

ESTABELECIMENTO DO PROTOCOLO AGNOR PARA MEMBRANAS EMBRIONÁRIAS E FETAIS DE EQUINO¹

ANA CAROLINA FURLANETTO MANÇANARES², CELINA ALMEIDA FURLANETTO MANÇANARES³, ANA CLÁUDIA CRISTIANE FERRAZ⁴, ANA FLÁVIA DE CARVALHO³

¹ Bolsa de Iniciação Científica Fapesp – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo.

² Graduando do Curso de Ciências Biológicas do Centro Universitário da Fundação de Ensino Octávio Bastos. Av. Dr. Octávio da Silva Bastos, s/n°, São João da Boa Vista/SP, 13874-159.

³ Docente do Centro Universitário da Fundação de Ensino Octávio Bastos. Av. Dr. Octávio da Silva Bastos, s/n°, São João da Boa Vista/SP, 13874-159.

⁴ Graduando do Curso de Medicina Veterinária do Centro Universitário da Fundação de Ensino Octávio Bastos. Av. Dr. Octávio da Silva Bastos, s/n°, São João da Boa Vista/SP, 13874-159.

RESUMO: As regiões organizadoras de nucléolos (RONs) ou Nucleolar Organizer Regions (NORs) são regiões de cromatina ligeiramente coradas em volta das quais, no final da telófase, o nucléolo é outra vez formado após a mitose. Um grupo peculiar de proteínas ácidas que tem alta afinidade por prata, são localizadas nos mesmos sítios que as NORs, o que confere as mesmas características de serem clara e rapidamente visualizadas por colorações que utilizam nitrato de prata. Para este estudo, foram utilizadas membranas de embriões/fetos de equinos obtidas a partir de 30 placentas. Tal material foi coletado de éguas adultas, sem raça definida e em diferentes períodos de gestação de até 100 dias. Fragmentos das membranas embrião/feto foram fixadas em formol a 10% para os procedimentos histológicos de rotina (TOLOSA et al, 2003). Foram obtidos cortes seriados com espessura de 5µm em micrótomo (Leica 2165[®]), os quais foram desparafinados e imersos em uma solução final 1:2, constituída por solução coloidal (gelatina 2% e ácido fórmico 1%) e solução de nitrato de prata (AgNO₃) (1:1). Foram levadas à estufa a 37°C, em câmara úmida, por aproximadamente 20 minutos. Após a lavagem das lâminas com água, foi aplicada uma solução de tiosulfato de sódio 1% por um minuto e seguido de lavagem e secagem à temperatura ambiente sendo acondicionadas em câmara escura. Após a coloração de impregnação por Prata das NORs (Nucleolar Organizer Regions) algumas lâminas foram submetidas a banhos de Eosina para que o citoplasma fosse corado e assim obtermos maior facilidade de individualização celular. Os resultados obtidos foram apropriados, mostrando-se o protocolo adequado, sendo que, o fundo de eosina proporcionou melhor visualização das delimitações celulares, facilitando assim a possível contagem de NORs por célula.

PALAVRAS-CHAVE: placentação eqüina, NORs (Nucleolar Organizer Regions).

INTRODUÇÃO

O cavalo (*Equus caballus*, Linneaus 1758) é um mamífero ungulado de porte grande, da família dos Equidea, uma das sete espécies modernas do gênero *Equus*. Domesticado há milhares de anos é um animal inigualável, de beleza incomum, graça, sensibilidade e habilidade atlética; um animal fascinante para estudo, como descrevem Evans et al. (1990); Ginther (1992) e Dantzer et al. (1988). O cavalo (*Equus caballus*) pertence ao reino Animalia, filo Chordata, classe Mammalia, Ordem Perissodactyla, Família Equidae, gênero *Equus* e espécie *caballus*.

