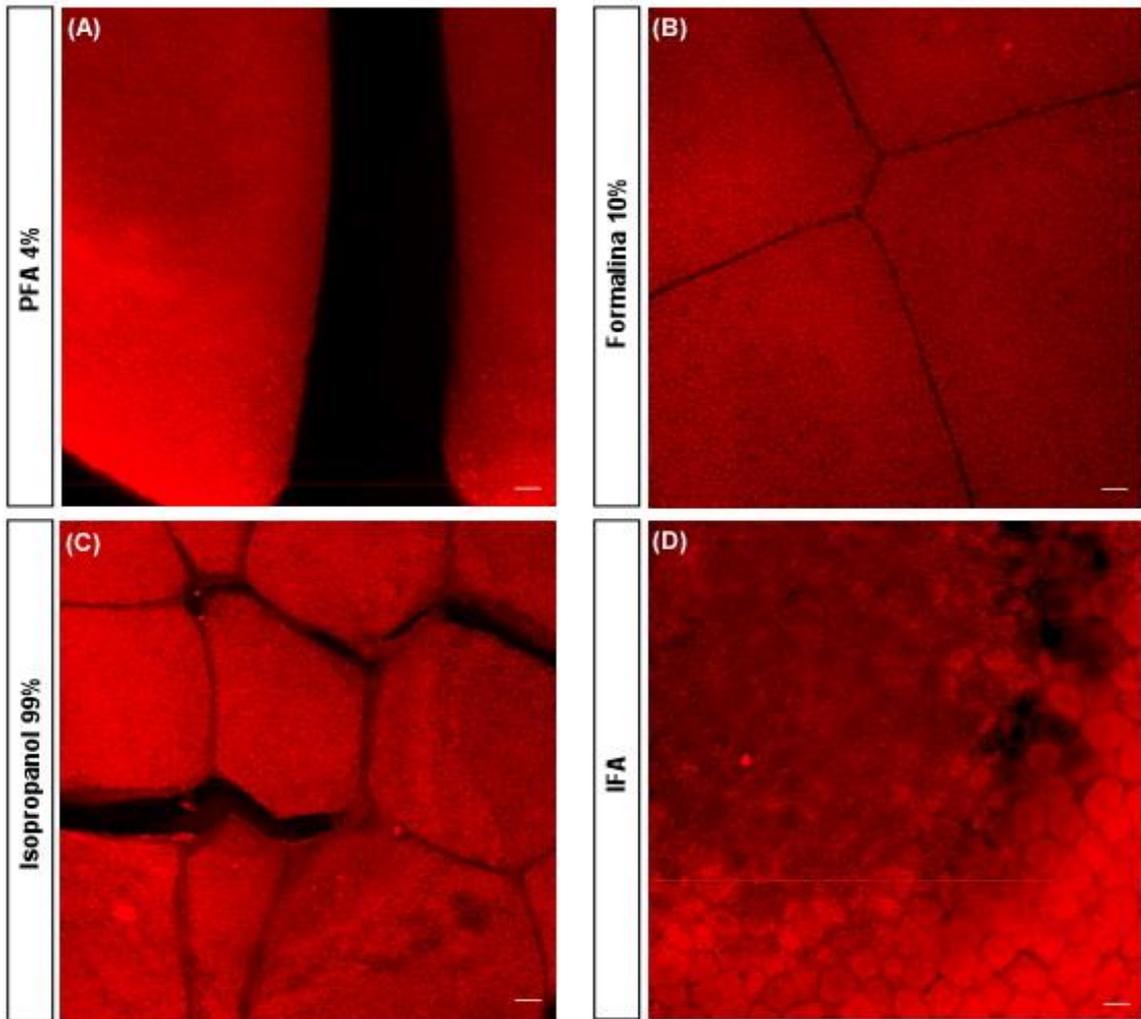


Figura 22: Embriões fixados, corados com azul de toluidina e observados em microscopia confocal. (A) Embrião de 2 células fixado em PFA 4%. **(B)** Embrião de 4 células fixado em formalina 10%. **(C)** Mórula fixada em isopropanol. **(D)** Blástula fixada em IFA. Barra de escala: 20 μ m. Número de embriões por fixador = 4; 1 em cada estágio estudado.

5.6 EMBRIÕES FIXADOS EM SOLUÇÃO COM ISOPROPANOL E SEM FORMALINA PRESERVAM RNA

Dentre os fixadores já utilizados no modelo de *Xenopus laevis*, a solução de Carnoy é a que apresenta a maior concentração de RNA extraído (Figura 23), sendo o fixador já indicado para esta finalidade pela literatura especializada (PUCHTLER *et al.*, 1968; BUESA, 2008; SANTOS *et al.*, 2012; ROLLS, 2012d; HOWAT; WILSON, 2014; PEREIRA *et al.*, 2015).

Os agentes fixadores IA e o isopropanol 99% apresentaram concentração de RNA extraído próxima àquela obtida com a extração de RNA dos embriões fixados em solução de Carnoy. Os fixadores IA e solução de Carnoy apresentam ácido acético em suas composições e ausência de formalina.

Foram consideradas para análises as amostras que apresentaram grau de pureza entre 1,7 e 1,9.

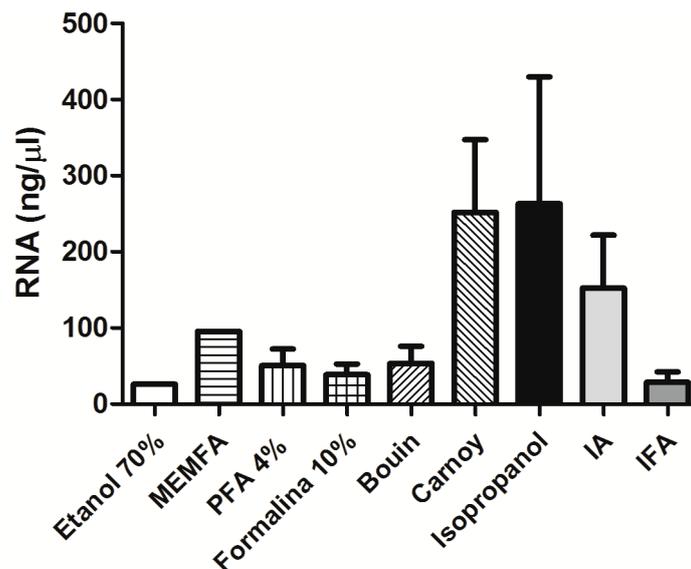


Figura 23: Fixadores com ácido acético, na ausência ou presença de isopropanol, preservam RNA de embriões emblocados para procedimentos histológicos. A extração de RNA de embriões fixados em IA e isopropanol 99% apresentaram rendimento próximo ao obtido de embriões fixados em solução de Carnoy. Cada amostra foi eluída em 12 μl de H₂O_{DEPC}. Número de amostras por fixador = 3 (4 embriões por amostra, 1 de cada estágio).

Todos os controles utilizados no qPCR foram negativos indicando que não havia contaminação nas amostras analisadas. Entretanto a amplificação do gene de referência (EF1α) só foi possível ser observada nas amostras de embriões fixados em isopropanol e em IA (Figura 24). O dCt das amostras que apresentaram amplificação foram: 29,61 para amostras fixadas em isopropanol e 28,19 para amostras fixadas em IA. Os outros fixadores, dentre eles a solução de Carnoy, com

alto rendimento de extração, podem estar ou com o RNA degradado ou com pouca concentração do RNA do gene alvo do experimento.



Figura 24: Amplificação de EF1 α das amostras de RNA extraídas de embriões emblocados em resina Paraplast®. As amostras de isopropanol e de IA amplificaram para o gene de referência EF1 α . Eixo X: número de ciclos. Eixo Y: fase exponencial de amplificação. n=1 amostra de cada fixador.

5.7 EMBRIÕES FIXADOS EM IA OU IFA NÃO PRECISAM TER O CÓRIO REMOVIDO PARA OBSERVAÇÃO POR MEV

Para imagens de *Xenopus laevis* é indicado retirar a membrana vitelínica (cório). Porém, nos estágios em questão, é difícil retirá-la sem destruir parcialmente o embrião. Buscamos avaliar se dentre os fixadores testados algum deles proporcionaria boas imagens mesmo com a presença da membrana. Alguns embriões foram rompidos propositalmente para observarmos seu interior.

Ao avaliarmos os efeitos dos fixadores sobre a superfície dos embriões de *X. laevis*, por microscopia eletrônica de varredura (MEV), foi verificado que o glutaraldeído, fixador indicado para a técnica, preservou a integridade dos embriões, mas a qualidade das imagens foi afetada pela presença do cório (Figura 25A e B). Embriões que foram imersos diretamente em etanol 70% não resistiram ao processamento para MEV (Figura 25C e D). As amostras de embriões foram submetidas ao banho de ouro e levadas ao MEV para captura de imagens do interior do embrião. Na figura 25D, foram observados célula e matriz extracelular. Em embriões fixados em isopropanol 99%, o cório dificultou a visualização da superfície das células (Figura 25E).

Os fixadores PFA 4%, Bouin, Formalina 10% e MEMFA mantiveram a integridade dos embriões, mas para boas imagens seria necessária a retirada do cório.

