

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE BIOFÍSICA CARLOS CHAGAS FILHO
PÓS-GRADUAÇÃO PARA A PESQUISA BIOMÉDICA (BIOFÍSICA)**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO PROFISSIONAL

Jean Pierre Fonseca dos Santos

O acidocalcissomo do Trypanosoma cruzi como modelo para quantificação nanoquímica
em organismos eucarióticos

Orientador: Dr. Kildare Rocha de Miranda

Co-orientador: Dr. Wendell Girard Dias

Rio de Janeiro
2019

Jean Pierre Fonseca dos Santos

Dissertação de Mestrado Profissional apresentada ao Programa de Pós-graduação em formação 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: Dr. Kildare Rocha de Miranda

Co-orientador: Dr. Wendell Girard Dias

Rio de Janeiro
2019

FICHA CATALOGRÁFICA

Santos P. F., Jean.

O acidocalcissomo do *Trypanosoma cruzi* como modelo para quantificação nanoquímica em organismos eucarióticos. Rio de Janeiro, 2019.

64 fls.

Dissertação (Mestrado Profissional em Pesquisa Biomédica-Biofísica)
Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, 2019.

Orientador: Kildare Miranda

1. *Trypanosoma cruzi*

3. Microanálise de raios-X

2. Acidocalcissomos

4. Quantificação de elementos

I. Universidade Federal do Rio de Janeiro

II. Título

FOLHA DE APROVAÇÃO

Jean Pierre Fonseca dos Santos

O acidocalcissomo do *Trypanosoma cruzi* como modelo para quantificação nanoquímica em organismos eucarióticos

Orientador: Dr. Kildare Miranda

Co-orientador: Dr. Wendell Girard-Dias

Aprovado por:

Prof. Dr. Kildare Rocha de Miranda (IBCCF/UFRJ)

Dr. Wendell Girard-Dias (IOC/Fiocruz)

Profa. Isabela Ramos (IBQM/UFRJ) (Revisora)

Prof. André Linhares Rossi (CBPF) (Banca examinadora)

Prof. Eduardo José Lopes Torres (UERJ) (Banca Examinadora)

Profa. Taís Hanae Brunswick (CENABIO/UFRJ) (Banca Examinadora)

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho ao meus amados e queridos; pai, irmão e sobrinho que, por motivos que somente Deus conhece, não se encontram mas entre seus familiares, deixando uma eterna saudade e lembranças de momentos felizes.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao professor Kildare Miranda e ao Dr. Wendell Girard Dias pela sua ajuda e orientação ao longo deste tempo, me instruindo na confecção deste trabalho. Relato meus sinceros agradecimentos a todo o grupo que tenho a honra de pertencer e aos demais integrantes do Laboratório de Ultraestrutura Celular Hertha Meyer do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho da UFRJ e ao seu corpo docente que em momentos de dúvida sempre me ajudaram.

Também agradeço ao corpo técnico do CENABIO por toda a sua ajuda e atenção, principalmente ao Dr. Daniel Gonçalves Lucif Vieira, que me ensinou os primeiros conceitos de microscopia, ao Dr. Fernando Pereira de Almeida que inúmeras vezes sanou minhas dúvidas de formatação durante a confecção deste trabalho.

Gostaria de agradecer imensamente a professora Isabela Ramos pela correção de minha dissertação, trabalho esse árduo mas que faz parte da vida de um docente.

EPÍGRAFE

“A mente que se abre para uma nova ideia, jamais voltará ao seu tamanho original.”

Albert Einstein

“Os homens são fruto de sua educação e da sociedade em que vivem.”

Jean Piaget

“ Professor não é o que ensina, mas o que desperta no aluno a vontade de aprender.”

Jean Piaget

RESUMO

Microanálise de raios- X é uma técnica utilizada para identificar a composição química em amostras biológicas e de materiais. Embora essa seja uma técnica amplamente difundida na área da microscopia, sua utilização em biologia permanece restrita, especialmente no que se refere ao seu componente *quantitativo*, sendo este restrito à poucos grupos de pesquisa. Grande parte dessa limitação se deve à necessidade de maior difusão de protocolos padronizados de preparo de amostras, geralmente por métodos criogênicos, e de análise no microscópio. Dependendo da instrumentação e das tecnologias existentes em cada laboratório, estes podem variar, implicando em uma adaptação de protocolo para cada caso. Desta forma, este trabalho procurou padronizar e descrever um protocolo otimizado para quantificação de elementos em modelos celulares através da utilização de métodos analíticos associados à microscopia eletrônica de transmissão, mais especificamente a microanálise de raios-X por energia dispersiva. Como modelo de estudo foram escolhidas organelas ricas em íons denominadas “acidocalcissomos” existentes no protozoário parasita *Trypanosoma cruzi*, agente etiológico da doença de Chagas. Para isso, parasitos foram submetidos à diferentes métodos de criofixação (por alta pressão ou imersão) para minimizar a extração de íons e macromoléculas, crioseccionados e liofilizados (“*freeze drying*”). Padrões contendo concentrações conhecidas de diferentes sais dissolvidos em solução de albumina também foram produzidos a fim de calibrar os sistemas de microanálise dos microscópios utilizados. Os resultados mostraram sucesso na preservação do conteúdo iônico existente nos acidocalcissomos, que apresentaram concentrações de diferentes íons quantitativamente comparáveis com os dados existentes para este parasito. Para expansão da utilização deste método para outros modelos celulares, um protocolo detalhado de preparo de amostras e de análise foi elaborado e disponibilizado como principal produto desta dissertação. Esperamos com este trabalho contribuir para a utilização mais ampla desta técnica no país, de modo a colaborar para a implementação efetiva da microanálise quantitativa no campo das ciências da vida.

Abstract

X-ray microanalysis is a technique used to identify the elemental composition in biological samples and materials. Although this is a widely used technique in the field of microscopy, its use in biology remains restricted, especially with regard to its quantitative component, which is restricted to a few research groups. Much of this limitation is due to the need for greater diffusion of standardized sample preparation protocols, generally by cryogenic methods, and microscopic analysis. Depending on the biological sample and existing equipment in each laboratory, these can vary, implying in a protocol adaptation for each case. Thus, this work sought to standardize and describe an optimized protocol for quantification of elements in cellular models by using analytical methods associated with transmission electron microscopy, more specifically energy dispersive X-ray microanalysis. As a model, we used ion-rich organelles named "acidocalcisomes" present in the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*, the etiologic agent of Chagas disease. Parasites were submitted to different cryofixation methods (by high pressure or by immersion in cryogenic fluids) to minimize the extraction of ions and macromolecules, cryosectioned and freeze dried. Standards containing known concentrations of different salts dissolved in albumin solution were also produced in order to calibrate the microanalyses systems of the microscopes used. The results showed a successful preservation of the ion content within the acidocalcisomes, which presented concentrations of different ions quantitatively comparable to the existing data for this parasite. To expand the use of this method to other cellular models, a detailed sample preparation and analysis protocol was developed and made available as the main product of this dissertation. We hope to contribute to the wider use of this technique in the country, in order to collaborate to the effective implementation of quantitative microanalysis in the field of life sciences.

Lista de Figuras

Figura 1. Imagem de microscopia eletrônica de transmissão onde se observa os acidocalcissomos aparecendo como esferas escuras devido a sua alta eletrodensidade.....	17
Figura 2. Relação entre a geometria do corpo a ser congelado e a profundidade de vitrificação.....	26
Figura 3. Pinos de alumínio no suporte de acrílico para manuseio no momento do congelamento.....	29
Figura 4. Esquema do primeiro aparelho de congelamento por impacto construído por Heuser.....	31
Figura 5. Esquema de funcionamento do aparelho de congelamento por alta pressão onde se observa as partes enumeradas do aparelho.....	32
Figura 6. Esquema de funcionamento do aparelho de congelamento por spray.....	33
Figura 7. Esquema de funcionamento do aparelho de congelamento por jato de criogênio.....	34
Figura 8. Espectro mostrando as áreas que são usadas para quantificação.....	38
Figura 9. Suporte desenvolvido para congelamento por alta pressão em capilar de cobre.....	45
Figura 10. Suporte desenvolvido para congelamento por alta pressão em capilar de cobre. A e B , observação do suporte original para congelamento em discos e suporte confeccionado para utilização de capilares de cobre. C e D , suporte com capilar de cobre inserido	46
Figura 11. Trimagem e crioultramicrotomia de capilar de cobre.....	47
Figura 12. Suporte pra secagem por <i>freeze-drying</i>	49
Figura 13. Suporte para secagem por <i>freeze-drying</i> . A , suporte montado. B , vista frontal da base do suporte. C e D , tampa do suporte com vista externa e inerente, respectivamente.....	50
Figura 14. Aparelho de criofratura utilizado para a etapa de <i>freeze-drying</i>	51
Figura 15. Observação de cortes de 120 nm do <i>T. cruzi</i> após <i>freeze-drying</i>	54
Figura 16. Microanálise de raios-X em acidocalcissomo do <i>T. cruzi</i>	55

Figura 17. Microanálise de raios-X em acidocalcissomo do <i>T. cruzi</i> e padrão de ferrocianeto de potássio.....	56
Figura 18. Mapeamento de elementos em células de <i>T. cruzi</i>	58
Figura 19. Mapeamento de elementos em acidocalcissomo individualizado.....	59
Figura 20. Fluxograma demonstrando em ordem cronológica as diferentes etapas envolvidas neste trabalho.....	62

Lista de equações

$E = hf$ (1).....	22
$N \cdot \lambda = 2 \cdot d \cdot \text{sen} \Theta$ (2).....	22
$E = K_1(Z - K_2)^2$ (3).....	23
$C_x = K_x \cdot (P_x / W) \cdot \Sigma (f_a Z_a^2 / A_{r(a)})$ (4).....	37
$C_{xa} = C_{xp} \cdot [(P_x / W)_a / (P_x / W)_p] \cdot (G_a / G_p)$ (5).....	38
$W_t = W_a + W_g + W_f + W_h$ (6).....	39
$R_h = W_h / P_h$ (7).....	39
$R_g = W_g / P_g$ (8).....	40
$W_f = W_t - W_h - W_g$ (9).....	40
$K_x = C_{xp} / (P_{xp} / W)_p \cdot G_p$ (10).....	60
$C_{xa} = C_{xp} \cdot [(P_x / W)_a / (P_x / W)_p]$ (11).....	60
$C_x = P_x / W_a \cdot K_x$ (12).....	60

Lista de siglas

MET: Microscópio eletrônico de transmissão

T.cruzi: Trypanosoma cruzi

EDS: Espectrômetro de energia dispersiva

WDS: Espectrômetro de comprimento de onda dispersivo

EELS: Espectroscopia por perda de energia de elétrons

FEG: Canhão de emissão de campo

ME: Microscópio Eletrônico

LITMEC: Laboratório de Instrumentação e Tecnologia Mecânica

CBPF: Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas

IOC: Instituto Oswaldo Cruz

Sumário

1. Introdução.....	15
2. Justificativa.....	18
3. Objetivo	18
3.1 Objetivo Geral.....	18
3.2 Objetivos específicos.....	18
4. Revisão bibliográfica	19
4.1 Histórico da Microanálise de raios-X.....	19
4.2 Microscopia Analítica.....	20
4.3 Características de detectores para análise de elementos por microscopia analítica.....	22
4.3.1 WDS – Espectrometria por comprimento de onda dispersivo	22
4.3.2 EDS- Espectrometria por energia dispersiva	23
4.3.3 EELS- Espectroscopia por perda de energia de elétrons	23
5. Criofixação da amostra e seccionamento.....	24
5.1 Vitrificação da amostra	25
5.2 Formato da amostra e sua relação com o bom congelamento	25
5.3 Tipos de criogênios e suas classes.....	26
5.4 Métodos de criofixação.....	27
5.4.1 Princípios	27
5.4.2 Congelamento rápido e ultrarrápido	28
5.4.3 Congelamento por imersão	28
5.4.4 Congelamento por impacto	30
5.4.5 Congelamento por alta pressão	32
5.4.6 Congelamento por spray.....	33
5.4.7 Congelamento por jato de criogênio.....	34
5.5 Equipamentos de seccionamento de material biológico	35

5.6 Fabricação de facas de vidro	36
6. Quantificação de elementos por microanálise de raios-X em amostras biológicas.....	36
6.1 Quantificação pelo método de normalização da radiação contínua.....	37
6.1.1 Faixa de energia e a estimacão da radiação contínua.....	38
6.1.2 Radiação contínua e fatores de correção.....	39
7. Metodologia	41
7.1 Cultivo de células.....	41
7.2 Congelamento por alta pressão.....	41
7.3 Congelamento por imersão.....	42
7.4 Crioultramicrotomia e <i>freeze-drying</i>	42
7.5 Elaboracão de amostras-padrão para microanálise quantitativa	42
7.6 Microanálise de raios-X	43
7.7 Mapeamento de raios-X	43
8. Resultados e Discussão	44
8.1 Confeccão de peças para otimização do congelamento por alta pressão, crioultramicrotomia e secagem por " <i>freeze-drying</i> "	44
8.2 Avaliacão da preservacão estrutural e química das amostras.....	52
8.3 Quantificacão de elementos em acidocalcissomos.....	60
8.4 Fluxo de trabalho para quantificacão de elementos em células.....	61
9. Conclusão.....	63
10. Referências	64

1. Introdução

Os íons são de vital importância para a célula pois estão envolvidos com diferentes processos celulares como controle de reações enzimáticas, sinalização celular, controle de pH, entre outras funções. Como exemplo podemos citar o íon Ca^{2+} , que funciona como mensageiro secundário em processos de sinalização celular, sendo essencial também para o perfeito funcionamento de mecanismos de contração muscular, transporte vesicular, motilidade celular, entre outras funções (Luckey., 2014). Íons como o Na^+ e K^+ são importantes para a manutenção do potencial de membrana através da bomba de sódio e potássio (Na^+/K^+ ATPase), notadamente crucial para os mecanismos de despolarização celular e transdução de sinal químico e elétrico nas células. Outros íons como Mg^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{2+} , atuam como cofatores enzimáticos (Nelson, M. David.; Cox, M. Michael., 2005). Da mesma forma, no *Trypanosoma cruzi*, o protozoário causador da Doença de Chagas, os íons possuem diversas funções, dentre elas um papel importante nos mecanismos de controle osmótico e de pH, desempenhado em grande parte pela associação de organelas como o complexo do vacúolo contrátil e organelas ricas em diferentes íons chamadas acidocalcissomos (Miranda et al., 2000; Girard Dias et al., 2012).

