

01 a 04 de outubro de 2018

Evento: Bolsistas de Iniciação Científica e Iniciação Tecnológica da Unijuí

PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA DE COLORAÇÃO POR HEMATOXILINA E EOSINA DE CÓCLEA DE RATOS: PERSPECTIVAS DE ESTUDO DE ESTRESSE CELULAR CAUSADO PELA EXPOSIÇÃO AO RUÍDO E PELA QUIMIOTERAPIA¹
STANDARD PROTOCOL FOR HEMATOXILINE AND EOSIN STAINING IN RAT COCHLEA: STUDIES PERSPECTIVES REGARDING CELL STRESS INDUCED BY NOISE AND BY CHEMOTHERAPY

**Samara Nicole Friske², Paula Taís Friske³, Jaíne Borges Dos Santos⁴,
Bruna Endl Bilibio⁵, Marcos Soares⁶, Thiago Gomes Heck⁷**

¹ Pesquisa desenvolvida pelo Grupo de Pesquisa em Fisiologia, Departamento de Ciências da Vida - UNIJUI

² Acadêmica do Curso de Medicina Veterinária - UNIJUI, Bolsista PIBITI/CNPq, Grupo de Pesquisa em Fisiologia/GPeF

³ Acadêmica do Curso de Nutrição - UNIJUI, Bolsista PIBIC/UNIJUI, Grupo de Pesquisa em Fisiologia/GPeF

⁴ Acadêmica do curso de Enfermagem - UNIJUI, Bolsista PIBIC/CNPq, Grupo de Pesquisa em Fisiologia - GPeF

⁵ Acadêmica do Curso de Nutrição - UNIJUI, Bolsista PIBITI/UNIJUI, Grupo de Pesquisa em Fisiologia/GPeF

⁶ Docente do Departamento de Ciências da Vida - UNIJUI, doutorando em Distúrbios da Comunicação Humana-UFSM

⁷ Orientador. Grupo de Pesquisa em Fisiologia (GPeF), Programa de Pós-Graduação em Atenção Integral à Saúde (PPGAIS), Departamento de Ciências da Vida (DCVida), Universidade Regional do Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul (UNIJUI)

Introdução

O ruído constante e em alta intensidade pode trazer consequências à saúde tanto de humanos como de animais. Este tipo de estresse pode gerar aumento da pressão arterial, aumento da tensão muscular, dificuldades do sono, transtornos neurológicos, problemas digestivos, transtornos comportamentais, falta de atenção e concentração. Além disso, o ruído é potencial causador de problemas auditivos como zumbido, vertigem e perda auditiva induzida pelo ruído (PAIR) (SERVILHA; DELATTI, 2012).

A PAIR é um dos principais problemas de saúde, sendo um distúrbio considerado evitável (BRAMATTI; MORATA; MARQUES, 2008). Segundo a Associação Brasileira de Otorrinolaringologia e Cirurgia Cérvico-facial (ABORL-CCF 2003) a exposição a sons intensos não atinge somente profissionais que trabalham em locais com elevado nível de ruído, mas pode acontecer situações que são frequentes no dia-a-dia da maioria das pessoas.

01 a 04 de outubro de 2018

Evento: Bolsistas de Iniciação Científica e Iniciação Tecnológica da Unijui

Outro gerador de danos auditivos é o agente quimioterápico cisplatina, utilizado para tratamento de alguns tipos de câncer (GONÇALVES et al., 2013). O ruído e a cisplatina induzem na cóclea, através de uma intensa atividade metabólica, uma condição de estresse oxidativo, que produz as espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, podendo provocar um dano, definitivo ou temporário, nas células sensoriais do órgão (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006; HENDERSON et al., 2006).