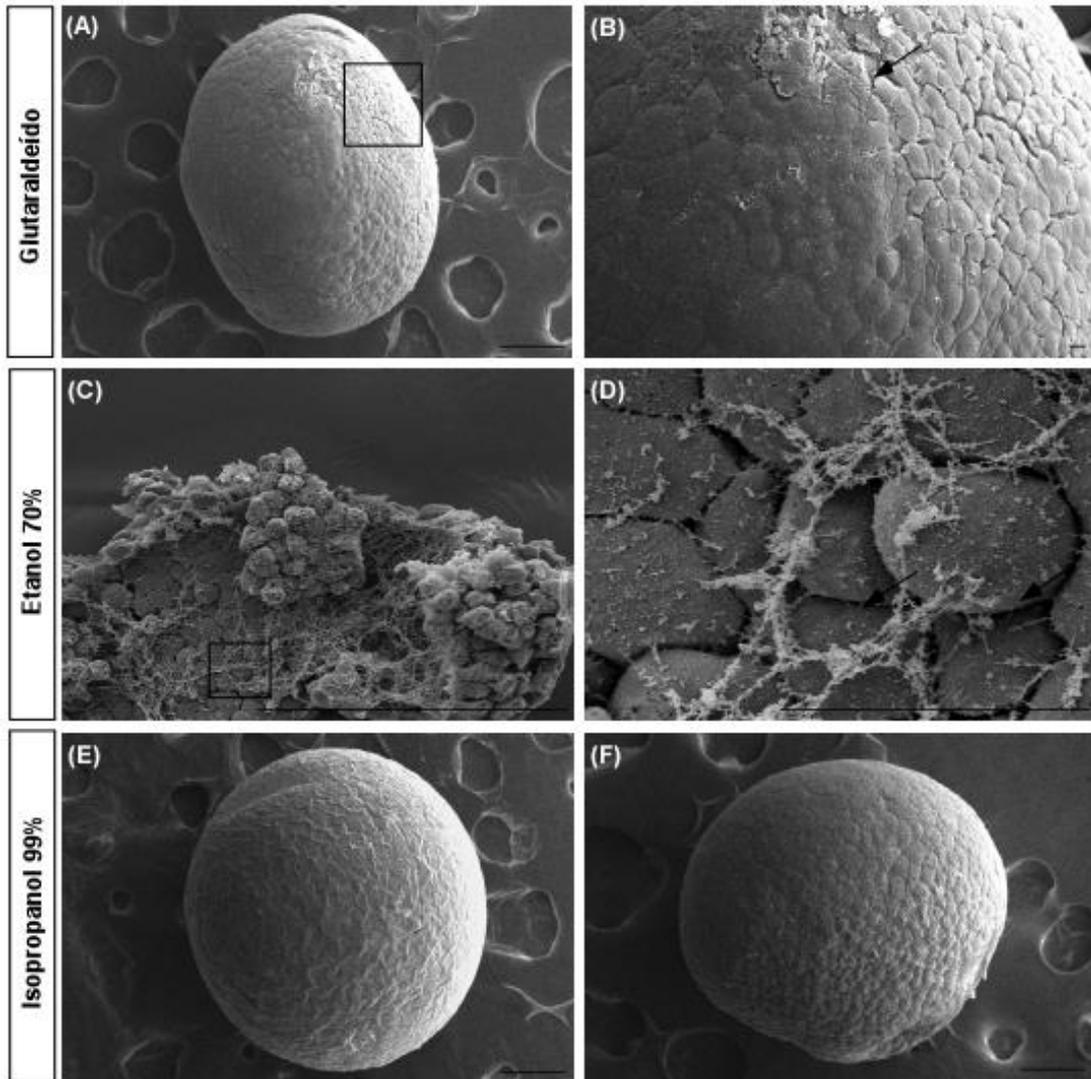


Figura 25: MEV de embriões de *Xenopus laevis* fixados nos agentes controles. (A, B) Embriões fixados em glutaraldeído apresentam a qualidade de imagem prejudicada pelo cório (seta em **B**). **(C, D)** Embriões fixados em etanol 70% não resistiram ao protocolo de preparação do material para MEV; matriz extracelular indicados pelas setas em **(D)**. **(E, F)** Embriões fixados em isopropanol podem **(E)** ou não **(F)** ser prejudicados pelo cório. **(A, B, F)** Blástula. Destaques nas imagens **(A, C)** referem-se às regiões apresentadas em **(B, D)**. Barras de escala: **(A, E, F)** 200 μm ; **(B)** 20 μm ; **(C)** 300 μm ; **(D)** 400 μm . n= 6 embriões.

Dentre os fixadores tradicionais ao modelo estudado, a solução de Carnoy foi aquele com o qual se obteve embriões íntegros e o cório não interferiu na qualidade da imagem (Figura 26).

Assim como ocorreu com os embriões fixados em Carnoy, os fixadores IA (Figura 27) e IFA (Figura 28) apresentaram resultados positivos. Os embriões fixados com esses não sofreram interferência da membrana vitelínica para identificação do estágio do embrião. Tanto em IA quanto em IFA foi possível identificar as vilosidades presentes na superfície dos embriões, principalmente próximo aos sulcos que separam as células. IA e IFA mostraram-se bons substitutos ao glutaraldeído. Podemos observar que, além de manterem a integridade do embrião, ambos fixadores preservaram detalhes da superfície desses, como os sulcos de separação entre as células e as áreas com microvilosidades.

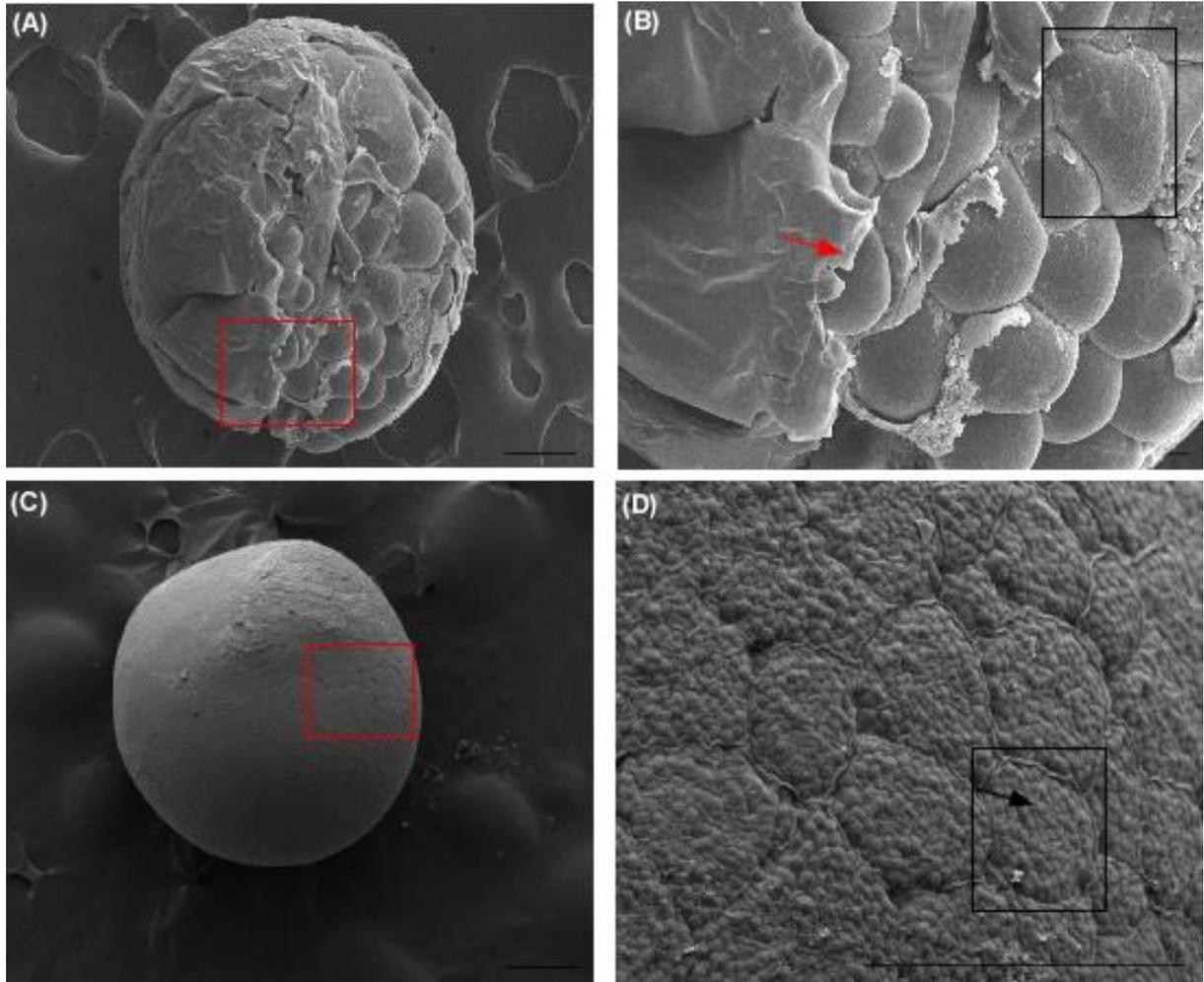


Figura 26: MEV de embriões de *Xenopus laevis* fixados em solução de Carnoy. (A, B) Mórula com o cório todo rompido (seta em B). (C, D) Blástula. Note vesículas vitelínicas presentes no citoplasma das células (seta em D). Destaques em vermelho (A, C) referem-se às regiões apresentadas em (B, D); destaque em preto corresponde a uma célula (B, D). Barras de escala: (A, C) 200 μm ; (B) 20 μm ; (D) 100 μm . n= 6 embriões.