Os acidocalcissomos possuem natureza ácida devido à existência de bombas de prótons em sua membrana e servem também como um grande reservatório de elementos químicos que podem ser mobilizados pela célula em função de suas atividades metabólicas. O acidocalcissomo é rico em fósforo, principalmente na forma de polifosfatos e pirofosfato, e outros elementos químicos, mobilizados através da sua membrana através de diversos mecanismos específicos de transporte de íons como uma Ca^{2+} -ATPase, trocadores iônicos $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ e $\text{Na}^{2+}/\text{H}^+$ e bombas de prótons como a V-H^+ -ATPase e V-H^+ -PPase (Vercesi et al., 1996; Lu et al., 1998; Benchimol et al., 1998; Scott et al., 1998). Os Acidocalcissomos estão presentes em muitos organismos, sendo nos tripanossomatídeos sua primeira caracterização (Docampo., 2001). Esse repertório de transportadores permitem o acúmulo de grandes concentrações de íons em sua matriz, rica em sódio, magnésio, potássio, cálcio, ferro e zinco, complexados à cadeias de polifosfatos de diferentes tamanhos (Ramos, Ib de et al., 2010). Do ponto de vista ultraestrutural, os acidocalcissomos apresentam aspecto esférico, com uma eletrondensidade

característica, decorrente da sua composição iônica. Em preparações de rotina de inclusão em resina, esta organela aparece como um vacúolo vazio ou parcialmente preenchido por um material de alta eletrondensidade, quando se observa ao microscópio eletrônico de transmissão. Este material representa o conteúdo iônico remanescente após as diferentes etapas de fixação química, desidratação, inclusão em resina, ultramicrotomia e contrastação. A natureza altamente eletrondensa dos acidocalcissomos pode ser observada em preparações de células inteiras levadas ao microscópio eletrônico de transmissão, sem a necessidade de adição de agentes contrastantes (figura 1). Esta morfologia pode variar em função de estímulos externos como disponibilidade iônica, e/ou com o modelo celular em questão (*Trypanosoma*, *Leishmania*, *Phytomonas*, etc) (Miranda et al., 2000, Miranda et al., 2004a, 2004b, 2004c). Isto torna esta organela um excelente modelo de estudo da distribuição de íons em compartimentos sub-celulares através de métodos de microscopia eletrônica analítica, como a microanálise de raios-X.

Muitos grupos de pesquisa atualmente utilizam a microanálise de raios-X para o estudo da composição química em diversos modelos celulares, porém, poucos trabalhos se dedicam à quantificação absoluta de elementos por esta metodologia, principalmente no Brasil (Miranda et al., 2004a). Desta forma, o presente trabalho tem como objetivo principal estabelecer um protocolo para a identificação e quantificação de íons em amostras biológicas através da microanálise de raios-X, utilizando como modelo de estudo os acidocalcissomos do *T. cruzi*.

Dada a importância dos acidocalcissomos para diferentes processos de viabilidade celular do *T. cruzi*, a compreensão da dinâmica da mobilização iônica a partir dessas estruturas e seu impacto no metabolismo e na fisiologia celular, especialmente sob diferentes condições osmóticas e/ou na presença de diferentes drogas, pode auxiliar no desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento da doença. Nesse sentido, o emprego de técnicas de congelamento de células que possibilitam a imobilização dos íons no acidocalcissomo e em outros compartimento celulares, seguido do emprego da microscopia analítica quantitativa, permite uma melhor avaliação da composição química, distribuição e quantificação dos elementos químicos presentes no parasita (LeFurgey et al., 1990). Além disso, os métodos e estratégias de quantificação de íons utilizados neste projeto poderão ser aplicados a

diferentes modelos celulares, o que pode ampliar o conhecimento sobre a importância dos íons em diferentes organismos.

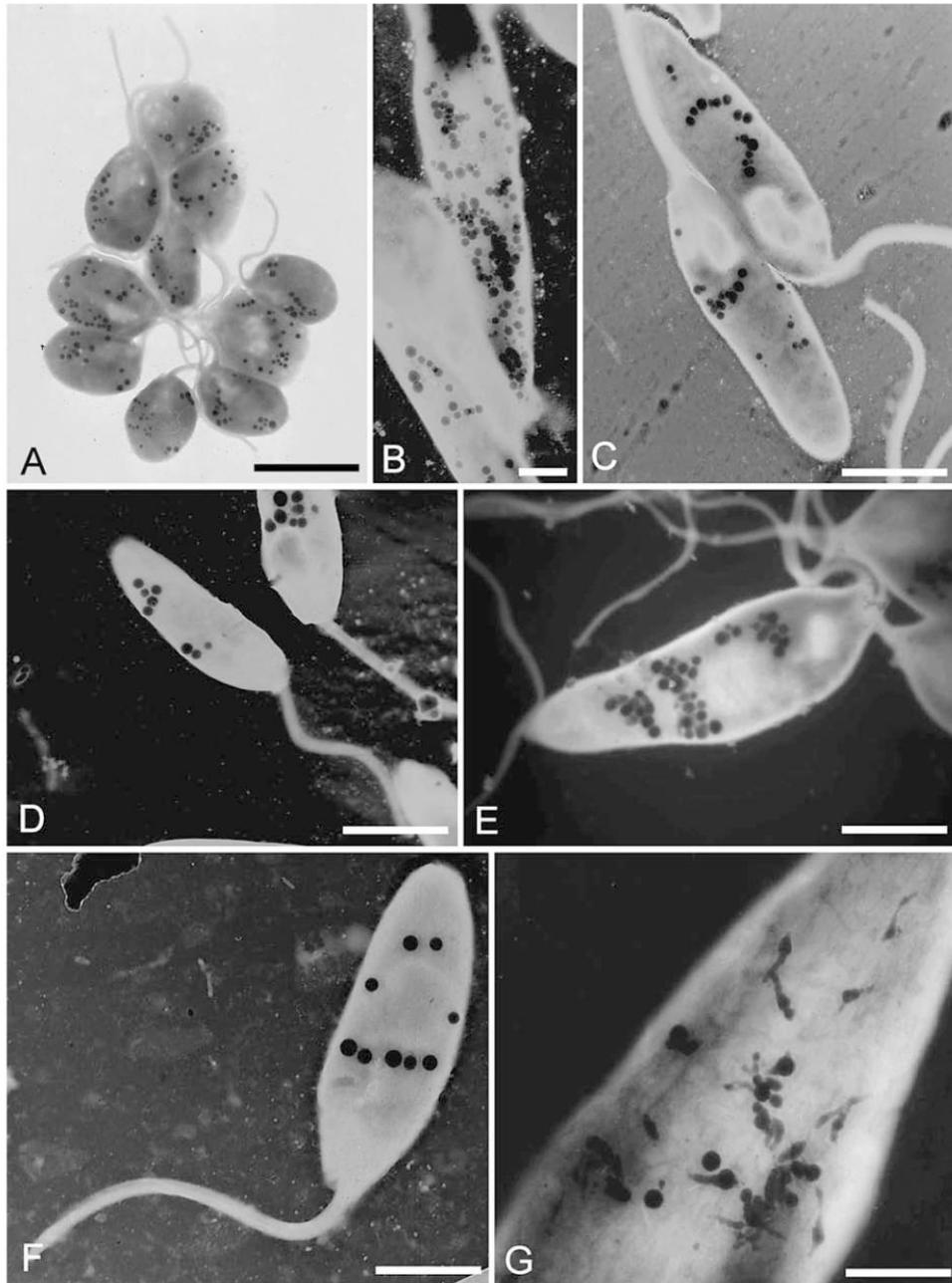


Figura 1. Imagem de microscopia eletrônica de transmissão onde se observa acidocalcissomos aparecendo como esferas escuras devido a sua alta eletron densidade. Por conta dessa característica, essas organelas se tornam um potencial modelo para estudos de microscopia analítica em tripanossomatídeos, A – *Leishmania amazonensis* – barra de escala: 280nm; B – *Herpetomonas angulsteri* – barra de escala: 130nm; C – *Crithidia deanei* – barra de escala: 160nm; D – *Blastocrithidia culicis* – barra de escala: 190nm; E – *Herpetomonas muscarum muscarum* – barra de escala: 160nm; F, G – *Blastocrithidia culicis* – barra de escala: 2 μ m (Retirado de Miranda et al., 2004a).

2. Justificativa

A microanálise de raios-X é uma técnica amplamente utilizada para detecção e quantificação de elementos. Porém, no campo da biologia celular, sua utilização é mais restrita, especialmente no Brasil, onde poucos grupos se dedicam à sua utilização, principalmente à quantificação de elementos. Grande parte dessa limitação se deve à necessidade de maior difusão de protocolos padronizados de preparo de amostras, geralmente por métodos criogênicos, e de análise no microscópio. Desta forma, este trabalho descreve um protocolo otimizado para quantificação de elementos, assim como o desenvolvimento e a inovação de suportes para se realizar a metodologia proposta para quantificação, mais especificamente a microanálise de raios-X por energia dispersiva.

3. Objetivo

3.1 Objetivo Geral

Este projeto tem como objetivo estabelecer um protocolo para quantificação nanoquímica de elementos em células eucarióticas, utilizando os acidocalcissomos de *T. cruzi* como modelo.

3.2 Objetivos específicos

- Otimização e desenvolvimento de suportes metálicos para congelamento por alta pressão em capilar de cobre e realização de *freeze-drying* para o estudo analítico de acidocalcissomo em *T. cruzi*;
- Implementar as amostras-padrão para a realização de microanálise quantitativa;
- Implementar a técnica de microanálise de raios-X para quantificação de íons em compartimento celular de células eucariontes ou procariontes no país.

4. Revisão bibliográfica

4.1 Histórico da Microanálise de raios-X

A origem da Microanálise remonta à descoberta dos raios X por Wilhelm Rontgen, da Universidade de Wurtzburg, no ano de 1895. Este foi agraciado com o prêmio Nobel de física em 1901 pela descoberta, que teve sua primeira aplicação pouco tempo depois no campo da medicina, sendo posteriormente expandida para outros campos da ciência. Na Universidade de Leeds, William Bragg e seu filho desenvolveram os primeiros trabalhos em cristalografia de materiais e estabeleceram os conceitos básicos para o desenvolvimento da técnica de difração de raios-X para a determinação da estrutura cristalográfica de diferentes materiais. William Bragg definiu a equação que relaciona comprimento de onda e distância entre planos cristalinos, sendo também agraciado com o prêmio Nobel concedido às pesquisas referentes à radiação em 1915 (Reed, Garratt, J. A; Bell, C. D., 2005). Por volta de 1919, o físico Henry Moseley, da Universidade de Oxford, utilizou-se da equação de Bragg para a construção de um espectrômetro capaz de quantificar elementos pelo princípio da difração através de cristais. Em seus experimentos, amostras com diferentes elementos eram bombardeadas e o comprimento de onda emitido, determinava assim suas respectivas frequências de linhas K e L. Rutherford, ganhador do Nobel de física em 1908, fez uso das pesquisas de Moseley para deduzir o primeiro modelo atômico (Reed, Garrat, J. A.; Bell, C.D., 2005; Riege-Han, P. Stefan., 2011). Todo esse conhecimento propiciou rápidos avanços sobre a estrutura da matéria. Em sua tese de doutorado, Louis de Broglie propôs o modelo onda-partícula, tendo vista a recém descrita dualidade da luz. Sua tese, apresentada à Universidade de Paris em 1928, propôs que toda partícula com pequena massa e aceleração possua um comportamento ondulatório, sendo sua teoria confirmada por diferentes estudos (Eisberg, Robert.; Resnick, Robert., 1979).