Wolf (2003) relata que as membranas extra-embriônicas são o elo de comunicação entre os organismos materno-embriônico que posteriormente irão formar a placenta, órgão vital para o desenvolvimento e crescimento fetal. Uma grande parte das mortalidades embriônicas eqüinas ocorre em fêmeas sadias em decorrência de uma comunicação materno-embriônica deficiente, que impede a manutenção da gestação.

A placenta da égua, conforme a descrição de Silva (1971), Banks (1992) é do tipo corioalantóica (formada pela fusão do mesoderma alantoidiano com o mesoderma coriônico), epiteliocorial (o epitélio coriônico e o uterino estão em contato íntimo, sem perda de tecido materno), difusa (as vilosidades coriônicas estão presentes sobre toda a superfície desta membrana), não-decídua (não há perda dos elementos da mucosa uterina durante o parto) e vilosa (projeções coriônicas se interdigitam com as criptas maternas), e o período de gestação é de 340 dias aproximadamente.

As regiões organizadoras de nucléolo (NORs) foram descritas primeiramente por McClintock (1934) e Derenzini (2000), como sendo as regiões marcadas de cromatina em torno

da qual, no fim da telófase, o nucléolo é reformado após seu desaparecimento durante a fase mitótica da célula. As NORs são constituídas por proteínas nucleolares facilmente identificáveis pela impregnação por prata e são constituídas por cístrons de rDNA que estão localizados em regiões secundárias dos cromossomos (EGAN, 1988; CROKER e EGAN, 1988; SOOMRO et al., 1991). Ploton et al (1986) descreveram uma técnica modificada para a demonstração das NORs (Regiões Organizadoras de nucléolos) que foi aplicada em sessões histológicas. Esta técnica ficou conhecida como AgNORs. Diversos métodos para a coloração por nitrato de prata já foram estabelecidos de acordo com o tipo de fixação e o tipo de tecido a ser analisado. O método de coloração por Nitrato de Prata foi originalmente descrito por Ploton *et al.* (1986) e posteriormente modificado por Ofner et al. (1992) para amostras fixadas em formalina.

A transcrição dos genes para RNA ribossômico (RNAr) envolve, além da RNA polimerase I, proteínas que formam partículas pré-ribossômicas, dando origem ao nucléolo (PLOTON, 1994). Essas proteínas associadas às regiões organizadoras do nucléolo têm grande afinidade pela prata (UNDERWOOD e GIRI, 1998), e são observadas ao microscópio ótico como pontos pretos dispersos pelo núcleo ou pelo nucléolo (TRERÉ, 1993).

Atualmente, vários trabalhos descrevem o emprego da técnica de AgNORs e sua aplicação em morfometria quantitativa, como método auxiliar na distinção entre células benignas e malignas, em diversos tecidos (KRUGER et al., 2000). Essa técnica é muito utilizada no diagnóstico e prognóstico de vários tipos de tumores, por caracterizar com grande eficácia a proliferação celular, já que as células cancerosas possuem uma grande quantidade de AgNORs enquanto que as células de lesões benignas ou normais possuem menor quantidade (DERENZINI, 2000). Entretanto, deve-se observar o fato de que nem sempre a taxa de proliferação celular em tumores malignos é maior do que as células normais ou de tumores benignos. De acordo com SURESH et al. (1990) e NEUDECK et al. (1997) em tecidos não-tumorais existem poucos trabalhos realizados. Especialmente em tecido trofoblástico, encontramos algumas referências a respeito provenientes de abortos (hidropsia, mola hidatiforme completa ou parcial), mas nenhuma referência foi encontrada em tecidos placentários normais.

OBJETIVOS

Estabelecer o protocolo de coloração por nitrato de prata em Regiões Organizadoras de Nucléolos (AgNORs) utilizadas como marcadores em células de placentas eqüinas.

