

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
INSTITUTO DE BIOFÍSICA CARLOS CHAGAS FILHO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO MESTRADO PROFISSIONAL PARA A  
PESQUISA BIOMÉDICA (BIOFÍSICA)

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO PROFISSIONAL

**RACHEL DE PINHO RACHID**

APERFEIÇOAMENTO DE METODOLOGIAS DE  
CRIOPROCESSAMENTO DE *Plasmodium chabaudi* PARA  
MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO

Orientador: Prof Kildare Miranda

Rio de Janeiro

2015



**RACHEL DE PINHO RACHID**

APERFEIÇOAMENTO DE METODOLOGIAS DE CRIOPROCESSAMENTO DE  
*Plasmodium chabaudi* PARA MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO

Dissertação de Mestrado Profissional  
apresentada ao Programa de Pós-graduação  
para a pesquisa Biomédica (Biofísica),  
Instituto de Biofísica Carlos Chagas  
Filho, como parte dos requisitos  
necessários à obtenção do grau de  
Mestre em Ciências Biomédicas (Biofísica).

Orientador: Prof Kildare Miranda

Rio de Janeiro

2015

## FICHA CATALOGRÁFICA

**Rachid, Rachel de Pinho.**

**Aperfeiçoamento de metodologias de crioprocessamento de *Plasmodium chabaudi* para microscopia eletrônica de transmissão / Rachid, Rachel de Pinho.– Rio de Janeiro : UFRJ/IBCCF, 2015.**

**xii, 66 f. : il. ; 31 cm.**

Orientador: Kildare Miranda.

**Dissertação (mestrado) -- UFRJ/IBCCF, Programa de Pós-graduação para a Pesquisa Biomédica, Biofísica, 2015.**

**Referências bibliográficas: f. 70-78.**

1. Criopreservação - métodos. 2. *Plasmodium chabaudi* - ultraestrutura. 3. Microscopia Eletrônica de Transmissão. 4. Malária - parasitologia. 5. Biofísica - Tese. I. Miranda, Kildare. II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, IBCCF, Programa de Pós-graduação para a pesquisa Biomédica, Biofísica . III. Título.

## FOLHA DE APROVAÇÃO

RACHEL DE PINHO RACHID

Aperfeiçoamento de metodologias de crioprocessamento de *Plasmodium chabaudi* para microscopia eletrônica de transmissão

Rio de Janeiro, 28 de Maio de 2015

---

**Kildare Miranda**, Universidade Federal do Rio de Janeiro (Orientador).

---

**Thais Cristina Baeta Soares Souto Pradrón**, Universidade Federal do Rio de Janeiro (Revisor).

---

**Gilberto Weissmuller**, Universidade Federal do Rio de Janeiro (Banca Examinadora).

---

**Loraine Campanati Araujo de Andrade**, Universidade Federal do Rio de Janeiro (Banca Examinadora).

---

**Leonardo Tavares Salgado**, Instituto de Pesquisa Jardim Botânico do Rio de Janeiro (Banca Examinadora).

*Dedico a Pedro e Rosane,*

*Pais sempre presentes.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por acreditar que tudo vem dEle, por Ele e para Ele.

Aos meus pais Pedro e Rosane, meu irmão Pedro Henrique e ao meu marido Yury pelo amor e incentivo. Pelas puxadas de orelha, pelos empurrões na vida, e por nunca me deixarem desistir. Por fazerem acreditarem que sou capaz.

Agradeço ao meu orientador Kildare, pela enorme paciência ao me ensinar tudo que sei hoje sobre microscopia eletrônica e assuntos relacionados. Pelo apoio, e por acreditar em mim. Por ser tão apaixonado pela ciência, e contagiar seus alunos com essa paixão. Por acreditar naquilo que faz e trabalhar com amor.

Ao meu grupo de trabalho, em especial a Camila Wendt. Nossos trabalhos entrelaçados nos trouxeram laços de amizade. Pela sua colaboração.

Aos amigos do Laboratório de Ultraestrutura Celular Hertha Meyer, que me aceitaram de braços abertos, sem experiência, nem conhecimento. Por me fazerem querer ficar. Em especial ao corpo técnico, Noemia Rodrigues, Thiago Barros, Daniel Gonçalves, Fernando Almeida e Diogo Dias.

A Vânia Vieira, Beatriz Bastos, Juliana Vidal e Carolina Catta Preta pelos dias de congelamento. Sem elas o trabalho seria pesado. Agradeço ao Diogo Dias e Daniel Gonçalves, que nunca se negaram a carregar meus galões de Nitrogênio Líquido. Ainda que o “pagamento” fosse uma barra de chocolate.

Agradeço a cada membro da banca que disponibilizou seu tempo a avaliação deste trabalho. Em especial a Thais Padron, que “abraçou minha causa” e me socorreu em meio ao desespero chamado prazo.

Agradeço as instituições de financiamento CAPES, FAPERJ e Cnpq pelos recursos disponibilizados.

Por fim, agradeço a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização desta Dissertação: Aos Professores do laboratório, Wanderley de Souza, Narcisa Cunha, Marcia Attias, Cristina Mota, Rossiane Vommaro e Susana Frases (em especial a Susi por todo carinho, caronas, e conversas). Aos Mestrandos e Doutorandos e pós doutores, Lissa Catherine, Carol Alcântara e Miria Pereira pela doçura. Ana Carolina, Aline Alves, Jean e Victor Midlej pela bagunça. Ana Paula Gadelha pelos brindes e risadas.

**“Ama-se mais o que se conquista com esforço.”**

**Benjamin Disrael**

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Formação da base de Schiff.....	17
FIGURA 2: Formas químicas do glutaraldeído. ....	17
FIGURA 3: Interação de formaldeído com proteínas. ....	18
FIGURA 4: Diagrama de Kanno. ....	22
FIGURA 5: Esquema do aparelho de HPF HPM 010 da Bal-Tec.....	23
FIGURA 6: Curva de temperatura e pressão obtidas durante o congelamento por alta pressão.....	24
FIGURA 7: Curva de substituição a frio. ....	26
FIGURA 8: Desenho esquemático da ultraestrutura celular da forma anel de <i>P. falciparum</i> . ....	28
FIGURA 9: Desenho esquemático da ultraestrutura celular do <i>P. falciparum</i> na fase de trofozoíta.....	29
FIGURA 10: Desenho esquemático da ultraestrutura celular da forma esquizonte de <i>P. falciparum</i> . ....	30
FIGURA 11: Ciclo eritrocítico da malária.....	Erro! Indicador não definido.
FIGURA 12: Aparelho de HPF HPM 010 da Bal-Tec.....	36
FIGURA 13: Suportes metálicos utilizados durante a técnica de HPF. ....	36
FIGURA 14: Preparo de células em suspensão para o congelamento ultrarrápido sob alta pressão.....	37
FIGURA 15: Foto do porta-amostras pronto para o congelamento. ....	37
FIGURA 16: Aparelho Leica AFS2, utilizado na realização deste trabalho. ....	38
FIGURA 17: Câmara no interior do aparelho Leica AFS2. ....	38
Figura 18: Aspecto geral de eritrócitos infectados cotendo trofozoítas de <i>P. Chabaudi</i> .....	Erro! Indicador não definido.
Figura 19: Aspecto geral de eritrócitos infectados por trofozoítas de <i>P. chabaudi</i> obtidas por MET.....	52
Figura 20: Aspectos da estrutura da mitocôndria de trofozoítas de <i>P. chabaudi</i> . ....	59

## **LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS**

**FQ: Fixação química**

**FS: “freeze substitution”, substituição a frio**

**HPF: “High Pressure Freezing”, congelamento ultrarrápido sob alta pressão**

**MET: Microscópio eletrônico de transmissão**

**ME: Microscopia eletrônica**

**MP: Membrana plasmática**

## RESUMO

RACHID, Rachel de Pinho. Aperfeiçoamento de metodologias de criofixação e substituição a frio de *Plasmodium chabaudi* para a visualização em microscopia eletrônica de transmissão. Rio de Janeiro, 2015. Dissertação (Mestrado Profissional em Ciências Biomédicas – Biofísica) – Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2015.

A malária persiste ainda como uma doença responsável por altos níveis de mortalidade no mundo. Esta é causada por protozoários parasitos do gênero *Plasmodium*, entre os quais o *P. falciparum* e o *P. vivax* são os de maior importância médica. Parasitos deste gênero apresentam estruturas peculiares, não encontradas em células de mamíferos e constituindo, portanto, interessantes modelos de estudo tanto do ponto de vista da biologia celular quanto para o desenvolvimento de novos fármacos. A maior parte do conhecimento sobre a estrutura e organização morfofuncional de protozoários se deu com a combinação de técnicas bioquímicas, moleculares e de microscopia eletrônica. Estas requerem uma série de etapas no preparo de amostras que notadamente provocam significativas alterações na sua estrutura. O desenvolvimento de métodos de preparo para microscopia eletrônica menos invasivos, como técnicas de fixação física e metodologias complementares, surgiu então como alternativa de preparo para manter a integridade estrutura de material biológico em estado mais próximo do seu estado nativo. Neste trabalho, utilizamos técnicas de criofixação de protozoários parasitas como método de preparo para microscopia eletrônica. Células de *Plasmodium chabaudi* foram criofixadas por congelamento ultrarrápido sob alta pressão e em seguida submetidas à substituição a frio. Os resultados mostraram maior preservação estrutural em células submetidas às criotécnicas, quando comparadas às submetidas a técnicas de fixação química. Em geral, estruturas com organização menos rugosa foram observadas em diferentes domínios da célula hospedeira e dos parasitas, como a membrana do vacúolo parasitóforo e o conjunto de membranas do parasito, indicando sua acentuada preservação estrutural, além de estrutura íntegra dos cristais de hemozoína. Em conjunto, os resultados mostram um papel potencial de métodos de preparo menos invasivos para a compreensão detalhada sobre a organização estrutural destes parasitas, contribuindo assim para diversos estudos que envolvem a biologia da malária.

## ABSTRACT

RACHID, Rachel de Pinho. Aperfeiçoamento de metodologias de criofixação e substituição a frio de *Plasmodium chabaudi* para a visualização em microscopia eletrônica de transmissão. Rio de Janeiro, 2015. Dissertação (Mestrado Profissional em Ciências Biomédicas – Biofísica) – Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2015.

Malaria persists as a disease responsible for high levels of mortality in the world. This is caused by protozoan parasites of the genus *Plasmodium*, including *P. falciparum* and *P. vivax* are the most medically important. Parasites of this kind have peculiar structures not found in mammalian cells and are, therefore, interesting study models both cell biology point of view and for the development of new drugs. Most of the knowledge regarding the structure and organization morphofunctional protozoa occurred with the combination of biochemical techniques, molecular and electron microscopy. These require a number of steps in the preparation of samples that particularly cause significant changes in its structure. The development of methods of preparation for electron microscopy less invasive, such physical attachment techniques and methodologies complementary then emerged as an alternative preparation to maintain the integrity of biological material structure closest state in its native state. In this study, we used cryofixation techniques of protozoan parasites as a preparation method for electron microscopy. Cells were *Plasmodium chabaudi* criofixadas by ultrafast freezing under high pressure and then subjected to cold replacement. The results showed greater structural preservation in cells subjected to criotécnicas compared to undergo chemical fixation techniques. In general, structures with less rough organization was observed in different areas of the host cell and parasites, as the membrane of the parasitophorous vacuole and the parasite membranes set, indicating their strong structural conservation in addition to intact structure of hemozoin crystals. Together, the results indicate a potential role of less invasive methods of preparation for a detailed understanding of the structural organization of these parasites, thus contributing to many studies involving the biology of malaria.

# SUMÁRIO

1- INTRODUÇÃO .....	13
1.1- A tecnologia na Microscopia eletrônica e consequente demanda por novas técnicas. Um breve histórico .....	14
1.2- Métodos tradicionais de fixação utilizados no preparo de amostras para microscopia eletrônica .....	16
1.3- Métodos de criofixação.....	18
1.3.1- Congelamento por imersão (“ <i>Plunge Freezing</i> ”) .....	20
1.3.2- Congelamento por jato de Propano (“ <i>Propane Jet Freezing</i> ”) .....	21
1.3.3- Congelamento por <i>spray</i> (“ <i>Spray-freezing</i> ”) .....	21
1.3.4- Congelamento por impacto (“ <i>Impact or Slam freezing</i> ”).....	21
1.3.5- Congelamento sob alta pressão (“ <i>High Pressure freezing</i> ”) .....	21
1.4 – Substituição a frio (“ <i>Freeze substitution</i> ”) .....	25
1.5 – Aplicações de criotécnicas em protozoários parasitas .....	26
1.5.1 - <i>Plasmodium spp.</i> .....	27
2- OBJETIVOS: .....	32
2.1- Objetivo geral: .....	32
2.2- Objetivo específico: .....	32
2- DESENHO EXPERIMENTAL .....	33
4- METODOLOGIA .....	34
4.1- Cultivo de células e infecção experimental .....	34
4.2- Processamento da amostra para microscopia eletrônica de transmissão.35	
4.2.1- Fixação química – FQ .....	35
4.2.2 - Metodologias de criofixação .....	35
4.2.2.1- Aparelho de Congelamento ultrarrápido sob alta pressão (HPF) .....	35
4.2.2.2- Substituição a frio - FS .....	38
4.3- Observação das amostras.....	39
5- RESULTADOS .....	40
5.1- Aspecto geral de eritrócitos infectados por trofozoítas de <i>P.chabaudi</i> .....	41
5.2- Observação da estrutura da membrana plasmática de trofozoítas de <i>P. chabaudi</i> .....	42

<b>5.3- Ultraestrutura do Núcleo do parasita de trofozoítas de <i>P. chabaudi</i>.....</b>	<b>42</b>
<b>5.4- Ultraestutura da Mitocôndria de trofozoítas de <i>P. Chabaudi</i> .....</b>	<b>42</b>
<b>5.5 - Estrutura dos cristais de hemozoína de trofozoítas de <i>P. chabaudi</i>.....</b>	<b>43</b>
<b>5.6 - Observação da estrutura do retículo endoplasmático rugoso (RER) trofozoítas de <i>P. chabaudi</i>.....</b>	<b>43</b>
<b>7- CONCLUSÃO .....</b>	<b>69</b>
<b>8- REFERENCIAS .....</b>	<b>70</b>

## 1- INTRODUÇÃO

Desde a construção do primeiro microscópio eletrônico na década de 1930, a microscopia eletrônica contribuiu de forma significativa para a consolidação dos conceitos sobre a organização celular e sua importância no campo da ultraestrutura celular. A primeira micrografia eletrônica de tecidos biológicos foi publicada por Morton em 1934 (MORTON, 1934 Apud HAGUENAU *et al.*, 2003), onde as amostras de tecido vegetal observadas apresentavam qualidade e resolução ainda inferior àquela obtida por microscopia óptica. Isso se deveu em parte às limitações da óptica do microscópio, até então contendo ainda uma série de aberrações, e à falta de técnicas adequadas de preparo de amostras biológicas para M.E. Um grande avanço para as ciências da vida se deu então com o desenvolvimento de técnicas de preparo de material biológico. Com o avanço tecnológico, os microscópios eletrônicos foram se especializando e imagens, agora digitais, cada vez com maior resolução vêm sendo obtidas, resultando em uma demanda por novas técnicas de preparo de amostras biológicas que permitam uma maior preservação da ultraestrutura celular.

O preparo de amostras para microscopia eletrônica, por sua vez, requer sucessivas etapas que utilizam fixadores químicos, lavagem em tampões e solventes orgânicos específicos, infiltração em resinas e, finalmente, polimerização a altas temperaturas, etapas que podem potencialmente alterar as estruturas celulares de maneira significativa. Neste sentido, diversos estudos vêm mostrando alterações ultraestruturais em amostras biológicas submetidas às técnicas mais utilizadas para microscopia eletrônica, principalmente devido à utilização de fixadores químicos (HUNZIER, 1984 Apud HSIAO *et al.*, 1991; KOLLENBERGER *et al.*, 1992; GIRARD-DIAS *et al.*; 2012). Deste modo, a necessidade do desenvolvimento de métodos menos invasivos levou ao aperfeiçoamento de técnicas de preparo que provocassem menos alterações na amostra, de modo que esta pudesse ser observada ao microscópio de maneira mais próxima ao seu estado nativo. Entre estas, estão as técnicas de fixação física, conhecidas também como técnicas de congelamento, que se caracterizam por extrair grande calor da amostra em tempos muito curtos, permitindo assim a transição das moléculas de água presentes na amostra do estado líquido para o estado sólido sem a formação de grandes cristais de gelo (processo conhecido como vitrificação). Uma vez criofixado e mantido em

nitrogênio líquido, o material pode ser submetido a outros métodos de preparo, que envolvem etapas específicas para cada tipo de informação desejada. Com os avanços na microscopia acima mencionados e uma maior popularização das criotécnicas, estas técnicas voltaram a ser aplicadas, sendo adaptadas aos diferentes modelos atualmente estudados.

O presente trabalho teve como objetivo a aplicação de técnicas avançadas de criofixação de eritrócitos de camundongo infectados com *Plasmodium chabaudi* e a comparação da preservação estrutural de células submetidas a esta técnica com células submetidas à fixação química. A seguir, serão descritos os princípios envolvidos em alguns procedimentos mais utilizados no preparo de amostras para microscopia eletrônica, assim como os fundamentos teóricos das principais técnicas de criofixação atualmente aplicadas em diferentes modelos celulares.

### **1.1- A tecnologia na Microscopia eletrônica e consequente demanda por novas técnicas. Um breve histórico**

Durante a primeira década da microscopia eletrônica, poucas técnicas de preparo de amostras biológicas foram desenvolvidas. Nas primeiras tentativas, células e pedaços de tecido eram colocados sobre um suporte, expostos a vapor de ósmio e posteriormente desidratados. Este era um material em geral muito espesso e dessa forma, só era possível observar amostras muito finas (em geral projeções de células), com uma espessura que permitisse ser ultrapassada pelo feixe de elétrons. Após o advento da ultramicrotomia, realizada através da impregnação da amostra com resina plástica e a posterior obtenção de cortes finos de tecidos em micrótomo manual com o auxílio de navalhas de vidro (LATTA & HARTMANN, 1950 Apud HAGUENAU *et al.*, 2003), tornou-se possível o estudo de estruturas internas da célula. Esta técnica foi rapidamente aprimorada com o desenvolvimento de um micrótomo exclusivo para processamento de amostras para ME (SJOSTRAND, 1953) e com a utilização de navalhas de diamante. Estes avanços resultaram em cortes mais precisos e finos da célula (FERNÁNDEZ-MORÁN, 1956) e são utilizados até a presente data. Com a possibilidade de estudar estruturas cada vez menores, a busca por preparos de amostra era crescente. Em 1963 iniciou-se a utilização de aldeídos como fixadores, a fim de garantir melhor preservação estrutural (SABATINI, BENSCH & BARNETT, 1963; KARNOVSKY, 1965). Em paralelo ao

desenvolvimento de técnicas que utilizavam fixadores químicos, a aplicação de baixas temperaturas como forma de fixar tecidos foi também desenvolvida (FERNÁNDEZ-MORÁN, 1951).

Com o avanço da ultramicrotomia, houve também uma demanda crescente por novas resinas. Em 1961, Luft iniciou a utilização da resina epoxi Epon, uma resina que não se deformava durante a polimerização (LUFT, 1961), e que se tornou por muito tempo o padrão ouro das resinas hidrofóbicas. A introdução de resinas hidrofílicas polimerizáveis (CARLEMALM; GARAVITO & VILLINGER, 1982) permitiu o desenvolvimento de técnica imunológica associada à microscopia eletrônica imunocitoquímica, técnica de grande importância e utilizada até os dias de hoje na identificação e localização de antígenos específicos.

Além dos métodos de fixação e polimerização acima mencionados, um dos grandes problemas encontrados no preparo de amostras biológicas para microscopia eletrônica de transmissão (MET) era o baixo contraste dos cortes finos. Salvo casos menos frequentes, onde a amostra apresentava eletrondensidade natural, a similaridade de elementos químicos presentes nas moléculas encontradas em diferentes estruturas celulares (em grande parte compostas de carbono, oxigênio, nitrogênio e hidrogênio) não permitia a obtenção de imagens de alto contraste especialmente em cortes finos. Em 1955, Cecil Hall introduziu métodos de contraste, onde utilizou a técnica de contrastação negativa no estudo de partículas virais (HALL, 1955). A partir de então, outros contrastantes foram utilizados, como o citrato de chumbo por Reynolds (REYNOLDS, 1963), acetato de uranila (SILVA, *et al.*, 1970), etc.

Com o desenvolvimento de Microscópios de média e alta voltagem, que trabalham com voltagem de aceleração de elétrons na faixa de 200 a 1000 KV, tornou-se também possível a análise de um maior volume da amostra. Nestes instrumentos, agora equipados com mecanismo de aquisição automática de series tomográficas para posterior aplicação de métodos de reconstrução tridimensional, tornou-se possível o estudo da estrutura tridimensional de diferentes modelos biológicos. O aumento do poder de penetração do feixe de elétrons na amostra permitiu a análise de secções mais espessas. Para uma observação mais fidedigna de estruturas celulares, foi necessário o desenvolvimento de metodologias que gerassem menos

artefatos, sendo estas aprimoradas até os dias atuais e serão mais bem descritas ao longo deste trabalho.

## **1.2- Métodos tradicionais de fixação utilizados no preparo de amostras para microscopia eletrônica**

O processo de fixação química ocorre pela utilização de substâncias que reagem com determinadas moléculas presentes na amostra, estabilizando-as. Os fixadores químicos podem desnaturar proteínas em variados graus. Os que estabelecem ligações cruzadas entre os componentes estruturais da amostra são os utilizados para estudos da ultraestrutura celular. Além disso, fixadores químicos podem ser classificados como não aditivos ou aditivos. Os classificados como não aditivos, como por exemplo o etanol, tem ação coagulante sobre as proteínas, precipitando permanentemente as mesmas, alterando significativamente sua conformação. Em função da necessidade de grande preservação estrutural, estes fixadores não são utilizados para o estudo de ultraestrutura celular. Já com a utilização dos fixadores aditivos como o glutaraldeído e o formaldeído, as proteínas assumem o aspecto de um gel transparente, devido à estabilização estrutural decorrente da formação de ligações cruzadas entre estas e o fixador.