Uma contribuição importante para o avanço dos estudos sobre microanálise e espectroscopia por perda de energia de elétrons foi o próprio desenvolvimento do microscópio eletrônico por Ernst Ruska e Max Knoll. Em sua tese de doutorado, Ruska propôs a criação do primeiro microscópio eletrônico, baseando-se na teoria de Abbe, que determinava que a resolução do microscópio de luz dependia do comprimento de onda da fonte de iluminação, e em diversos estudos sobre

eletromagnetismo e na existência de lentes eletromagnéticas capazes de defletir elétrons propostas por Busch. Ruska calculou o limite de resolução do microscópio eletrônico, encontrando um valor de 2Å (Williams, Carter., 2009; Pennycook, J. Stephen.; Nellist, D. Peter., 2011; Riege-Han.P. Stefan., 2011).

A construção e a evolução do microscópio eletrônico seguiu paralelamente ao desenvolvimento dos detectores de raio-X. Em 1944, os pesquisadores da universidade de Princeton James Hillier e Richard Baker patentearam um microanalisador eletrônico acoplado ao microscópio eletrônico de transmissão. Esta modalidade de microanálise se baseia na interação do feixe de elétrons e a perda de energia que estes sofrem depois de atravessar a amostra (Pennycook, J. Stephen; Nellist, D. Peter., 2011). No final da década de 40, Raimond Castaing criou o primeiro detector eletrônico de energia dispersiva e adaptou um contador Geiger ao microscópio eletrônico, sendo capaz de detectar raios X emitidos de diferentes amostras, porém sem a capacidade de diferenciá-los (Reed, B. J.S., 1993). Esse problema foi resolvido com a adição de um cristal de quartzo para difração de partículas e radiação. Nos anos seguintes, Castaing construiu mais dois protótipos de detecção eletrônica, um destes foi levado ao instituto de pesquisa metalúrgicas da França. Como Castaing não patenteou os equipamentos desenvolvidos, a indústria rapidamente percebeu o potencial analítico e comercial. A companhia francesa CAMECA foi a primeira empresa a produzir e comercializar o microscópio analítico (Reed, Garrat. J. A; Bell, C. D., 2005; Williams, Carter., 2009).

4.2 Microscopia Analítica

A microscopia analítica é um conjunto de técnicas que associa a microscopia eletrônica à detectores específicos capazes de coletar informações químicas da amostra (raios-X característicos ou a perda de energia de elétrons) durante a interação entre o feixe de elétrons primários e a amostra (Warley., 1997).

Os raios-X são ondas eletromagnéticas de pequeno comprimento de onda formadas no interior da coluna do microscópio após interação do feixe de elétrons primários com átomos presentes na amostra ou em partes da coluna. A colisão do feixe de elétrons com os elétrons das camadas mais internas dos átomos da amostra causa a sua ionização. Isso deixa uma vacância que é rapidamente preenchida pelo

deslocamento de elétrons de camadas mais externas. Durante esse processo ocorre perda de energia na forma de radiação (Reed, B. J.S., 1993; Riege-Han.P Stefan., 2011). Cada elemento da tabela periódica gera um raio X cujo comprimento de onda é conhecido e tabelado, chamados raios-X característicos (Ingram, P.,1999). Com isso, pode-se realizar a qualificação e quantificação dos elementos químicos presentes na amostra, desde que o sistema esteja devidamente calibrado (Warley., 1997., Ingram., 1999). Duas classes principais de detectores podem ser encontradas para microscopia eletrônica: (1) Detectores de raios-X por energia dispersiva e (2) detector de raios-X por comprimento de onda dispersivo. O primeiro detector realiza a separação dos raio-X de acordo com sua energia (EDS) enquanto o segundo separa pelos seus respectivos comprimentos de onda (WDS), sendo este último um sistema que possui melhor resolução quando comparado com o detector por energia dispersiva. Por outro lado, ao contrário dos sistemas WDS, que detectam apenas um elemento por vez, os detectores EDS são capazes de detectar paralelamente diferentes elementos, possuindo assim maior velocidade de detecção. Estes últimos são predominantes em estudos microanalíticos na área biológica (Lyman et al., 1990; Warley., 1997; Ingram., 1999).

As primeiras modalidades de microscópio de transmissão e varredura utilizavam emissão termoiônica através do aquecimento de um filamento de tungstênio ou de hexaboreto de lantânio. O desenvolvimento do canhão de emissão de campo (FEG-field emission gun) permitiu melhora significativa no desempenho analítico dos MEs, onde um feixe de elétrons altamente coerente (mesma energia), com alta corrente e dimensões nanométricas pode ser condensado e/ou varrido sobre a amostra. Esse avanço possibilitou uma maior exatidão na iluminação e imageamento da estrutura em estudo, um maior desempenho analítico em função da corrente maior (maior sinal para detecção), além de minimizar a formação de raios-X de regiões vizinhas, problema comum em sistemas sem FEG (Williams, Carter., 2009). Por motivos comparativos relacionado a quantificação como redução de massa, diminuição de volume e redistribuição de elementos devido ao aquecimento da amostra, os parâmetros citados anteriormente devem ser majoritariamente iguais para a amostra e para o padrão de quantificação (Stenn, Bahr., 1970; Hall., Gupta., 1974; Saubermann., 1975). Um maior detalhamento dos diferentes tipos de detectores para quantificação de elementos químicos encontra-se descrito no capítulo 4.3.

4.3 Características de detectores para análise de elementos por microscopia analítica

4.3.1 WDS – Espectrômetro por comprimento de onda dispersivo

O espectrômetro de comprimento de onda dispersivo ou WDS do inglês *wavelength dispersive spectrometry* tem como base a equação $E = hf$ (1), onde E é a energia do raio-X, h é a constante de Planck e f é a frequência de onda. Essa equação relaciona o comportamento da onda eletromagnética de raio-X e suas propriedades corpusculares. Isolando frequência na equação acima e com respectivas substituições algébricas, podemos obter uma relação de comprimento de onda com energia. Este tipo de análise tem a vantagem de possuir um espectro com baixa radiação branca ou radiação contínua, que se forma devido à deflexão de elétrons de espalhamento elástico com o campo eletrostático do núcleo (campo Coulombiano) ou com a colisão de elétrons transmitidos com o núcleo de elementos da amostra (Eisberg, Robert.; Resnick, Robert., 1979; Echilin., 1992; Warley., 1997; Ingram., 1999; Williams., Carter., 2009; Riege-Han, P Stefan., 2011). A análise através de um detector por comprimento de onda dispersivo somente identifica um elemento por vez no espectro, necessitando de longos períodos para capturar diversos elementos e alocar em suas faixas de energia (Warley., 1997; Williams, Carter., 2009). No detector de comprimento de onda dispersivo, os raios-X característicos de elementos da amostra incidem no cristal e são imediatamente espalhados em ângulos, cujo sucessivos planos cristalinos se encontram em fase com os raios-X incidentes. Como os raios-X incidentes possuem o mesmo ângulo de reflexão, esse detector atua como um monocromador, selecionando o ângulo inicial para determinar o comprimento de onda. A equação que rege esse ângulo com os diversos comprimento de onda é a equação de Bragg.

$$N.\lambda = 2.d.\text{sen}\Theta \quad (2)$$

Os primeiros detectores para raio- X foram construídos empregando diversos cristais dentre eles; fluoreto de lítio (LiF), quartzo(SiO_2), mica ($\text{KA}_3\text{Si}_3\text{O}_{12}$), fosfato de amônia ácida (NH_6PO_3), pentaeritritol ($\text{C}_5\text{H}_{12}\text{O}_4$), talato de ácido tálio ($\text{C}_8\text{H}_5\text{O}_4\text{TI}$) e germânio. Atualmente os detectores de WDS ou EDS, são feitos por cristais de Si(Li) com baixa capacidade higroscópica e alta estabilidade em vácuo, além de

possuir um arranjo cristalino uniforme, o que resulta em melhor reflexão de ondas eletromagnéticas (Reed, B. J.S., 1993).

4.3.2 EDS- Espectrômetro por energia dispersiva

O espectrômetro de energia dispersiva (EDS - *Energy Dispersive Spectrometry*), possui como base de sua construção a equação de Moseley:

$$E=K_1(Z- K_2)^2 \quad (3)$$

onde E=energia, K_1 e K_2 são constantes relacionadas ao raio X emitido pela amostra durante a interação com os elétrons do feixe (Warley., 1997). Esse modelo de determinação de elementos químicos através da radiação característica possui maior probabilidade de ocorrer em amostras com núcleo atômico mais denso, tornando mais fácil a detecção quantitativa de elementos mais pesados. Por este motivo, do ponto de vista puramente analítico (sem considerar os problemas associados ao preparo de amostras), esta técnica é menos precisa para análise de amostras biológicas, que contém majoritariamente elementos leves. Todavia, as aplicações da microanálise de raios-X por energia dispersiva em biologia perfazem um amplo escopo de disciplinas, sendo utilizada em projetos que visam desde a identificação de contaminantes no solo, ar, água e tecidos de diferentes organismos (como resultado de ações antrópicas) à identificação de íons em compartimentos intracelulares (Zs-Nagy., 1989; Wroblewski, R., Wroblewski, J., 1984; Wroblewski, J., Wroblewski, R., Roomans, G. M., 1988). Quando comparados aos sistemas WDS, os equipamentos com EDS sofrem maior influência da radiação contínua, sendo mais propensos à sobreposição de picos de elementos diferentes ou de emissões alfa e beta de um mesmo elemento, se a energia de emissão destes for muito próxima, geralmente abaixo da energia de emissão do fósforo.

4.3.3 EELS- Espectroscopia por perda de energia de elétrons

A espectroscopia por perda de energia de elétrons (EELS - *Electron Energy Loss Spectroscopy*), utiliza informações oriundas da perda de energia de elétrons do feixe primário após a interação deste com a amostra. A cada interação com diferentes

átomos da amostra, elétrons do feixe primário altamente energéticos perdem (transferem) energia para elétrons existentes nas diferentes camadas eletrônicas dos átomos da amostra. Esta perda de energia pode ser maior ou menor dependendo do elemento químico e da (sub)camada de ionização em questão e é característica de cada elemento químico. Dessa forma, microscópios equipados com um filtro de energia (espectrômetro de perda de energia de elétrons), capaz de separar os elétrons de acordo com sua energia são capazes de detectar a assinatura energética dos átomos constituintes da amostra e suas respectivas ligações químicas. Alguns autores defendem que essa modalidade de microscopia analítica seria mais eficaz para detecção de elementos mais leves. No entanto, esse conceito tem mudado recentemente em função de uma evolução de espectrômetros de WDS mais sensíveis e com faixa energética mais ampla, acoplados ao microscópio com voltagem intermediária, capazes de capturar sinal de elementos mais pesados. Da mesma forma, sistemas mais modernos de EDS, incluindo uma modalidade com múltiplos detectores, são capazes de detectar elementos leves com grande sensibilidade (Reed, B. J.S., 1993; William, Carter., 2009).

5. Criofixação da amostra e seccionamento

Do ponto de vista analítico, não basta se fazer uso de detectores para fins de quantificação. É necessário também fazer uso de técnicas não convencionais de preparo de amostras biológicas, visando preservar sua integridade estrutural, assim como o conteúdo de íons e osmólitos, de modo que possam ser qualitativamente e quantitativamente identificados no seu local de origem. Um dos maiores problemas no preparo de amostras biológicas para microscopia eletrônica é o uso de fixadores químicos em células mantidas à temperatura ambiente. Estes penetram na célula fixando gradativamente as estruturas de fora para dentro (da membrana para as regiões mais profundas da célula). Esse efeito de fixação em gradiente causa uma série de artefatos que impactam significativamente na preservação de diferentes estruturas, bem como na mobilização de íons e osmólitos, um problema para quem deseja realizar microscopia analítica. Isto ocorre porque, nos momentos iniciais da fixação, a primeira estrutura a ser fixada é a membrana plasmática, impedindo o funcionamento dos sistemas de transporte iônico (bombas, canais e carreadores) e

induzindo a troca de íons e osmólitos da célula com o meio extracelular e das organelas com o citosol. Este processo por sua vez impacta os sistemas de controle osmótico, o que causa deformações em maior ou menor grau em estruturas e organelas, bem como a mobilização iônica. Como alternativa à fixação química, uma série de ferramentas de preparo de amostras por métodos criogênicos foi desenvolvida. Esta se baseia no congelamento ultrarrápido da amostra, que pode ser feito com uma variada gama de técnicas, visando obter o estado de vitrificação conforme descrito a seguir.

5.1 Vitrificação da amostra

O principal problema enfrentado quando se deseja trabalhar com métodos criogênicos é o controle do crescimento de cristais de gelo no interior das células. Isso ocorre, pois a água no seu estado amorfo ocupa um volume inferior ao seu estado cristalizado. Dessa forma, quando cristais de gelo são formados, estes induzem a segregação do material biológico (íons, moléculas e estruturas), causando drásticas rupturas nas células e tecidos congelados, o que pode ser facilmente observado na microscopia eletrônica (Fletcher, N. H., 1970; Franks, Felix., 1985; Bald, W. B., 1986). O objetivo de todo método de criofixação é fornecer a melhor preservação ultraestrutural possível, limitando o tamanho dos cristais de gelo em dimensões nanométricas, cujas magnitudes estejam abaixo do limite de resolução do microscópio que será utilizado na visualização das amostras (Leunissen, Yi., 2007; Leunissen, Yi., 2009).