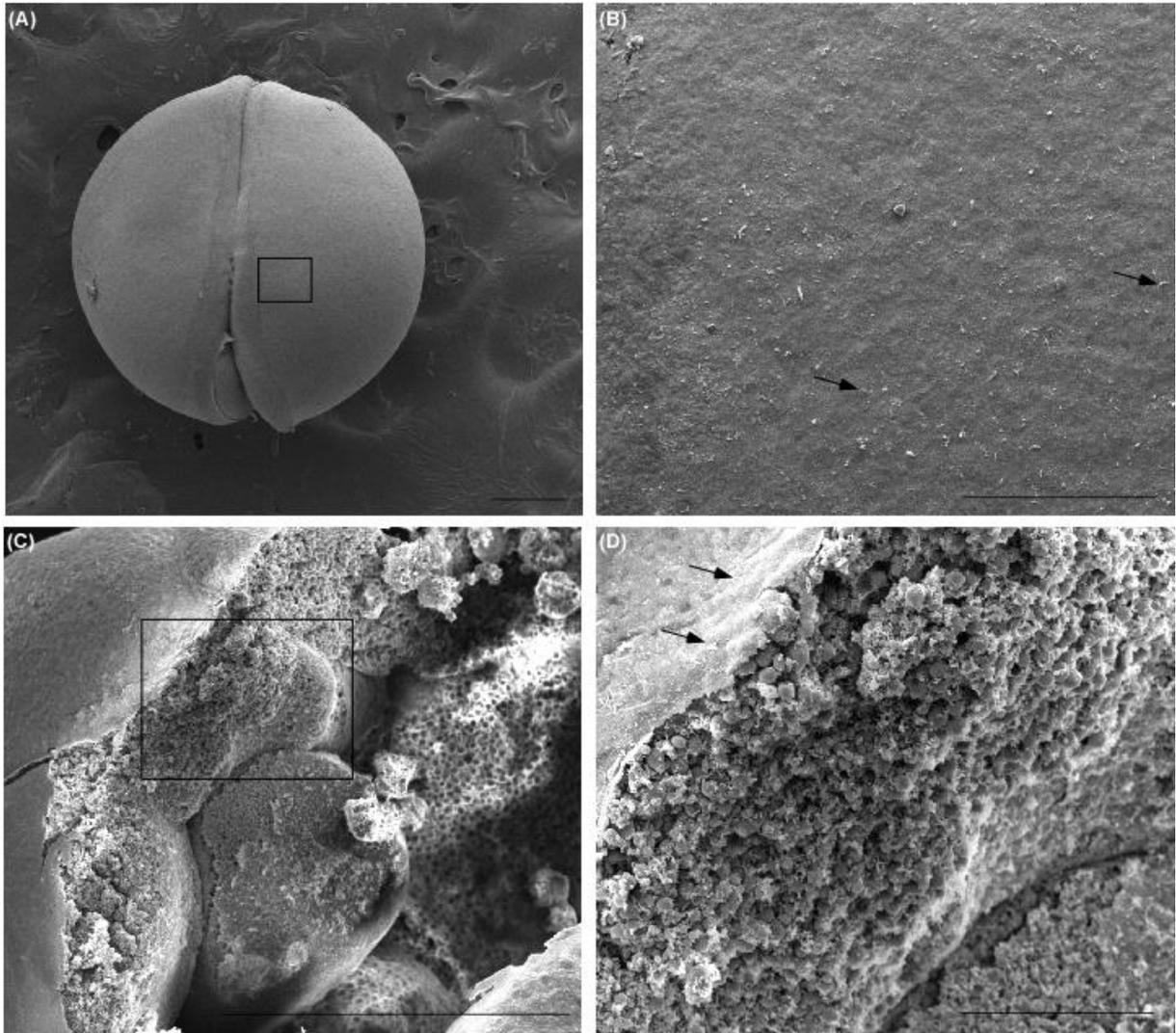


Figura 27: MEV de embriões de *Xenopus laevis* fixados em IA. (A, B) Embrião de duas células. (C, D) Mórula rompida para mostrar o interior celular rico em vitelo. Destaques em (A, C) referem-se às regiões apresentadas em (B, D); setas correspondem às vilosidades (B, D). Barras de escala: (A, C) 200 μm ; (B, D) 50 μm . n= 6 embriões.

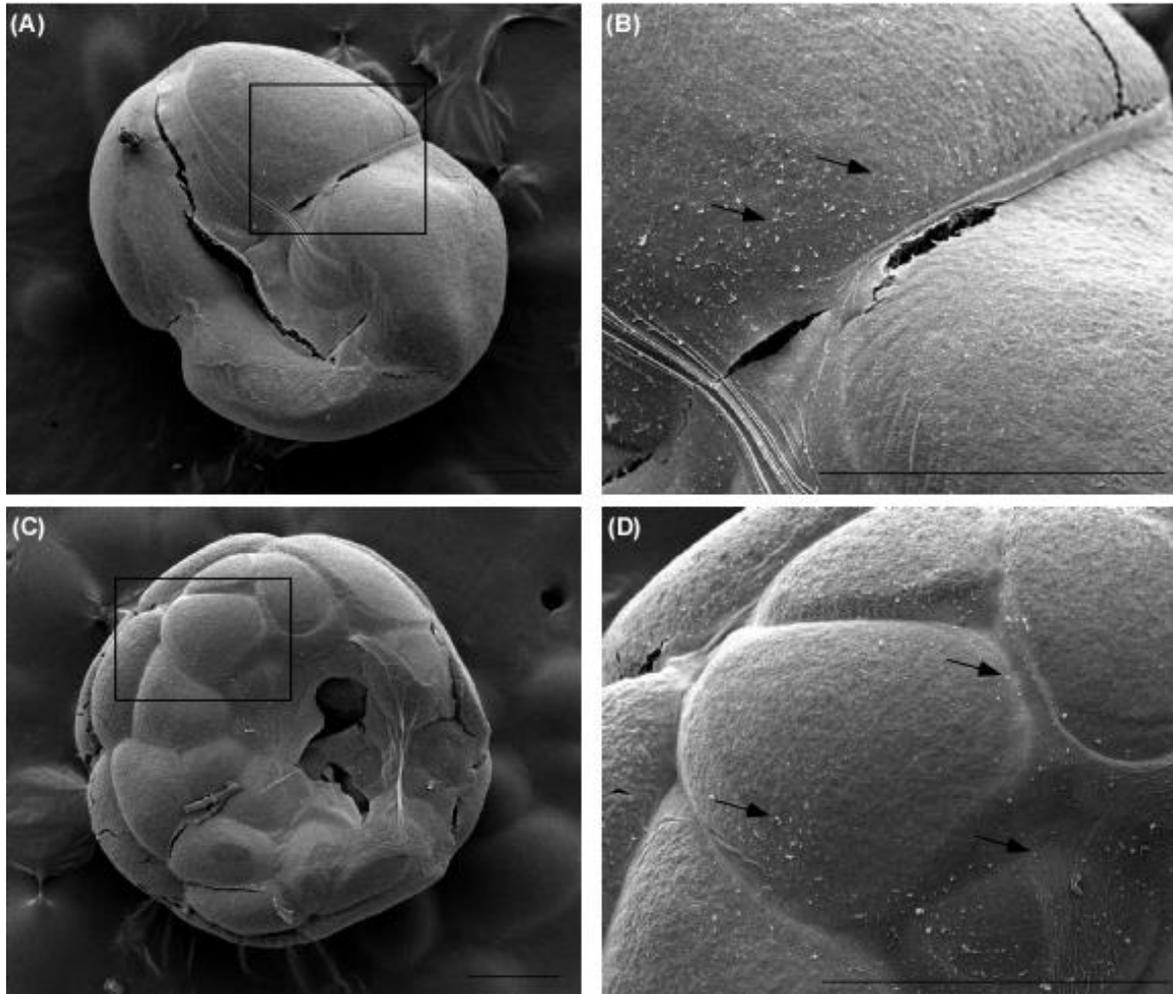


Figura 28: MEV de embriões de *Xenopus laevis* fixados em IFA. Embriões fixados em IFA se mantiveram íntegros e o cório não atrapalhou sua visualização e identificação. **(A, B)** Embrião de duas células. **(C, D)** Mórula. Destaques em **(A, C)** referem-se às regiões apresentadas em **(B, D)**; setas pretas correspondem às vilosidades na superfície embrionária. Barras de escala: **(A, C)** 300 μm ; **(B, D)** 300 μm . n= 6 embriões.

6 DISCUSSÃO

A busca de um novo fixador para uma determinada amostra requer do pesquisador o cuidado de ter vários controles no estudo, para comparação dos resultados e validar ou não a qualidade do composto proposto.

Um ovo não fertilizado de *Xenopus laevis* tem 0,9-1,0 mm de diâmetro (WEISZ, 1945) e não altera de tamanho durante o período de clivagem. Os embriões fixados em agente a base de isopropanol, IA ou IFA, não apresentaram variação de tamanho quando comparados com fixador ouro para *Xenopus*, MEMFA, e o fixador indicado para esses períodos do desenvolvimento, a solução de Bouin.