O glutaraldeído é um dos fixadores químicos mais utilizados no processamento de amostras biológicas para microscopia eletrônica e vem sendo aplicado desde 1963 (SABTINI; BENCH & BARNETT, 1963). Composto por cinco carbonos e dois grupamentos aldeídos, quando utilizado em soluções de fixação, resulta na formação de bases de Schiff com os grupamentos amino das proteínas e também com os radicais aminados de dois fosfolipídios das membranas, a fosfatidiserina e a fosfatietanolamina (HOPWOOD, 1969; 1972; 1975).

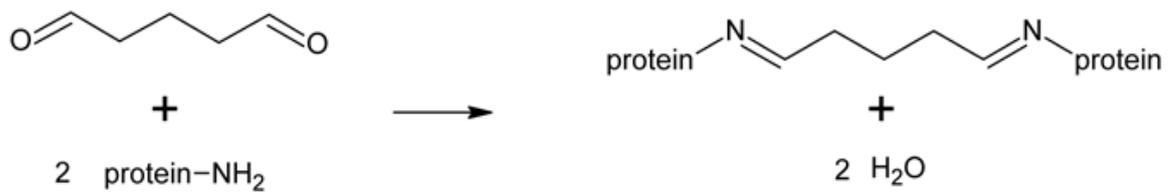


FIGURA 1: Formação da base de Schiff. A figura a cima mostra a formação da base de Schiff, resultado da reação entre o glutaraldeído e o grupamento amino de proteínas, resultando em ligações cruzadas e água. (MIGNEAULT *et al.*, 2004).

O glutaraldeído pode apresentar três diferentes formas em relação a temperatura. Dependendo da temperatura da solução, sua forma ativa varia de  $-60^{\circ}\text{C}$  a  $+40^{\circ}\text{C}$ , como mostra a figura a baixo:

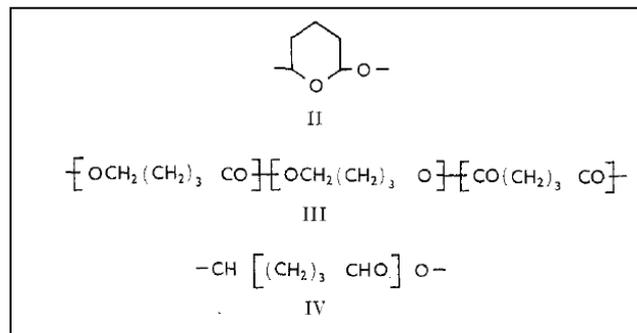


FIGURA 2: Formas químicas do glutaraldeído. Dependendo da temperatura da solução em que se encontra, o glutaraldeído pode apresentar três diferentes formas. A forma II representa a forma encontrada em temperaturas abaixo de  $0^{\circ}\text{C}$ , a forma predominante é a III encontrada a temperatura ambiente, e em menores proporções a forma IV é encontrada, em uma faixa de temperatura bem próxima a de polimerização (adaptada de YOKOTA; SUZUKI & ISHII, 1965).

O formaldeído é um monoaldeído composto por apenas um carbono. Este reage com proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos (FRENCH & EDSALL, 1945) e também é amplamente utilizado em métodos de preparo para ME. Embora possua menor poder de fixação como monoaldeído, por ser pequeno, este composto penetra mais facilmente nos tecidos, atingindo rapidamente regiões teciduais mais profundas. Por este motivo, misturas de formaldeído e glutaraldeído são comumente utilizadas como fixadores utilizados para ME, baseados na fórmula proposta por Karnovsky em 1965 (KARNOVSKY, 1965). Atividades enzimáticas e propriedades imunogênicas são menos comprometidas com o uso formaldeído do que por outros fixadores.

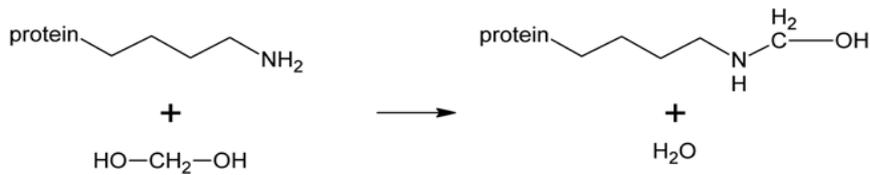
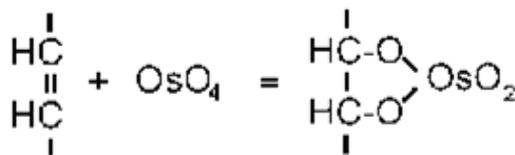


FIGURA 3: Interação de formaldeído com proteínas. A figura mostra a reação entre o formaldeído e proteínas. (KIERNAN,2000)

Outras moléculas também são comumente utilizadas em rotinas de preparo para microscopia eletrônica. Este é o caso do Tetróxido de ósmio ( $\text{OsO}_4$ ), utilizado como fixador desde 1952 (PALADE, 1952 Apud HAGUENAU *et al.*, 2003), conforme exposto anteriormente. Este composto estabiliza e contrasta especialmente fosfolípidios constituintes das membranas, atuando sobre os ácidos graxos insaturados, além de proteger as lipoproteínas naturais dos tecidos, evitando a sua ruptura e coagulação (PORTER & KALLMAN, 1952).



Outro fixador conhecido é o acetato de uranila. Utilizado comumente como um agente contrastante, ao reagir com as membrana biológicas, este proporciona um contraste que permite a visualização de sua estrutura trilaminar. Entretanto, alguns trabalhos demonstram que, após a utilização do acetato de uranila, a extração de proteínas e fosfolípidios de vários tipos celulares é substancialmente reduzida, o que o caracteriza também como um fixador. Por outro lado, sua utilização induz grande extração de glicogênio, o que o torna indesejável na fixação de amostras para microscopia eletrônica, principalmente com a finalidade de localizar carboidratos (SILVA *et al.*, 1968).

### 1.3- Métodos de criofixação

Diferentemente dos métodos que utilizam fixadores químicos, o uso da fixação de amostras biológicas por congelamento não visa estabilizá-la utilizando reagentes que estabeleçam ligações cruzadas com as moléculas presentes na amostra, mas estabilizá-las pela extração de calor. Estes métodos têm como objetivo a

conservação de estruturas da amostra, sem que haja a formação de cristais de gelo que se originam da água presente no meio intracelular. Como a água presente no interior das células se encontra no estado líquido, dependendo da variação da temperatura ou pressão no ambiente onde se encontra a amostra, pode haver conversão do estado líquido da água para o estado sólido ou gasoso. O fenômeno desejado durante o congelamento de amostras biológicas para subsequente observação e análise por microscopia eletrônica é o estado vitrificado, ou seja, gelo em estado amorfo, de maneira homogênea, em alternativa a formação de grandes cristais hexagonais, fenômeno natural do congelamento mais lento (MAYER & MCDOWALL, 1980; DUBOCHET & MCDOWALL, 1981). Outro aspecto a ser considerado é o da propriedade coligativa da água, onde o ponto de fusão da água, entre outras propriedades físico-químicas, dependerá diretamente da quantidade de solutos diluídos no meio. Este princípio associado a metodologia de congelamento será discutido posteriormente.

Sabe-se que a faixa crítica da temperatura de cristalização da água pura se situa entre  $-30^{\circ}\text{C}$  e  $-140^{\circ}\text{C}$ . Logo, o princípio do bom congelamento surgiu com a ideia de resfriar a amostra de modo que a faixa crítica de temperatura de cristalização fosse transposta da maneira mais rápida possível. Como em amostras biológicas há uma quantidade considerável de solutos, a temperatura máxima crítica de cristalização e o ponto de recristalização da água são aumentados, mas o intervalo entre estas diminui, o que diminui consideravelmente esta faixa crítica. Com a incubação da amostra com crioprotetores, acredita-se que esta faixa crítica fique entre  $-10^{\circ}\text{C}$  e  $-40^{\circ}\text{C}$  (DUBOCHET *et al.*, 1983; DUBOCHET *et al.*, 1988; DUBOCHET, 1995).

Observou-se também que a geometria da amostra interfere na eficiência do congelamento, já que o volume máximo de vitrificação de  $1\mu\text{m}$  para água pura é de 2 a 3  $\mu\text{m}$  para amostras biológicas, é multiplicado por 6 caso a amostra seja cilíndrica e até 7 vezes no caso de esféricas (RIEHLE, 1968 Apud MCDONALD, 2014). A escolha do criogênio utilizado para o congelamento também é importante. Os mais utilizados nas metodologias que serão descritas a seguir são o nitrogênio líquido ( $\text{N}_2\text{L}$ ), o propano e o etano. O nitrogênio líquido é o mais conhecido e utilizado. Além de ser facilmente produzido industrialmente, não há contaminação da amostra. Este apresenta ponto de fusão a  $-210^{\circ}\text{C}$  e ponto de ebulição a  $-196^{\circ}\text{C}$ , oferecendo uma desvantagem no congelamento de materiais biológicos por imersão

por possuir temperaturas de ponto de fusão e ebulição muito próximas entre si. Para minimizar os possíveis danos que este criogênio possa gerar ao congelar uma amostra, algumas metodologias foram desenvolvidas e serão descritas a seguir.

Para cada pergunta experimental, há uma técnica ideal de congelamento. Dentre estas, estão os métodos de congelamento rápido e ultrarrápido, que são agrupados nas seguintes modalidades: congelamento por imersão (“*plunge-freezing*”), congelamento por jato de propano (“*Propane Jet freezing*”), congelamento por spray (“*spray-freezing*”), congelamento por impacto (“*slam freezing*”) e congelamento sob alta pressão (“*high pressure freezing*”). Cada um deles será descrito nos próximos tópicos.

### **1.3.1- Congelamento por imersão (“*Plunge Freezing*”)**

O congelamento por imersão é o método mais popular de congelamento, já que consiste na imersão direta e rápida da amostra em um criogênio líquido, sem a necessidade de infraestrutura e instrumentação muito elaborada. Caso seja utilizado o N<sub>2</sub>L, deve ser agitada continuamente para evitar que ocorra o efeito Leidenfrost, fenômeno que ocorre quando o N<sub>2</sub>L entra em contato com uma massa que possua maior quantidade de calor, formando uma massa de gás de temperatura mais alta a seu redor, impedindo que a mesma seja congelada de maneira eficiente. Em geral, amostras que possuem entre 0,1 a 1 µm de espessura são criofixadas eficientemente através desta técnica (LEPAULT *et al.*, 1983). Células em suspensão também podem ser congeladas por imersão. Neste caso, as células são aplicadas a uma grade de cobre coberta com filme de carbono, revestida por um filme (ou incluídas em gelatina) e posteriormente imersas diretamente no criogênio líquido, geralmente propano ou etano previamente resfriados em N<sub>2</sub>L. Amostras mais espessas, até 10 µm, podem ser fixadas por este método, se forem previamente incubadas com um crioprotetor, mas para isso precisam ser levemente fixadas para evitar efeitos osmóticos. Este processo pode ser seguido da técnica de crioultramicrotomia, podendo ser utilizada tanto para o estudo de ultraestrutura celular como para técnicas de imunocitoquímica (TOKUYASU, 1980).

### **1.3.2- Congelamento por jato de Propano (“*Propane Jet Freezing*”)**

O congelamento por jato de propano ocorre de maneira oposta à do congelamento por imersão, a amostra é mantida fixa em uma superfície enquanto o criogênio é adicionado em jatos (VAN VENETIË, *et al.*). O propano é previamente resfriado pelo Nitrogênio líquido em um contêiner pressurizado. O material biológico é colocado ainda vivo em meio de cultura entre duas placas de cobre e em seguida recebe um jato de propano. A amostra congelada necessita ser rapidamente transferida para um recipiente contendo nitrogênio líquido onde será estocada por tempo indeterminado. Este método é apropriado para o congelamento de pequenos fragmentos de tecidos além de células em suspensão, limitando, portanto esta técnica a este tipo de amostra.

### **1.3.3- Congelamento por *spray* (“*Spray-freezing*”)**

Nesse método, o material biológico imerso em suspensão viscosa é lançado sob a forma de *spray* sobre o interior de um recipiente de cobre ou alumínio preenchido com o líquido criogênico, geralmente o propano. Após a evaporação do criogênio (utilizando-se bomba de vácuo), restam gotas da amostra congelada no fundo do recipiente (VAN VENETIË, 1980). Para a utilização desta técnica, a amostra precisa estar em suspensão líquida e em volume pequeno.

### **1.3.4- Congelamento por impacto (“*Impact or Slam freezing*”)**

O método de congelamento por impacto é geralmente utilizado para amostras mais espessas. A técnica consiste no lançamento da amostra em queda livre sobre um metal com alto grau de pureza previamente resfriado em N<sub>2</sub>L. A execução desta técnica possibilita o congelamento eficiente de amostras de até 25µm de espessura. (CROWELL, 1964 Apud NICOLAS, 2005).

### **1.3.5- Congelamento sob alta pressão (“*High Pressure freezing*”)**

O congelamento sob alta pressão foi desenvolvido com a finalidade de aumentar a profundidade de congelamento livre da formação de cristais (ou de tamanho reduzido). Consiste na aplicação uma pressão de 2100 bar durante a injeção de Nitrogênio líquido na câmara contendo a amostra (MOOR, 1968 Apud MOOR, 1987). Segundo o princípio de Le Chatelier, o congelamento induz ao aumento do volume da água (a água organizada no estado cristalino possui volume maior que no estado

amorfo), o que por sua vez induz uma expansão de toda a amostra. A alta pressão no entorno das moléculas da água dificulta esta expansão, induzindo o fenômeno de vitrificação. Desta forma, quando aplicada uma alta pressão durante o congelamento da água pura, seu ponto de congelamento passa a ser de  $-20^{\circ}\text{C}$ . Logo, o congelamento da amostra se torna mais rápido do que a formação de cristais de gelo em seu interior. A maior vantagem desta técnica é possibilitar o congelamento eficiente de amostras de até  $200\ \mu\text{m}$  de espessura. A desvantagem está relacionada à complexidade do processo, exigindo conhecimento prévio do aparelho a ser utilizado, a alta quantidade de criogênio necessário para o processo, além do alto custo do equipamento, indispensável para esta técnica.

A vantagem da aplicação da alta pressão durante o congelamento e sua relação com ganho em espessura da amostra eficientemente congelada é facilmente observada no diagrama proposto por Kanno (KANNO, 1975 Apud STUDER, 2008), que demonstra o estado físico da água em função da temperatura e pressão aplicadas sobre ela. Há uma pressão mínima a ser aplicada, além de temperaturas específicas para que ocorra a nucleação homogênea da água, caso contrário, há formação de cristais de gelo em diferentes formatos e tamanhos, o que pode levar a ruptura de estruturas celulares. Para que isso ocorra, a amostra deve ser pressurizada poucos milissegundos (em torno de  $20\text{ms}$ ) antes de ser congelada.

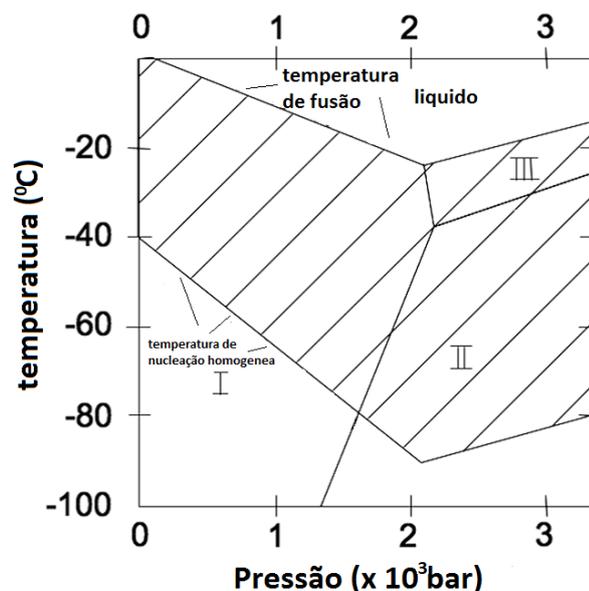


FIGURA 4: Diagrama de Kanno. O diagrama demonstra a relação entre formação de cristais de gelo em relação à temperatura e pressão. "I" representa a formação hexagonal de cristais de gelo, "II"

romboédrico e “III” tetragonal. Já a temperatura de nucleação homogênea da água está representada pela linha assinalada. (KANNO, 1975 Apud STUDER, 2008)

A amostra é inserida, em pequeno volume dentro de um suporte específico na câmara de congelamento do aparelho. Em seguida, nitrogênio na forma líquida é injetado na câmara previamente pressurizada.

O primeiro aparelho especialmente desenvolvido para esta técnica (utilizado durante a realização deste trabalho) funciona da seguinte forma (figura 5): um compartimento inicial (2) é pressurizado com nitrogênio gasoso para uma pressão em torno de 150 bar; essa pressão é elevada para 300 bar com o auxílio de uma bomba de pressão (1); após iniciar ciclos de resfriamento do aparelho, um pequeno volume de etanol é injetado dentro da câmara onde a amostra será congelada (13); a pressão de 300 bar é convertida para alta pressão forçando o nitrogênio líquido a passar do cilindro de alta pressão (7) através da linha de alta pressão (10) para a câmara (13). O fluxo de nitrogênio líquido pressurizado comprime o volume de etanol o expelindo pelo orifício de saída (20); a pressão dentro da câmara aumenta para 2100 bar a uma temperatura ambiente antes do resfriamento da amostra (15) pelo nitrogênio líquido.

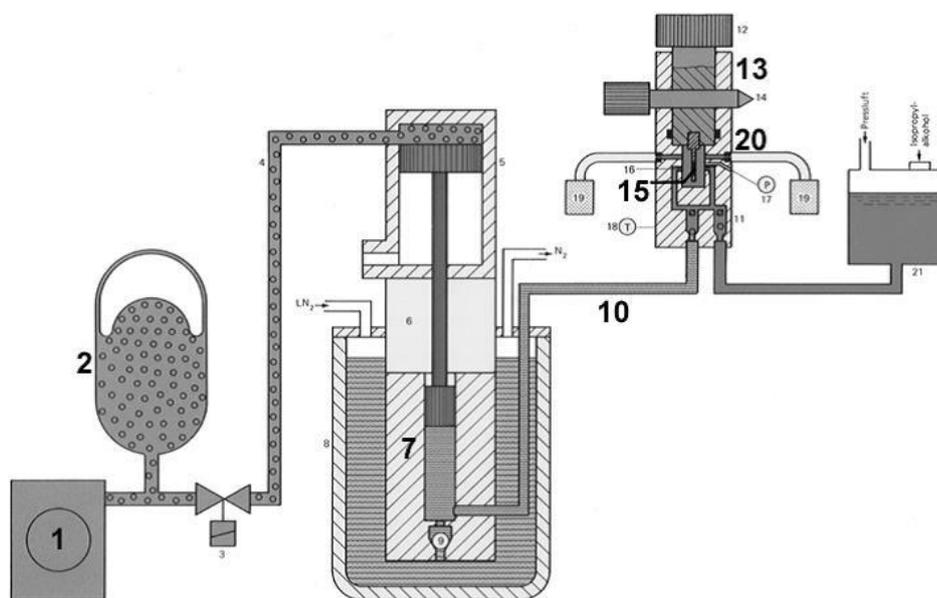


FIGURA 5: Esquema do aparelho de HPF HPM 010 da Bal-Tec. A figura acima representa um esquema mostrando o funcionamento básico do aparelho de HPF da Bal-Tec HPM 010; 1- bomba de alta pressão; 2- compartimento de alta pressão; 7- cilindro de alta pressão; 10- linha de alta pressão; 13- câmara de congelamento da amostra; 15- orifício de entrada do Nitrogênio líquido; 20- orifício de saída do etanol. (HUMBEL, 2009)

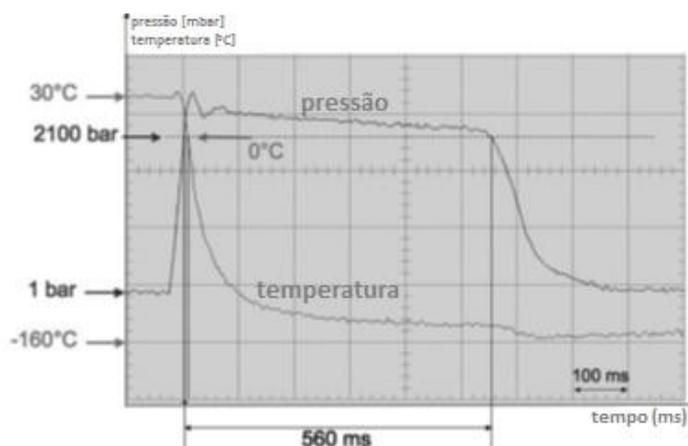


FIGURA 6: Curva de temperatura e pressão obtidas durante o congelamento por alta pressão. O gráfico mostra a relação de temperatura e pressão em relação ao tempo para um congelamento ideal. O processo se inicia com temperatura e pressão ambiente e o congelamento da amostra ocorre a 2100 bar com uma temperatura de  $-160^{\circ}\text{C}$ , após a injeção de nitrogênio líquido (HUMBEL, 2009).

Com o objetivo de garantir um congelamento eficiente, respeitando a faixa de  $200\ \mu\text{m}$  desta técnica, além de facilitar a posterior manipulação da amostra congelada, uma metodologia de congelamento de células em suspensão inseridas em capilares de celulose com diâmetro de  $200\ \mu\text{m}$  foi desenvolvida (HOHENBERG, MANNWEILER & MULLER 1994). Esta metodologia foi a escolhida para criofixação de protozoários, conforme explicitado abaixo.