5.2 Formato da amostra e sua relação com o congelamento

O estado vitrificado de amostras é obtido quando a água passa do estado líquido para o sólido sem a formação de cristais de gelo ou com cristais de tamanho muito reduzido ($< 1\text{nm}$). No estado vitrificado, a densidade da água em estado sólido deve permanecer próximo à densidade da água em estado líquido, sendo esta a principal característica de amostras biológicas bem criopreservadas (Dubochet, J., 1995; Leunissen, Yi., 2009). Existem vários métodos de congelamento e a eficiência de cada um pode ser influenciada pelo formato da amostra e a direção da propagação

de calor durante o congelamento. Experimentos de Hans Moor demonstraram que amostras com formato esférico, onde há troca de calor por todos os lados, resultam em um congelamento sete vezes melhor em área e profundidade do que amostras onde o congelamento se dá apenas por um lado da amostra. Amostras cilíndricas apresentam uma eficiência seis vezes maior, seguida de amostras com formato tetrahédrico com congelamento dos dois lados (quatro vezes maior) (Riehle., 1968; Moor, H., 1973; Mcdonald., 2014). A única exceção se aplica para materiais extremamente finos. A influência da forma de um objeto na espessura máxima da zona bem congelada pode ser evidenciada na Figura 2, onde a distância “X” é considerada como profundidade bem congelada de uma amostra congelado com troca de calor somente em um dos lados.

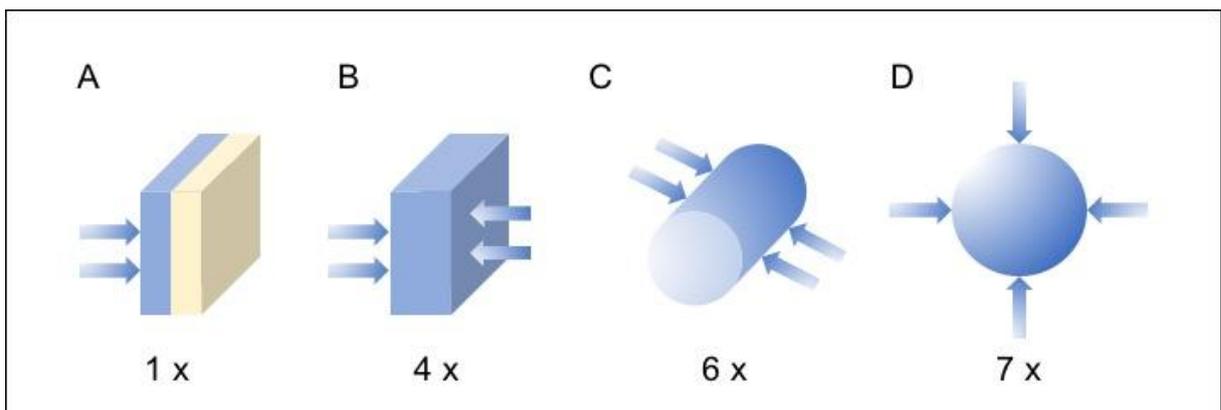


Figura 2. Relação entre a geometria do corpo a ser congelado e a profundidade de vitrificação. **A**, amostra plana com congelamento em um dos lados. **B**, amostra plana com congelamento em ambos os lados. **C**, amostra cilíndrica. **D**, amostra esférica. A taxa de eficiência da vitrificação é indicada abaixo de cada tipo de amostra. As regiões das amostras na cor azul indicam a profundidade da vitrificação e em bege, não vitrificada. As setas indicam as regiões da amostra em contato com o meio criogênico.

5.3 Tipos de criogênicos e suas classes

Existem diferentes tipos de meio criogênicos como propano, etano, freon, nitrogênio, entre outros, que possuem características importantes para o congelamento como o baixo ponto de fusão e de ebulição e alto coeficiente de condução de calor. A função de todo meio criogênico é trocar calor com a amostra, diminuindo sua temperatura

até que a temperatura de equilíbrio ocorra. Para ser considerado um bom criogênio para congelamento de células, o meio criogênico deve condensar-se com pressões moderadas, sua evaporação deve ser acima da pressão ambiente, possuir pequeno volume específico, ter alto calor latente de vaporização e ser altamente estável quimicamente (Silva, J. G., 2003).

Em pressão ambiente foi relatado que o etano líquido seria o melhor criogênio para amostras biológicas, porém previsões teóricas indicam alto potencial do nitrogênio para congelamento de material biológico quando esse se encontra em estado supercrítico, essa alta capacidade de troca de calor com a amostra se dá devido ao impedimento de formação de vapor em torno da amostra (leidenfrost), sua alta densidade e baixa viscosidade no estado supercrítico, o nitrogênio neste estado se difunde rapidamente em sólidos, sendo a taxa de congelamento neste estado de 10^4 K / s ou 10^5 °C / s, impedindo a formação de cristais de gelo, explicando a qualidade do congelamento em material biológico (N, R. Silvester, Marchese-Ragona; D. N. Johnsto., 1982; Bald, W. B., 1983; Bald, W. B., 1984; Bald, W. B., 1985; Frank., 2006).

5.4 Métodos de criofixação

5.4.1 Princípios

Métodos convencionais de preparo de amostras, como a fixação química por imersão, podem gerar uma série de artefatos. Entre eles está a remoção ou mobilização de íons de compartimentos celulares, o que pode inviabilizar o estudo analítico (Warley., 1997). Uma alternativa para a preservação da integridade estrutural e morfológica, bem como a prevenção da mobilidade de íons e osmólitos na célula, é a fixação por diferentes métodos de congelamento ultrarrápidos.

A finalidade deste tipo de congelamento é obter o estado de vitrificação das moléculas de água, ou seja, um estado amorfo onde o fenômeno de nucleação e crescimento dos cristais ocorra de forma reduzida, assim favorecendo a criomobilização dos íons contidos em organelas (Cavalier et al., 2013; Girard-Dias et al., 2012).

A nucleação de cristais de gelo depende de uma série de fatores como temperatura, pressão, composição do meio, etc. No que se refere à temperatura, existe uma faixa crítica de cristalização que varia entre 0°C à -40 °C, para água pura, e em torno de 0 °C à -70 °C para soluções contendo outras moléculas além da água (meios de cultura, ambiente intracelular, etc) (Bald, W. B., 1987; Echlin., 1992).

Essa cristalização pode ser minimizada de diferentes formas, em geral por duas estratégias principais: (1) o uso de substâncias que interferem nas ligações de hidrogênio e dificulta a formação de cristais de gelo durante o processo de congelamento (crioprotetores como; etilenoglicol, sacarose, sais, etanol, metanol, etc) ou (2) o uso de técnicas de congelamento rápido e ultrarrápido que reduzam o tempo de permanência da amostra na faixa crítica de cristalização, dessa forma reduzindo o tempo de crescimento dos cristais (Steinbrecht, R. A, Zierold., 1987; Echlin., 1992).

5.4.2 Congelamento rápido e ultrarrápido

Existem diferentes métodos de congelamento rápido e ultrarrápido, cada um com aplicações específicas para cada tipo de amostra e informação que se deseja obter. Em alguns casos, a amostra pode ser previamente fixada e infiltrada em solução contendo crioprotetor (estratégia 1), o que não é o ideal no preparo de amostras para microscopia analítica, por contar com etapas de fixação e infiltração. Em outros casos, a amostra deve ser congelada no seu estado nativo, sem etapas prévias de fixação ou infiltração (estratégia 2). A seguir, descreveremos os métodos e equipamentos mais utilizados desta última.

5.4.3 Congelamento por imersão

Esta forma de congelamento se baseia na imersão da amostra em meio criogênico como o freon, etano ou propano líquido resfriado por nitrogênio líquido (-196 °C) ou no próprio nitrogênio líquido, caso a amostra esteja infiltrada em crioprotetor. Este congelamento pode ser realizado manualmente ou com auxílio de equipamento especializado. De ambas as formas, a amostra é montada em suporte específico

(“stubs” com formato de prego) e imersa com o auxílio de uma pinça em um líquido criogênico. O modo manual possui a vantagem de ser de baixo custo e de fácil acesso à qualquer grupo de pesquisa, pois não necessita de equipamento específico. No entanto, não possui controle de temperatura nem de umidade. Nos casos onde se deseja obter um filme de material congelado em suspensão (como moléculas e células) é necessário fazer uma secagem controlada do material (blotting) de modo a formar o filme fino sem a secagem completa das células (Kuo, John., 2007). Alguns equipamentos realizam esta etapa com controle de temperatura, umidade e secagem robotizada, o que aumenta significativamente a eficiência de produção de filmes congelados (Kuo, John., 2007). O congelamento por imersão é considerado um método de baixa eficiência, apresentando baixa profundidade de bom congelamento, em torno de 1-10 μ m (Echlin., 1992). Entre as considerações que devem ser feitas para um bom congelamento por imersão incluem-se a espessura da amostra, sua área, volume, formato e superfícies de contato com o criogênio, assim como o tempo de permanência da amostra no meio congelante e velocidade de troca de calor do respectivo líquido (Echin.,1992).

Na figura abaixo se demonstra o procedimento para congelamento por imersão.

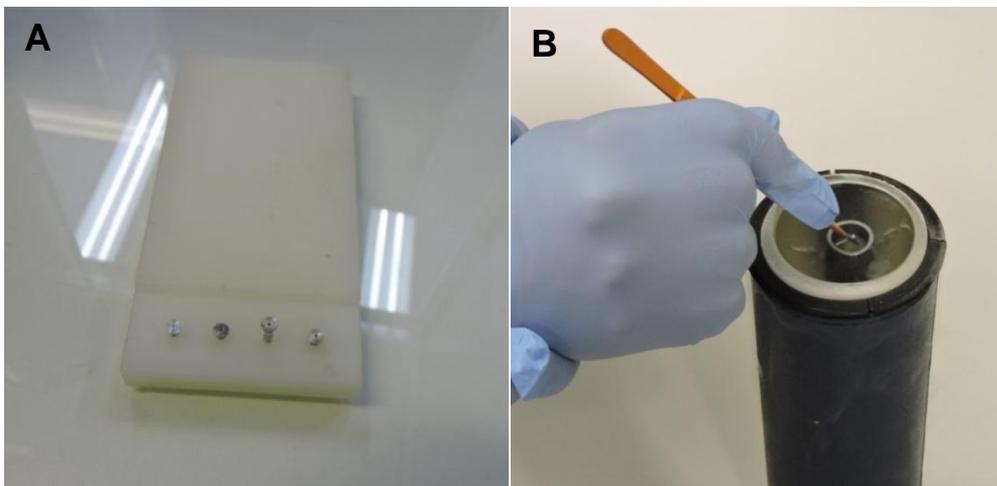


Figura 3. Pinos de alumínio no suporte de acrílico para manuseio no momento do congelamento. **A**, pino de alumínio imerso em etano resfriado por nitrogênio líquido. **B**. (Imagens obtidas no Laboratório de Ultraestrutura Celular Hertha Meyer).

5.4.4 Congelamento por impacto

Neste tipo de congelamento a amostra é montada em um suporte apropriado para encaixe em um braço vertical mecânico do aparelho de congelamento por impacto. Por meio de um acionamento eletrônico, o braço é solto e a gravidade o fará colidir com um bloco de metal extremamente polido, livre de impurezas e resfriado por nitrogênio ou hélio líquido. Ao colidir com esta superfície resfriada, a amostra é congelada instantaneamente (Bald, W. B., 1987). Por contar com esta superfície metálica que permanece sólida à baixa temperatura, este método proporciona maior taxa de troca de calor quando comparado com o método anterior. Sua eficiência de vitrificação, no entanto, se restringe à uma profundidade em torno de 10-20 μm . Neste método, os materiais mais adequados para a confecção dos blocos para colisão do espécime são cobre ou prata em função do seu alto coeficiente de condução de calor (Carslaw, H. S; Jaeger, J. C., 1959; Bald, W. B., 1983). Uma desvantagem deste método é a potencial deformação da amostra, caso a força de colisão seja muito alta. Para minimizar este efeito, amostras podem ser montadas em gelatina ou almofadas de feltro podem ser acopladas ao suporte, formando um colchão que absorve o impacto da amostra (Bald, W. B., 1987; Kuo, Jhon., 2007).

Na figura 4 se observa o esquema do aparelho de congelamento por impacto.