O isopropanol puro demonstrou uma retração significativa dos embriões quando relacionamos aos outros fixadores no estudo. É possível que a retração seja devido a grande quantidade de lipídeos removidos do interior das células embrionárias, pois isopropanol é solvente de lipídeos. A combinação com ácido acético forma isopropilacetato, que é um solvente menos agressivo à retirada de lipídeos das vesículas presentes nas células.

Além do isopropanol, o clorofórmio pode reduzir o efeito do vitelo nos cortes histológicos, pois é uma substância fixadora e solvente de vitelo (PUCHTLER *et al.*, 1968). Neste estudo, o clorofórmio fez parte da solução de Carnoy, que não apresentou-se como opção de fixador porque os cortes soltaram das lâminas ou não coraram especificamente.

Em nenhuma secção de embriões de duas células foi possível identificar algo além do ambiente celular riquíssimo em vesículas de vitelo.

Aliamos à fixação química um agente físico, colocando os embriões submersos nos agentes fixadores a 4°C. Experimentos piloto deste trabalho indicaram que os embriões não suportaram o processamento histológico quando a fixação foi realizada à temperatura ambiente.

Leung e colaboradores (2011) recomendam que, após o período de 12-24 horas o material fixado em formalina deva ser preservado, até o processamento, em etanol ou em isopropanol 70%, dando preferência ao isopropanol porque retrai menos o tecido que o etanol e mantém a qualidade de marcação em histoquímica e imuno-histoquímica. Essa medida diminui as ligações cruzadas da formalina com as proteínas do tecido. Este procedimento não foi aplicado neste estudo, onde os embriões foram processados após as 72 horas de fixação porque o procedimento

não é descrito para o modelo de *Xenopus laevis* e não quisemos colocar mais esta variável no estudo.

Fixadores que apresentam formalina em sua composição possuem boa penetração tecidual e preservam ácidos nucleicos e proteínas, além de fazerem ligação cruzada com proteínas. Porém, são altamente tóxicos. Acton, Harvey e Grow (2005) foram os primeiros a buscar fixadores sem formalina em suas composições para preservar embriões de *Xenopus*, indicando como uma boa alternativa ao MEMFA, um fixador comercial. Porém, ambos tiveram problemas em preservar o sinal da fluorescência após imunofluorescência. Vale ressaltar que os autores usaram embriões em estágios mais avançados aos utilizados neste estudo e não foi feita coloração histológica dos cortes, somente imuno-histoquímica.

Howat e Wilson (2014) citam que alternativas aos fixadores tóxicos podem ser soluções à base de sais de zinco, mas que ainda estão em testes de protocolos. Gatta e colaboradores (2012) testaram fixadores comerciais sem formalina como alternativas para obterem resultados de qualidade em técnicas histológicas e moleculares. Em nosso estudo, fixadores com isopropanol e com baixa concentração de formaldeído em sua composição apresentaram resultados semelhantes ao de fixadores tradicionais com formalina na preservação do embrião inteiro e em análises de secções histológicas desses. Uma baixa quantidade de formaldeído na formulação de um agente fixador é uma alternativa para manter a qualidade de fixação do material histológico, mantendo o propósito de diminuição da toxicidade de resíduos químicos (ROLLS, 2012d).

Poucos estudos presentes na literatura apresentam secções de embriões de *Xenopus laevis*, principalmente quando esses são usados para coloração histológica e quase todos apresentam marcação em azul de toluidina (KURTH; HAUSEN, 2000; KURODA; WESSELY; DE ROBERTIS, 2004). Um dos raros trabalhos é o de Chalmers, Strauss e Papalopulu (2003), que fizeram histologia de blástulas de *X. laevis*, após emblocamento em solução com metacrilato, um composto tóxico. De forma semelhante, observamos no presente estudo a coloração de blástulas de *X. laevis* com azul de toluidina.

Em nosso estudo, conseguimos, tanto por HE quanto por azul de toluidina, observar distinção entre citoplasma e estruturas nucleares em embriões fixados em IA e IFA.

O xileno é fundamental na histologia (processamento e coloração) por suas propriedades de desparafinização e clareamento dos tecidos. Porém, oferece riscos de contaminação desde sua produção, sendo a exposição ocupacional a maior fonte de contato a altos níveis de xileno (CAZARI *et al.*, 2013).

Viktorov e Proshin (2003) descrevem um protocolo de coloração com isopropanol, mas não descartam o xileno para desparafinização. Nós descartamos o uso do isopropanol da coloração porque em experimentos iniciais tivemos o material repleto de bolha e o meio de montagem Entellan® não polimerizou completamente. Cazari e colaboradores (2013) não observaram a diferença de coloração HE em lâminas do mesmo tecido, processados de modo tradicional (etanol e xileno) ou com quantidades menores de xileno. Viktorov e Proshin (2003) propuseram o uso do fixador IFA e o processamento em isopropanol, porém não mostra imagens que comprovem a eficiência descrita. Em nosso estudo podemos ver a eficácia da fixação com isopropanol e ela foi positiva em nosso modelo nos estágios iniciais do desenvolvimento. A presença de ácido acético é essencial para a integridade do tecido quando da fixação com isopropanol, mas a formalina mostrou-se opcional.

Avanços em técnicas de biologia molecular têm demandando melhor preservação de ácidos nucleicos de amostras fixadas e parafinizadas, para futuras análises científicas ou clínicas (SCORSATO; TELLES, 2011; TURASHVILI *et al.*, 2012). É importante ressaltar que além do tipo de fixação, o tipo de tecido também influencia na qualidade da extração (SCORSATO; TELLES, 2011).

Para as fases seguintes do desenvolvimento embrionário é fundamental a ativação da expressão gênica. Portanto, é relevante a preservação de proteínas e ácidos nucleicos. Até a fase de nosso estudo, são poucas as moléculas transcritas descritas. A maior parte das proteínas iniciam a transcrição até o final do estágio 12 (GILBERT, 2010). Durante os estágios de blástulas ocorrem modificações de cromatina, com promotores desmetilados para transcrição de genes. Ao final desses estágios, outros promotores são ativados, indicando a alteração temporal dos períodos de blástula (GILBERT, 2010).

O isopropanol precipita ácidos nucleicos. Por conta disso, o embrião fixado com esse composto deve ter boa preservação de DNA e RNA. De fato, na presença deste fixador foi possível realizar extração de RNA com boa qualidade. Tais resultados corroboram os de Sive, Grainger e Harland (2010).

Neste estudos demonstramos que a extração de RNA pelo protocolo de TRIzol foi eficaz quanto a capacidade de produzir RNA em quantidade suficiente para análise de expressão gênica. O TRIzol é tradicionalmente utilizado para extração de RNA de amostras frescas, para amostras parafinizadas existem diversos kits de extração com tampões que substituem a etapa de xileno. Os fixadores Carnoy e IA conservam o RNA com mais eficiência que aqueles fixadores com formalina em sua composição. O isopropanol 99% também tende a preservar o RNA de modo eficaz, mas é preciso um aumento no número de experimentos para confirmar o dado devido ao grande desvio encontrado por nosso grupo.

Todas as nossas amostras foram reidratadas, para que fosse retirado o xileno remanescente no tecido, mas é importante destacar que Körbler e colaboradores (2003) e Gouveia e colaboradores (2011) não observaram diferenças significativas entre realizar ou não essa etapa.

A integridade do RNA foi comprovada com amplificação do gene de referência EF1 α por RT-qPCR (DHORNE-POLLET; THÉLIE; POLLET, 2003). Houve amplificação somente nas amostras de isopropanol e IA. É preciso realizar mais experimentos para confirmar os dados, principalmente da solução de Carnoy, visto que houve um alto rendimento na extração e nenhuma amplificação do RNA escolhido.

Para observar a preservação dos ácidos nucléicos com técnicas histológicas, tentamos corar as secções dos embriões utilizando a técnica de reação de Feulgen, já que esta possui a característica de corar apenas o DNA (HARDIE; GREGORY; HEBERT, 2002; CALDINI, 2002). O protocolo utilizado foi o descrito por Silva (2009). Não conseguimos obter resultados satisfatórios através desta técnica, os cortes de embriões não marcaram em nenhum ensaio experimental.

A presença de ácidos nucléicos e estrutura nuclear foi observada com a marcação para DAPI. Os resultados não foram satisfatórios em análise de embriões inteiros, as marcações foram inespecíficas. Já em secções dos embriões é evidente a marcação, podendo identificar a cromatina condensada para a divisão celular.

Ao avaliarmos a identificação de DNA em cortes histológicos preparados com distintos fixadores, foi possível verificar a marcação por fluorescência.

Em nenhuma das situações, seja em embriões inteiros seja em fatias histológicas, houve marcação específica da faloidina.

Houve marcação inespecífica em todos os embriões inteiros incubados com DAPI, porém, nos cortes é possível identificar as marcações específicas de material nuclear. Como contra-coloração para citoplasma, utilizamos eosina e azul de toluidina em suas propriedades fluorescentes para visualização em microscópio confocal (SÁNCHEZ-GONZÁLES *et al.*, 2007).

A autofluorescência de eosina ou azul de toluidina em embriões de *X. laevis* não está descrita na literatura. Neste trabalho, mostramos que os citados corantes são uma opção para visualização da superfície do embrião e sua integridade, antes de efetuarmos cortes histológicos. Embriões fixados com isopropanol 99%, por exemplo, apresentaram espaços vazios em sua superfície, o que pode ser observado quando visualizamos os embriões corados.