Após o congelamento, o processamento da amostra deve seguir a metodologia de acordo com a pergunta a ser respondida. Quando o objetivo é a obtenção de cortes finos do material ainda congelado, o material pode ser submetido a técnica de crioultramicrotomia (TOKUYASU, 1980). Para a observação de partículas associadas à membrana plasmática ou partículas intra-membranares, a técnica a ser utilizada é a de Criofratura (BRANTON, 1966 Apud SEVERS, 2007), que também pode ser utilizada para a visualização de amostras ainda congeladas em microscópios eletrônicos de varredura adaptados para este fim. A técnica de substituição a frio, que será mais bem descrita neste trabalho, permite a inclusão do material em resina e posterior estudo ultraestrutural, podendo ser associada a outras técnicas como a tomografia, detecção de elementos por microscopia analítica (Raio-X) e espectroscopia por perda de energia de elétrons (EELS), imunocitoquímica, entre outros.

## 1.4 – Substituição a frio (“*Freeze substitution*”)

Esta técnica primeiramente descrita por Simpson (SIMPSON, 1941 Apud HUMBEL & MUELLER, 1986) se baseia em um processo de desidratação química a baixas temperaturas, onde a água no estado sólido é lentamente removida da amostra através de incubação em um solvente orgânico. A estes solventes (normalmente acetona, etanol ou metanol) podem ser previamente adicionados alguns fixadores químicos que se difundem por toda a amostra durante o período de desidratação. Este processo geralmente ocorre a baixas temperaturas (em torno de  $-80^{\circ}\text{C}$ ) onde os fixadores ainda permanecem em seu estado não ativo, estabelecendo ligações cruzadas somente quando submetidos a uma curva de aquecimento. Assim, garante-se uma melhor estabilidade às estruturas (FERNANDEZ-MORAN, 1955, 1957).

A amostra congelada é transferida para um meio contendo quantidades diferentes de água, um solvente orgânico e os fixadores químicos selecionados. Este meio precisa estar a uma temperatura na qual a água da amostra permaneça congelada para que não haja a recristalização, enquanto o solvente orgânico permanece na fase líquida. Portanto, este meio é mantido a uma temperatura em torno de  $-90^{\circ}\text{C}$ , acima da temperatura de fusão da maioria dos solventes orgânicos, mas abaixo da temperatura de fusão da água. Após a transferência do material para este meio de substituição, a amostra é lentamente aquecida, respeitando-se os tempos necessários para que o solvente remova toda a água da amostra e a ação de cada fixador químico em sua temperatura ótima de atividade seja alcançada. Por fim, a amostra é lavada com o próprio solvente à temperatura de infiltração da resina a ser utilizada, normalmente temperatura ambiente.

Outra vantagem da substituição a frio é combinar técnicas de imunomarcação, com boa preservação antigênica de amostras biológicas e uma melhor preservação morfológica.

Já os fixadores químicos mais utilizados em meios de substituição a frio são glutaraldeído, o tetróxido de ósmio, e o acetato de uranila. O glutaraldeído, tem sua forma ativa na faixa de temperatura entre  $-30^{\circ}\text{C}$  e  $-40^{\circ}\text{C}$ , o tetróxido de ósmio a  $-70^{\circ}\text{C}$  e o acetato de uranila a uma temperatura próxima a ambiente (STUDER, HUMBEL & CHIQUET 2008), como mostra o esquema a seguir:

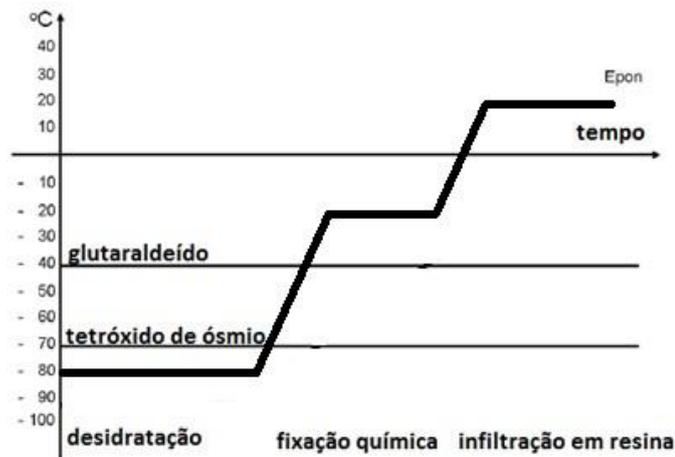


FIGURA 7: Curva de substituição a frio. Relação entre a temperatura (°C) e o tempo para as diferentes etapas (desidratação, fixação química e infiltração) do processo de FS. A amostra congelada permanece a uma baixa temperatura (-80° C) durante o período de 72h, inserida no meio de substituição contendo os fixadores químicos ainda inativos. Este é tempo de desidratação. A amostra é então aquecida lentamente, passando pela temperatura de ativação de cada fixador químico presente no líquido de substituição. A curva de aquecimento é mantida até a temperatura ambiente. (adaptado de HUMBEL, 2009)

## 1.5 – Aplicações de criotécnicas em protozoários parasitas

As técnicas acima descritas foram desenvolvidas utilizando-se tecidos e células de mamífero como objeto de estudo. Para espécimes unicelulares, algumas delas foram adaptadas e, conseqüentemente, para algumas amostras não apresentaram resultados tão satisfatórios. O mesmo já havia sido demonstrado em diferentes áreas do conhecimento.

Dentre os protozoários parasitas de grande interesse em doenças tropicais, o grupo dos apicomplexa (*Toxoplasma*, *Plasmodium*, *Eimeria*, entre outros) merece atenção especial no que se refere aos métodos criogênicos de preparo de amostras. Existem protocolos de HPF-FS para microscopia eletrônica bem estabelecidos para alguns protozoários, como é o caso do *T. cruzi* (GIRARD-DIAS *et al.*, 2012). No entanto, o mesmo protocolo não funciona bem para outros tripanossomatídeos, como por exemplo o *T. brucei*. O mesmo acontece para parasitas do grupo apicomplexa. Trabalhos recentes mostram grande preservação e alto contraste de oocistos de *Eimeria tenella* através de criofixação seguido de substituição a frio (MONAGHAN *et al.*, 2003), porém o mesmo resultado não é obtido com outros parasitas do grupo apicomplexa como *Toxoplasma* e *Plasmodium* (dados do laboratório), quando o mesmo protocolo é aplicado.

Desta forma, para este trabalho foi utilizado como modelo do grupo apicomplexa os parasitos causadores da Malária, iniciando com um representante, o *Plasmodium chabaudi*.

### 1.5.1 - Plasmodium spp

Todos os agentes etiológicos da malária pertencem à família Plasmodiidae e ao gênero *Plasmodium*. Existem mais de cem espécies de *Plasmodium* capazes de parasitar vários tipos de animais, porem quatro são as espécies que normalmente parasitam humanos: *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium malarie*. Destes, o *P. falciparum* é responsável pela maior parte dos casos fatais de Malária (GARCIA, 2004). No Brasil, o maior causador de mortes por malária é o *Plasmodium vivax*. Dos 21 países da América em endemia, o Brasil é o país com maior número de casos (WHO, 2012). Diferentemente da maioria dos patógenos intracelulares, o *Plasmodium* spp. apresenta uma fase do ciclo onde infecta exclusivamente eritrócitos, células desprovidas da maquinaria necessária para o tráfego de proteínas e de todas as organelas comuns às outras células (AIKAWA *et al.*, 1978).

Entre as espécies de *Plasmodium* que parasitam camundongos, o *Plasmodium chabaudi* é o que apresenta maior semelhança do ponto de vista fisiológico, molecular e de mecanismos de invasão e replicação com o *P. falciparum*, incluindo sua invasão preferencial em eritrócitos maduros e o seu desenvolvimento assexual sincronizado. Alguns estudos também têm demonstrado que o *P. chabaudi* e o *P. falciparum* possuem mecanismos semelhantes de resistência às drogas (MARTINS, 2003 Apud STEPHENS, 2011), com isso demonstrando a contribuição do estudo de *P. chabaudi* para o entendimento da biologia da malária (STEPHENS, CULLETON & TRACEY, 2012). Este trabalho foi realizado apenas com as formas eritrocíticas de *P. chabaudi* (anel, trofozoíto e esquizonte).

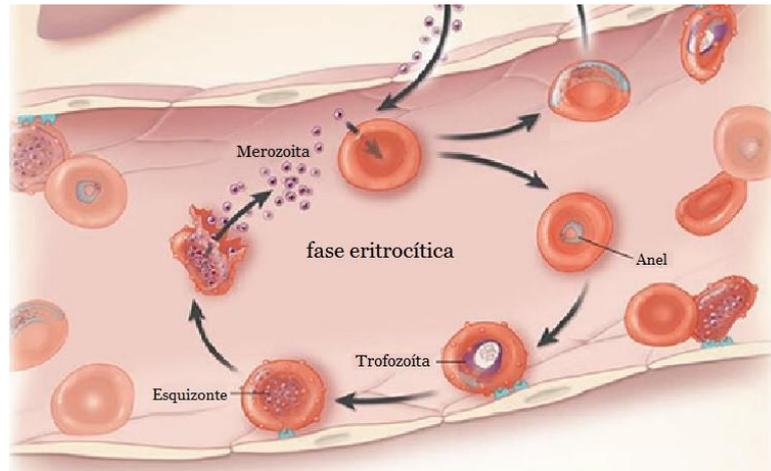


Figura 8: Ciclo eritrocítico da malária. A figura demonstra a fase sanguínea do parasita da malária. O ciclo se inicia com a invasão de merozoítas, estes se diferenciam em anel, trofozoíta, esquizonte, que dará origem a novas formas merozoítas que são liberadas na corrente sanguínea a fim de invadir novas células sanguíneas (adaptado de [www.mcwhelthcare.com](http://www.mcwhelthcare.com))

O ciclo intra-eritrocitário do parasita se inicia quando as formas merozoítas invadem novos eritrócitos e se diferenciam em formas de anel. Após a invasão, o parasita se desenvolve dentro da membrana do vacúolo parasitóforo, que permanece intimamente associado à membrana plasmática do parasita durante o seu desenvolvimento (AIKAWA, 1981; DE SOUZA *et al.*, 2009). Estudos prévios utilizando MET em células quimicamente fixadas mostram que, na fase inicial de anel, a região central do parasita é bastante fina, enquanto a região periférica é mais espessa contendo o núcleo e outras organelas (BANNISTER *et al.*, 2000).

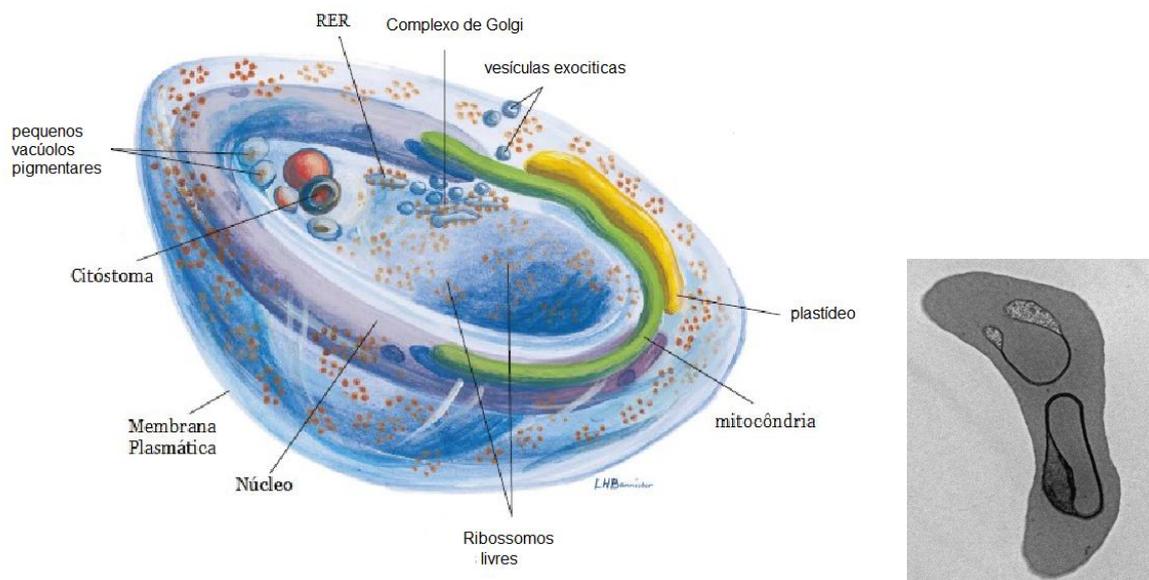


FIGURA 9: Desenho esquemático da ultraestrutura celular da forma anel de *P. falciparum*. Esta fase ocorre 30 minutos após a invasão do parasita. O esquema foi desenhado a partir de micrografias eletrônicas de amostras fixadas quimicamente. (BANNISTER *et al.*, 2000) Ao lado uma micrografia eletrônica de eritrócito infectado por *P. chabaudi* em fase de anel.

Aproximadamente de 20 a 38 horas após a invasão, já na fase de trofozoíta, o parasita se encontra metabolicamente mais ativo e possui tamanho entre 2 e 4  $\mu\text{m}$  de diâmetro, há uma grande quantidade de ribossomos livres devido a constante síntese proteica (BANNISTER *et al.*, 2000). O complexo de Golgi, composto por agregados de cisternas e vesículas tubulares, localiza-se perto do núcleo (BANNISTER *et al.*, 2000).

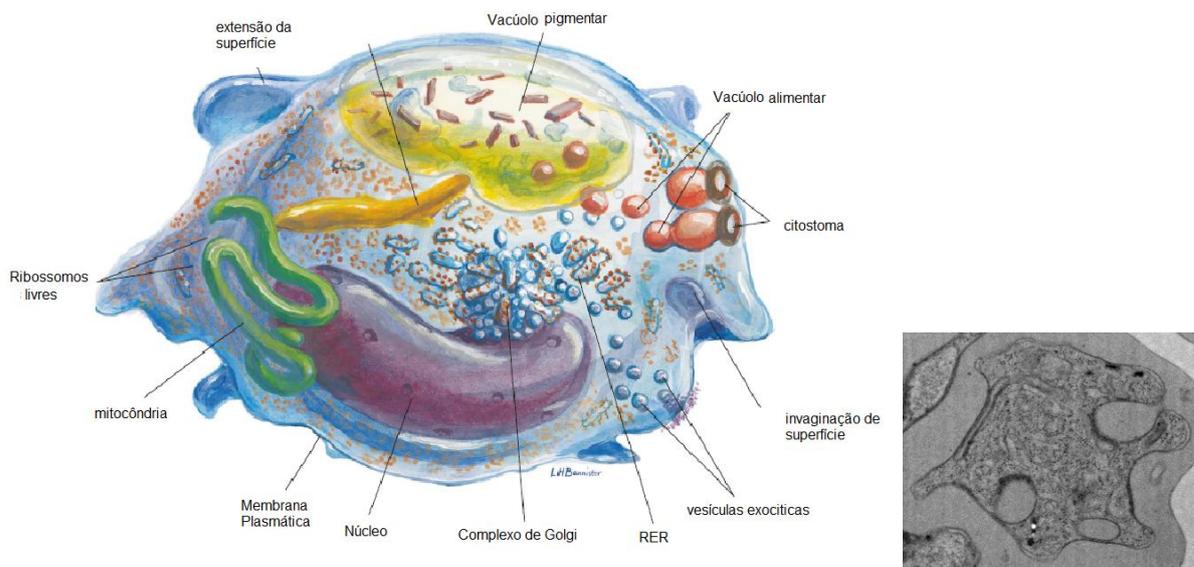


FIGURA 10: Desenho esquemático da ultraestrutura celular do *P. falciparum* na fase de trofozoíta. O esquema foi desenhado a partir de micrografias eletrônicas, de amostras fixadas quimicamente. (BANNISTER *et al.*, 2000) Ao lado uma micrografia eletrônica de eritrócito infectado por *P. chabaudi* em fase de trofozoíta.

Na fase de Esquizonte, de 38 a 48 horas após a invasão, o parasita sofre múltiplos ciclos de replicação do DNA, produzindo de 16 a 20 células filhas (BANNISTER *et al.*, 2000). Este, por sua vez, consome cerca de 80% da hemoglobina da célula hospedeira, ocupando a maior parte do seu volume (LORIA *et al.*, 1999 Apud BANNISTER *et al.*, 2000). O produto da digestão da hemoglobina (heme) é imobilizado em cristais de hemozoína, conhecidos também como pigmento malárico, amplamente utilizado na identificação do protozoário em exames de esfregaço sanguíneo.

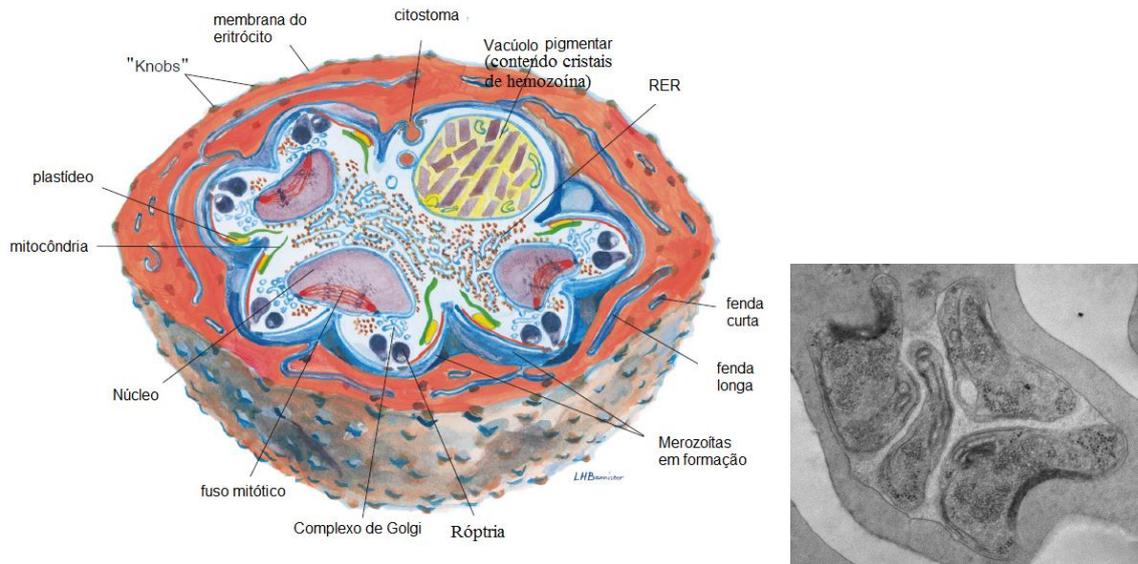


FIGURA 11: Desenho esquemático da ultraestrutura celular da forma esquizonte de *P. falciparum*. Aproximadamente 20 merozoítas são formados, há formação de um grande vacúolo contendo cristais de hemozoína. O esquema foi desenhado a partir micrografias eletrônicas, de amostras fixadas quimicamente. (BANNISTER *et al.*, 2000) Ao lado uma micrografia eletrônica de eritrócito infectado por *P. chabaudi* em fase de esquizonte.

Já na fase final, são gerados merozoítas, capazes de invadir novos eritrócitos.

Vários estudos apontam grande alteração na composição lipídica tanto da membrana da célula parasitada quanto das diferentes membranas do parasita durante a fase intra-eritocitária (MAGUIRE & SHERMAN, 1989; MAGUIRE, PRUDHOMME & SHERMAN, 1990). Durante a esquizogonia, há um aumento na fluidez da membrana do eritrócito da célula hospedeira. Estas chegam a possuir de 300 a 500% de fosfolipídios a mais que células não parasitadas. Também se demonstrou a ocorrência de alterações nas concentrações de fosfatidilcolina e fosfatidiletanolamina durante as formas de anel e trofozoíta. Já na forma de esquizonte, estes fosfolipídios são substituídos por fosfatidilserina na célula hospedeira (KIRK, 2001).

Durante toda fase intra-eritocitária, as membranas do parasita são predominantemente constituídas por fosfatidilcolina, seguida por fosfatidiletanolamina (HSIAO, 1991). Como demonstrado na tabela a seguir:

TABELA 1: Composição lipídica das membranas de *P. falciparum* durante a fase intra eritrocítica.

Composição lipídica (% do total de lipídios)			
Fosfolipídios	MPEN	MPEI	MPP
PC	31.7 ± 2.1	38.7 ± 3.2	56.7 ± 2.0
PE	37.1 ± 2.3	25.0 ± 3.3	26.8 ± 2.1
Shyngomielin	28.0 ± 1.2	14.6 ± 2.6	5.7 ± 1.4
PS	11.7 ± 0.4	9.2 ± 3.1	4.0 ± 1.0
PI	0.8 ± 0.4	2.1 ± 0.9	2.7 ± 0.6
PA	1.4 ± 0.5	1.6 ± 0.7	< 0.1
Cardiolipin	0.0	0.0	5.5 ± 0.5
Lyso-PC	0.8 ± 0.4	1.5 ± 0.9	< 0.1

Sendo: fosfatidilcolina (PC- *Phosphatidilcholine*) e Fosfatidiletanolamina (PE- *Phosphatidilethanolamine*). Em menores proporções, Esfingomielinina (*Sphyngomielin*), fosfatidilserina (PS- *phosphatidylserine*), fosfatidilinositol (PI- *phosphatidylinositol*), ácido fosfatídico (PA- *phosphatidic acid*), cardiolipina (*cardiolipin*) e lyso- *Phosphatidylcholine*. Sendo MPEN- Membrana plasmática de eritrócito não infectado, MPEI- membrana plasmática de eritrócito infectado, MPP- Membrana plasmática do Plasmódio (HSIAO, 1991).

Sabemos que o glutaraldeído estabelece ligações cruzadas com o grupamento amino dos fosfolipídeos como fosfatidiletanolamina e fosfatidilserina, sendo a fosfatidilcolina e a fosfatidiletanolamina mais abundantes na composição tanto da MP de eritrócitos infectados, como na PM do parasita.

Da mesma forma, é possível que a MP do eritrócito possua maior afinidade com o tetróxido de ósmio do que a MP do parasita, devido a maior concentração de esfingomielinina e, portanto, maior quantidade de insaturações. No entanto, não é o que geralmente se observa em amostras fixadas quimicamente. Em geral a MP do parasita apresenta maior eletrondensidade quando comparado a MP do eritrócito.