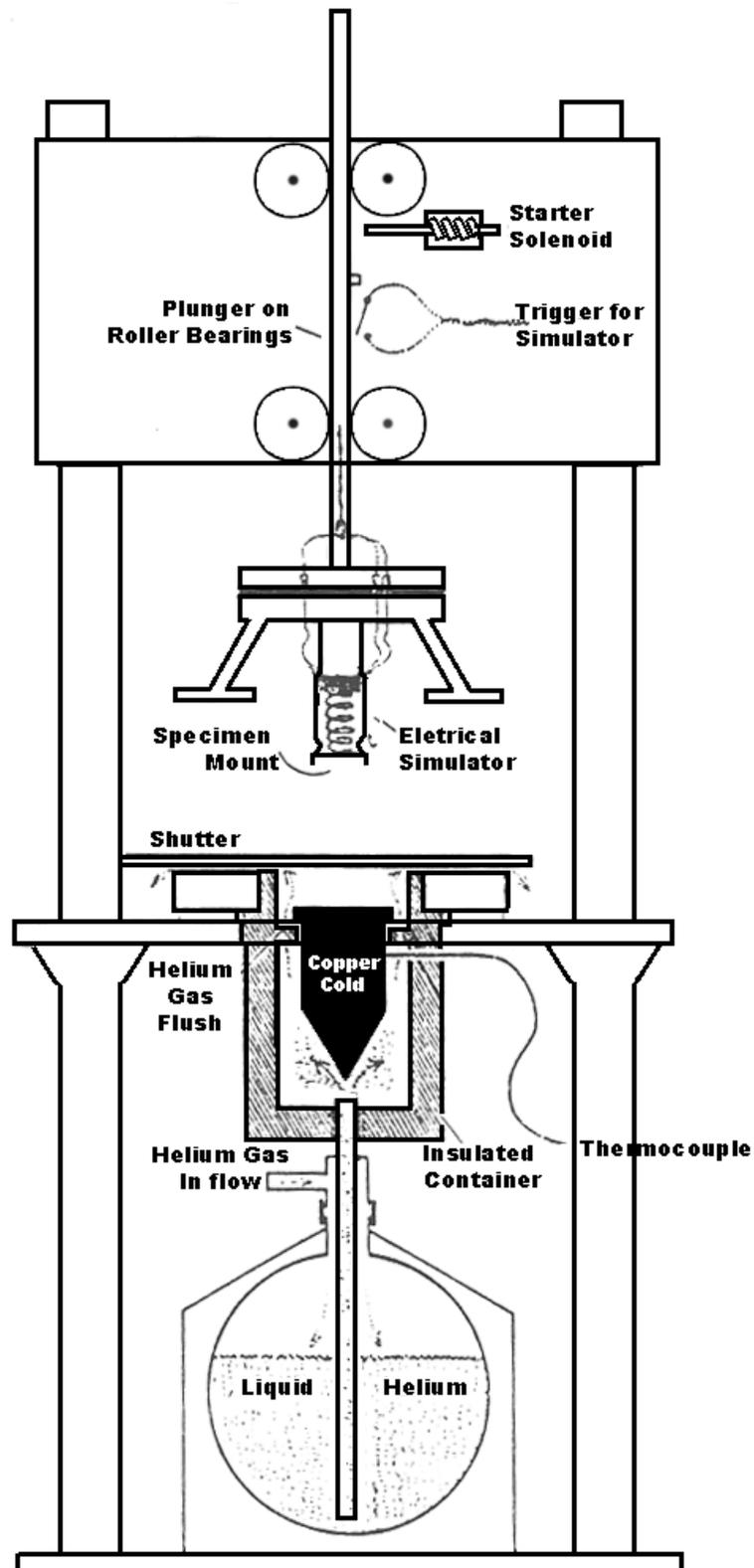


Figura 4. Esquema do primeiro aparelho de congelamento por impacto construído por Heuser. (Retirado e adaptado de De Souza., 2011).

5.4.5 Congelamento por alta pressão

Este é o método que proporciona a maior profundidade de vitrificação da amostra, em torno de 300 μm (alguns fabricantes alegam uma boa profundidade de até 500 μm) (Moor, H., 1973). Neste método, a amostra é alocada entre suportes de alumínio que serão congelados por nitrogênio líquido na câmara do aparelho à uma pressão de 2100 bar por cerca de 500 ms. A pressão suprime fisicamente a expansão do volume da amostra, minimizando significativamente a formação de cristais de gelo. Esse método requer treinamento na utilização do equipamento, assim como altos custos na aquisição do equipamento e sua manutenção (Steinbrecht, R. A., Zierold., 1987).

Na figura 5 se observa o esquema de funcionamento de aparelho de congelamento por alta pressão.

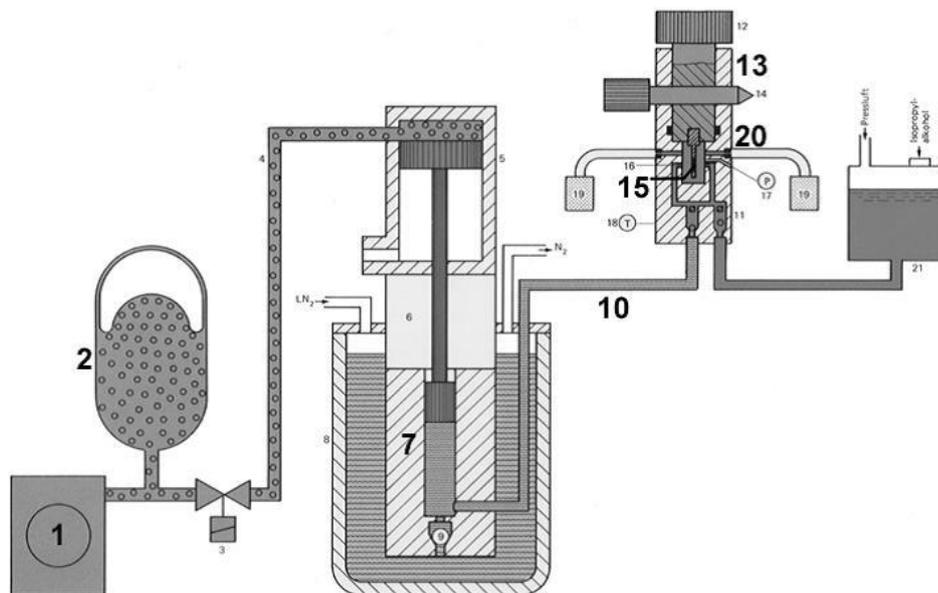


Figura 5. Esquema de funcionamento do aparelho de congelamento por alta pressão onde se observa as partes enumeradas do aparelho: 1 – bomba mecânica, 2 – tanque de óleo, 7 – cilindro de alta pressão, 10 – linha de nitrogênio pressurizado, 13 – câmara de congelamento, 15 – orifício de entrada do nitrogênio líquido, 20 – orifício de saída de etanol. (Retirado e adaptado de Humbel., 2009).

5.4.6 Congelamento por spray

Neste tipo de congelamento, o material biológico é pulverizado em uma câmara apropriada produzindo células individualizadas em gotas de dimensões micrométricas. Estas gotas são então lançadas contra um recipiente metálico contendo um líquido criogênico (propano ou etano) resfriado em nitrogênio líquido. Após o congelamento, o excesso de criogênio é sublimado com o auxílio de bomba de vácuo, restando esferas de amostras congeladas. Este método possui a vantagem de congelar células individualizadas em gotas, o que teoricamente não limita o volume total da amostra, mas sim o volume da gota. Pelo mesmo motivo, trata-se de um método exclusivo para células em suspensão, não podendo ser utilizado em tecidos (Bald, W. B., 1987).

Na figura 6 se observa o esquema de congelamento por spray..

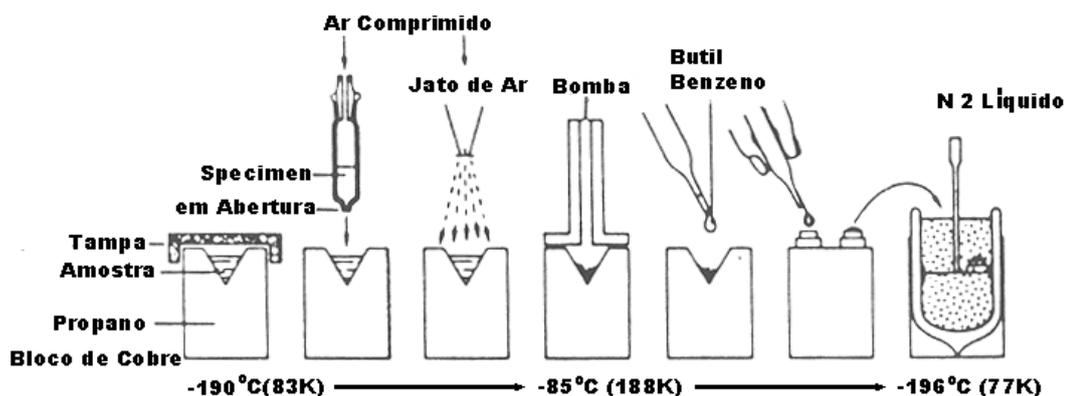


Figura 6. Esquema de funcionamento do aparelho de congelamento por spray. O propano se condensa em um recipiente metálico resfriado por nitrogênio líquido, em seguida as células são lançadas ao meio de congelamento pelo jato de ar, a temperatura é então elevada a -85°C , tornando o propano gasoso e este será retirado pela bomba de mecânica. As gotículas congeladas entram em contato com o butil benzeno a cerca de -90°C e essas são transferidas para o nitrogênio líquido. (Retirado e adaptado de De Souza., 2011).

5.4.7 Congelamento por jato de criogênio

Neste tipo de congelamento, amostras são depositadas entre duas superfícies metálicas compostas de material com baixo coeficiente de condução de calor como alumínio ou titânio, pois estes irão conservar a temperatura baixa logo que o material receber meio criogênico. Após o congelamento, as amostras podem ser transferidas e armazenadas em balão de nitrogênio líquido. A eficiência deste método limita a profundidade de bom congelamento em cerca de 20 μm (Bald, W. B., 1987; Steinbrecht, R. A, Zierold., 1987). Na figura 7 se observa o esquema da técnica de congelamento por jato de criogênio.

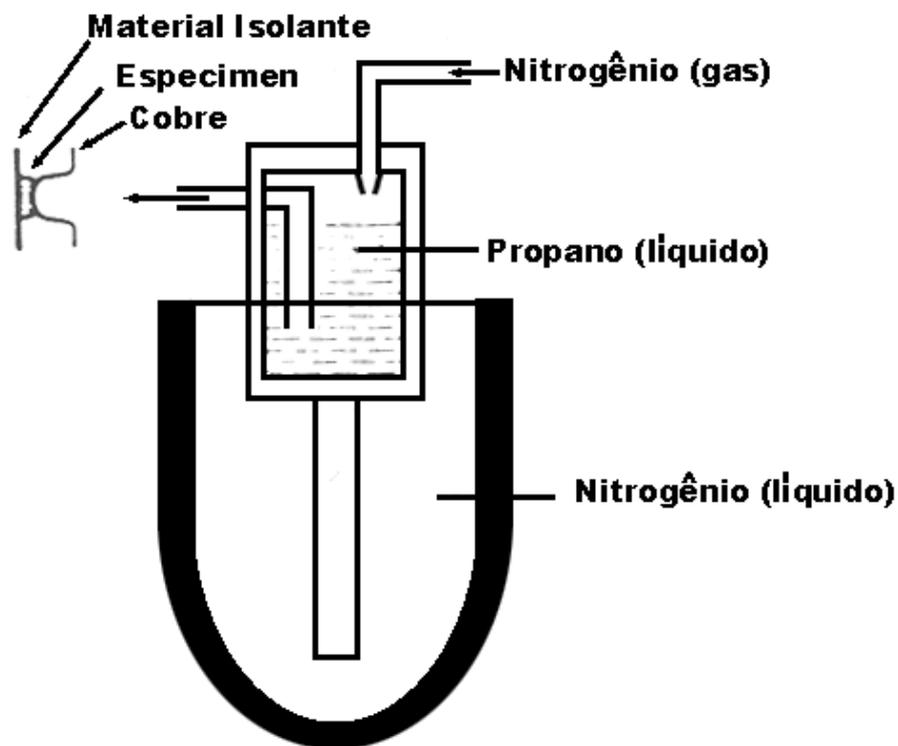


Figura 7. Esquema de funcionamento da técnica de congelamento por jato de criogênio. Sendo o criogênio (propano), as amostras biológicas são alocadas entre duas placas metálicas para então receber o jato de propano ou qualquer outro meio criogênico. (Retirado e adaptado de De Souza., 2011).