A eficácia dos fixadores com isopropanol e o processamento com o mesmo deve ser confirmada em outras espécies embrionárias e em outras estágios do desenvolvimento. Zech e colaboradores (2005) mostraram secções histológicas de blastocistos de camundongos fixados em PFA4%, os mesmos experimentos poderiam ser feitos observando a ação do isopropanol. No caso de blastocistos de camundongos (ZECH *et al.*, 2005) foi possível fazer cortes em criostato, o que não conseguimos com os embriões de *Xenopus laevis* em nossos experimentos prévios. Acreditamos que a dificuldade em seccionarmos os embriões em criostato é devida ao citoplasma rico em lipídeo. E, em estágios larvais a microtomia em criostato é viável.

O processamento sem xileno e com isopropanol deixou o material com a mesma qualidade ou superior aquele processado de modo tradicional, o que corrobora estudos anteriores com outros modelos experimentais (FALKEHOLM *et al.*, 2001). A retirada do xileno proporcionou menos toxicidade ao manuseio.

Na etapa de processamento, foi observada uma melhor qualidade das imagens histológica quando os embriões foram previamente impregnados e emblocados em resina Paraplast® em comparação àqueles que foram submetidos aos mesmos e emblocados em parafina (não mostrado). Tais dados confirmam Sive, Grainger e Harland (2010), que afirmam que métodos histológicos com resina plástica preservam melhor tecidos e morfologia celular de embriões de *Xenopus*.

Substitutos ao xileno são constantemente testados em protocolos de processamento histológico e de coloração, mas é válido verificar a viabilidade

financeira de tais (CAZARI *et al.*, 2013). Falkeholm e colaboradores (2001) indicam que, além de manter a qualidade histológica do material, um processamento histológico sem xileno é mais econômico em relação ao isopropanol mas também porque a eliminação do xileno favorece na qualidade do meio ambiente laboratorial, permitindo um sistema de exaustão mais simples (VIKTOROV; PROSHIN, 2003). Segundo Falkeholm e colaboradores (2001), o uso de isopropanol permitiu ganho de tempo no processamento em comparação com o protocolo convencional com uso de xileno. Porém, no caso do protocolo utilizado no presente estudo, isto não ocorreu. Nosso estudo levou em consideração o possível ganho em qualidade laboral e do material embrionário utilizado. Vale ressaltar que o isopropanol não onera os orçamentos quando utilizado em substituição ao álcool etílico. Porém, no processamento na presença de isopropanol e em xileno é mais econômico financeiramente.

Neste estudo, não foram realizados experimentos em microscopia eletrônica de transmissão. Contudo, segundo Gonçalves (2016), o formaldeído não é um bom fixador quando consideramos análises ultraestrutural celular. Por outro lado, Fox e colaboradores (1985) afirmam que as concentrações entre 0,5 e 20% de formalina produzem fotomicrografias comparáveis com as de tecidos fixados com glutaraldeído, porém o estudo não mostra imagens comparativas e nem especifica qual o tipo de microscopia eletrônica.

Abrahão e colaboradores (2004) utilizaram alguns fixadores de microscopia de luz para análise de microscopia eletrônica de transmissão (MET) e observaram que esses fixadores com formalina ou paraformaldeído na composição provocam artefatos celulares. Em nossas análises em microscopia de varredura, observamos que alguns fixadores, como formalina 10% e PFA4%, sequer permitiram que o material ficasse íntegro para visualização. Fixadores que apresentam etanol, ácido acético e ácido pícrico, não fixam carboidratos e lipídeos e são mais indicados para microscopia de luz.

Para MEV de embriões de *Xenopus laevis* é recomendado retirar a membrana vitelínica (WINNING; WYMAN; WALKER, 2001; DANILCHIK *et al.*, 2002) e o fixador padrão da técnica é o glutaraldeído (DE SOUZA, 2011; GONÇALVES, 2016). Nos estágios embrionários utilizados neste estudo é tecnicamente muito difícil retirar a membrana vitelínica sem causar danos ao embrião e por esse motivo a mantivemos

nos embriões. Jones e colaboradores (1998) apresentam imagens de embriões no estágio 8 em imagens de MEV sem a membrana. Em nossas análises observamos que a não retirada prévia do cório não interferiu na visualização dos embriões fixados em IA e IFA, assim como em solução de Carnoy. Destaca-se que o ácido acético é reagente comum nesses fixadores; este parece romper ou até mesmo dissolver a membrana, rica em proteínas e glicoproteínas (GERTON; HEDRICK, 1986; HEDRICK; NISHIHARA, 1991).

Através da microscopia de varredura, evidenciamos microvilosidades na superfície embrionária mais ou menos preservada de acordo com o fixador, assim como em diversos modelos de inibição ou expressão de moléculas nos embriões, que podem aumentar ou diminuir sua densidade (ROBERSON; ARMSTRONG; ARMSTRONG, 1980; WINNING; WYMAN; WALKER, 2001; WINNING *et al.*, 2002; DANILCHIK *et al.*, 2002; CARDELLINI; CIRELLI; CITI, 2007; EFREMOV *et al.*, 2011). Observamos que a intensidade de material fibroso (SCHATTEN; THOMAN, 1978) pode variar conforme o fixador utilizado, tomando como base o glutaraldeído. Em nossos dados identificamos junções comunicantes por MEV em embrião de *Xenopus laevis*. Tais junções são consideradas requisito para formação da blastocela, segundo Cardellini, Cirelli e Citi (2007). Identificamos ainda grânulos de vitelo na superfície das células. Vale colocar que em alguns fixadores esses grânulos ficam menos salientes.

Todos os resultados apresentados ao longo dessa dissertação estão presentes na Tabela 7, a qual é a Tabela 2 completada com os achados deste trabalho.

Tabela 7: Ação de fixadores e sua aplicação na preservação de embriões de *Xenopus laevis*.

| Agente Fixador | Testado em <i>Xenopus laevis</i> |
|---------------------------|--|
| MEMFA | Fixador padrão para diversas técnicas; muito indicado para os primeiros estágios do desenvolvimento embrionário; não indicado para colorações histológicas de embriões. |
| FORMALDEÍDO TAMPONADO 10% | Utilizado na forma de MEMFA e em solução de Bouin; não preserva algumas estruturas celulares de <i>Xenopus</i> ; preserva componentes da matriz extracelular; não indicado para coloração HE de embriões; indicado para coloração azul de toluidina quando processado em isopropanol. |
| PFA 4% | Indicado para imuno-histoquímicas e hibridização <i>in situ</i> . Pouco utilizado em <i>X. laevis</i> ; indicado para coloração HE em embriões; indicado para coloração azul de toluidina quando processado com etanol e xileno; coloração de embriões inteiros com azul de toluidina. |
| SOLUÇÃO DE BOUIN | Em experimentos que precisam clarificar os embriões (imuno-histoquímica e hibridização <i>in situ</i> , por exemplo), é o fixador mais indicado porque o embrião fica menos pigmentado; não indicado para coloração HE de embriões; coloração de embriões inteiros com azul de toluidina. |
| SOLUÇÃO DE CARNOY | Indicado para imunofluorescência e para técnicas que precisam de integridade dos ácidos nucleicos; ; não indicado para coloração HE de embriões; embriões submetidos a MEV sem retirada de cório; indicado para coloração azul de toluidina quando processado com etanol e xileno; coloração de embriões inteiros com corantes histológicos fluorescentes; preserva ácidos nucleicos para extração (RNA). |
| ISOPROPANOL | Usado durante o processamento histológico, mas não é componente de nenhum fixador clássico de <i>Xenopus</i> ; melhor qualidade nas peças histológicas quando processamento e fixadores tem isopropanol na composição associado a formalina e/ou ácido acético; coloração de embriões inteiros com corantes histológicos fluorescentes; preserva ácidos nucleicos para extração (RNA). |
| IA | Preserva morfologia de embriões de <i>Xenopus laevis</i> para análises histológicas; embriões submetidos a MEV sem retirada de cório; HE em secções de embriões processados em isopropanol; preserva ácidos nucleicos para extração (RNA); indicado para coloração azul de toluidina quando processado em isopropanol; coloração de embriões inteiros com corantes histológicos fluorescentes. |
| IFA | Preserva morfologia de embriões de <i>Xenopus laevis</i> para análises histológicas; embriões submetidos a MEV sem retirada de cório; HE em secções de embriões processados em isopropanol; indicado para coloração azul de toluidina quando processado em isopropanol; coloração de embriões inteiros com corantes histológicos fluorescentes. |

7 CONCLUSÃO

Através deste estudo técnico pudemos concluir que:

- Assim como os fixadores tradicionais ao modelo de *X. laevis* (MEMFA, formaldeído tamponado a 10%, PFA 4%, solução de Bouin, solução de Carnoy), os fixadores IA e IFA não alteram a morfologia dos embriões.
- Os fixadores IA e IFA apresentaram resultados satisfatórios em todas as técnicas histológicas apresentadas.
- A retirada da formalina do fixador (IA) é uma alternativa para deixar o procedimento de fixação menos tóxico.
- Agentes fixadores com isopropanol na composição podem ser usados na fixação de embriões de *Xenopus laevis*, quando esses são direcionados a processamento histológico sem uso de xileno, tornando o preparo menos tóxico para o manipulador e o meio ambiente.
- O processamento não interfere nos resultados de marcações com fluorescência.
- Os cortes de embriões fixados com IA e IFA podem ser corados com marcadores citoplasmáticos fluorescentes para visualização em confocal, para visualização de sua superfície.
- Embriões fixados com solução de Carnoy, IA e isopropanol apresentam elevado rendimento na extração de RNA, em comparação aos embriões fixados com os outros agente.
- Amostras de embriões fixados em Isopropanol e IA amplificaram para o gene de referência EF1 α , indicando a integridade do RNAm extraído.
- Embriões fixados em IA, IFA e solução de Carnoy podem ser submetidos à microscopia eletrônica de varredura sem que ocorra a retirada do cório, membrana que envolve e prejudica a visualização do embrião.