Alguns estudos demonstram que a proteína de choque térmico de 70kDa (HSP70) tem sido apontada como protetora do dano auditivo. Sua eficácia foi comprovada em pesquisas feitas com camundongos submetidos ao choque térmico, gerando um aumento na expressão da HSP70 coclear, que protegeu os animais de um dano por ruído enquanto os níveis de HSP70 na cóclea estavam elevados (YOSHIDA; KRISTIANSEN; LIBERMAN, 1999). A expressão elevada de HSP70 (iHSP70) intracelular representa uma proteção das células por mecanismos anti-inflamatórios (HECK; SCHÖLER; DE BITTENCOURT, 2011). A expressão de HSP70 pode ser potencializada por estratégias farmacológicas e não farmacológicas. Por exemplo, a sua suplementação com glutamina atua positivamente no estoque intracelular de glutathione (GSH), uma importante defesa antioxidante, e aumenta a expressão de iHSP70 aumentando a proteção dos tecidos ao estresse oxidativo (PETRY et al., 2014). Assim a L-glutamina e a administração de HSP70 exógena (exHSP70) podem constituir um novo tratamento para a PAIR e perda auditiva pela cisplatina.

Contudo, para verificar se estas substâncias realmente são protetoras das células cóclea é necessário que se possa observar a localização celular da HSP70, uma vez que possui efeitos citoprotetores no citoplasma e no núcleo das células, e representa uma situação de estresse extremo, quando localizada próxima às membranas celulares, o que indica um sinal pró-inflamatório (Heck et al, 2017). Assim, analisar morfológicamente as células sensoriais envolvidas na audição torna-se imprescindível. Neste sentido, a padronização de uma técnica de coloração de lâminas que seja eficiente para avaliar a viabilidade celular após indução do dano coclear pelo ruído ou pela cisplatina é parte fundamental da análise de estresse celular, assim como torna possível avaliar se os efeitos citoprotetores da L-glutamina ocorrem mediante expressão de HSP70. Portanto o objetivo deste estudo é padronizar a técnica de coloração por hematoxilina e eosina para a visualização das células da cóclea, constatando e quantificando a viabilidade das células ciliares da cóclea.

Metodologia

Foram utilizados 4 ratos Wistar adultos, provenientes do biotério da UNIJUI. Os animais receberam ração padronizada para animais de laboratório (Nuvilab CR-1) e foram mantidos em temperatura controlada (22 ± 2 °C), ciclo claro/escuro de 12 horas e receberam água e ração *ad libitum*. O projeto foi aprovado na CEUA-UNIJUI (nº. 058/15).

Estes animais foram eutanasiados para a coleta da cóclea que foi rapidamente dissecada, janelas oval e redonda abertas. Em seguida, as cócleas foram submetidas a fixação com paraformaldeído 4% pH 7.0 e mantidas na mesma solução por 6h. Após foram lavadas em solução de PBS e

01 a 04 de outubro de 2018

Evento: Bolsistas de Iniciação Científica e Iniciação Tecnológica da Unijuí

colocadas em solução de descalcificação EDTA 10% por 4 dias à 4°C. Depois deste período as cócleas foram submetidas à desidratação por passagem em soluções crescentes de etanol (etanol 30% 1h, 40% 1h, 50% 1h, 60% 1h, 70% overnight, 80% 1h, 90% 1h, 96% 1h e 100% 1h), e ao processo de clarificação, passando em Xilol 100% por 2 vezes, 1h cada passagem. Posteriormente foi realizada a infiltração em parafina líquida à 60°C (2x 40min), e em seguida inclusão em bloco de parafina. A microtomia foi realizada em cortes de 8 µm, paralelo ao eixo modiolar.

Para que fosse possível a coloração dos tecidos foi feita a retirada da parafina passando no Xilol I por 3 minutos e após no Xilol II por mais 3 minutos. Depois é feita a hidratação passando em Álcool 100% por 3 minutos, depois em Álcool 90% por 3 minutos, em Álcool 70% por 3 minutos e então é feita a lavagem com água destilada.