5.5 Equipamentos de seccionamento de material biológico

Uma das principais limitações na observação de amostras por microscopia eletrônica de transmissão se refere à espessura da amostra a ser analisada. Amostras muito espessas geram uma série de artefatos que degradam a resolução da imagem (aberração cromática, sobreposição de estruturas, entre outros). No que se refere à microscopia analítica, uma limitação se dá pela sobreposição de estruturas ao longo do volume iluminado pelo feixe de elétrons. Nessa condição, se houver duas ou mais estruturas sobrepostas, a sua composição iônica combinada será registrada, o que pode levar a erros de interpretação. Em alguns casos, compartimentos ricos em íons que se apresentam em grande número ou estruturas também ricas em íons, bem definidas e com grande volume, podem ser observadas como estruturas inteiras (células ou organelas isoladas) no MET e ainda assim prover uma boa assinatura de elementos para as organelas em questão. Este é o caso dos grânulos de volutina e acidocalcissomos de bactérias e protozoários, magnetossomos de bactérias, etc, que, por possuírem certos elementos químicos em alta concentração, são comumente analisados em células inteiras e gerando assinaturas qualitativas confiáveis de seus elementos químicos (Miranda et al., 2000; Querido, W., Rossi, Al., Farina, M.; 2016; Silva. T., Karen et al., 2013). Quando se trata de microscopia analítica quantitativa, no entanto, é necessário que a amostra tenha uma espessura definida, que possa ser comparada com o padrão utilizado para a calibração do microscópio. Dessa forma, parâmetros importantes para quantificação, como a contribuição do raio-X contínuo para o espectro, podem ser normalizados e as diferenças minimizadas. Para obtenção de amostras com espessura definida, com seções extremamente finas (cerca de 70 nm) na MET convencional, utiliza-se um ultramicrotomo (Groot De.,1988). Já para microscopia analítica, como as amostras encontram-se em estado vitrificado, utiliza-se um crioultramicrotomo, que possui uma câmara apropriada que é resfriada com nitrogênio líquido e preenchida de nitrogênio gasoso. A temperatura reduzida da câmara e do braço mecânico do crioultramicrotomo mantém o estado amorfo das moléculas de água presente na amostra, que é seccionada em uma navalha de diamante também mantida à baixa temperatura. As temperaturas da faca e da amostra devem possuir uma pequena diferença de pelo menos 1 (um) Kelvin, para que ocorra um microderretimento da amostra no gume da navalha, caso contrário esta não será cortada, mas sim

fraturada (Hodson, Stuart, Williams., 1976; Kirk, Gary, Knoff, Laura, Lee, Ping., 1991).

5.6 Fabricação de facas de vidro

As facas de vidro são de extrema importância para se realizar um bom trabalho em crioultramicrotomia. Diferentemente das facas de diamante que possuem um alto custo de aquisição, as facas de vidro possuem baixo custo e em geral são confeccionadas no laboratório. A confecção de facas de vidro de qualidade depende de alguns parâmetros, como a limpeza das barras de vidro (utilização de luvas em seu manuseio e um ambiente isolado são importantes) e a velocidade e a forma de fratura (Kuo, John., 2007). O desenho do fio de corte da faca é importante, podendo ser côncavo planar, em forma de cunha ou com a ponta em forma de formão (Humbel, B. M; Muller, M., 1986; Ludwig, Edelmann., 1991). As facas com o formato côncavo planar possuem fio de corte mais fino e são ideais para material de alta maleabilidade, enquanto as facas com o formato de cunha são empregadas para material resinado e corte de material congelado hidratado e material crioprotetido que recebeu tratamento prévio de fixação e infiltração em sacarose (Sitte, Hellmuth., 1981; Skaer, H., 1982).

6. Quantificação de elementos por microanálise de raios-X em amostras biológicas

A quantidade de raios-X característicos emitidos pela amostra depende majoritariamente de suas concentrações, da área irradiada, da corrente do feixe, do tempo de permanência deste feixe sobre a região de interesse, do tempo de aquisição dos raios X e da espessura da amostra. A eficiência na coleta destes raios X característicos é também dependente da perda por excitação secundária e da capacidade de processamento de sinal do detector. Além disso, fatores como a espessura da amostra (espessas, semi-finas ou finas) influenciam significativamente na emissão e captação de sinal, sendo necessária a escolha do método mais adequado para aferir as concentrações dos diferentes elementos presentes na amostra (Warley., 1997; Warley., 2016).

6.1 Quantificação pelo método de normalização da radiação contínua

O método de normalização do contínuo ou método de Hall faz uso da radiação contínua presente em espectros para determinar a massa total da região analisada e expressar a concentração de elementos como massa (número de átomos) por unidade de massa (μg da amostra) (Figura 3). Amostras biológicas possuem em sua composição elementos de baixo número atômico, sendo C, N e O constituintes de cerca de 90% da matriz orgânica. Estes apresentam uma radiação contínua significativa no espectro. Hall propôs que a radiação contínua poderia contribuir para a aferição da massa total da área analisada, introduzindo o ensaio de normalização da radiação característica e o valor da radiação contínua para se obter a concentração do elemento de interesse em relação a concentração total de elementos na amostra biológica, desta forma compensando variações na espessura dos cortes (Hall, T. A., 1991; Warley., 1997; Warley., 2016). Este tem sido o método de escolha por diferentes microscopistas (Shuman et al., 1976; Roomans., 1988a; Zierold., 1988b; Warley., 2016). A equação referente ao método da normalização do contínuo pode ser definida por:

$$C_x = K_x \cdot (P_x / W) \cdot \Sigma (f_a Z_a^2 / A_{r(a)}) \quad (4)$$

onde K_x = corresponde a constante de calibração do sistema para o elemento de interesse (analisado no momento da microanálise de raio-X), a = representa os diversos elementos constituintes da região analisada e $\Sigma (f_a Z_a^2 / A_{r(a)})$ = a soma da fração de massa total dos elementos presentes na área irradiada multiplicada por Z^2 / A_r de cada elemento localizado na região irradiada, $\Sigma (f_a Z_a^2 / A_{r(a)})$ também pode ser encontrado em artigos científicos como fator G (Hall, T. A., 1991; Warley., 1997; Warley., 2016). Isolando K_x na equação do método do contínuo para o padrão obtemos $K_x = C_{xp} / (P_x / W)_p \cdot G_p$. Realizando a substituição de K_x na equação referente a amostra que será analisada pelo método do contínuo obtemos uma nova equação. A equação obtida geralmente é encontrada em artigos e livros por ser a forma prática de utilização dos programas de microanálise de raios-X. Essa equação é mostrada abaixo:

$$C_{xa} = C_{xp} \cdot [(Px/W)_a / (Px/W)_p] \cdot (G_a / G_p) \quad (5)$$

onde C_x = é a concentração do elemento de interesse que será analisado em mmoles / Kg de massa seca. Os subscritos a e p são referentes a amostra e ao padrão utilizado (Warley., 1997; Warley., 2016).

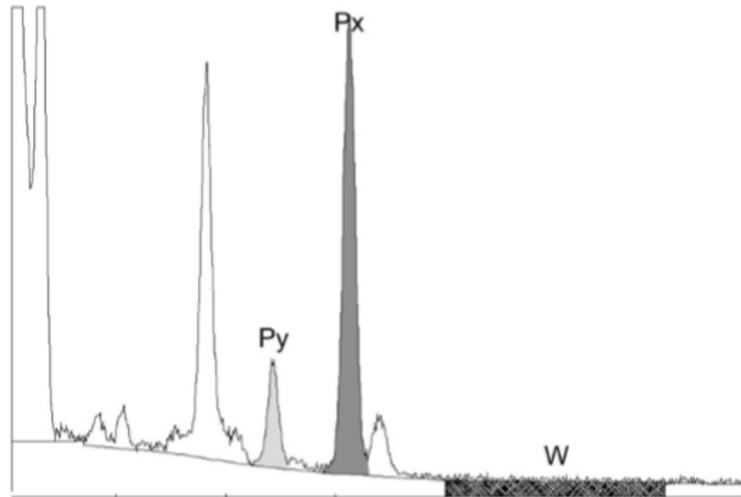


Figura 8. Espectro mostrando as áreas que são usadas para quantificação. Com o método de Hall, a fração de massa do elemento de interesse é determinada dividindo-se o número de contagens de pico da radiação característica (P_x) pelo número de contagem da faixa de radiação branca (W) definida em uma região livre de pico do espectro. Quantificação (mmoles/ kg massa total) é obtida pela análise de um padrão de interesse (K_x) (Retirado e adaptado de Warley., 2016).

6.1.1 Faixa de energia e a estimativa da radiação contínua

A seleção da região do espectro para se determinar a intensidade da radiação contínua é escolha do operador no momento da análise, porém vem de longa data uma discussão entre diferentes pesquisadores sobre a melhor região para se determinar a radiação contínua. Hall em seu artigo de 1973 sugere que a faixa de mais alta energia do espectro deva ser utilizada, pois efeitos de absorção e fluorescência secundária são mínimos, ou seja, estes podem ser negligenciados durante quantificação (Hall et al., 1973). Shuman (1976) discute a utilização da região de baixa energia do espectro baseado no fato de que a radiação gerada pelos elementos de pequeno número atômico é máxima nesta região e a radiação contínua emitida da grade utilizada é mínima (Shuman et al., 1976). Outros grupos de pesquisa definiram uma região intermediária para se realizar a quantificação

(Roomans, G. M; Kuypers, G. A. J., 1980). Até o momento não há um consenso sobre a região da radiação contínua a ser selecionada no momento da quantificação porém alguns fatores devem ser considerados entre esses; a faixa de energia da radiação contínua deve ser igual para o padrão e para a amostra analisada; a faixa de energia para se determinar a radiação contínua deverá esta isenta de picos característicos de elementos presentes na amostra. Além disso, a região a ser realizada a quantificação da radiação contínua deverá ser larga o bastante para que variações no número de contagem seja reduzida ao máximo assim se determinando com grande precisão o valor da radiação contínua (Warley., 1997; Warley., 2016).

6.1.2 Radiação contínua e fatores de correção

O sucesso do método de Hall é dependente da aferição da radiação contínua da amostra sozinha, ou seja, sem influências da radiação contínua emitida pela grade, pelo porta amostras do microscópio e pelo filme de carbono ou formvar onde o corte se encontra depositado (Warley., 1997). A região do espectro da radiação contínua será a soma das radiações emitidas pelos fatores citados acima, sendo a equação representativa listada abaixo;

$$W_t = W_a + W_g + W_f + W_h \quad (6)$$

onde W_t = radiação contínua total, W_a = radiação da amostra, W_g = radiação da grade, W_f = radiação do filme e W_h = radiação do porta amostras do microscópio. A quantificação de elementos presentes na amostra depende da subtração da radiação emitida pelos interferentes na equação acima. O número de contagens de um dado elemento para a formação da região no espectro da radiação contínua é uma fração do número total de contagem de seu pico característico. Desta forma a grade e o porta amostras são analisados separadamente e suas respectivas radiações contínuas e seus picos característicos podem ser determinados. Essa fração obtida é um fator de correção para análise dos espectros utilizando-se as mesmas fontes de avaliação (Warley., 1997; Warley., 2016). O fator de correção para o porta amostras e para a grade é evidenciado abaixo nesta ordem;

$$R_h = W_h / P_h \quad (7)$$

$$R_g = W_g / P_g \quad (8)$$

A radiação contínua do filme é calculada pela subtração da soma das radiações contínuas sem a presença da amostra. Essa equação é mostrada abaixo;

$$W_f = W_t - W_h - W_g \quad (9)$$

Quando se realiza a correção da radiação contínua deve-se realizar o alinhamento do microscópio analítico além de se dar preferência à região central da grade. Em relação à análise do porta amostras e da grade, estes somente produzem um pico característico, simplificando a quantificação de elementos. Caso mais de um elemento químico seja constituinte do holder e da grade citada, o fator de correção deve ser feito para cada elemento. Durante a análise quantitativa no microscópio analítico, o fator de correção deverá permanecer constante para utilização posterior em quantificação de elementos (Warley., 1997).

7. Metodologia

7.1 Cultivo de células

Formas epimastigotas de *T. cruzi* (cepa Y) foram cultivadas em meio LIT (Liver Infusion Tryptose) suplementado com 10% de soro fetal bovino (GIBCO) por 72 horas a 28 °C. Todas as células foram cultivadas no Laboratório de Ultraestrutura Celular Hertha Meyer, no Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, na Universidade Federal do Rio de Janeiro.

7.2 Congelamento por alta pressão

As formas epimastigotas foram centrifugadas a 1.500 g por 3 minutos em temperatura ambiente. Após isso, o sobrenadante foi descartado e as células foram resuspensas sem a utilização de qualquer líquido de lavagem de células e inseridas em capilar de cobre com o auxílio de uma pipeta de 10 μ L p. Para o congelamento em capilares de cobre puro cujas dimensões foram de 7 mm de comprimento, 650 μ m de diâmetro externo e 350 μ m de diâmetro interno. Foram projetados e confeccionados suportes específicos para o aparelho de congelamento por alta pressão (HPM 010, Bal-Tec). Os suportes originais deste equipamento foram projetados para acomodar amostras em discos de alumínio, cobre ou safira de 3 mm. Para que tubos de cobre pudessem ser congelados, um novo porta amostras foi projetado, conforme descrito nos resultados. Os suportes foram então submetidos ao congelamento sob alta pressão em nitrogênio líquido a uma pressão de aproximadamente 2.100 bar quando se utiliza um osciloscópio conectado ao equipamento de congelamento por alta pressão. As células congeladas em capilar de cobre foram armazenadas em nitrogênio líquido ou seguiram para etapa de crioultramicrotomia.

7.3 Congelamento por imersão

As formas epimastigotas foram centrifugadas a 1.500 g por 3 minutos à temperatura ambiente. Após isso, foi descartado o sobrenadante e as células foram inseridas em pinos suporte de alumínio para crioultramicrotomia com o auxílio de um palito que teve sua ponta cortada para adquirir um formato de pá. Com auxílio de pinças, o material foi então congelado manualmente por imersão por 30 segundos em etano líquido, resfriado por nitrogênio líquido a -196 °C. As células congeladas foram armazenadas em nitrogênio líquido ou seguiram para crioultramicrotomia.