REFERÊNCIAS

ABRAHÃO, D.S. *et al.* Estudo comparativo com diversos fixadores para aplicação em microscopia eletrônica de transmissão. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 63, n. 2, p 248-254, 2004.

ACTON, A.; HARVEY, T.; GROW, M.W. An examination of non-formalin-based fixation methods for *Xenopus* embryos. **Developmental Dynamics**, v. 233, p. 1464-1469, 2005.

ALBERTS, B.; JHONSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. Molecular biology of the cell. 5TH edition. **New York: Garland Science**, 2007.

ALIKANI, M. Epithelial cadherin distribution in abnormal human pre-implantation embryos. **Human Reproduction**, v. 20, n. 12, p. 3369-3375, 2005.

AMARAL, D. *et al.* Efeito dos fixadores formalina e Bouin na preservação de biópsias do endométrio de éguas após inclusão em resina plástica. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 56, n. 1, p. 7-12, 2004.

BONIN, S. *et al.* DNA and RNA obtained from Bouin's fixed tissues. **Journal of Clinical Pathology**, v. 58, p. 313-316, 2005.

BORGES, M.S.; ZAMORA, P.P.; KUNZ, A. Gerenciamento de resíduos de laboratórios: as novas tendências e a sustentabilidade ambiental. **ICTR2004**, p. 2265-2272, 2004.

BOWES, J.B. *et al.* Xenbase: a *Xenopus* biology and genomics resource. **Nucleic Acids Research**, v. 36, p. D761-D767, 2008.

BROOKS, E.R.; WALLINGFORD, J.B. *In vivo* investigation of cilia structure and function using *Xenopus*. **Methods Cell Biology**, v. 12, n. 6, p. 387-397, 2015.

BUESA, R.J. Histology without formalin? **Annals of Diagnostic Pathology**, v. 12, n. 6, p. 387-397, 2008.

CARDELLINI, P.; CIRELLI, A.; CITI, S. Tight junction formation in early *Xenopus laevis* embryos: identification and ultrastructural characterization of junctional crests and junctional vesicles. **Cell Tissue Research**, v. 330, p. 247-256, 2007.

CALDINI, E.G. Manual de técnicas em histologia e biologia celular do Laboratório de Biologia Celular da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo - Consolidação dos Procedimentos. **LABIOCEL, Universidade de São Paulo, São Paulo**, 2002.

CARLSON, B. M. Embriologia humana e biologia do desenvolvimento - 5ª edição. **Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro – RJ**, 1998.

CAZARI, V.R.R. *et al.* Redução do uso de xileno na técnica de coloração hematoxilina e eosina. **Colloquium Vitae**, v. 5, n. 2, p. 135-148, 2013.

CAPUTO, L.F.G.; GITIRANA, L.B.; MANSO, P.P.A. Capítulo 3: Técnicas histológicas. **Conceitos e métodos para formação de profissionais em laboratórios de saúde, Fundação Oswaldo Cruz**, v. 2, p. 89-188, 2010.

CHALMERS, A.D.; STRAUSS, B.; PAPALOPULU, N. Oriented cell divisions asymmetrically segregate aPKC and generate cell fate diversity in the early *Xenopus* embryo. **Development**, v. 130, n. 12, p. 2657-2668, 2003.

CHECKOWAY, H. *et al.* Critical review and synthesis of the epidemiologic evidence on formaldehyde exposure and risk of leukemia and other lymphohematopoietic malignancies. **Cancer Causes & Control**, v. 23, n. 11, p. 1747-1766, 2012.

CHURCH, A.S.; WITTING, M.D. Laboratory testing in ethanol, methanol, ethylene glycol, and isopropanol toxicities. **The Journal of Emergency Medicine**, v. 15, n. 5, p. 687-692, 1997.

COSTA, S. *et al.* Increased levels of chromosomal aberrations and DNA damage in a group of workers exposed to formaldehyde. **Mutagenesis**, v. 30, n.4, p. 463-473, 2015.

COSTA, T.F.; FELLI, V.E.A.; BAPTISTA, P.C.P. A percepção dos trabalhadores de enfermagem sobre o manejo dos resíduos químicos perigosos. **Revista da Escola de Enfermagem da USP**, v. 46, n. 6, p. 1453-1461, 2012.

COX, M.L. *et al.* Assessment of fixatives, fixation, and tissue processing on morphology and RNA integrity. **Experimental and Molecular Pathology**, v. 80, p. 183-191, 2006.

DANILCHIK, M.V. *et al.* Furrow microtubules and localized exocytosis in cleaving *Xenopus laevis* embryos. **Journal of Cell Science**, v. 116, n. 2, p. 273-283, 2002.

DENT, J.A.; POLSON, A.G.; KLYMKOWSKY, M.W. A whole-mount immunocytochemical analysis of the expression of the intermediate filament protein vimentin in *Xenopus*. **Development**, v. 105, p. 61-74, 1989.

DESAI, N.N. *et al.* Morphological evaluation of human embryos and derivation of human embryos and derivation of an embryo quality scoring system specific for day 3 embryos: a preliminary study. **Human Reproduction**, v. 15, n. 10, p. 2190-2196, 2000.

DE SOUZA, W. Técnicas de microscopia eletrônica aplicadas às ciências biológicas. 3ª Edição. **Rio de Janeiro, SBMM, 2011.**

DHORNE-POLLET, S.; THÉLIE, A.; POLLET, N. Validation of novel reference genes for RT-qPCR studies of gene expression in *Xenopus tropicalis* during embryonic and post-embryonic development. **Developmental Dynamics**, v. 242, n. 6, p.709-717, 2013.

DUARTE, R.F. Processamento manual em micro-ondas: comparação entre a utilização do xileno e do isopropanol. **APCT - Investigação em Anatomia Patológica**, p. 1-5, 2009.

EFREMOV, Y.M. *et al.* Atomic force microscopy of living and fixed *Xenopus laevis* embryos. **Micron**, v. 42, p. 840-852, 2011.

ELTOUM, I. *et al.* Introduction to the theory and practice of fixation of tissues. **The Journal of Histotechnology**, v. 24, p. 173 -190, 2001.

FALCONI, M. *et al.* Effect of fixative on chromatin structure and DNA detection. **Microscopy Research and Technique**, v. 70, p. 599-606, 2007.

FALKEHOLM, L. *et al.* Xylene free method for histological preparation: a multicentre evaluation. **Laboratory Investigation**, v. 81, n. 9, p. 1213-1221, 2001.

FOX, C.H. *et al.* Formaldehyde fixation. **The Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v. 33, n. 8, p. 845-853, 1985.

FORTI, M. C.; ALCAIDE, R. L. M. Normas de procedimentos para separação, identificação, acondicionamento e tratamento de resíduos químicos do laboratório de aerossóis, soluções aquosas e tecnologias. **LAQUATEC, São José dos Campos: INPE, 2011.**

GATTA, L.B. *et al.* Application of alternative fixatives to formalin in diagnostic pathology. **European Journal of Histochemistry**, v. 56, p. 63-70, 2012.

GERTON, G.L.; HEDRICK, J.L. The vitelline envelope to fertilization envelope conversion in eggs of *Xenopus laevis*. **Developmental Biology**, v. 116, n. 1, p. 1-7, 1986.

GILBERT, S.F. Developmental Biology, 9th edition. **Sinauer Associates, Inc., Sunderland, Massachusetts USA, 2010.**

GONÇALVES, N.R. Padronização de técnicas de microscopia eletrônica de transmissão e varredura para o estudo da ultraestrutura dos esporos de fungo

Encephalitozoon hellem. **Dissertação de Mestrado Profissional. Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2016.**

GOUVEIA, G.R. *et al.* Comparação de três protocolos distintos para extração de RNA de amostras fixadas em formalina e emblocadas em parafina. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 47, n. 6, p. 649-654, 2011.

GREEN, J. The animal cap assay. **Methods in Molecular Biology: Molecular Methods in Developmental Biology - Xenopus and Zebrafish**, v. 127, p. 1-13, 1999.

GRIZZLE, W.E. Models of fixation and tissue processing. **Biotech Histochemistry**, v. 84, n. 5, p. 185-193, 2009.

GRIZZLE, W.E. The use of fixatives in diagnostic pathology. **The Journal of Histotechnology**, v. 24, n. 3, p. 151-152, 2001.

HASLAM, I.S. *et al.* From frog integument to human skin: dermatological perspectives from frog skin biology. **Biological Reviews**, v. 89, n. 3, p. 618-655, 2013.