Após estes procedimentos se iniciou o processo de coloração: a lâmina foi colocada em Hematoxilina por 5 minutos, após é feita a lavagem com água destilada e então a lâmina é submetida à Eosina por 5 minutos. Em seguida é feita a desidratação passando em Álcool 95% por 2 minutos, em Álcool I 100% 3 minutos, em Álcool II 100% 3 minutos, Xilol I (utilizado na retirada de parafina) por 3 minutos e em Xilol II por 3 minutos. E então é feita a montagem pingando uma gota de Entelan na lamínula e colocando a lâmina sobre esta, retirando as bolhas de ar. Esta coloração permite a comparação com as lâminas feitas com a técnica de imunohistoquímica, que juntas possibilitarão determinar se a HSP70 está localizada intra ou extracelularmente (NEAL et al., 2015)

Resultados e Discussão

A coloração permitiu que fossem visualizadas os núcleos das células, em tons arroxeados, e também o citoplasma, em tons de rosa (Figura 1). A contagem das células ciliadas poderá ser realizada em microscópio óptico. Os cortes realizados e a coloração permitiram a aquisição de imagens que representam a totalidade da cóclea íntegra. Os cortes propostos e permitem a contagem celular por espira basal, média e apical. A presença de célula ciliada é definida como núcleo íntegro e esférico, localizado na metade basal da célula (NEAL et al., 2015).

01 a 04 de outubro de 2018

Evento: Bolsistas de Iniciação Científica e Iniciação Tecnológica da Unijui

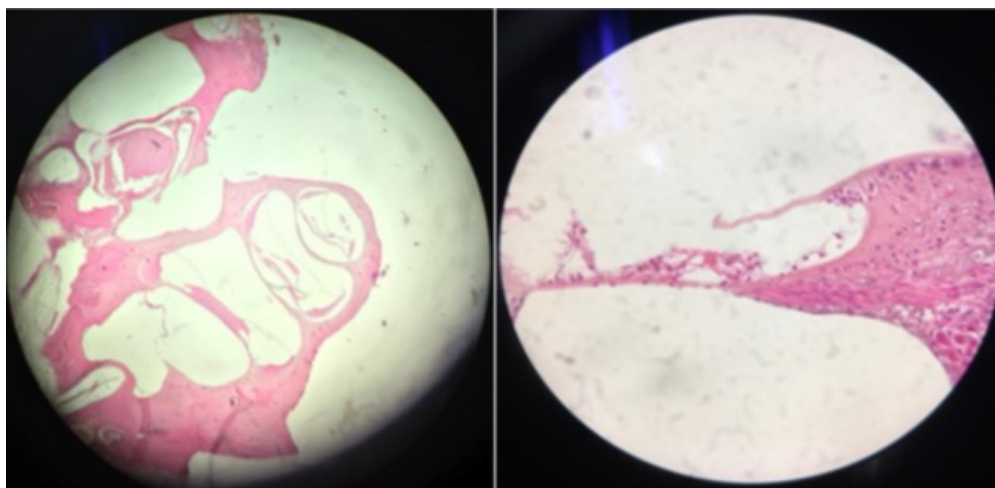


Fig 1. Imagem ilustrativa da coloração da cóclea de ratos wistar com hematoxilina e eosina A) Corte da cóclea de 8 μ m, no eixo paramodiolar, colorido por Hematoxilina e Eosina Aumento de 50x. B) Corte do órgão de córti de 8 μ m, paralelo ao eixo modiolar, colorido por Hematoxilina e Eosina. Aumento de 400x.

A cóclea é um canal espiralado de formato parecido com a concha de um caracol, inserida no osso temporal. Possui de 30 à 35 mm de comprimento e seu lúmen tem três compartimentos: a rampa média (ou ducto coclear), rampa vestibular e rampa timpânica. A estrutura que forma o assoalho do ducto coclear e o separa da rampa timpânica é a membrana basilar. Sobre esta membrana está o órgão de Corti, um epitélio especializado de células pilosas e células de suporte (OVALLE; NAHIRNEY; NETTER, 2014). Estruturas que foram possíveis de observar nas imagens obtidas.