7.4 Crioultramicrotomia e *freeze-drying*

As amostras congeladas pela metodologia de imersão e alta pressão foram transferidas para o equipamento de crioultramicrotomia (Leica EM FC6). Cortes congelados foram obtidos com espessura de 120 nm, sendo a temperatura do suporte do espécime ajustada para -161 °C, a da faca para -156 °C e da câmara a -166 °C. As grades para microscopia de transmissão (100 mesh) cobertas com formvar/carbono foram submetidas à descarga elétrica no equipamento Easyglow momentos antes da realização de crioultramicrotomia e guardadas em suportes resfriados à -196 °C em nitrogênio líquido. Com o auxílio de um cílio, os cortes foram depositados em grades de microscopia eletrônica, que foram então armazenadas para suportes desenhados e confeccionados especialmente para transferência para o aparelho de criofratura (BAF 300, Balzers 060, Liechtenstein) previamente resfriado a -170 °C e mantido em alto vácuo (10^{-6} Pascal), onde foi realizado o *freeze-drying*. A temperatura da câmara permaneceu em -170 °C por 2 horas até que ocorresse a retirada total de cristais de gelo sob o suporte por sublimação. Logo depois, a válvula de bombeamento de nitrogênio líquido e o aparelho de criofratura foram desligados, permanecendo no interior da câmara o suporte com as grades até atingir a temperatura ambiente.

7.5 Elaboração de amostras-padrão para microanálise quantitativa

Para preparação das amostras referentes à calibração do sistema do microscópio, foi utilizado 1g de albumina dissolvida em 4ml de solução contendo 100 mM de

diferentes eletrólitos como; CaCl_2 , MgCl_2 , CuCl_2 , K_2HPO_4 , NaCl , KCl , $\text{KFe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ e MgSO_4 (Warley., 1997). Estas soluções foram preparadas com água miliq congeladas pelos dois métodos citados e posteriormente submetidas à crioultramicrotomia. Cortes obtidos com espessura de 120 nm foram coletados em grades de cobre e transportados em porta grades para o equipamento de criofratura para a realização do *freeze-drying*.

7.6 Microanálise de raios-X

Nesta etapa, os cortes liofilizados de *T. cruzi* foram observados no microscópio eletrônico de transmissão-varredura Jeol 1200 EX, operando a 80 kV, spot size 6 a 60.000 vezes de magnificação. Os raios-X foram coletados por 100 segundos utilizando-se um detector de Si(Li) com janela Norvar, 0-10 Kev de dispersão de energia e com resolução de 10 eV por canal. As análises foram feitas utilizando-se um sistema de análise NSS 2.3 X-ray Microanalysis (Thermo Fisher Scientific). A área do pixel foi de $0,2\mu\text{m}^2$, a corrente do feixe em torno de 1nA, o tempo de permanência do feixe de elétrons por pixel foi de 4s e a corrente de emissão do filamento de tungstênio de aproximadamente 10 μA . O mapeamento de elementos e a aquisição de imagens quantitativas de raios-X foram feitas utilizando os parâmetros descritos acima. Nesta dissertação de mestrado foi utilizado o método de normalização do contínuo (método de Hall) para determinação das concentrações em acidocalcissomos de *T. cruzi*.

7.7 Mapeamento de raios-X

Nesta etapa, os cortes liofilizados de *T. cruzi* foram observados no microscópio de transmissão-varredura de alta resolução FEI G2 80-200 KV Titan, operando a 200KV, spot size 3, gun lens 3 e tempo de aquisição dos mapas de raios-X de 10 minutos. Os raios-X foram coletados utilizando um sistema de EDS FEI Super X ChemsSTEM com 4 detectores.

8. Resultados e Discussão

8.1 Confeção de peças para otimização do congelamento por alta pressão, crioultramicrotomia e secagem por *freeze-drying*

Em sistemas que utilizam métodos de congelamento ultrarrápido, a geometria do corpo influencia diretamente na profundidade de vitrificação da amostra criofixada. Desta forma, amostras com geometria esférica ou cilíndrica proporcionam maior eficiência na preservação estrutural (Riehle., 1968; Moor, H., 1973; Bald, W. B., 1987). Neste trabalho, realizamos a criofixação das amostras e padrões para microanálise quantitativa de duas formas: (1) congelamento por imersão em etano líquido e (2) congelamento por alta pressão. Para o congelamento por alta pressão, optamos por inserir as amostras em capilares de cobre para aumentar a eficiência do congelamento devido sua geometria cilíndrica. Neste sentido, foi necessário a confecção do projeto, antes de se realizar a adaptação do suporte original do equipamento de congelamento por alta pressão para que esse pode-se acomodar os capilares de cobre. Na figura 9, ilustramos o projeto com as dimensões deste suporte, com base nas medidas do suporte original do equipamento para congelamento de amostras em discos (“*carries*”). Este suporte foi projetado e sua execução realizada no Laboratório de Instrumentação e Tecnologia Mecânica (LITMEC), no Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas (CBPF).

De forma prática, optamos por adaptar o suporte original para as medidas detalhadas no projeto (Figura 9) e, com isso, otimizar o tempo de confecção do suporte para os capilares. Os capilares de cobre utilizados possuem dimensões de 7mm de comprimento, 650 μm de diâmetro externo e 350 μm de diâmetro interno. Além de aumentar a eficiência no congelamento por alta pressão como mencionado anteriormente, a utilização dos capilares de cobre também proporcionou maior facilidade na etapa de crioultramicrotomia (Figura 11). Os capilares com amostras criofixadas puderam ser facilmente transportados para o crioultramicrotomo e sua geometria favoreceu a rápida trimagem para exposição da amostra criofixada e obtenção dos cortes semifinos e coleta em grades de cobre (100 mesh), grades estas utilizadas para diminuir a radiação emitida pela mesma, o que poderia ser um interferente do radiação contínua da amostra no momento de análise quantitativa. Podemos também considerar que esta estratégia é capaz de preservar o tempo de

vida útil da navalha, uma vez que as dimensões da parede do capilar de cobre que devem ser trimadas são consideravelmente menores quando comparadas com os discos (“*carries*”) normalmente utilizados para o congelamento por alta pressão no equipamento.

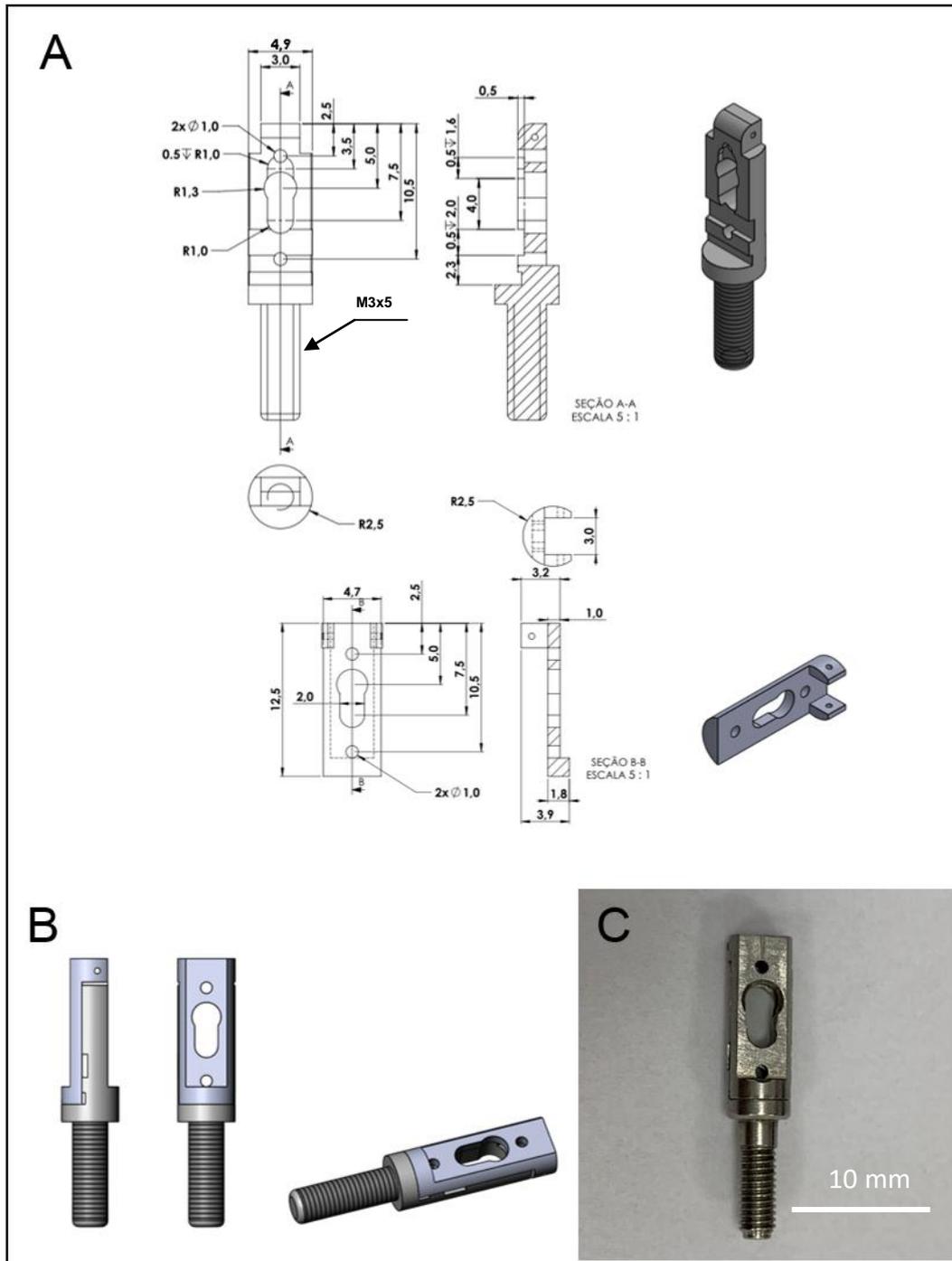


Figura 9. Suporte desenvolvido para congelamento por alta pressão em capilar de cobre. **A**, projeto bidimensional e tridimensional com dimensões das diferentes partes do suporte. **B**, modelo tridimensional com vista lateral e frontal. **C**, imagem do suporte finalizado. Todas as medidas estão em milímetros (Adaptação realizada no LITMEC - CBPF).

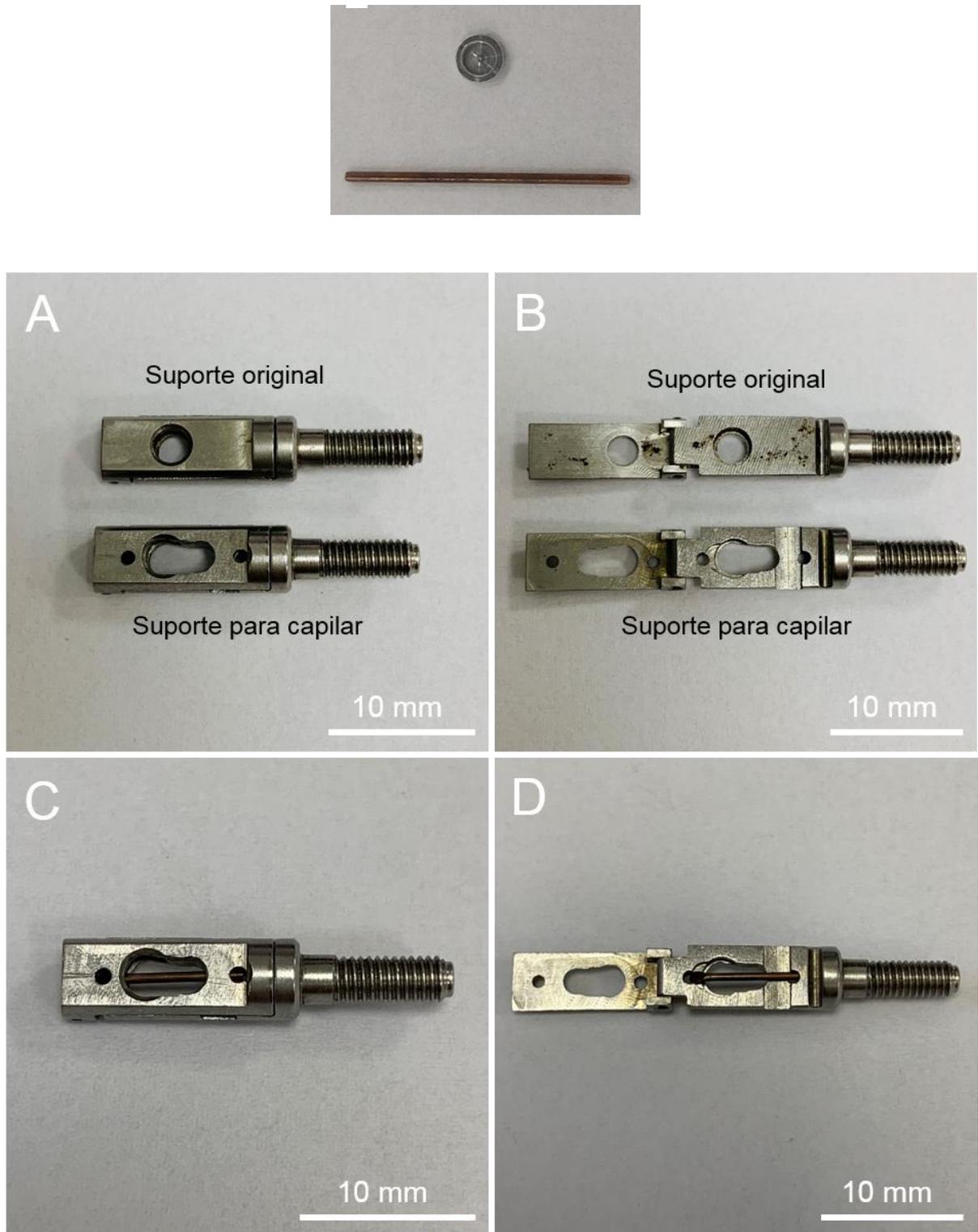


Figura 10. Suporte desenvolvido para congelamento por alta pressão em capilar de cobre. **A e B**, observação do suporte original para congelamento em discos e suporte confeccionado para utilização

de capilares de cobre. **C e D**, suporte com capilar de cobre inserido. **E**, imagem do disco para congelamento de amostras no suporte original e a imagem do capilar.