HARDIE, D.C.; GREGORY, T.R.; HEBERT, P.D. From pixels to pictograms: a beginners' guide to genome quantification by Feulgen image analysis densitometry. **The Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, v. 50, n. 6, p. 735-749, 2002.

HOLGER, M. *et al.* Tissue microarrays: what will they bring to molecular and anatomic pathology? **Advances in Anatomic Pathology**, v. 8, n. 1, p. 14-20, 2001.

HEDRICK, J.L.; NISHIHARA, T. Structure and function of the extracellular matrix of anuran eggs. **Journal of Electron Microscopy Technique**, v. 17, n. 3, p. 319-335, 1991.

HOWAT, W.J.; WILSON, B.A. Tissue fixation and the effect of molecular fixatives on downstream staining procedures. **Methods**, v. 70, p. 12-19, 2014.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (INCA). Disponível em: http://www1.inca.gov.br/conteudo_view.asp?ID=795. Último acesso em: 28 de janeiro de 2016.

IRIE, N.; SEHARA-FUJISAWA, A. The vertebrate phylotypic stage and an early bilaterian-related stage in mouse embryogenesis defined by genomic information. **BioMed Central Biology**, v. 5, p. 1-8, 2007.

JARDIM, E.C.G. *et al.* Uso de técnicas de análise histológica e imunohistoquímica em odontologia. **Archives of Health Investigation**, v. 2, n. 1, p. 40-49, 2013.

JARDIM, W.F. Gerenciamento de resíduos químicos em laboratórios de ensino e pesquisa. **Química Nova**, v. 21, n. 5, p. 671-673, 1998.

JIA, X. *et al.* Effects of formaldehyde on lymphocyte subsets and cytokines in the peripheral blood of exposed workers. **PLOS one**, v. 9, n. 8, p. 1-8, 2014.

JONES, T.L.; CHONG, L.D.; KIM, J.; XU, R.; KUNG, H.; DAAR, I.O. Loss of cell adhesion in *Xenopus laevis* embryos mediated by the cytoplasmic domain of XLerk, an erythropoietin-producing hepatocellular ligand. **Proceedings of the National Academy of Science of United States of America - PNAS**, v. 95, p. 576-581, 1998.

JORGENSEN, P. *et al.* The mechanism and pattern of yolk consumption provide insight into embryonic nutrition in *Xenopus*. **Development**, v.136, p. 1539-1548, 2009.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. Histologia básica – 12^a edição. **Rio de Janeiro: Ed Guanabara Koogan**, 2013.

KAY, B.K.; PENG, H.B. *Xenopus laevis*: practical uses in cell and molecular biology. **Academic Press**, v. 36, 1991.

KIERNAN, J.A. Formaldehyde. formalin, paraformaldehyde and glutaraldehyde: what they are and what they do. **Microscopy Today**, v. 00, n. 1, p. 8-12, 1999.

KIERNAN, J.A. Histological and histochemical methods: theory and practice. **Cold Spring Harbor Laboratory Press**, 4th edition, 2008.

KÖRBLER, T. *et al.* A simple method for RNA isolation from formalin-fixed and paraffin-embedded lymphatic tissues. **Experimental and Molecular Pathology**, v. 74, n. 3, p. 336-340, 2003.

KUNHUA, W. *et al.* A novel non-toxic xylene substitute (SBO) for histology. **Afr J Tradit Complement Altern Med**, v. 9, n. 1, p. 43-49, 2012.

KURODA, H.; WESSELY, O.; DE ROBERTIS, E.M. Neural induction in *Xenopus*: requirement for ectodermal and endomesodermal signals via chordin, noggin, β -catenin, and cerberus. **PLOS Biology**, v. 2, n. 5, p. 0623-0634, 2004.

KURTH, T.; HAUSEN, P. Bottle cell formation in relation to mesodermal patterning in the *Xenopus* embryo. **Mechanisms of Development**, v. 97, p. 117-131, 2000.

LASSALI, T.A.F. Gerenciamento de resíduos químicos: normas e procedimentos gerais. **Laboratório de Resíduos Químicos, Universidade de São Paulo**, 2003.

LEUNG, C. *et al.* Effects of isopropanol storage time on histochemical and immunohistochemical stains in lung tissue. **Journal of Histotechnology**, v. 34, n. 3, p. 132-137, 2011.

LI VIGNI, R. *et al.* Successful application of indirect in-situ polymerase chain reaction to tissues fixed in Bouin's solution. **Histopathology**, v. 35, p. 134-143, 1999.

MAGLI, M.C. *et al.* Atlas of human embryology: from oocytes to preimplantation embryos. **Human Reproduction**, v. 27, n. 1, p. i2-i90, 2012.

MANDARIM, E. Para conhecer melhor o desenvolvimento embrionário. **Arquivo de Notícias da FAPERJ**, 2013. Disponível em: <http://www.faperj.br/?id=2478.2.3>. Último acesso em: 28 de março de 2016.

MANSO, P.P.A.; MACHADO, M.P. Capítulo 3: Microscopia de luz. **Conceitos e métodos para formação de profissionais em laboratórios de saúde, Fundação Oswaldo Cruz**, v. 1, p. 125-153, 2010.

METZ, H.L.; FRANCHIN, K. Microscópio confocal. **Universidade Estadual de Campinas**, 2014.

MORRIS, S.A. *et al.* Tsukushi modulates Xnr2, FGF and BMP signaling: regulation of *Xenopus* germ layer formation. **PLOS one**, v. 2, n. 10, p. e1004, 2007.

NETTO, G.J.; SAAD, R.D.; DYSERT, P.A. Diagnostic molecular pathology: current techniques and clinical applications, part I. **Baylor University Medical Center Proceedings**, v. 16, n. 4, p. 379-383, 2003.

OKAMOTO, A.C. *et al.* Condições de uso, manuseio, armazenamento e descarte de xileno em laboratórios de patologia e histologia: uma abordagem multidisciplinar. **Universidade Estadual Paulista, Araraquara**, 2010.

OLIVEIRA, C.R.D.R. *et al.* Gestão de resíduos de serviços de saúde: avaliação de procedimentos adotados no hospital da cidade de Guaporé-RS. **HOLOS**, v. 2, n. 29, p. 251-260, 2013.

PEREIRA, M.A. *et al.* Carnoy's solution is an adequate tissue fixative for routine surgical pathology, preserving cell morphology and molecular integrity. **Histopathology**, p. 66, n. 3, p. 388-397, 2015.

PRADOS, F.J. *et al.* The cleavage stage embryo. **Human Reproduction**, v. 27, n. S1, p. i50-i71, 2012.

PROCOLOS DE HISTOLOGIA EMPREGADOS NA UNIDADE DE MULTIUSUÁRIOS DE HISTOTÉCNICAS DO INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS (UMH/ICB/UFRJ). Hematoxilina e eosina. Rio de Janeiro, 2014.

PUCHTLER, H. *et al.* Carnoy fixation: practical and theoretical considerations. **Histochemie**, v. 16, p. 361-371, 1968.

ROBERSON, M.; ARMSTRONG, J.; ARMSTRONG, P. Carnoy Adhesive and non-adhesive membrane domains of amphibian embryo cells. **Journal of Cell Science**, v. 44, p. 19-31, 1980.

ROLLS, G. Fixation and Fixatives (1) - The process of fixation and the nature of fixatives. **Leica Biosystem**, 2012a. Disponível em: <http://www.leicabiosystems.com/pathologyleaders/fixation-and-fixatives-1-the-process-of-fixation-and-the-nature-of-fixatives/>. Último acesso em: 01 de abril de 2016.

ROLLS, G. Fixation and Fixatives (2) - Factors influencing chemical fixation, formaldehyde and glutaraldehyde. **Leica Biosystem**, 2012b. Disponível em: <http://www.leicabiosystems.com/pathologyleaders/fixation-and-fixatives-2-factors-influencing-chemical-fixation-formaldehyde-and-glutaraldehyde/>. Último acesso em: 01 de abril de 2016.

ROLLS, G. Fixation and Fixatives (3) - Fixing agents other than common aldehydes. **Leica Biosystem**, 2012c. Disponível em: <http://www.leicabiosystems.com/pathologyleaders/fixation-and-fixatives-3-fixing-agents-other-than-the-common-aldehydes/>. Último acesso em: 01 de abril de 2016.

ROLLS, G. Fixation and Fixatives (4) - Popular fixative solution. **Leica Biosystem**, 2012d. Disponível em: <http://www.leicabiosystems.com/pathologyleaders/fixation-and-fixatives-4-popular-fixative-solutions/#c22918>. Último acesso em: 01 de abril de 2016.

SÁNCHEZ-GONZÁLES, D.J.; TREJO-BAHENA, N.; VÁSQUEZ-MOCTEZUMA, I.; MARTÍNEZ-MARTÍNEZ, C.M.; ORTEGA-RANGEL, J.A. Fluorescencia de la eosina captada por microscopia confocal en cortes histológicos de piel. **Actas de Dermatología & Dermatopatología**, v. 7, n. 3, p. 41-47, 2007.

SANTOS, J.T. *et al.* Efeito do tipo de fixador e tempo de fixação na morfologia de folículos pré-antrais ovarianos bovinos. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 33, n. 1, p. 297-304, 2012.

SCHATTEN, G.; THOMAN, M. Nuclear surface complex as observed with the high resolution scanning electron microscope. **The Journal of Cell Biology**, v. 77, p. 517-535, 1978.