Este trabalho utilizou, entre outros critérios, a composição lipídica da MP do Plasmódio e da célula hospedeira para o desenvolvimento e aplicação de um protocolo otimizado de substituição a frio para parasitas da malária.

## **2- OBJETIVOS:**

### **2.1- Objetivo geral:**

Este trabalho teve como objetivo estabelecer procedimentos para aplicação da técnica de congelamento ultrarrápido sob alta pressão e adaptação de protocolos já existentes de substituição a frio no processamento de amostras de *P. chabaudi*, para a visualização através da microscopia eletrônica.

### **2.2- Objetivo específico:**

- Estabelecer um protocolo de congelamento ultrarrápido sob alta pressão para eritrócitos de camundongo infectados por *P. chabaudi*.
- Avaliar diferentes formulações de meios de substituição a frio para eritrócitos de camundongo infectados por *P. chabaudi*, considerando sua composição lipídica particular.
  - Avaliar diferentes procedimentos de substituição a frio.
  - Obter protocolo otimizado de criofixação para eritrócitos de camundongo infectados por *P. chabaudi*.
  - Avaliar qual método permite maior preservação estrutural por MET.

## **2- DESENHO EXPERIMENTAL**

Eritrócitos contendo formas intracelulares do parasito *P. chabaudi* foram obtidas de camundongos infectados, conforme será descrito a seguir, e posteriormente crio-fixadas pela a técnica de HPF. Em seguida, foram testados diversos protocolos de FS (esquemáticos no capítulo de resultados). Estes meios foram baseados em informações sobre a composição bioquímica de diferentes membranas e componentes presentes tanto nos parasitas como na célula hospedeira. Após a realização da técnica de substituição a frio, o material foi infiltrado em resina epoxi, polimerizado, e seccionado em ultramicrotomo a fim de ser analisado ao MET. Em paralelo, uma alíquota da mesma amostra foi processada por fixação química para fim de comparação entre os resultados obtidos.

## 4- METODOLOGIA

### 4.1- Cultivo de células e infecção experimental

Foram utilizados camundongos isogênicos normais suíços (por serem mais suscetíveis à infecção com *P. chabaudi*) machos, com seis a oito semanas de idade (em torno de 20 gramas) em todos os experimentos. Os animais foram mantidos e criados no biotério do Laboratório de Ultraestrutura Celular Hertha Meyer, no Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, na Universidade Federal do Rio de Janeiro. Todos os animais foram tratados de acordo com as normas do Guia de cuidados para uso de animais de laboratório (Clark, 1996), e os protocolos de experimentação utilizados foram aprovados pelo Comitê de Ética do Centro de Ciências da Saúde da UFRJ.

Os camundongos foram infectados via intraperitoneal com inóculos contendo formas sanguíneas de *P. chabaudi* obtidas de outro animal infectado ou de estabilados (mantidos em Nitrogênio líquido) descongelados em banho-maria, 37°C por 10 minutos. Em diferentes dias após a infecção, o nível de parasitemia foi determinado através de esfregaços de sangue da veia caudal dos animais infectados, fixados com metanol e corados por Giemsa, ou por panótico, sendo determinada a porcentagem de eritrócitos infectados em 500 hemácias, com amostragem de ao menos 10 campos.

Cada animal experimental foi sacrificado com o auxílio de uma câmara de CO<sub>2</sub>, e o sangue infectado obtido por punção cardíaca.

- *P. chabaudi*: eritrócitos infectados por parasitas da cepa AJ letal, foram mantidos estocados como estabilatos em nitrogênio líquido em meio de congelamento contendo soro fetal bovino estéril com 20% DMSO (v/v), e as passagens de animal para animal foram feitas no máximo até 5 vezes seguidas, para evitar qualquer seleção de cepas virulentas.

Os camundongos infectados foram mantidos em câmara de ciclo circadiano, em um regime de 12 horas no escuro e 12 horas de luz. Desta forma, as diferentes formas do *P. chabaudi* foram obtidas em diferentes horas do dia. Para nos certificar em qual fase do ciclo do desenvolvimento a maior parte da população dos parasitas se

encontrava, houve o acompanhamento por esfregaço sanguíneo corado com Panótico rápido.

## **4.2- Processamento da amostra para microscopia eletrônica de transmissão**

### **4.2.1- Fixação química – FQ**

O sangue infectado dos animais foi centrifugado por 5 minutos a 2000 rpm. Após descartar o plasma, as células foram fixadas em glutaraldeído 2,5% + formaldeído 4% + sacarose 3,8% em tampão PHEM 0,1M (2,5mM de MgCl<sub>2</sub>, 35 mM de KCl, 5 mM de EGTA, 10 mM de Hepes, 30 mM de Pipes), pH 7.2 por 2 horas a 4°C. Em seguida o material foi lavado três vezes em tampão PHEM 0,1M e pós-fixado em tetróxido de ósmio (OsO<sub>4</sub>) 1%, ferrocianeto de potássio 1.25% e cloreto de cálcio 5 mM por 40 minutos no escuro, à temperatura ambiente. As células sanguíneas foram lavadas três vezes em tampão PHEM 0,1M, pH 7.2, desidratadas em concentrações crescentes de etanol, infiltradas e incluídas em Epon. Cortes ultrafinos (70nm) foram obtidos, colhidos em grades de cobre de 300 mesh e contrastados por 40 min em acetato de uranila 5% e em citrato de chumbo por quatro minutos. O material foi observado e fotografado em microscópio eletrônico de transmissão.

### **4.2.2 - Metodologias de criofixação**

#### **4.2.2.1- Aparelho de Congelamento ultrarrápido sob alta pressão (HPF)**

Para a criofixação ultrarrápida sob alta pressão, foi utilizado o aparelho BAL-TEC HPM 010 da Balzers da seguinte forma:



FIGURA 12: Aparelho de HPF HPM 010 da Bal-Tec.

Foram selecionados para o congelamento os suportes metálicos: B1 (3 mm de diâmetro, 0,4 mm de altura, com abertura de 2 mm de diâmetro e 0,2 mm de profundidade) e B2 (3 mm de diâmetro, 0,6 mm de altura, com abertura de 2 mm de diâmetro e 0,4 mm de profundidade), conforme esquematizados abaixo. Quanto a montagem dos suportes, a face escavada de suportes B1 foi posicionado com a face reta de suportes B2. Desta forma a espessura máxima de congelamento foi limitada a de 0,2 mm garantindo uma boa eficiência de congelamento.

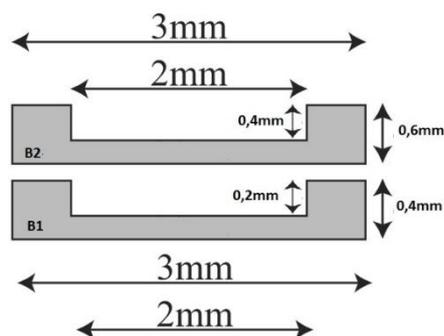


FIGURA 13: Suportes metálicos utilizados durante a técnica de HPF. O esquema acima mostra as dimensões dos suportes específicos utilizados no aparelho de congelamento ultrarrápido sob alta pressão.

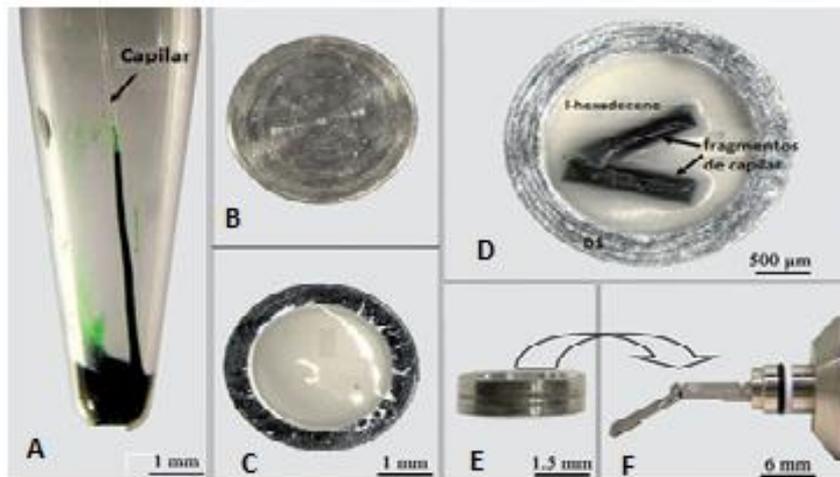


FIGURA 14: Preparo de células em suspensão para o congelamento ultrarrápido sob alta pressão. A figura mostra a montagem da amostra dentro do capilar de celulose, acomodado nos suportes metálicos de congelamento, que por sua vez são posicionadas no porta-amostras específico ao aparelho de HPF (utilizado neste trabalho). “A” representa o capilar inserido tubo plástico contendo o pellet de células; “B” representa a superfície lisa posicionada sobre a superfície escavada “C” contendo I-hexadeceno. “D” representa os capilares contendo a amostra posicionados sobre o suporte escavado. “E” representa os suportes sobrepostos e finalmente “F”, representa o porta amostras específico ao aparelho de congelamento ultrarrápido sob alta pressão. (DAGHMA, 2011)



FIGURA 15: Foto do porta-amostras pronto para o congelamento.

#### ➤ Capilares de celulose

A amostra foi inserida em micro capilares de celulose (200  $\mu\text{m}$  de diâmetro), e o espaço livre entre os fragmentos de capilar e o suporte foi preenchido com I-hexadeceno no intuito de evitar bolhas de ar no interior dos suportes e facilitar a troca de calor com a amostra (STUDER, 1989).

#### 4.2.2.2- Substituição a frio - FS

Para a técnica de substituição a frio, o aparelho da Leica AFS2 foi utilizado. Alguns meios de substituição a frio foram testados, variando as concentrações de glutaraldeído, tetróxido de ósmio, acetato de uranila e água. A curva de aquecimento utilizada foi de 72 horas a  $-90^{\circ}\text{C}$ , 24 horas a  $-20^{\circ}\text{C}$ , 4 horas a  $4^{\circ}\text{C}$  e 1 hora a temperatura ambiente. O resultado apresentado foi gerado a partir da utilização do líquido de substituição contendo 2% de tetróxido de ósmio, 0,5% de glutaraldeído, 0,5% de acetato de uranila, 1% de água em acetona. Os demais serão esquematizados no capítulo de resultados. Já em temperatura ambiente, as amostras foram lavadas em acetona absoluta, infiltradas com resina Epoxi (PolyBed 812) e polimerizado em estufa a  $60^{\circ}\text{C}$  por 48 horas. Depois de polimerizado, seções ultrafinas foram montadas em grades de cobre e contrastadas com acetato de uranila 5% em água por 30 minutos, e citrato de chumbo (Reynolds) por 5 minutos.



FIGURA 16: Aparelho Leica AFS2, utilizado na realização deste trabalho.

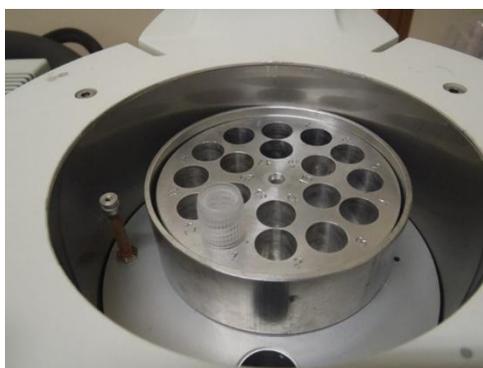


FIGURA 17: Câmara no interior do aparelho Leica AFS2. Local onde as amostras congeladas são transferidas para criotubos contendo o líquido de substituição, e posteriormente submetida a curva de aquecimento adequada a amostra utilizada

### **4.3- Observação das amostras**

As amostras foram observadas nos microscópios eletrônicos de transmissão ZEISS 900, ZEISS 902, e Tecnai Spirit da FEI company 80KV e 120KV respectivamente.

## 5- RESULTADOS

Após o congelamento das amostras por HPF, diferentes meios de substituição foram testados. O solvente orgânico escolhido foi a Acetona, sendo variáveis as concentrações de tetróxido de ósmio, gluataraldeído, acetato de uranila e água. Inicialmente foram testados dois meios com concentração idêntica de tetróxido de ósmio, acetato de uranila e água, contendo ou não gluataraldeído. Em seguida, testamos um meio de substituição também sem o gluataraldeído, porém com maior concentração de água. O quarto meio testado foi composto apenas por tetróxido de ósmio e gluataraldeído diluídos em acetona. Testamos ainda o quinto meio de substituição, com concentrações parecidas com as do segundo meio, porém com um percentual maior de gluataraldeído. As composições destes meios encontram-se resumidas na tabela 2. Dos cinco meios testados, somente um garantiu uma preservação considerada satisfatória. Os demais não apresentaram uma boa preservação estrutural (Fig. 18, 19, 20 e 21). O primeiro meio, contendo 1% de tetróxido de ósmio, 0,5% de acetato de uranila e 1% de água, resultou em pouca preservação estrutural do parasita, foi possível somente a observação dos cristais de hemozoína (seta) (Fig. 18). Para o terceiro meio testado, contendo 1% de tetróxido de ósmio, 0,5% de acetato de uranila e 3% de água, notamos uma boa preservação estrutural para o eritrócito, com um bom contraste, porém o parasito não tão bem preservado, apresentando também descolamento das membranas (Fig. 19). O quarto meio de substituição contendo somente 1% de tetróxido de ósmio e 0,5% de gluataraldeído, apresentou membranas eletondensas, porém sem estruturas internas bem preservadas (Fig.20). Por último, foi testado uma variável do segundo meio de substituição variando apenas a concentração de gluataraldeído para 1% e contendo 1% de tetróxido de ósmio, 0,5% de acetato de uranila e 1% de água (Fig. 21). O resultado foi bem similar ao obtido pelo segundo meio de substituição, porém observamos que algumas estruturas internas do parasita se mostraram mais bem preservadas do que quando utilizada menor concentração de gluataraldeído. O melhor resultado, no entanto, foi obtido utilizando-se o meio de substituição número 2 contendo 1% de tetróxido de ósmio, 0,5% de gluataraldeído, 0,5% de acetato de uranila e 1% de água. A partir deste resultado, analisamos características da amostra e algumas estruturas separadamente e fizemos análises comparativas com amostras fixadas quimicamente. Estas serão mais bem descritas a seguir.

TABELA 2: Diferentes meios de substituição testados ao longo do desenvolvimento deste trabalho (todos os protocolos utilizam acetona absoluta como diluente):

Meio	OsO <sub>4</sub>	GA	AU	Água
1	1%	X	0,5%	1%
2	1%	0,5%	0,5%	1%
3	1%	X	0,5%	3%
4	1%	0,5%	X	X
5	1%	1%	0,5%	1%

### 5.1- Aspecto geral de eritrócitos infectados por trofozoítas de *P.chabaudi*

Ao analisarmos o aspecto geral de eritrócitos infectados por *P. chabaudi*, a diferença característica mais marcante entre as células fixadas quimicamente (Fig.22A) e células criofixadas (Fig.22B) foi o contraste das estruturas e o formato geral dos parasitos e suas estruturas internas. Amostras submetidas a FQ apresentaram membranas mais eletrondensas em relação ao citoplasma tanto da célula hospedeira quanto do parasita, dando impressão de maior destaque em relação a células submetidas a HPF-FS (Fig. 22B). Por outro lado, observamos que o citoplasma de eritrócitos criofixados se apresentou mais contrastados em relação a eritrócitos fixados quimicamente, indicando maior preservação estrutural das moléculas citoplasmáticas nestas células. Em relação aos aspectos morfológicos e estruturais, o parasita em geral apresenta estruturas mais circulares em células criofixadas e não tende a apresentar estruturas polimórficas, como observado em amostras submetidas a fixação química. Esta característica foi avaliada através de medidas de circularidade tanto da célula hospedeira como do parasita. Foram realizadas medidas de circularidade em 30 células submetidas a FQ (Fig. 22A) e 30 células submetidas a HPF-FS (Fig. 22B). Os resultados mostraram diferenças não significativas quanto a circularidade dos eritrócitos (Fig. 23), que se apresentam polimórficos em ambos métodos de preparo. No entanto, medidas de circularidade de parasitas submetidos a FQ e HPF-FS mostraram resultados significativos, corroborando as observações por MET. Os parasitos submetidos ao processamento

por HPF-FS apresentaram circularidade 54% maior quando comparadas aqueles fixados por fixação química (Fig. 24).

## **5.2- Observação da estrutura da membrana plasmática de trofozoítas de *P. chabaudi*.**

Cortes ultrafinos de células submetidas à HPF-FS observados em aumentos superiores aos utilizados na observação do aspecto geral, mostraram diferenças na preservação da totalidade das membranas (Fig. 25). A membrana plasmática de parasitos submetidos a HPF-FS (Fig. 25B-C) apresentou sua estrutura trilaminar notoriamente mais bem preservada em relação a amostra submetida a FQ (Fig. 25A), evidenciando mais facilmente a proximidade entre as membranas do parasito e do vacúolo parasitóforo (Fig. 25C). Em alguns casos, a presença de uma terceira bicamada lipídica foi observada ao longo da membrana do vacúolo parasitóforo em células criofixadas. A impressão de maior contraste das membranas de células quimicamente fixadas parece se dar em função do baixo contraste do citoplasma do eritrócito, provavelmente devido à extração de moléculas durante a FQ, já que em grandes aumentos foi possível notar com certa facilidade a eletrondensidade das membranas de células criofixadas (Fig. 25C).

## **5.3- Ultraestrutura do Núcleo do parasita de trofozoítas de *P. chabaudi*.**

Como dito anteriormente, as membranas em geral apresentaram melhor preservação estrutural em células criofixadas. Isto também refletiu em uma maior preservação do núcleo do parasita (Fig. 26). Em células submetidas a HPF-FS (Fig. 26B), o núcleo apresentou-se de forma mais circular (circularidade 0,99 – 1.0 representa um círculo perfeito), apresentando regiões eletrondensas representando domínios ricos em heterocromatina, além da estrutura trilaminar da membrana envelope nuclear preservada. Em células submetidas à FQ (Fig. 26A), o núcleo não se apresentou circular (circularidade 0,73) e não pareceu ter havido boa preservação do conteúdo genético.

## **5.4- Ultraestutura da Mitocôndria de trofozoítas de *P. Chabaudi*.**

Ao contrário de células de mamíferos e outros protozoários, a mitocôndria de *P. chabaudi* não é facilmente observada em preparações de rotina para MET. No que se refere à morfologia geral, observamos que esta organela apresenta-se de

maneira similar tanto em células quimicamente fixadas (Fig. 27A) quanto em células crio-fixadas (Fig. 27 B). Esta aparece com sua parte central afilada e extremidades mais alargadas. Porém, somente em células submetidas a HPF-FS observamos a presença da membrana interna, com a matriz mitocondrial mais densa (e contrastada), evidenciando a preservação da estrutura interna desta organela.

### **5.5 - Estrutura dos cristais de hemozoína de trofozoítas de *P. chabaudi*.**

Conforme citado na parte introdutória deste trabalho, grande parte do produto da digestão da hemoglobina contida no citoplasma da célula hospedeira é imobilizado no interior do parasito em vacúolos digestivos na forma de cristais de hemozoína (Fig. 28). Observamos uma notória diferença tanto na estrutura dos cristais como em sua distribuição e contraste, entre células quimicamente fixadas (Fig. 28A -B) e células crio-fixadas (Fig. 28C-F). Para as amostras submetidas à FQ, observamos pequenas estruturas eletrondensas amorfas espalhadas pelo citoplasma do parasita. Raras são as evidências de membranas envolvendo essas estruturas. Já as amostras submetidas a HPF-FS, possuem estruturas eletrônicas de aspecto regular comumente agrupadas no interior de compartimentos delimitados por estrutura trilaminar da membrana.

### **5.6 - Observação da estrutura do retículo endoplasmático rugoso (RER) trofozoítas de *P. chabaudi*.**

A análise do aspecto estrutural do retículo endoplasmático rugoso (Fig. 29), mostrou que a estrutura da sua membrana de células submetidas à FQ (Fig. 29A) é mais facilmente observada. Em células submetidas a HPF-FS (Fig. 29B), o lúmen do retículo aparece de forma muito densa e contrastada, dificultando a visualização da membrana. Em geral, esta organela é de difícil reconhecimento, sendo identificada apenas pela presença de ribossomos na sua superfície, como em outros modelos eucarióticos.