A hematoxilina é um corante natural obtido de uma árvore originalmente encontrada na América Central. É um método de coloração antigo utilizado desde o final do século XIX e tem sido um método de coloração padrão (LLEWELLYN, 2009). O uso da coloração com hematoxilina e eosina permite localizar o núcleo celular. Os núcleos das células, que são ricos em ácidos nucleicos, por terem afinidade com a hematoxilina ficam com uma tonalidade arroxeada. Já o citoplasma e a matriz extracelular geralmente tem afinidade com a eosina e se coram em tonalidade rosada (OVALLE; NAHIRNEY; NETTER, 2014).

Em estudos de ZHANG et al., (2013), que realizou uma comparação entre a coloração por Hematoxilina & Eosina e de violeta de metila, foi observado que apesar da primeira ser mais demorada, esta tem vantagens pois pode exibir a morfologia celular e distinguir os componentes celulares de forma mais explícita e as lâminas podem ser permanentemente armazenadas.

01 a 04 de outubro de 2018

Evento: Bolsistas de Iniciação Científica e Iniciação Tecnológica da Unijui

Considerações finais

A técnica de preparação histológica e de coloração por Hematoxilina e Eosina utilizada foi adequada para estudos morfológicos cocleares. Esta padronização abre perspectiva para a continuidade dos estudos em estresse celular causado pelo ruído ou pela quimioterapia. Além de propiciar o estudo de características morfológicas, a técnica aqui apresentada representa a primeira etapa dos estudos inéditos sobre a localização e quantificação de proteínas de estresse celular na cóclea, como a HSP70.

Palavras-chave: Cóclea; Proteínas de Choque Térmico HSP70; Glutamina; Histologia.

Keywords: Cochlea; HSP70 Heat-Shock Proteins; Glutamine; Histology.

Referências

- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE OTORRINOLARINGOLOGIA E CIRURGIA CÉRVICO-FACIAL (ABORL-CCF). A sociedade brasileira de otorrinolaringologia adverte: o som intenso provoca perda de audição. 2003. Acesso em: http://www.aborlccf.org.br/secao_detalhes.asp?s=51&id=477.
- BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: Relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 113-123, 2006.
- BRAMATTI, L.; MORATA, T. C.; MARQUES, J. M. Ações educativas com enfoque positivo em programa de conservação auditiva e sua avaliação. **Revista CEFAC**, v. 10, n. 2, p. 398-408, 2008.
- GONÇALVES, M. S. et al. Mechanisms of cisplatin ototoxicity: Theoretical review. **Journal of Laryngology and Otology**, v. 127, n. 6, p. 536-541, 2013.
- HECK, T. G.; SCHÖLER, C. M.; DE BITTENCOURT, P. I. H. HSP70 expression: Does it a novel fatigue signalling factor from immune system to the brain? **Cell Biochemistry and Function**, v. 29, n. 3, p. 215-226, 2011.
- HENDERSON, D. et al. The role of oxidative stress in noise-induced hearing loss. **Ear and Hearing**, v. 27, n. 1, p. 1-19, 2006.
- LLEWELLYN, B. D. Nuclear staining with alum hematoxylin. **Biotechnic and Histochemistry**, v. 84, n. 4, p. 159-177, 2009.
- PETRY, É. R. et al. Alanyl-glutamine and glutamine plus alanine supplements improve skeletal redox status in trained rats: Involvement of heat shock protein pathways. **Life Sciences**, v. 94, n. 2, p. 130-136, 2014.
- SERVILHA, E. A. M.; DELATTI, M. DE A. Percepção de ruído no ambiente de trabalho e sintomas auditivos e extra-auditivos autorreferidos por professores universitários. **Jornal da Sociedade Brasileira de Fonoaudiologia**, v. 24, n. 3, p. 233-238, 2012.
- YOSHIDA, N.; KRISTIANSEN, A; LIBERMAN, M. C. Heat stress and protection from permanent acoustic injury in mice. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 19, n. 22, p. 10116-10124, 1999.
- ZHANG, W. et al. Comparison of hematoxylin-eosin staining and methyl violet staining for displaying ghost cells. **Eye Science**, v. 28, p. 7-10, 2013.