SCHOENWOLF, G.C. *et al.* Chapter 5: Principles and mechanisms of morphogenesis and dysmorphogenesis - Larsen's Human Embryology, 4th edition. **Editora Elsevier**, 2008.

SCORSATO, A.P.; TELLES, J.E.Q. Fatores que interferem na qualidade do DNA extraído de amostras biológicas armazenadas em blocos de parafina. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 47, n. 5, p. 541-548, 2011.

SILVA, A.A.J.S. Teste do micronúcleo *in vitro*: validação do método através da ativação metabólica. **Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas) – Universidade Federal Fluminense**, Niterói, páginas 23-25, 2009.

SIVE, H.L.; GRAINGER, R.M.; HARLAND, R.M. Early development of *Xenopus laevis*: a laboratory manual. **Cold Spring Harbor Press, Cell Press**, 2010.

STAVELEY, B.E. Molecular & Developmental Biology (BIOL3530). **Memorial University of Newfoundland**. Disponível em: http://www.mun.ca/biology/desmid/brian/BIOL3530/DEVO_03/devo_03.html. Último acesso em: 04 de novembro de 2016.

TIMM, L.L. Técnicas rotineiras de preparação e análise de lâminas histológicas. **Caderno La Salle XI**, v. 2, n. 1, p. 231-239, 2005.

TURASHVILI, G. *et al.* Nucleic acid quantity and quality from paraffin blocks: defining optimal fixation, processing and DNA/RNA extraction techniques. **Experimental and Molecular Pathology**, v. 92, p. 33-43, 2012.

VIKTOROV, I.V.; PROSHIN, S.S. Use of isopropyl alcohol in histological assays: dehydration of tissue, embedding into paraffin, and processing of paraffin sections. **Bulletin of Experimental Biology and Medicine**, v. 1, p. 105-106, 2003.

WEISZ, P.B. The normal stages in the development of the South Africa clawedtoad, *Xenopus laevis*. **The Anatomical Record**, v. 93, p. 161-169, 1945.

WERNER, M. *et al.* Effect of formalin tissue fixation and processing on immunohistochemistry. **The American Journal of Surgical Pathology**, v. 24, n. 7, p. 1016-1019, 2000.

WINNING, R.S.; WYMAN, T.L.; WALKER, G.K. EphA4 activity causes cell shape change and a loss of cell polarity in *Xenopus laevis* embryos. **Differentiation**, v. 68, p. 126-132, 2001.

WINNING, R.S. *et al.* EphA4 catalytic activity causes inhibition of RhoA GTPase in *Xenopus laevis* embryos. **Differentiation**, v. 70, p. 46-55, 2002.

ZECH, N.H. *et al.* Paraffin-embedded manipulated blastocysts: a tool to demonstrate stem cell plasticity? **Reproductive BioMedicine Online**, v. 10, n. 3, p. 406-414, 2005.

ANEXO A – SOLUÇÕES FIXADORAS E TAMPÕES

TAMPÃO FOSFATO

Para preparo de tampão fosfato 10x (PBS 0,1 M, pH 7.2), utilizou-se: fosfato de sódio dibásico (Na_2HPO_4) (7,6 g), fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4) (2 g), cloreto de potássio (KCl) (2 g), cloreto de sódio (NaCl) (80 g) e H_2O destilada (1L).

TAMPÃO STEINBERG

Para preparação do tampão Steinberg 10x, utilizou-se: tris(hidroximetil)aminometano ($\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$) (6 g), cloreto de sódio (34 g), cloreto de potássio (0,5 g), nitrato de cálcio tetrahidratado ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) (0,8 g), sulfato de magnésio heptahidratado ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) (2 g), e H_2O destilada (1L).

FIXADOR MEMFA

Para volume final de 10 ml do fixador, utilizou-se: 0,1 M ácido 3-morfolinopropano-1-sulfônico (MOPS) (pH 7.4) (1,74 g), 2 mM ácido aminopolicarboxílico (EGTA) (solução estoque de 100mM) (1,7 ml), 1 mM sulfato de magnésio (MgSO_4) (0,02 g) e formaldeído comercial 10% (3,7% Formaldeído) (8,3 ml) (SIVE; GRAINGER; HARLAND, 2010).

FIXADOR FORMALDEÍDO TAMPONADO 10%

Para 10 ml do fixador, utilizou-se: formaldeído comercial 10% (1 ml), H_2O destilada (9 ml), fosfato de sódio dibásico (65 mg) e fosfato de sódio monobásico (NaH_2PO_4) (40 mg).

FIXADOR PARA FORMALDEÍDO 4%

Para 10 ml do fixador, utilizou-se: PBS 0,1 M (1 ml), cloreto de sódio (0,9 g), paraformaldeído (4 g) e H_2O destilada (9 ml). Colocou-se a água para aquecer com o NaCl e PBS. Por último, dissolvemos o paraformaldeído, mas sem deixar que a temperatura ultrapassasse 60°C , para evitar sua transformação em ácido fórmico.

SOLUÇÃO DE BOUIN

Para 10 ml da solução de Bouin, utilizou-se:

(1) Solução aquosa saturada de ácido pícrico ($C_6H_3N_3O_7$), composta por: ácido pícrico (120 mg) em H_2O destilada (10 ml).

(2) Solução fixadora de Bouin, composta por: solução aquosa saturada de ácido pícrico (7,5 ml), formaldeído comercial 10% (3,7% Formaldeído) (2,5 ml) e ácido acético glacial (CH_3COOH) (0,5 ml).

Todo material fixado em solução de Bouin precisa ser bem lavado em etanol 70% (C_2H_6O 70%) antes de prosseguir com a histologia, para evitar reações lentas do ácido pícrico com compostos do tecido (ROLLS, 2012(3)).

SOLUÇÃO DE CARNOY

Para 10 ml da solução de Carnoy, utilizou-se: etanol 100% (6 ml), clorofórmio ($CHCl_3$) (3 ml) e ácido acético glacial (1 ml).

ISOPROPANOL/ÁCIDO ACÉTICO

Para 10 ml do fixador Isopropanol/Ácido acético (IA), utilizou-se: isopropanol 99% (C_3H_8O 99%) (9 ml) e ácido acético glacial (1 ml).

ISOPROPANOL/FORMALDEÍDO/ÁCIDO ACÉTICO

Para 10 ml do fixador Isopropanol/Formalina/Ácido acético (IFA) (VIKTOROV; PROSHIN, 2003), utilizou-se: isopropanol 99% (7 ml), formaldeído comercial 10% (3,7% Formaldeído) (2 ml) e ácido acético glacial (1 ml).

TAMPÃO PBS/ H_2O_2

Para clarificação foi utilizado tampão PBS/ H_2O_2 . Para 10 ml do tampão, utilizou-se: PBS 1x (9 ml), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (1 ml) e Tween 0,1% (100 μ l).

GLICEROL 70%

Para preservar os embriões submetidos à microscopia confocal e secções histológicas submetidas à marcação fluorescente, utilizou-se para 10 ml de solução: glicerol 100% (7 ml) e H_2O destilada (3 ml).

ANEXO B – CORANTES HISTOLÓGICOS E MARCADORES FLUORESCENTES

CORANTE HEMATOXILINA DE HARRIS

O protocolo utilizado para a coloração de hematoxilina foi o do Protocolo de Operação Padrão da UMHICB/UFRJ.

Para fazer 1L do corante, utilizou-se: hematoxilina (5 g), etanol 100% (C₂H₆O 100%) (50 ml), sulfato de alumínio e amônio (NH₄Al(SO₄)₂·12H₂O) ou alúmen de potássio (KAl(SO₄)₂) (100 mg), óxido de mercúrio vermelho (2,5 g) e H₂O destilada (completar para 1L). A hematoxilina foi dissolvida no álcool e o alúmen em metade da quantidade de água (água quente, de 70 a 80°C). As soluções foram misturadas e levadas a uma fonte de calor até atingir fervura. Após a fervura, foi retirada da fonte de calor e adicionou-se o óxido de mercúrio. A solução foi aquecida novamente até ficar vermelho escuro; deixada no aquecimento por mais 1 minuto e retirada da fonte de calor. Por fim, a solução corante atingiu a temperatura ambiente, foi filtrada e armazenada em recipiente âmbar. Para a solução de uso, adicionou-se 10 gotas de ácido acético para um volume de 200 ml de corante.

CORANTE EOSINA

O protocolo utilizado para a coloração de eosina foi o do Protocolo de Operação Padrão da UMHICB/UFRJ.

Para volume final de 1L, utilizou-se: eosina amarela (5 g), H₂O destilada (100 ml) e etanol 95% (900 ml). Após dissolver a eosina em água destilada, adicionou-se o álcool 95%. Na solução de eosina em uso, adicionou-se ácido acético (200 µl para cada 100 ml).

AZUL DE TOLUIDINA

O protocolo utilizado para coloração de azul de toluidina foi baseado em Kurth e Hausen (2000) e Mercer (1963). Para 500 ml de azul de toluidina 0,1%, utilizou-se: azul de toluidina (0,5 g), borato de sódio (Na₂B₄O₇) (0,5 g), H₂O destilada (500 ml).

DAPI

Para 1L de 4',6-diamidino-2-fenilindol dihidrocloro (DAPI), utilizou-se: DAPI (20 mg) em 1L de PBS 1x.