**Figura 18: Aspecto geral de eritrócitos infectados cotendo trofozoitas de *P. Chabaudi*. Células submetidas ao meio de substituição n° 1: 1% de tetróxido de ósmio, 0,5% de acetato de uranila e 1% de água. Preservação estrutural de cristais de hemozoína (seta).**

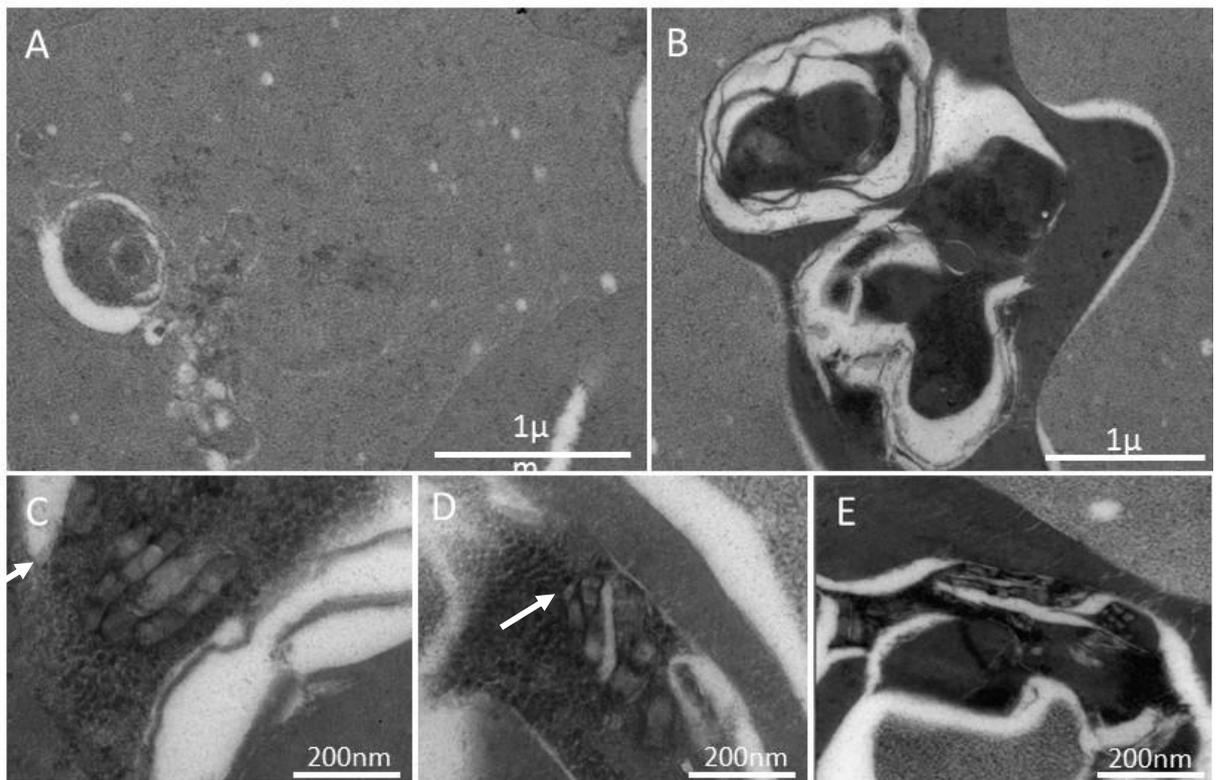
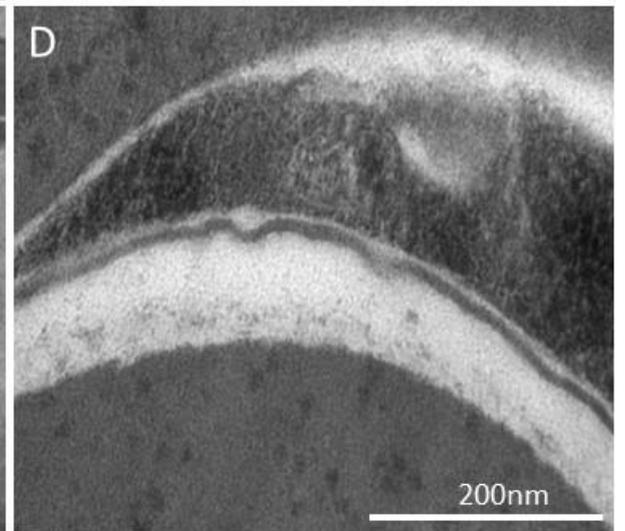
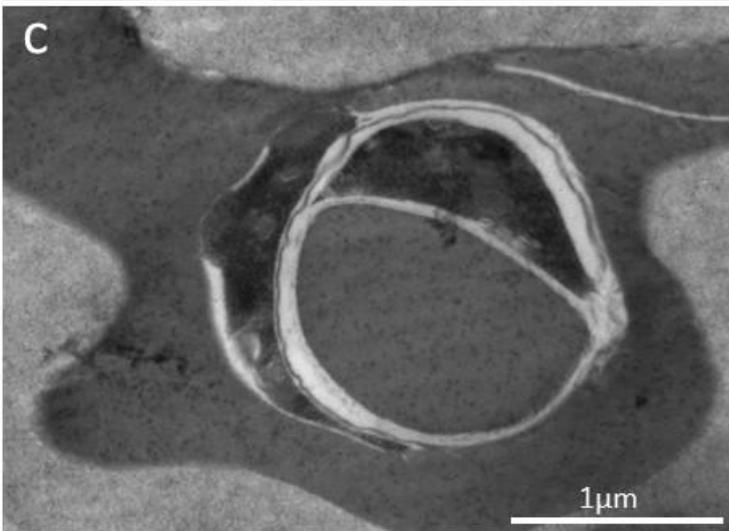
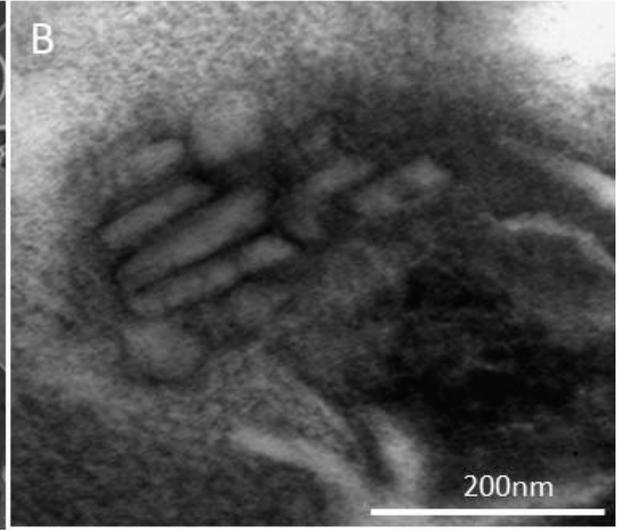
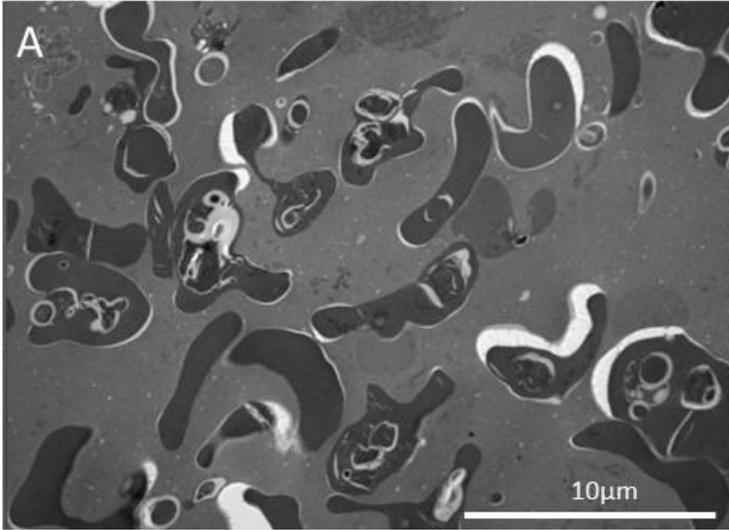
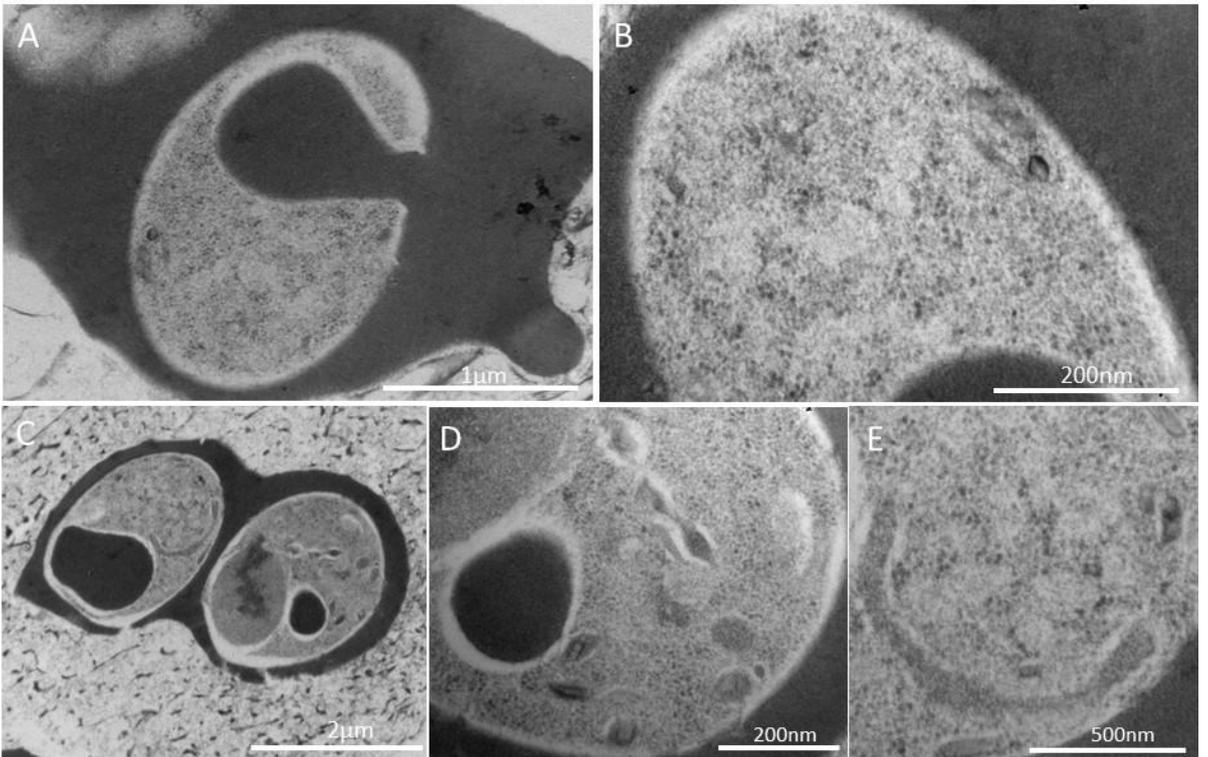


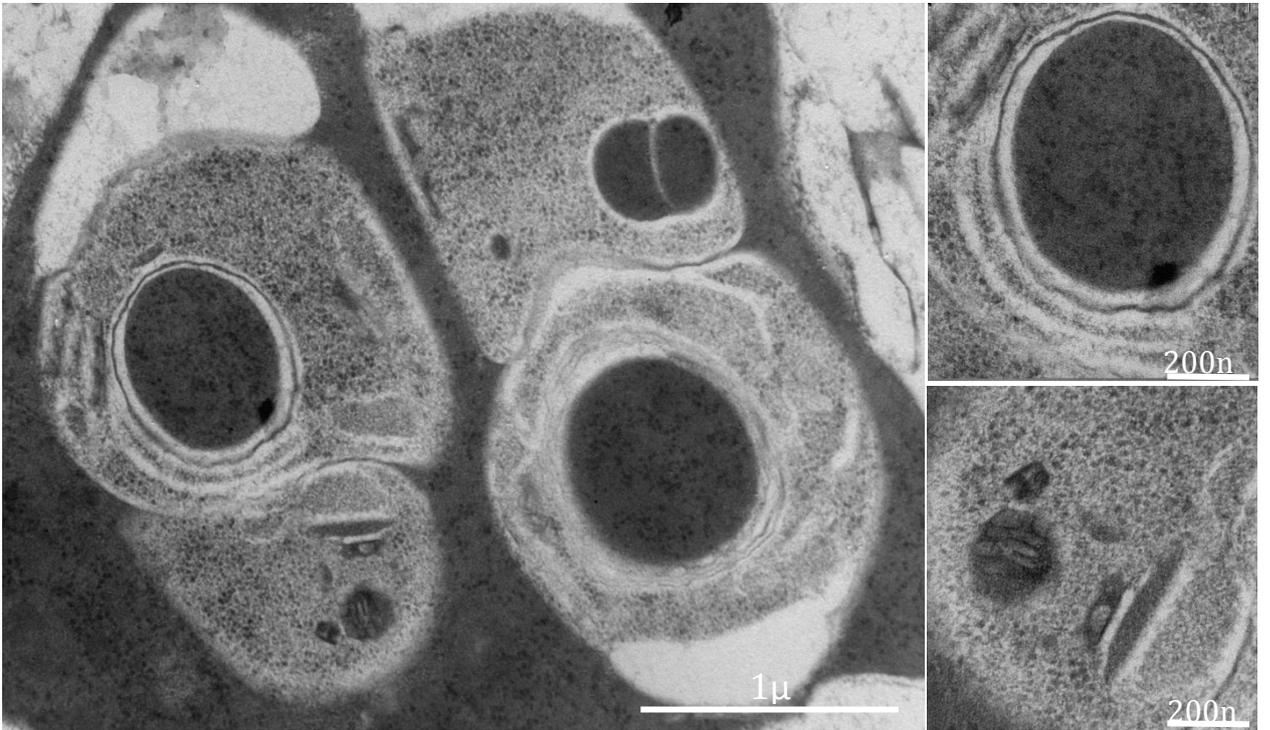
Figura 19: **Aspecto geral de eritrócitos infectados cotendo trofozoitas de *P. Chabaudi***. Células submetidas ao meio de substituição n° 3: 1% de tetróxido de ósmio, 0,5% de acetato de uranila e 3% de água. Não são observados detalhes do citoplasma.



**Figura 20: Aspecto geral de eritrócitos infectados contendo trofozoítas de *P. Chabaudi*.** Células submetidas ao Meio de substituição nº 4: 1% de tetróxido de ósmio, 1% de glutaraldeído, 0,5% de acetato de uranila e 1% de água. Embora as membranas sejam de fácil observação não são observados detalhes do citoplasma.

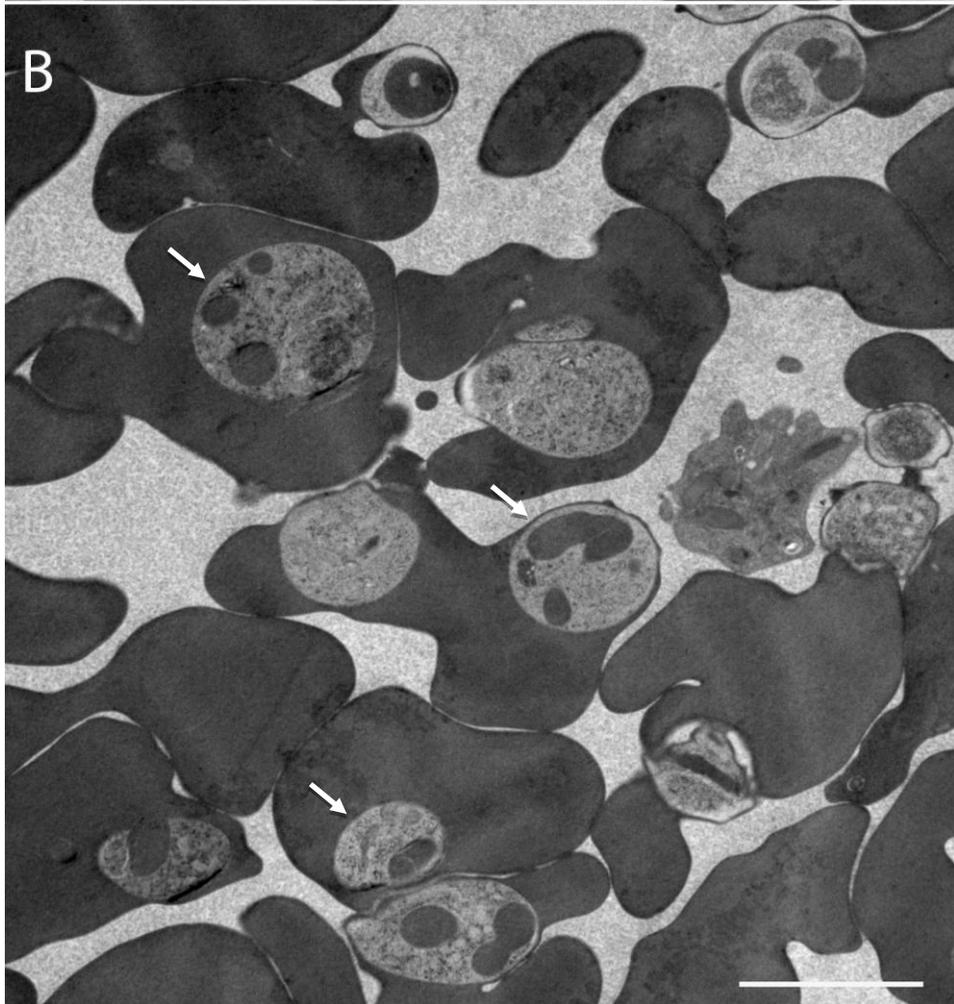
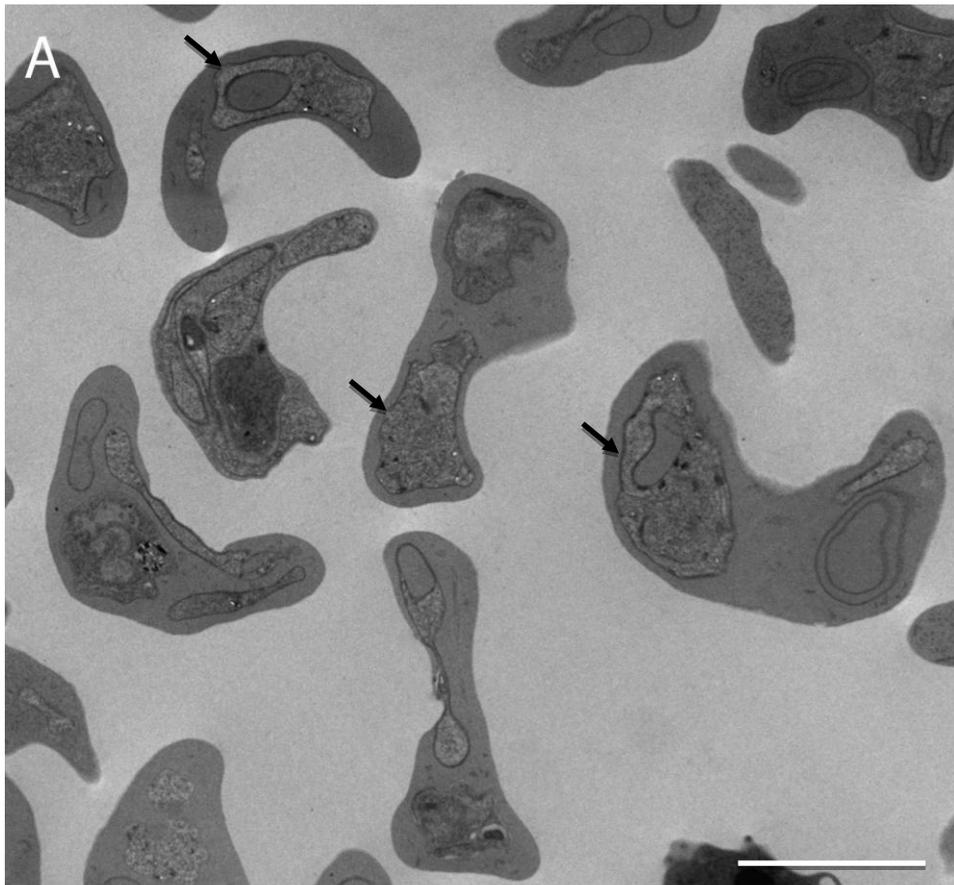


**Figura 21: Aspecto geral de eritrócitos infectados contendo trofozoítas de *P. Chabaudi*.** Células submetidas ao Meio de substituição nº 5: 1% de tetróxido de ósmio, 1% de glutaraldeído, 0,5% de acetato de uranila e 1% de água. A preservação do parasito não foi considerada adequada

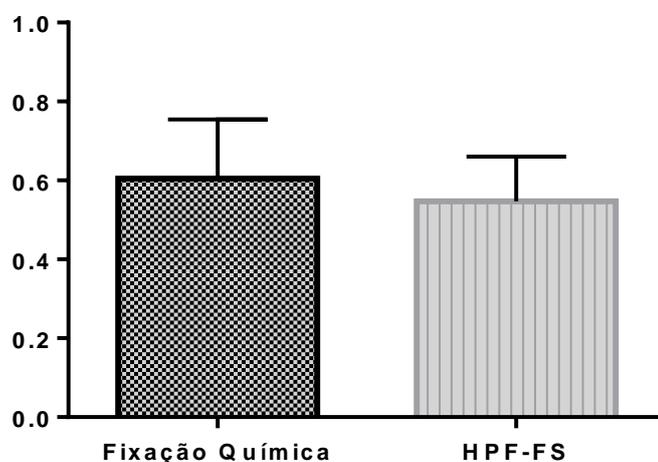


**Figura 22: Aspecto geral de eritrócitos infectados por trofozoítas de *P. chabaudi* obtidas por MET.**

**A-** Eritrócitos de camundongo infectados por *P. chabaudi* processados pelo método da fixação química apresentam forma irregular. Os trofozoítas no interior dos eritrócitos, que são facilmente observados devido à eletrondensidade de suas membranas, também apresentam formas irregulares (setas); **B-** eritrócitos processados por HPF-FS apresentam aspecto eletrondenso e forma irregular. Os parasitos apresentam aspecto circular (setas). (Barras= 5µm)

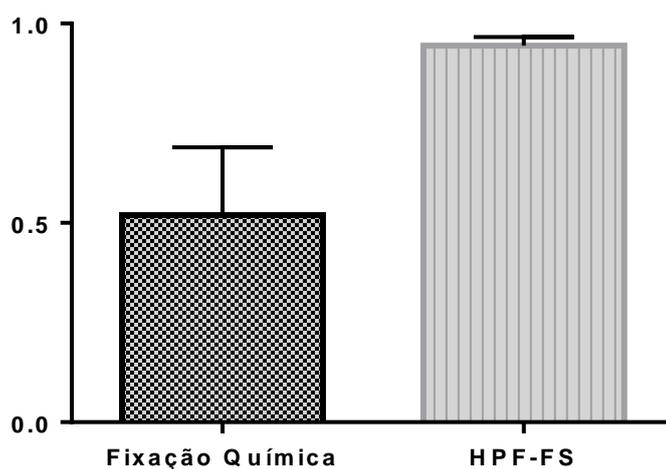


### Medidas de circularidade de eritrócitos infectados por *P.chabaudi*



**Figura 23: Medida de circularidade de eritrócitos infectados por de *P. chabaudi*.** O gráfico mostra que não há diferença significativa em relação a circularidade de eritrócitos submetidos a FQ, e aquela de eritrócitos submetidos a HPF-FS. ( $P= 0,194$ , não significativo)