MATERIAL E MÉTODO

Foram coletadas 30 amostras de placentas de éguas adultas, sem raças definidas, do primeiro ao terceiro trimestre de gestação divididas em grupos por idades gestacionais seguindo a metodologia empregada por EVANS e SACK (1973), provenientes do frigorífico Miramar, localizado na cidade de Pelotas, Rio Grande do Sul. Os fragmentos de 0,5 cm foram fixados em formol tamponado a 10%. Após a fixação, foram desidratadas em uma série de etanóis em concentrações crescentes (de 70 a 100%) e diafanizado em xilol, seguido de inclusão em parafina Histosec¹ (TOLOSA et al., 2003). Algumas lâminas foram coradas por Hematoxilina-Eosina (HE) (TOLOSA et al., 2003), para avaliação morfológica do tecido, outras lâminas foram imersas em uma solução final 1:2, que consiste de solução coloidal (gelatina 2% e ácido fórmico 1%) e solução de nitrato de prata (AgNO₃) (1:1), foram levadas à estufa à 37°C, em câmara úmida, por aproximadamente 20 minutos. Após a lavagem das lâminas com água, foi aplicada uma solução de tiosulfato de sódio 1% por um minuto e lavado novamente, em seguida as lâminas foram secas a temperatura ambiente e acondicionadas em câmara escura. Após a coloração algumas lâminas foram submetidas a banhos de Eosina para que fosse corado o citoplasma e obter maior facilidade de identificação das NORs.

RESULTADOS

Neste estudo foi utilizado o protocolo de coloração de Aubele et al. (1994). Este método de coloração permite a visualização das proteínas associadas as NORs (Nucleolar Organizer Regions). Por meio da microscopia ótica foram visualizados pequenos pontos escuros intranucleares (dots) e aglomerados destes pontos (clusters). Entretanto,

¹ Merck – lote k91225309

quando a técnica de AgNOR foi realizada, obtivemos uma excelente visualização das NORs e melhor definição das células, modificando esta coloração incluindo fundo de eosina.

DISCUSSÃO

A técnica de AgNOR é simples, de fácil interpretação e é muito utilizada como marcador de proliferação celular (CABRINI *et al.*, 1992; THERÉ *et al.*, 1989), sendo este protocolo ideal. A técnica demonstra pontos ou agrupamentos de pontos prata intranucleolares, que podem apresentar com número, forma e tamanhos variados, permitindo uma análise quantitativa, qualitativa morfológica ou morfométrica dos mesmos.

Cada ponto (DOT) corado pela prata corresponde, em nível ultra-estrutural, ao centro fibrilar em íntima associação ao componente fibrilar denso (DERENZINI *et al.*, 1990; DERENZINI e PLOTON, 1991) sendo que os DOTs foram facilmente evidenciados em todas as fases de gestação em que se procedeu nosso estudo.

De acordo com o estágio da gestação, observa-se que a quantidade de AgNORs nas células das membranas embrionárias e fetais aumentam. Isso indica um aumento na atividade proliferativa e/ou metabólica dessas células, confirma Carneiro (2003). Um nucléolo com baixa taxa de biogênese ribossomal é caracterizado por uma NOR única e grande. Entretanto, observamos que os nucléolos de células ativadas exibem um grande número de NORs pequenas, de acordo com o que dizem Derenzini e Ploton (1991).

O aumento da proliferação celular é facilmente justificável, já que em muitas espécies de mamíferos o peso do feto, e conseqüentemente sua placenta, aumenta exponencialmente ao longo da gestação, sendo esse aumento mais evidenciado durante os últimos meses (EVANS e SACK, 1973; FERRELL *et al.*, 1976).

Além disso, considerando que essas células são responsáveis pela produção de diversos hormônios e fatores de crescimento associados ao desenvolvimento e manutenção da gestação (SCHLAFER *et al.*, 2000), é natural que sua atividade metabólica aumente a medida em que a gestação passa a requerer maiores esforços do animal, nos permitindo sua aplicação com baixo custo para análise metabólica da placenta equina.