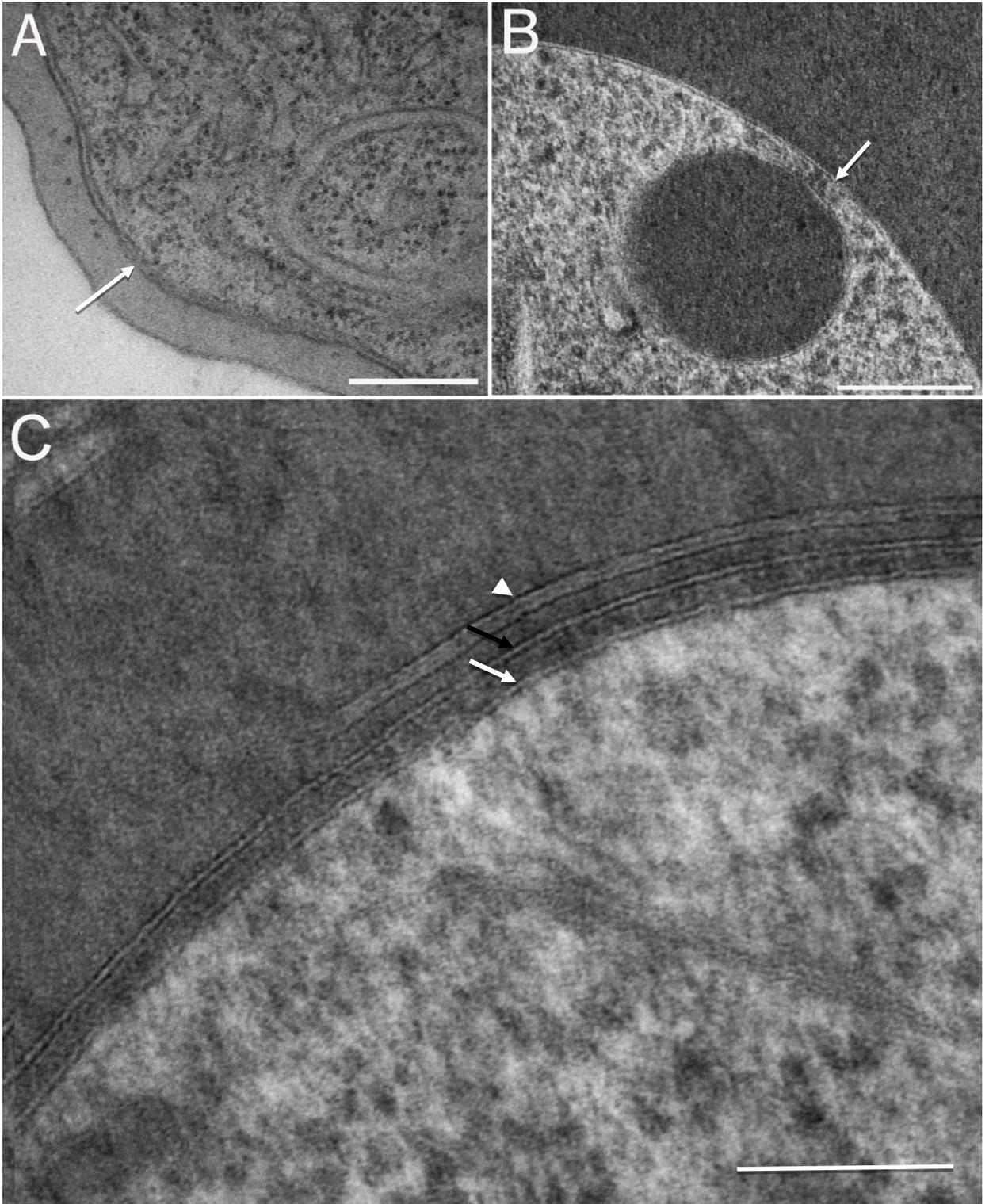
### Medidas de circularidade de *P.chabaudi* em eritrócitos



**Figura 24: Medida de circularidade de trofozoítas de *P. chabaudi*.** A figura mostra os valores de circularidade de trofozoítas de *P. chabaudi* processados pelo método de HPF-FS em comparação àqueles processados por FQ. Os processados por criofixação e substituição a frio apresentaram 54% de maior circularidade comparada a células submetidas FQ. ( $P<0,0001$ , significativo)

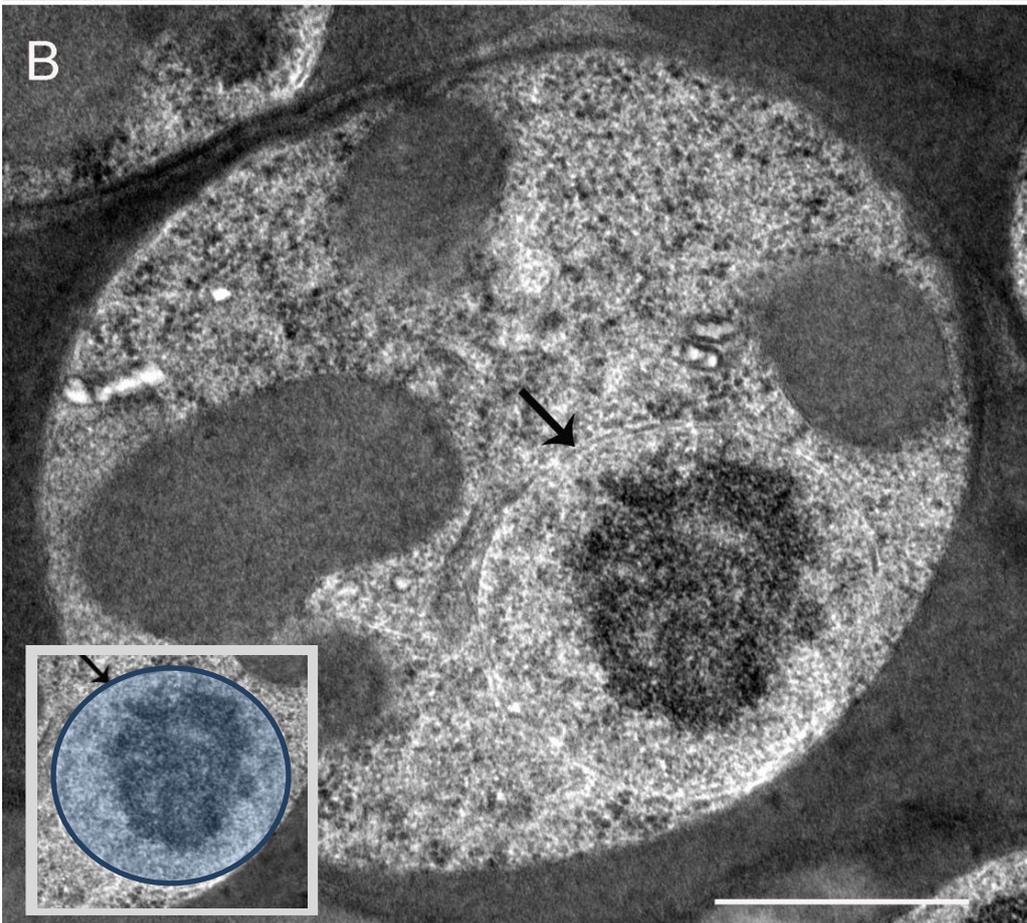
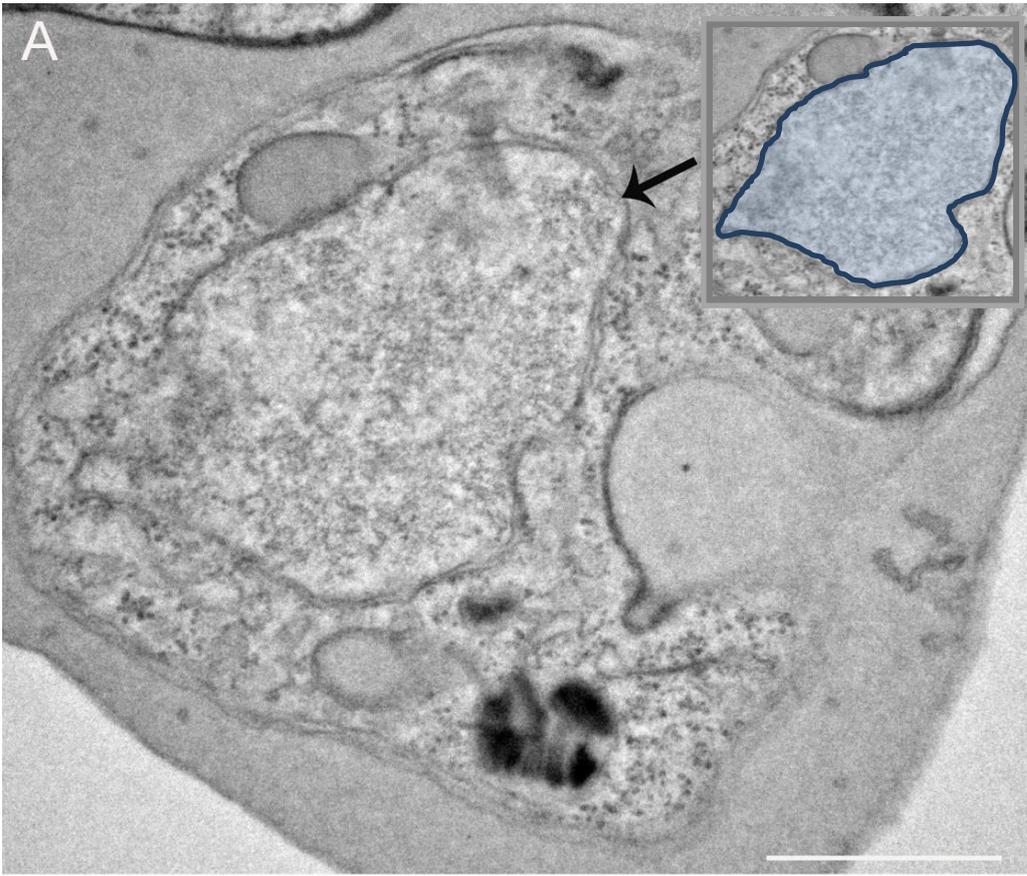
**Figura 25: Aspecto da estrutura da membrana plasmática de trofozoítas de *P. chabaudi* .**

**A-** Estrutura da membrana plasmática de trofozoítas de *P. chabaudi* de células submetidas à fixação química (seta). **B-** Estrutura da membrana plasmática de trofozoítas de *P. chabaudi* de células submetidas à criofixação, indicado por seta. **C-** Estrutura da membrana plasmática de trofozoítas de *P. chabaudi* de células submetidas à criofixação, onde a seta branca indica a membrana do parasita, a seta preta indica a membrana do vacúolo parasitóforo e a cabeça de seta indica a membrana do eritrócito. (Barras= 100nm)



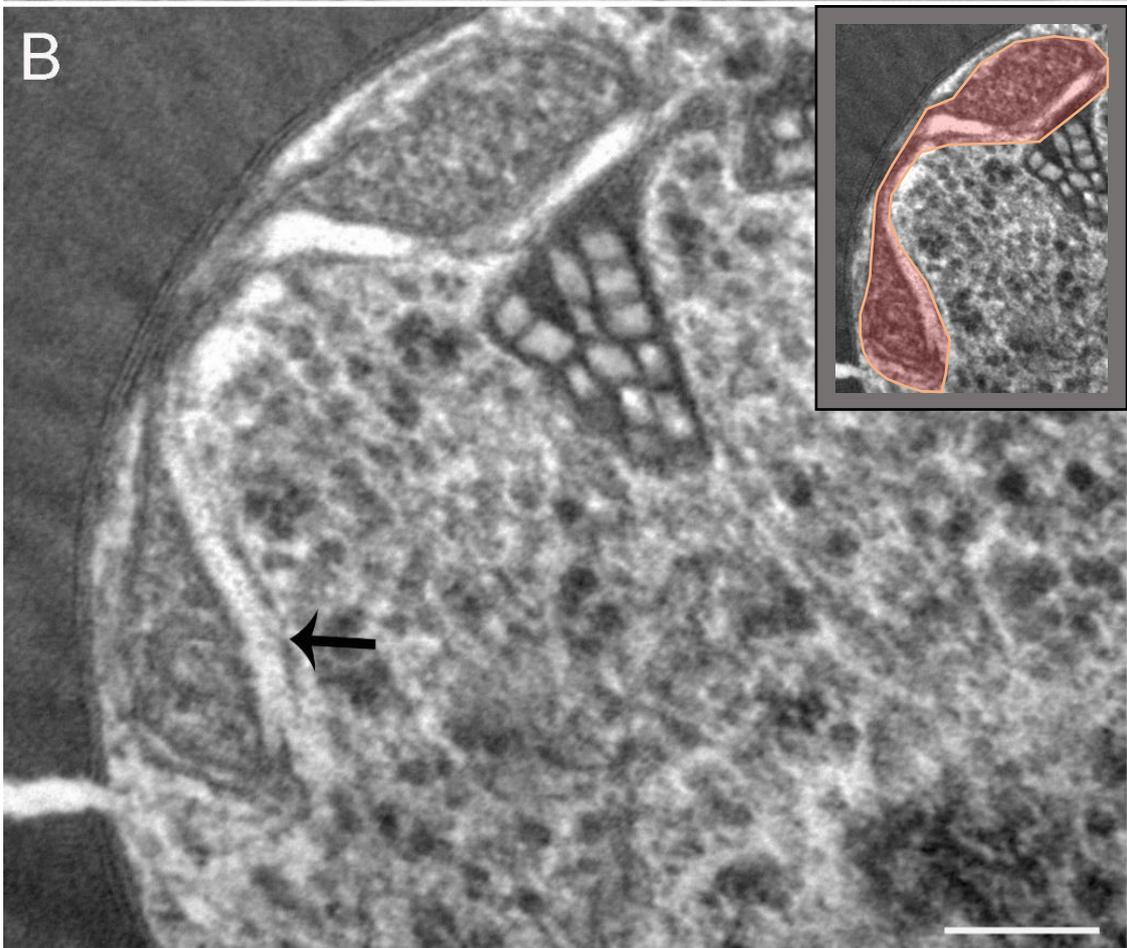
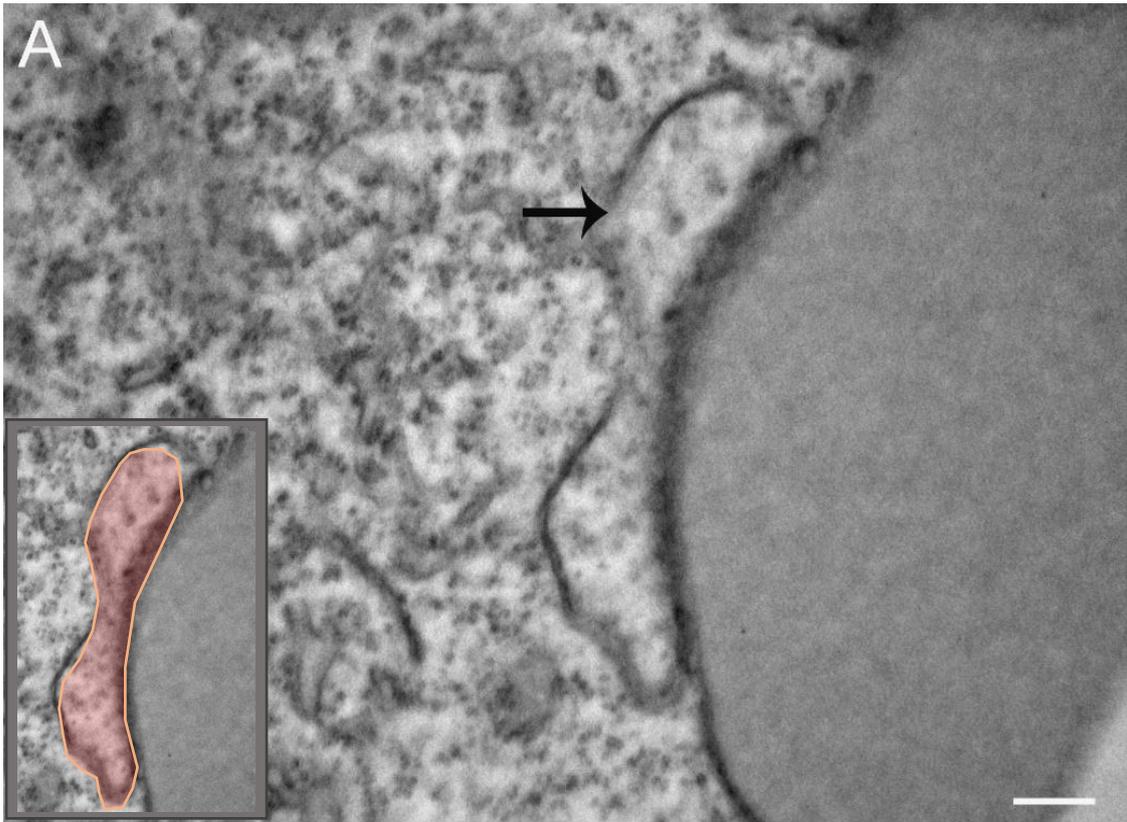
**Figura 26: Aspecto da estrutura do núcleo de trofozoítas de *P.chabaudi*.**

**A-** Estrutura do núcleo de trofozoítas de *P. chabaudi* submetidos à fixação química, apresentando um formato irregular (seta e inset). **B-** Estrutura do núcleo de trofozoítas de *P. chabaudi* submetidos a criofixação, apresentam maior circularidade (seta e inset), além de um visível material genético. (Barras = 200nm)



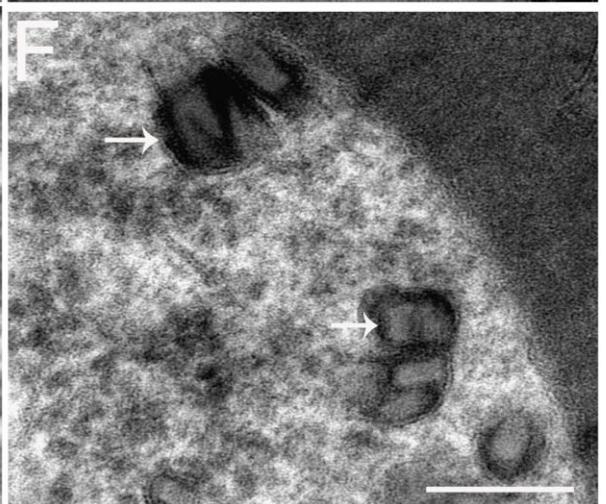
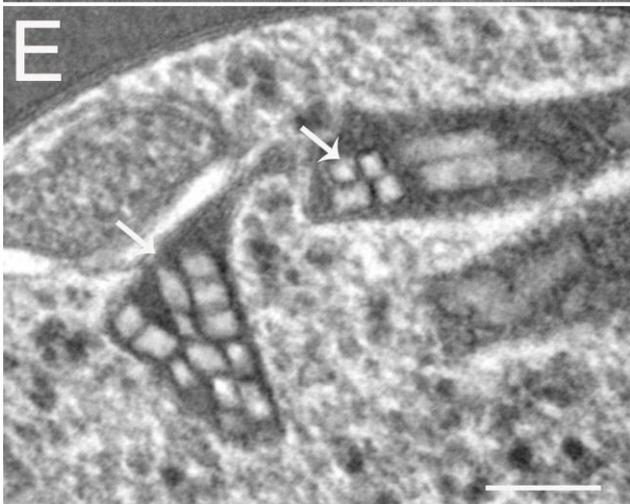
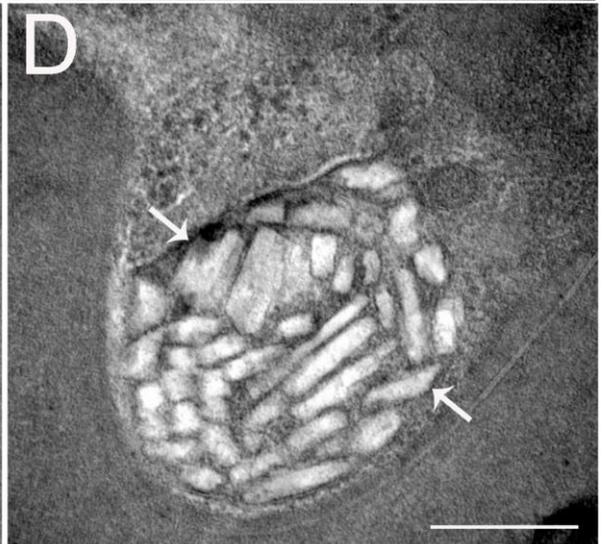
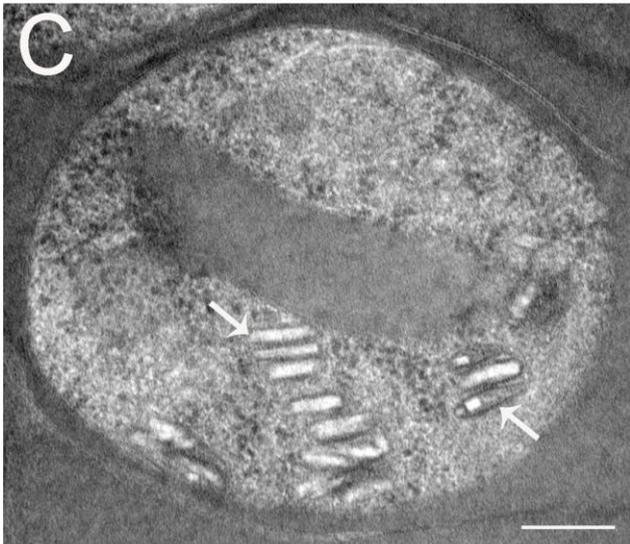
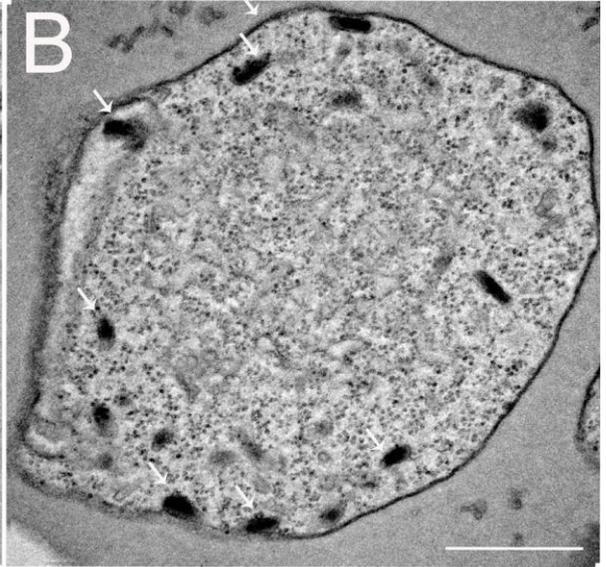
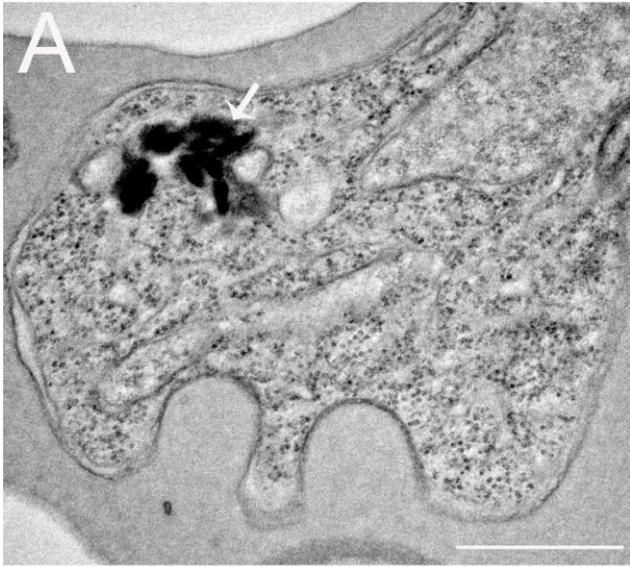
**Figura 27: Aspectos da estrutura da mitocôndria de trofozoítas de *P. chabaudi*.**