CONCLUSÃO

Neste trabalho definimos o protocolo para Regiões Organizadoras de Nucléolos como marcadores da placenta equina. A técnica de AgNOR é simples, de fácil interpretação, absorve pouco tempo de trabalho, apresenta custos relativamente baixos e pode ser padronizada com razoável facilidade sendo, então, facilmente incorporada à rotina laboratorial. A adição do corante Eosina em alguns cortes após o uso da solução de prata permitiu a melhor identificação das células e suas respectivas NORs.

REFERÊNCIAS

- AUBELE, M.; BIESTERFELD, S.; DERENZINI, M. Guidelines of AgNOR quantitation. **Zentralblatt für Pathol.**, v.140, p107-108, 1994.
- BANKS, W. J. **Histologia Veterinária Aplicada**, 2nd edição, Editora Manole Ltda, São Paulo-SP, 1992, p. 579-584.
- CABRINI, R.L. *et al.* Morphometric study of nucleolar organizer regions in human oral normal mucosa, papilloma and squamous cell carcinoma. **J. Oral Pathol Med.**, 21: 275-9, 1992.
- CARNEIRO, P. S. **Determinação da relação entre a proliferação celular, atividade metabólica e estágios da gestação e estabelecimento da ploidia e do ciclo celular em células de placentas bovinas. [Relationship among cell proliferation, metabolic activity and days of pregnancy and determination of ploidy and cell cycle in bovine placenta]**. 2003. 75f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.
- CROCKER, J; EGAN, M. J. Correlation between NOR sizes and numbers in on Hodgkins lymphomas. **J.Pathol**, 156: 23-29, 1988.
- DANTZER, V.; LEISER, R.; KAUFMANN, P.; LUCKHARDT, M. Comparative morphological aspects of placental vascularization. **Trophoblast Research** 3: p. 235-260, 1988.