**A-** Estrutura da mitocôndria de trofozoítas de *P.chabaudi* submetidos à fixação química (seta e inset). **B-** Estrutura da mitocôndria de trofozoítas de *P.chabaudi* submetidos à criofixação, (seta e inset). (Barras = 200nm)



**Figura 28: Aspecto estrutural dos cristais de hemozoína de *P. chabaudi*.**

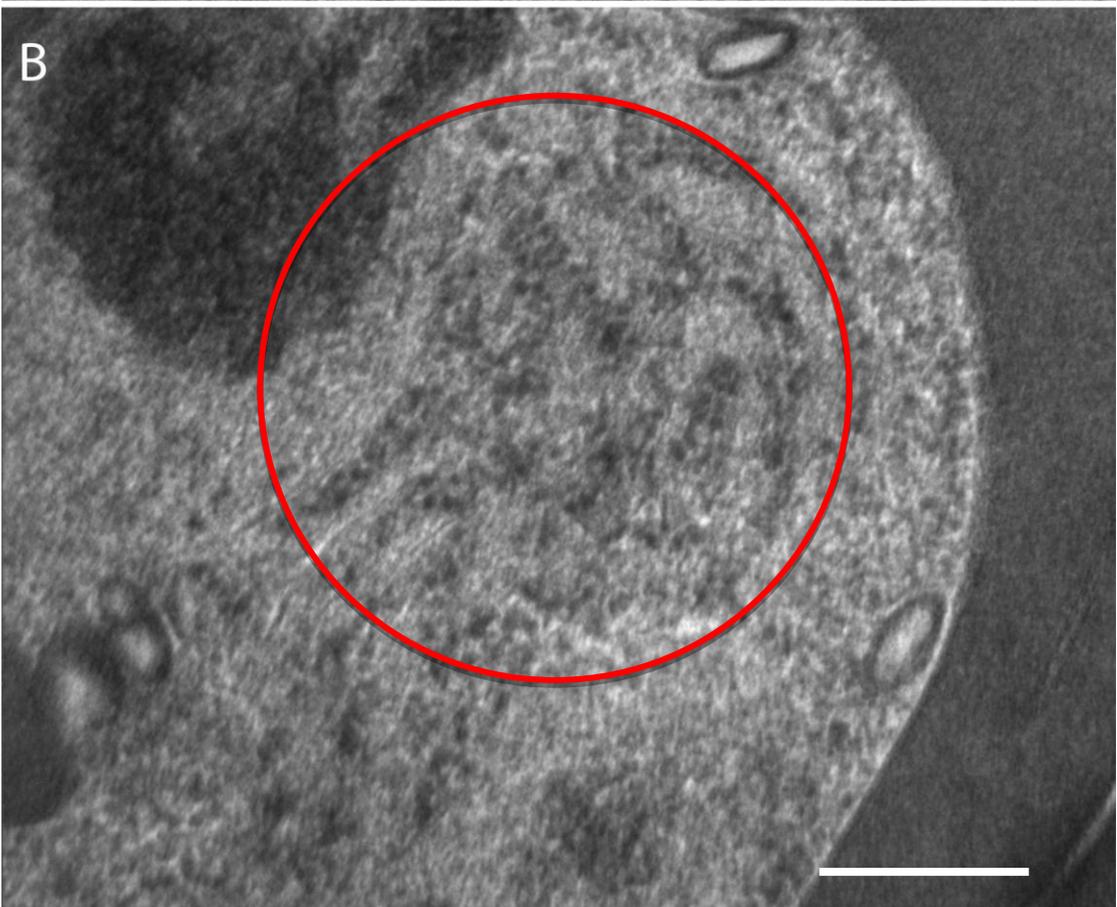
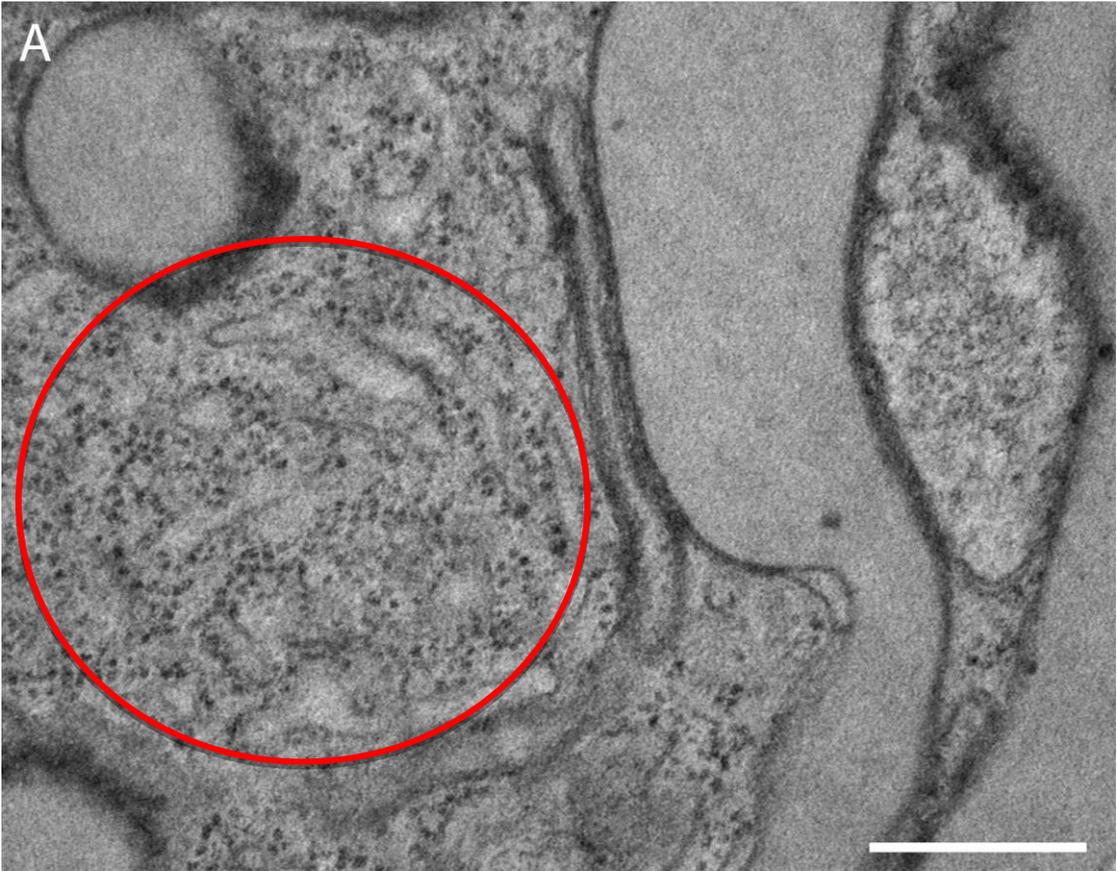
**A e B** - Estrutura dos cristais de hemozoína de trofozoítas de *P.chabaudi* submetidos à fixação química, (setas). **C, E e F**- Estrutura dos cristais de hemozoína de trofozoítas de *P.chabaudi* submetidos a criofixação, (setas). **D**- Estrutura dos cristais de hemozoína de esquizonte de *P.chabaudi* (setas). (Barras = 200nm)



**Figura 29: Aspecto estrutural do reticulo endoplasmático rugoso de trofozoíta de *P. chabaudi*.**

**A-** Estrutura do RER de trofozoítas de *P.chabaudi* submetidos à fixação química, (círculo vermelho).

**B-** Estrutura do RER de trofozoítas de *P.chabaudi* submetidos à criofixação, (círculo vermelho).  
(Barras=200nm)



## 6- DISCUSSÃO

Desde a década de 1980 são discutidas as vantagens e desvantagens tanto da fixação química como da criofixação (SILVA & BECHARA, 1980; MARTI *et al.*, 1987; KELLENBERGER, 1990 Apud HURBAIN & SACHSET, 2011). Este trabalho se baseou na aplicação da técnica de congelamento sob alta pressão seguida pelo teste de diferentes protocolos de substituição a frio, a fim de obter melhor preservação estrutural do *P. chabaudi*. Os resultados mostraram que células submetidas a criofixação apresentaram uma morfologia geral de forma similar ao que se observa por microscopia de luz. É sabido que a utilização de fixadores químicos gera consideráveis alterações estruturais devido ao tempo necessário para penetração dos fixadores nas células e tecidos. Obviamente, os efeitos deletérios do processo de fixação química tendem a aparecer mais na microscopia eletrônica e os diversos artefatos decorrentes da deficiência de fixação que este tempo de penetração acarreta refletem principalmente na morfologia fina das estruturas mais internas das células. Isto explica em parte o fato de não ter havido significativas diferenças morfológicas na superfície e morfologia geral das hemácias entre células fixadas quimicamente e submetidas a HPF-FS, embora o tipo de análise realizada não exclua a possibilidade de que diferenças menores (decorrentes da diferença de fixação de estruturas internas com reflexos na superfície) tenham ocorrido. Alterações morfológicas, por sua vez, podem potencialmente influenciar na interpretação sobre diversas funções celulares. Quando mal interpretados, artefatos de técnica podem levar a conclusões equivocadas sobre as atividades celulares e a correlação estrutura-função de certos componentes. Este é claramente o caso da forma em anel do *Plasmodium*, que tem sido descrito em preparações de MET como uma célula de estrutura bicôncava e que possui este formato para promover uma expansão da área celular para incorporação de hemoglobina, conforme abordado abaixo.

A fixação química estabelece ligações com os diferentes componentes celulares, iniciando com regiões mais externas da amostra passando até a mais interna. Conforme explicitado anteriormente, quanto mais espessa amostra, mais lento é este processo (velocidade de 1-2 $\mu$ m/s) (MERSEY & MCCULLY, 1978 Apud HOPWOOD, 1969), gerando perda de moléculas da região mais interna da amostra, que fica suscetível a osmolaridade do meio. Esta perda de moléculas é minimizada

com o congelamento ultrarrápido, onde a amostra é totalmente fixada em milissegundos (MILLER & MOOR, 1984 Apud MCDONALD, 2013). Além disso, a baixas temperaturas (entre -70°C e -30°C), faixa de temperatura na qual se acredita que o tetroxido de ósmio e o glutaraldeído começam a estabelecer ligações, as proteínas e lipídios não possuem energia térmica suficiente para se moverem (MCDONALD & AUER, 2006 Apud HURBAIN & SACHSET, 2011). Esta é provavelmente a razão para observarmos maior densidade em regiões citoplasmáticas tanto da célula hospedeira quanto do parasito (quando comparados à células fixadas quimicamente). Em células preparadas por HPF-FS, a hemoglobina (tanto do citoplasma da hemácia quanto a endocitada pelo parasita) apresenta-se de forma bastante compactada e contrastada, o que leva a esta sensação de contraste invertido em relação às membranas, especialmente quando as preparações são observadas em baixo aumento.

As criotécnicas, em geral, imobilizam a amostra com maior velocidade, evitando não só grandes mudanças na estrutura celular, como mudanças químicas. Durante a substituição a frio a água é primeiramente retirada, ficando a fixação química das estruturas anteriormente imobilizadas pela extração de calor em uma etapa posterior. Esta metodologia já tem sido utilizada no preparo de amostras que apresentam dificuldade de fixação por difusão ou por se tratar de tecidos sensíveis, como é o caso de células e tecidos vegetais, fungos, bactérias, cartilagem, células nervosas, nematoides, embriões, etc, resultando de uma maneira geral, em uma grande melhoria na preservação de estruturas (EPPERLEIN *et al.*, 1997; HESS, 2007; HUNZIER *et al.*, 1984; MCDONALD & MORPHEW, 1993; MULLER-REICHERT *et al.*, 2008; ANTONY, 2010; STUDER *et al.*, 1992 Apud KNOTT & GENOUD, 2013). Alguns trabalhos recentes já apresentam a aplicação de criotécnicas em protozoários parasitas. Estes já mostram resultados onde há grande preservação estrutural de organelas, como por exemplo a organização das cisternas do Golgi, e a organização dos ribossomos, vacúolo contrátil e elementos do citoesqueleto do *Trypanosoma cruzi* (GIRARD-DIAS *et al.*, 2012). Da mesma forma, alguns parasitos do grupo dos Apicomplexa também já foram submetidos à criofixação e substituídos com sucesso. Este é o caso de oocistos de *Eimeria nieschulzi*, material reconhecidamente de difícil fixação e interpretação (KURTH; WIEDMER & ENTZEROTH, 2011).

A interpretação da morfologia do Plasmódio é importante para uma série de interpretações sobre a biologia deste organismos, desde a distinção das diferentes fases de desenvolvimento do parasita até o efeito biológico de anti-maláricos. A fase de anel, por exemplo, é descrita na literatura como a fase em que o parasita apresenta um formato bicôncavo ou circular (BANNISTER *et al.*, 2000). No entanto notamos que células criofixadas no estágio de anel possuem somente o formato circular, levando a crer que o formato bicôncavo descrito, na verdade, decorre de alteração morfológica ocorrida durante a fixação química. Vale ressaltar que o aspecto circular das células criofixadas se assemelha muito mais às preparações de microscopia óptica. De fato, o termo “anel”, utilizado para descrever as fases iniciais do ciclo intra-eritrocítico, decorre deste formato circular observado na microscopia óptica. O formato ameboide descrito para trofozoítas também não é observado em amostras criofixadas. Nesta fase, estes apresentam membranas mais lineares e também formato arredondado. Em esquizontes, podemos observar um grande vacúolo contendo os cristais de hemozoina, circundado por células semelhantes a merozoítas. Já em amostras fixadas quimicamente, essa semelhança não é observada. O vacúolo contendo os cristais aparece menor, com cristais apresentando morfologia menos preservada. A utilização de células fixadas quimicamente para avaliação do efeito biológico de anti-maláricos, especialmente aqueles com potencial efeito na biogênese de cristais de hemozoína, estratégia utilizada desde os primórdios da quimioterapia anti-malária, certamente não é recomendada. A avaliação de efeito biológico de fármacos nos aspectos morfo-funcionais da biogênese de cristais de hemozoína certamente se daria de maneira mais precisa se esta etapa fosse realizada em células submetidas à criofixação e substituição a frio.

Alguns trabalhos recentes também associaram técnicas de criopreservação de *Plasmodium* a outras metodologias de obtenção de imagens, como tomografia de Raio-X para tecidos moles em *P. falciparum*. Neste caso, o material foi observado no seu estado vitrificado (sem substituição a frio) e apresentou grande preservação estrutural dos cristais de hemozoína, embora com imagens com informação limitada em termos de resolução e contraste tenham sido obtidas.

Com o nosso trabalho, também notamos outras diferenças estruturais comparadas as já descritas. A mais nítida foi no aspecto geral, células quimicamente fixadas com

aspecto ameboides em relação às células criofixadas arredondadas, onde a estrutura trilaminar da membrana plasmática se apresentou de forma linear e muito mais preservada. Além da membrana plasmática, membranas internas como a membrana dos vacúolos, das vesículas, do envelope nuclear e a da mitocôndria apresentaram estrutura trilaminar da bicamada lipídica mais preservada. O plasmódio, possui apenas uma mitocôndria, alongada e grande. Esta organela é descrita como estando sempre bem próxima ao núcleo de células quimicamente fixadas. Considerando o volume interno total da célula e os artefatos comumente observados em células submetidas à fixação química, este é o resultado esperado para estruturas maiores (estas tendem a ficar mais próximas em células que sofreram deformação e se encontram em estado menos túrgido). Nas células submetidas à HPS-FS, onde o aspecto aparece de maneira mais túrgida, mitocôndrias menos alongadas e mais distantes do núcleo foram observadas. Porém para uma melhor interpretação seria necessária a observação tridimensional desta organela através da técnica de tomografia eletrônica.

Também observamos que amostras submetidas à fixação química apresentam o retículo endoplasmático rugoso com aspecto menos contrastado e com poucos ribossomos aderidos quando comparados à células criofixadas. Em células criofixadas, o RER apresenta um contraste luminal tão intenso que a primeira impressão é de que a fixação química permite a melhor preservação organela. É possível que isso esteja relacionado a uma maior preservação do conteúdo não só de moléculas, mas também de íons como o cálcio. Isto pode ser comprovado com microscopia analítica, etapa a ser ainda realizada nestas amostras no futuro.

Por fim, observamos a diferença de preservação dos cristais de hemozoína não se dá apenas na estrutura, mas também em contraste. É possível que este contraste se dê pela maior impregnação do tetróxido de ósmio na estrutura interna do cristal, o que não ocorre nas células submetidas à HPF-FS, que provavelmente possuem a estrutura cristalina da hemozoína mais íntegra e, portanto, deve ser menos suscetível à entrada de ósmio. Estes dados também poderão ser confirmados por microscopia analítica

## 7- CONCLUSÃO

- A ultraestrutura de amostras de *P. chabaudi* se mostrou mais bem preservada em células submetidas a HPF-FS.
- O melhor protocolo de substituição a frio foi obtido através do estudo prévio da composição química da membrana do parasita estudado.
- A fixação otimizada para o estudo de ultraestrutura celular de protozoários parasitas através de técnicas de criofixação deve ser o método de escolha quando se deseja avaliar a organização morfofuncional destas células, especialmente nos casos onde o efeito biológico de anti-maláricos (incluindo aqueles que agem sobre a biogênese de hemozoína) é avaliado.

## 8- REFERENCIAS

ADITYA, NP; VATHSALA, PG; VIEIRA, V; MURTHY, RSR; SOUTO, EB. 2013. Advances in nanomedicines for malaria treatment. *Adv. Colloid. Interface. Sci.*, 201: 1-17.

AIKAWA, M; MILLER, LH; JOHNSON, J; RABBEGE, J. 1978. Erythrocyte entry by malarial parasites. A moving junction between erythrocyte and parasite. *J. Cell Biol.*, 77: 72-82.

AIKAWA, M; MILLER, LH; JOHNSON, J; RABBEGE, J. 1978. Erythrocyte entry by malarial parasites. *J. Cell Biol.*, 77: 72-82.

AIKAWA, M; MILLER, LH; RABBEGE, JR; EPSTEIN, N. 1981. Freeze-fracture study on the erythrocyte membrane during malarial parasite invasion. *J. Cell Biol.*, 91: 55-62

AIKAWA, M; MILLER, LH; RABBEGE, JR; EPSTEIN, N. 1981. Freeze-fracture study on the erythrocyte membrane during malarial parasite invasion. *J. Cell Biol.*, 91: 55-62.

ALLISON, DP; DAW, CS; RORVIK, MC. 1987. The construction and operation of a simple inexpensive slam freezing device for electron microscopy. *J. Microsc.*, 147: 103-108.

BAKAR, NA; KLONIS, N; HANSEN, E; CHAN, C; TILLEY, L. 2010. Digestive-vacuole genesis and endocytic processes in the early intraerythrocytic stages of *Plasmodium falciparum*. *J. Cell Sci.*, 123: 441-450.

BANNISTER, LH; HOPKINS, JM; FOWLER, RE; KRISHNA, S; MITCHELL, GH. 2000. A brief illustrated guide to the ultrastructure of *Plasmodium falciparum* asexual blood stages. *Parasitol. Today*, 16: 427-433.

BANNISTER, LH; HOPKINS, JM; MARGOS, G; DLUZEWSKI, AR; MITCHELL, GH. 2004. Microscopy microanalysis three-dimensional ultrastructure of the ring stage of *Plasmodium falciparum*: evidence for export pathways. *Microsc. Microanal.*, 10: 551-562.

BONE, Q; DENTON, J. 1971. The osmotic effects of electron microscope fixatives. *J. Cell Biol.*, 49: 571-581.

BRENNER, S. & HORNE, RW. 1959. A negative staining technique for high resolution electron microscopy of viruses. *Biochem. Biophys. Acta.* 34: 103-110.

BURSTEIN, NL. & MAURICE, DM. 1979. Cryofixation of tissue surfaces by a propane jet for electron microscopy. *Micron*, 9: 191-198.

BUSER, C. & WALTHER, P. 2008. Freeze-substitution: The addition of water to polar solvents enhances the retention of structure and acts at temperatures around -60C. *J. Microsc.*, 230: 268-277.