- DERENZINI M, PESSION A, TRERÈ D. Quantity of nucleolar silver-stained proteins is related to proliferating activity in cancer cells. **Lab Invest.** 1990; 63(1):137-40. Comment in: *Lab Invest.* 1991; 64(5):718-9.
- DERENZINI, M. The AgNORs. **Micron**, v.31, p.117-120, 2000.
- DERENZINI, M.; PESSION, A.; TRERÈ, D. The quantity of nucleolar silver-stained proteins is related to proliferating activity in cancer cells. **Lab Invest.** v. 63, p. 137-40, 1990.
- DERENZINI, M.; PLOTON, D. Interphase nucleolar organizer regions in cancer cells. **International Reviews of Experimental Pathology**, v. 32, p. 150 – 192, 1991.
- EGAN, M.J.; RAAFAT F.; CROCKER, J.; SMITH, K. Nucleolar organizer regions in fibrous proliferations of childhood and infantile fibrosarcoma. **J. Clin. Pathol**, 41: 31-33, 1988.
- EVANS J. W.; BORTON A.; HINTZ H. F.; VLECK L.D. V. **The Horse**, 2nd Ed, W. H. Freeman and Company - New York, p. 340-349, 1990.
- EVANS, H.E.; SACK, W.O. Prenatal Development of Domestic and Laboratory Mammals: Growth Curves, External Features and Selected References. **Anat Histol Embriol**, v. 2, pág. 11-45, 1973.
- FERRELL, C.L.; GARRETT, W.N.; HINMAN, N. Estimation of body composition in pregnant and non pregnant heifers. **Journal Animal Science**, v.42, n.5, p. 1158-1166, 1976.
- GINTHER, O. J. Reproductive biology of the mare- Basic and applied aspects. Chapter: 12, **"Placentation and Embryology"**, United States- USA, p. 315- 352, 1992.
- KRUGER, S.; STAHLHUT, M.; MULLER, H. Cell cycle-dependent AgNOR analysis in invasive breast cancer. **Anal Quant Cytol Histol.**, 22(5): 358-363, 2000.
- McCLINTOCK, D. J. L. The relation of particular chromosomal element to the development of the nucleoli in *Zea mays*. **Zellforsch Mikrosk Anatomy**, v. 21, p. 294-328, 1934.
- NEUDECK, H.; UNGER, M. ; HUGNAGL, P.; EIBEN, B. ; PETERS, K.; KALLA, J. ; GRAF, R.; VOGEL, M. Villous cytotrophoblast proliferating potencial in complete or partial hydatidiform mole: diagnostic value of silver-stained nucleolar organizer region (AgNOR) – association proteins. **General e Diagnostic Pathology**, v. 143, n. 2-3, p.179-184, 1997.
- OFNER, D.; HITTMAR, A.; MARTH. C.; OFNER, C.; TÖTSCH, M.; DAXENBICHLER, G.; MIKUZ, G.; MARGREITER, R.; SCHMID, K. W.; Relationship between quantity of silver stained nucleolar organizer regions associated proteins (Ag-NORs) and population doubling time in ten breast cancer cell lines. **Pathol Res Pract**, v. 188, p. 742–746, 1992.
- PLOTON, D. Structure and molecular organization of nucleolus. **Zentr. Pathol.**, v.140, p.3-6, 1994
- PLOTON, D.; MENAGER, M.; JEANNESSON, P.; HIMBER, G.; PIGEON, F.; ADNETT, J. J. Improvement in the staining and in the visualization of the argyrophilic proteins of the nucleolar organizer region at the optical level. **Histochem J.**, 18: 5-14, 1986.
- SCHLAFER, D.H.; FISHER, P.J.; DAVIES, C.J. The bovine placenta before and after birth: placental development and function in health and disease. **Anim. Reprod. Sci.**, v.60-61, p.145-160, 2000.
- SILVA, D.F.A.P. **Placenta**. 1971. 101 f. (Monografia em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1971.
- SIRRI, V.; ROUSSEL, P.; HERNANDEZ-VERDUN, D. In vivo release of mitotic silencing of ribosomal gene transcription does not give rise to precursor ribosomal RNA processing. **J. Cell Biol.** v. 148, p. 259–270, 2000.
- SOOMRO, I.; PATEL, N.; WHIMSTER, W. F. Distribution and estimation of nucleolar organizer regions in various human lung tumours. **Pathol. Res. Pract.**, 187: 6872, 1991.
- SURESH, U. R.; CHAWNER, L.; BUCKLEY, C. H.; FOZ, H. Do AgNORs counts reflect cellular ploidy or cellular proliferation? A study of trophoblastic tissue. **Journal of Pathology**, v. 160, n. 3, p. 213-215, 1990.
- TOLOSA, E. M. C.; RODRIGUES, C. J.; BEHMER, O. A.; FREITAS NETO, A. G. **Manual de técnicas para histologia normal e patológica**. 2. ed. Barueri: Manole, 2003, 331 p.
- TRERÈ, D. AgNOR quantification in tumor pathology: What is actually evaluated? **J. Clin. Pathol.**, v.46, p.189, 1993.
- TRERÈ, D.; PESSION, A.; DERENZINI, M. The silver-stained proteins of interphasic nucleolar organizer regions as a parameter of cell duplication rate. **Experimental Cell Research**, v. 184, p. 131 – 137, 1989.
- UNDERWOOD, J.C.E.; GIRI, D.D. Nucleolar organizer regions as diagnostic discriminants for malignancy. **J. Pathol.**, v.155, p.95-96, 1998.

VAN DIEST, P. J., BRUGAL, G., BAAK, J. P. Proliferation markers in tumours: interpretation and clinical value. *J Clin Pathol.* 1998; 51(10):716-24. Comment in: **J Clin Pathol.** 1999;52(7):550.

WOLF, E. et al. Embryo-maternal communication in bovine – strategies for deciphering a complex cross-talk. **Reproduction in Domestic Animal**, v. 38, p. 276-289, 2003.