- CARLEMALM, E; GARAVITO, RM & VILLINGER, W. 1982. Resin development for electron microscopy and analysis of embedding at low temperature. *J. Microsc.*, 126: 123-143.
- CARSON, FL; MARTIN, JH; LYNN, JA. 1973. Formalin fixation for electron microscopy: a re-evaluation. *Am. J. Clin. Pathol.*, 59: 365-373.
- CASTAING, R. 1954. Microanalysis by means of electron-probe principle and corrections. In *Electron Physics. Nacional Bureau of Standards Circular*, 527: 305-308.
- CHANDLER, JA. (1975). Application of X-ray microanalysis to pathology. *J. Microsc. Biol. Cel.* 22: 425-432.
- COWMAN, AF; CRABB, BS. 2006. Invasion of red blood cells by malaria parasites. *Cell*, 126: 755-766.
- DA SILVA, PP; KACHAR, B. 1980. Quick freezing vs. chemical fixation: capture and identification of membrane fusion intermediates. *J. Cell Biol.*, 4: 625-640.
- DAGHMA, DS; KUMLEHN, J; MELZER, M. 2011. The use of cyanobacteria as filler in nitrocellulose capillaries improves ultrastructural preservation of immature barley pollen upon high pressure freezing. *J. Microsc.*, 244:79-84.
- DE SOUZA, W; ATTIAS, M; RODRIGUES, JCF. 2009. Particularities of mitochondrial structure in parasitic protists (Apicomplexa and Kinetoplastida). *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 41: 2069-2080.
- DEITCH, AD & GODMAN, G. 1955. The application of freezing-substitution method of fixation to tissue culture preparation. *Anat. Rec.*, 1: 123-127.
- DLUZEWSKI, AR; FRYER, PR; GRIFFITHS, S; WILSON, RJM; GRATZER, WB. 1989. Red cell membrane protein distribution during malarial invasion. *J. Cell Sci.*, 92: 691-699.
- DUBOCHET, J & MCDOWALL, AW. 1981. Vitrification of pure water for electron microscopy. *J. Microsc.*, 124: RP3-RP4.
- DUBOCHET, J. 1995. High-pressure cryoelectron freezing for microscopy. *Trends Biotechnol.*, 5: 366-368.
- DUBOCHET, J. 2007. The physics of rapid cooling and its implications for cryoimmobilization of cells. *Methods Cell Biol.*, 79: 7-21.
- DUBOCHET, J; ADRIAN, M; CHANG, JJ; HOMO, JC; LEPAULT, J; MCDOWALL, AW; SCHULTZ, P. 1988. Cryo-electron microscopy of vitrified specimens. *Biophysics*, 21: 129-228.
- DUBOCHET, J; MCDOWALL, AW; MENGE, B; SCHIMID, EM; LICKFELD, KG. 1983. Electron microscopy of frozen-hydrated bacteria. *J. Bacteriol.*, 155:381-390.

- DUBOUCHET, J. 1995. High pressure freezing for cryoelectron microscopy. *Trends Cell Biol.*, 5: 366-368.
- DUCUMB, P; EMMA, A. 1968. A combination of electron microscopy and microprobe analyzer. *J. Microsc.*, 7: 581-589.
- ELFORD, BC; COWAN, TGM; FERGUSON, DJP. 1995. Parasite-regulated membrane transport malaria-infected erythrocytes. *Biochem. J.*, 308: 361-374.
- ERK, I; NICOLAS, G; CAROFF, A; LEPAULT, J. 1998. Electron microscopy of frozen biological objects: A study using cryosectioning and cryosubstitution. *J. Microsc.*, 189: 236-248.
- ESHAR, S; DAHAN-PASTERNAK, N; WEINER, A; DZIKOWSKI, R. 2011. High resolution 3D perspective of Plasmodium biology: advancing into a new era. *Trends Parasitol.*, 27: 548-554.
- FEDER, N & SIDMAN, R. 1958. Methods and Principles of fixation by freeze-substitution. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 4: 593-603.
- FERNANDEZ, PP; OTERO, L; GUIGNON, B; SANZ, PD. 2006. High-pressure shift freezing versus high-pressure assisted freezing: Effects on the microstructure of a food model. *Food Hydrocolloids*, 20: 510-522.
- FERNÁNDEZ-MORÁN, H. 1956. Applications of diamond knife for ultrathin sectioning to study of the fine structure of biological tissues and metals. *J. Biophys. Biochem.*, 4: 29-31.
- FERNÁNDEZ-MORÁN, H. 1951. Low-temperature preparation techniques for electron microscopy of biological specimens based on rapid freezing with liquid helium i. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 85: 689–713.
- FISHER, DB & HOUSLEY, TL. 1972. The Retention of water-soluble compounds during freeze-substitution and microautoradiography. *Plant Physiol.*, 49: 166-171.
- FRENCH, D & EDSALL, J.1945. The reaction of formaldehyde with amino acids and proteins. *Adv. Protein. Chem.* 2: 277-335.
- GARCIA, L. S. Malaria. *Clin. Lab. Med.* 30, 93–129, 2010.
- GIDDINGS, TH. 2003. Freeze-substitution protocols for improved visualization of membranes in high-pressure frozen samples. *J. Microsc.*, 212: 53-61.
- GIRARD-DIAS, W; ALCÂNTARA, CL; CUNHA-SILVA N; DE SOUZA, W; MIRANDA K. 2012. On the ultrastructure organization of *Trypanosoma cruzi* using cryopreparation methods and electron tomography. *Histochem. Cell Biol.*, 138: 821-831.

- GRÜRING, C; HEIBER, A; KRUSE, F; UNGEFEHR, J; GILBERGER, T; SPIELMANN, T. 2011. Development and host cell modifications of *Plasmodium falciparum* blood stages in four dimensions. *Nature Commun.*, 2: 1-11.
- HAGUENAU, F; HAWKES, PW; HUTCHISON, JL; JEUNEMAÎTRE, BS; SIMON, GT. 2003. Microscopy microanalysis key events in the history of electron microscopy. *Microsc. Microanal.*, 9: 96-138.
- HALL, CE. 1955. Electron densitometry of stained virus particle. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 1: 1-12.
- HALL, TA. 1971. The microprobe assay of chemical elements. In *Physical Techniques in Biological Research*. Vol. I A. Optical Techniques (2nd. edition) (Ed. G. Oster), pp. 158-275. Academic Press, New York & London.
- HANSEN, E; DEKIWADIA, C; RIGLAR, DT; RUG, M; LEMGRUBER, L; COWMAN, AF; CYRKLAF, M; KUDRYASHEV, M; FRISCHKNECHT, F; BAUM, J; RALPH, S. 2013. Electron tomography of *Plasmodium falciparum* merozoites reveals core cellular events that underpin erythrocyte invasion. *Cell. Microbiol.*, 15: 1457-1472.
- HANSEN, E; GOLDIE, KN; TILLEY, L. 2010. Ultrastructure of the asexual blood stages of *Plasmodium falciparum*. *Methods Cell Biol.*, 96: 93-116.
- HANSEN, E; KNOECHEL, C; DEARNLEY, M; DIXON, MWA; LE GROS, M; LARABELL, C; TILLEY, L. 2012. Soft X-ray microscopy analysis of cell volume and hemoglobin content in erythrocytes infected with asexual and sexual stages of *Plasmodium falciparum*. *J. Structural. Biol.*, 177: 224-232.
- HANSEN, E; KNOECHEL, C; KLONIS, N; ABU-BAKAR, N; DEED, S; LEGROS, M; LARABELL, C; TILLEY, L. 2011. Cryo transmission X-ray imaging of the malaria parasite, *P. falciparum*. *J. Structural. Biol.*, 173: 161-168.
- HANSEN, E; MCMILLAN, PJ; TILLEY, L. 2010. Cellular architecture of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *Int. J. Parasitol.*, 40: 1127-1135.
- HAWES, P; NETHERTON, CL; MUELLER, M; WILEMAN, T; MONAGHAN, P. 2007. Rapid freeze-substitution preserves membranes in high-pressure frozen tissue culture cells. *J. Microsc.*, 2: 182-189.
- HAYAT, M.A. Principles and techniques of electron microscopy. *Biological application. 4th edn. Cambridge University. 2000*
- HILLMER, S; VIOTTI, C; ROBINSON, D. G. 2012. An improved procedure for low-temperature embedding of high-pressure frozen and freeze-substituted plant tissues resulting in excellent structural preservation and contrast. *J. Microsc.*, 247: 43-47.
- HOHERNBERG, H; MANNWEILER, K; MULLER, M. 1994. High-pressure freezing of cell suspensions in cellulose capillary tubes. *J. Microsc.*, 175: 34-43.

- HOLZ, GG. 1977. Lipids and the malarial parasite. *Bulletin of the World Health Organization*, 55: 237-248.
- HÖÖG, JL; BOUCHET-MARQUIS, C; MCINTOSH, JR; HOENGER, A; GULL, K. 2012. Cryo-electron tomography and 3-D analysis of the intact flagellum in *Trypanosoma brucei*. *J. Struct. Biol.*, 178: 189-198.
- HOPWOOD, D. 1969. Fixatives and fixation: a review. *Histochem. J.*, 1: 323-360.
- HOPWOOD, D. 1972. Theoretical and practical aspects of glutaraldehyde fixation. *Histochem. J.*, 4: 267-303.
- HOPWOOD, D. 1975. The reactions of glutaraldehyde with nucleic acids. *Histochem. J.*, 7: 267-276.
- HSIAO, LL; HOWARD, RJ; AIKAWAT, M; TARASCHI, TF. 1991. Modification of host cell membrane lipid composition by the intra-erythrocytic human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Biochem. J.*, 274: 121-132.
- HUMBEL, BM; MULLER, M. 1986. Freeze substitution and low temperature embedding. *Science of Biological Specimen Preparation*.
- HURBAIN, I & SACHSE, M. 2011. The future is cold: cryo-preparation methods for transmission electron microscopy of cells. *Biol. Cell* 103: 405-420.
- JIMENEZ, N & HUMBEL, BM. 2006. Aclar discs: a versatile substrate for routine high-pressure freezing of mammalian cell monolayers. *J. Microscopy*, 221: 216-223.
- KALANON, M & MCFADDEN, G. 2010. Malaria, *Plasmodium falciparum* and its apicoplast. *Biochem. Soc. Trans.*, 38: 775-82.
- KAPISHNIKOV, S; WEINER, A; SHIMONI, E; GUTTMANN, P; SCHNEIDER, G; DAHAN-PASTERNAK, N. 2012. Oriented nucleation of hemozoin at the digestive vacuole membrane in *Plasmodium falciparum*. *PNAS*, 109: 11188-11193
- KARNOVISK, MJ. 1965. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. *J. Cell Biol.* 24: 137A-138.
- KIERNAN, JA. 2000. Formaldehyde, formalin, paraformaldehyde and glutaraldehyde: What they are and what they do. *Microsc. Today*, 12:8-12.
- KIRK, K. 2001. Membrane transport in the malaria-infected erythrocyte. *Physiol. Rev.*, 81: 495-537.
- KNOTT, GRAHAM & GENOUD, CHISTEL. 2013. Is EM dead?. *J. of Cell Science*.126:4545-4552.
- KOLLENBERGER, E; JOHANSEN, R; MAEDER, M; BOHRMANN, B; STAUFFER, E; VILLIGER, W. 1992. Artefacts and morphological changes during chemical fixation. *J. Microsc.*, 168: 181-201.

- KOPSTAD, G.; ELGSAETER, A. 1982. Theoretical analysis of specimen cooling rate during impact freezing and liquid-jet freezing of freeze-etch specimens. *J. Biophys*, 40: 163-170.
- KURTH, T; WIEDMER, S; ENTZEROTH, R. 2012. Improvement of ultrastructural preservation of *Eimeria* oocysts by microwave-assisted chemical fixation or by high pressure freezing and freeze substitution. *Protist*, 163: 296-305.
- LEMGRUBER, L; KUDRYASHEV, M; DEKIWADIA, C; RIGLAR, DT; BAUM, J; STAHLBERG, H; RALPH, SA; FRISCHKNECHT, F. 2013. Cryo-electron tomography reveals four-membrane architecture of the Plasmodium apicoplast. *Malaria J.*, 12: 25-33.
- LENARD, J & SINGER, S J. 1968. Alteration of the conformation of proteins in red blood cell membranes and in solution by fixatives used in electron microscopy. *The J. Cell Biol.* 37: 117-21.
- LUFT, J.H. 1961. Improvements in epoxy resin embedding methods. *J. Biophys. Biochem. Cytol*, 9: 409-414.
- MACKENSTEDT, U; BROCKELMAN, CR.; MEHLHORN, H; RAETHER, W. 1989. Comparative morphology of human and animal malaria parasites. *Parasitol. Res.*, 75: 528-535.
- MAGUIRE, PA. & SHERMAN, IW. 1989. Phospholipid composition, cholesterol content and cholesterol Exchange in *Plasmodium falciparum*-infected red cells. *Mol. Biochem. Parasitol*, 38: 105-112.
- MAGUIRE, PA; PRUDHOMME, J; SHERMAN, IW. 1990. Alterations in erythrocyte membrane phospholipid organization due to the intracellular growth of the human malaria parasite, *Plasmodium falciparum*. *Parasitology*, 102: 179-186.
- MARSHALL, AT. 1975. Electron probe X-ray microanalysis. In Principles and Techniques of Scanning Electron Microscopy. Vol. 4. Biological Applications (Ed. M. A. Hayat), pp. 103-173. Van Nostrand Reinhold, New York & London.
- MARTI, R; WILD, P; SCHRANER, EM; MULLER, M & MOOR, H. 1987. Parathroid Ultrastructure after Aldehyde Fixation, High-pressure freezing, or microwave irradiation. *J. Histochem Cytochem.* 35: 1415-1424.
- MAYER, E. & MCDOWALL, AW. 1980. Complete vitrification in pure liquid water and dilute aqueous solutions. *Nature*. 288: 569.
- MCDONALD, K. 2014. Out with the old and in with the new: rapid specimen preparation procedure for electron microscopy of sectioned biological material. *Photoplasma*. 251: 429-448.
- MCDONALD, KL & AUER, M. 2006. High-pressure freezing, cellular tomography, and structural cell biology. *BioTechniques*, 41: 137-143.

- MIGNEAULT, I; DARTIGUENAVE, C; BERTRAND, MJ; WALDRON, KC. 2004. Glutaraldehyde: behavior in aqueous solution, reaction with proteins, and application to enzyme crosslinking. *BioTechniques*, 37: 798-802.
- MONAGHAN, P; COOK, H; HAWES, P; SIMPSON, J; TOMLEY, F. 2003. High-pressure freezing in the study of animal pathogens. *J. Microsc.*, 212: 62-70.
- MONAGHAN, P; PERUSINGUE, N & MULLER, M. 1998. High-pressure freezing for immunocytochemistry. *J. Microsc.* 192: 248-258.
- MOOR, H & HOECHLI, M. 1970. The influence of high-pressure freezing on living cells. In: Favard P (ed) Proceedings of the 7<sup>th</sup> International Congress on Electron microscopy, Genoble. Societe Fracaise de Microscopie Eletronique, Paris.
- MOOR, H. 1987. Theory and practice of high pressure freezing. In: Steinbrecht R, Zierold K (ed) cryotechniques in biological electron microscopy. Springer, Berlin, 175-191.
- MOOR, H; MUHLETHALER K, WALDNER H & FREY-WYSSLINGE. 1961. A new freezing-ultramicrotome. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 10:1-13.
- MORTON, L. 1934. Electron microscopy of biological objects. *Nature*, 133: 911
- NICOLAS, GISÈLE. 2005. Advantages of fast-freeze fixation followed by freeze-substitution for the preservation of cell integrity. *J. of Elec. Micro. Tech.*18: 395–405.
- PALADE, B. 1952. A Study of fixation for electron microscopy. *J. Exp. Med.*, 95: 19-23.
- PETERS, K & RICHARDS, FM. 1977. Chemical cross-linking: reagents and problems in studies of membrane structure. *Ann. Rev. Biochem.*, 46: 523-551.
- PORTER, KR & KALLMAN, F. 1952. The properties and effects of osmium tetroxide as a tissue fixative with special reference to its use for electron microscopy, *J. Microsc.* 2:127-141.
- POTER, K. 1945. A study of tissue culture cells by electron microscopy. *J. Exp. Med.*, 81:233-246.
- RANMUSSEN, K-E & ALBRECHTSEN, J. 1974. Glutaraldehyde. The influence of ph, temperature, and buffering on the polymerization rate. *Histochemistry*. 38:19-26.
- REYNOLDS, E. S. 1963. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain for electron microscopy. *J. Cell Biol.*17:208
- ROMANO, EL & ROMANO, M. 1977. Staphylococcal protein A bound to colloidal gold: a useful reagent to label antigen-antibody sites in electron microscopy. *Immunochemistry*, 14: 711-720.
- RUSS, JC. (1975). Evaluation of the direct element ratio calculation method. *J. Microsc. Biol. Cel.*, 22: 283-286.

- SABATINI DD, BENSCH K, & BARNETT RJ. 1963. Cytochemistry and electron microscopy. The preservation of cellular ultrastructure and enzymatic activity by aldehyde fixation. *J. Cell Biol.*, 17: 19-57.
- SABATINI, D; BENCH, K; BARNNET, R. 1963. Cytochemistry and electron microscopy. The preservation of cellular ultrastructure and enzymatic activity by aldehyde fixation. *J. Cell Biol.*, 17: 19-58
- SCALZI, HA. & BAHR, GF. 1968. An electron microscopic examination of erythrocytic stages of two rodent malarial parasites, *Plasmodium chabaudi* and *Plasmodium vinckei*. *J.Ultrastruct Res.*, 3: 116-133.
- SEVERS, NICOLAS J. 2007. Freeze-fracture electron microscopy. *Nature Protocols*. 2:547-576.
- SHERMAN, IW. 1979. Biochemistry of *Plasmodium* (Malarial Parasites). *Microbiol. Rev.*, 43: 453-495.
- SHIMONI, E & MULLER, M. 1998. On optimizing high-pressure freezing: from heat transfer theory to a new micro biopsy device. *J. Microsc.*, 192: 236–247.
- SILVA, M; SANTOS MOTA, J; MELO, J; CARVALHO GUERRA, F. 1970. Uranyl salts as fixatives for electron microscopy study of the membrane ultrastructure and phospholipid loss in *Bacilli*. *Biochim. Biophys. Acta*, 233: 513-520.
- SINGER, S.J. 1959. Preparation of an electron-dense antibody conjugate. *Nature*, 183: 1523-1524.
- SJÖSTRAND, F. S.1953. A new microtome for ultrathin sectioning for high-resolution electron microscopy. *Cel. & Mol. Life Scien.* 9:114-115.
- STEPHENS, R; CULLETON, RL; LAMB, TJ. 2012. The contribution of *Plasmodium chabaudi* to our understanding of malaria. *Trends Parasitol.*, 28: 73-82.
- STUDER D; GRAMBER W; AL-AMOUDI A; EGGI P. 2001. A new approach for cryofixation by high-pressure freezing. *J. Microsc.*, 203: 285-294.
- STUDER, D; HUMBEL, BM; CHIQUET, M. 2008. Electron microscopy of high pressure frozen samples: Bridging the gap between cellular ultrastructure and atomic resolution. *Histochem. Cell Biol.*, 130:877-889.
- TERZAKIS, JA. 1968. Uranyl acetate, a stain and a fixative. *J. Ultrastruct. Res.*, 184:168-184.
- TILLEY, L; DIXON, MWA; KIRK, K. 2011. The *Plasmodium falciparum*-infected red blood cell. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 43: 839-842.
- TOKUYASU, KT. 1980. Immunocytochemistry of ultrathin frozen sections. *Histochem. J.* 12: 381-403.
- VALENTINE, RC. 1961. Contrast enhancement in the electron microscopy of viruses. *Adv. Virus Res.* 8:287-318

- VAN DONSELAAR, E; POSTHUMA, G; ZEUSCHNER, D; HUMBEL, BM; SLOT, JW. 2007. Immunogold labeling of cryosections from high-pressure frozen cells. *Traffic*, 8:471-485.
- VAN VENETIË, R.; LEUNISSEN-BIJVELT, J.; VERKLEIJ, A & VERVERGAERT, TH. 1980. Size determination of sonicated vesicles by freeze-fracture electron microscopy, using the spray-freezing method. *J. of Micros.* 118: 401–408.
- VAN VENETIË, R; HAGE, W. J.; BLUEMINK, J. G & VERKLEIJ, A. J. 1981. Propane jet-freezing: A valid ultra-rapid freezing method for the preservation of temperature dependent lipid phases. *J. of Micros.* 123:287–292.
- VAN VENETIËA, R ; VERKLEIJ, AJ. 1981. Analysis of the hexagonal II phase and its relations to lipidic particles and the lamellar phase. A freeze-fracture study. *Biochim. Biophys. Acta (BBA) – Biomemb*, 645: 262–269.
- VANOOIJ, C; WITHERS-MARTINEZ, C; RINGEL, A; COCKCROFT, S; HALDAR, K; BLACKMAN, MJ. 2013. Identification of a *Plasmodium falciparum* phospholipid transfer protein. *J Biol Chem.*, 288: 31971-31983.
- VIAL, HJ; ELDIN, P; TIELENS, AGM; VAN HELLEMOND, JJ. 2003. Phospholipids in parasitic protozoa. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 126: 143-154.
- WHATSON, ML. 1958. Staining of tissue sections for electron microscopy with heavy metals. II. Application of solutions containing lead and barium. *J. Biophys. Biochem. Cytol*, 4: 724-730.
- WHITE, DL; ANDREWS, SB; FALLER, J; RUSSELL, W; BARNETT, S. 1976. The chemical nature of osmium tetroxide fixation and staining of membranes by x-ray photoelectron spectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta*, 436: 577-592.
- WHO - World malaria report: 2012.
- WIRTH, CC & PRADEL, G. 2012. Molecular mechanisms of host cell egress by malaria parasites. *International J. Med. Microbiol.*, 302: 172-178.
- WUNDERLICH, F; FIEBIG, S; VIAL, H; KLEINIG, H. 1991. Distinct lipid compositions of parasite and host cell plasma membranes from *Plasmodium chabaudi*-infected erythrocytes. *Mol. Biochem. Parasitol*, 44: 271-278.
- YOKOTA, K; SUZUKI, Y E ISHII, Y. 1965. Temperature dependence of the polymerization modes of glutaraldehyde. *Chem. Abstr*, 68: 2459-2463.