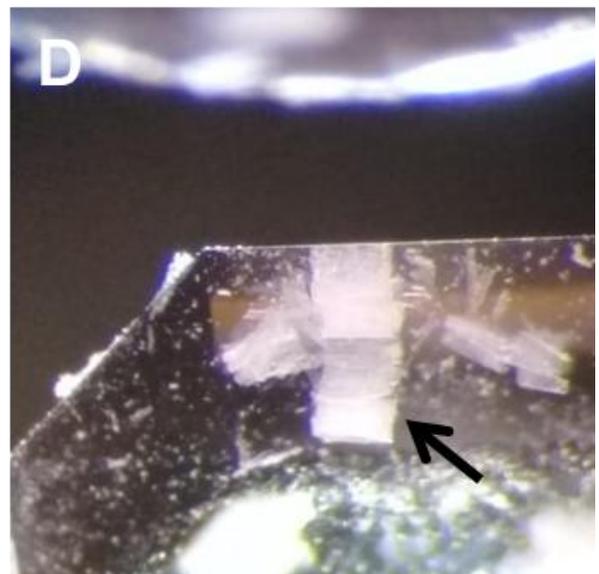
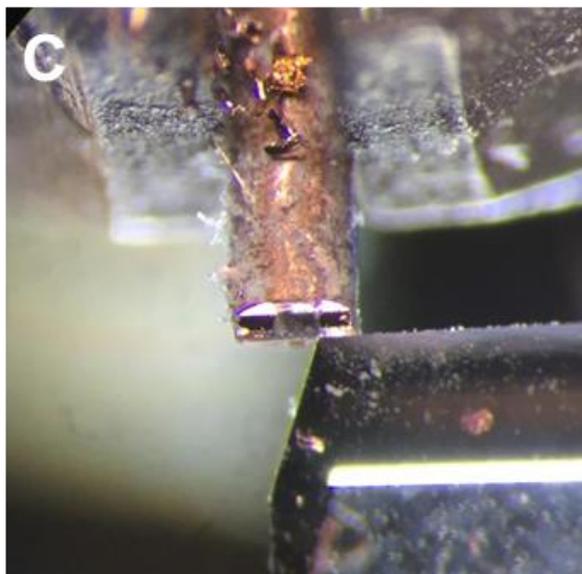
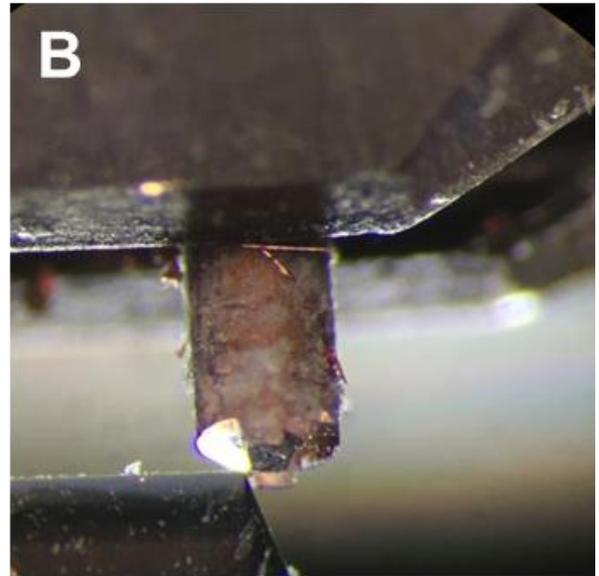
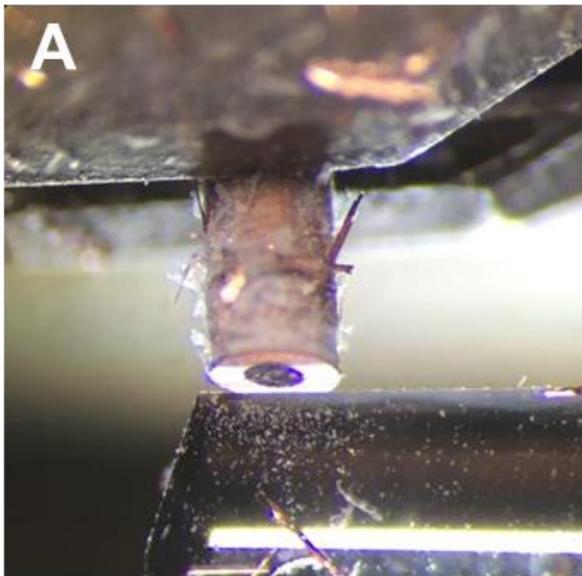
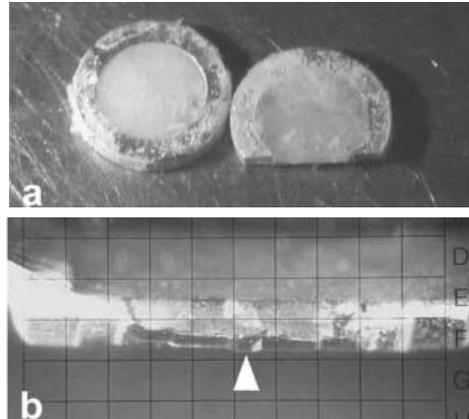


Figura 11. Trimagem e crioultramicrotomia de capilar de cobre. **A-C**, trimagem do capilar para exposição da amostra vitrificada. **D**, obtenção de fita de criocortes (seta). **a** e **b**, imagem de disco com material congelado no suporte original (figura 10), repare na redução do tempo de trimagem quando se compara amostras congeladas em capilar com amostras congeladas em discos (Retirado de Frank., 2006).

De forma a tornar segura a transferência das grades de cobre contendo os criocortes semifinos entre o crioultramicrotomo e o equipamento para realização da secagem pelo método “*freeze-drying*”, foi necessário desenvolver um suporte para acomodar e transportar diferentes grades simultaneamente. Como ilustrado na figura 11, o suporte foi projetado em liga de alumínio (Duralumínio – liga metálica de Al, Cu (1,5%-4,5%) e Mg (0,45%-1,5%, Mn (0,6%-0,8%) e Si (0,5%-0,8%)). sendo composto por três partes: uma base maciça; tampa e pino, cujas medidas estão detalhadas. A base maciça foi projetada para manter a baixa temperatura durante a transferência das amostras. Nesta base, foram perfurados orifícios para acomodar as grades e facilitar seu manuseio através de pinças. A tampa, juntamente com o pino, auxilia no manuseio e transporte do suporte, evitando, principalmente, a deposição de cristais de gelo sobre a amostra (figuras 11 e 12). O suporte pôde ser alocado tanto no interior da câmara do crioultramicrotomo, como no equipamento utilizado para a secagem, o que facilitou todo o processo com as grades.

A etapa de secagem pelo método de *freeze-drying* pode ser realizada em qualquer equipamento capaz de gerar alto vácuo (10^{-6} Pascal), controlar a temperatura em condições criogênicas (-170 °C) e possuir uma câmara com tamanho apropriado para acomodar as amostras. Neste trabalho, utilizamos para este fim um equipamento de criofatura BAF 300 (Balzers, Liechtenstein) (figura 14 A). Para acomodação do suporte com as grades contendo os criocortes (figura 13) previamente adquiridos na etapa de crioultramicrotomia, a base de inserção de amostras na câmara do equipamento foi modificada. Adaptamos uma mesa confeccionada em alumínio com dimensões apropriadas para o suporte com as grades (figura 14 B).

A confecção dos dois últimos suportes citados acima foi realizada na oficina de tornearia mecânica do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho.

Ambos suportes confeccionados foram fundamentais para a realização das diferentes etapas desde o congelamento até a secagem da amostra para a observação e quantificação dos elementos no MET. No caso do suporte para

congelamento por alta pressão de capilares de cobre, esta estratégia permitiu a utilização de um equipamento já existente no laboratório, eliminando a necessidade de aquisição ou emprego de um equipamento específico. Desta forma, disponibilizamos neste trabalho os projetos dos suportes desenvolvidos, que poderão ser reproduzidos por diferentes grupos de pesquisa para aplicações não somente na linha abordada neste trabalho, mas também em diferentes estudos que envolvam metodologias de criopreservação.

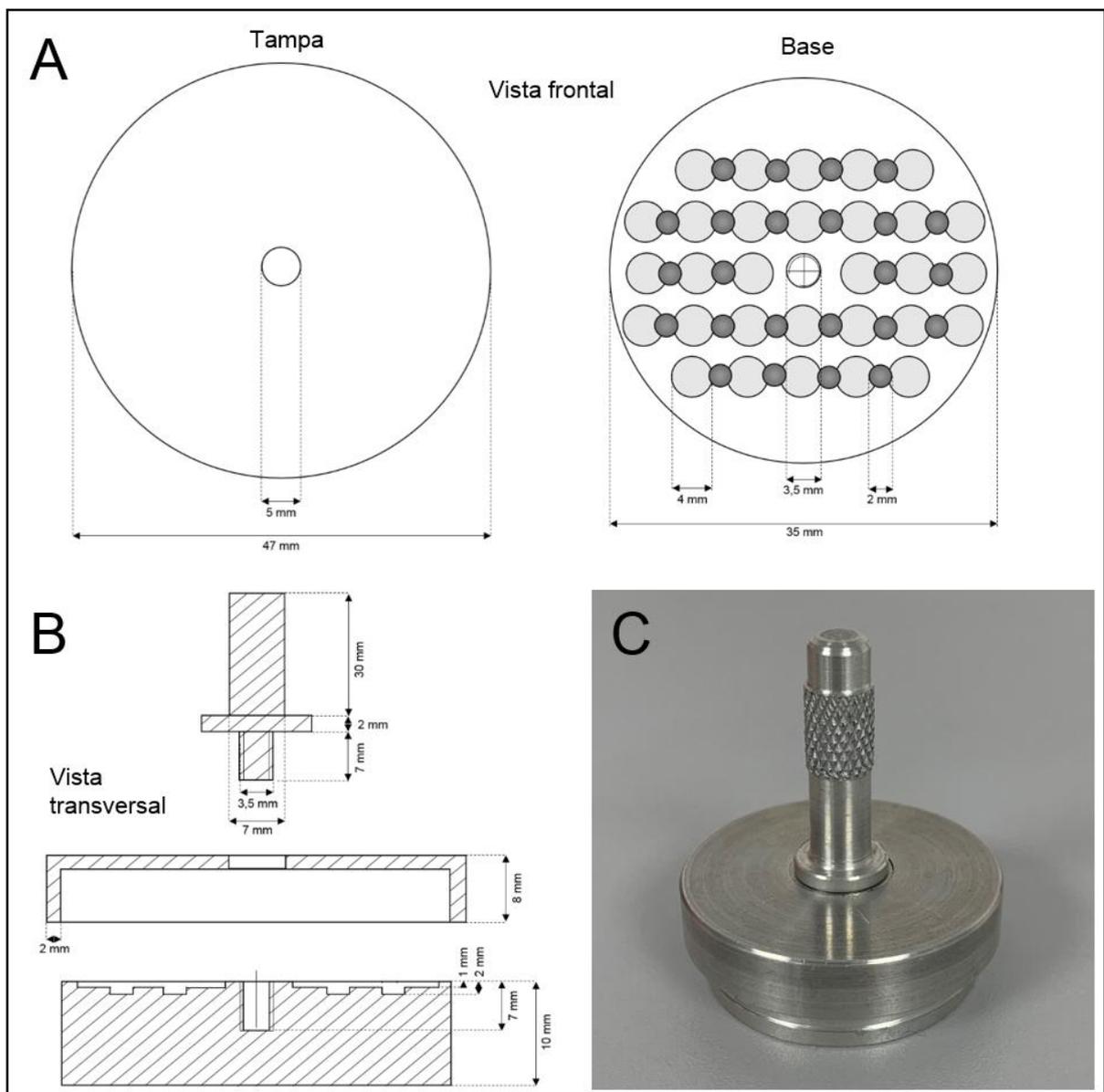


Figura 12. Suporte para secagem por *freeze-drying*. **A e B**, projeto com dimensões de diferentes partes do suporte. **C**, imagem do suporte finalizado (Confeção realizada na oficina mecânica do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho (UFRJ).

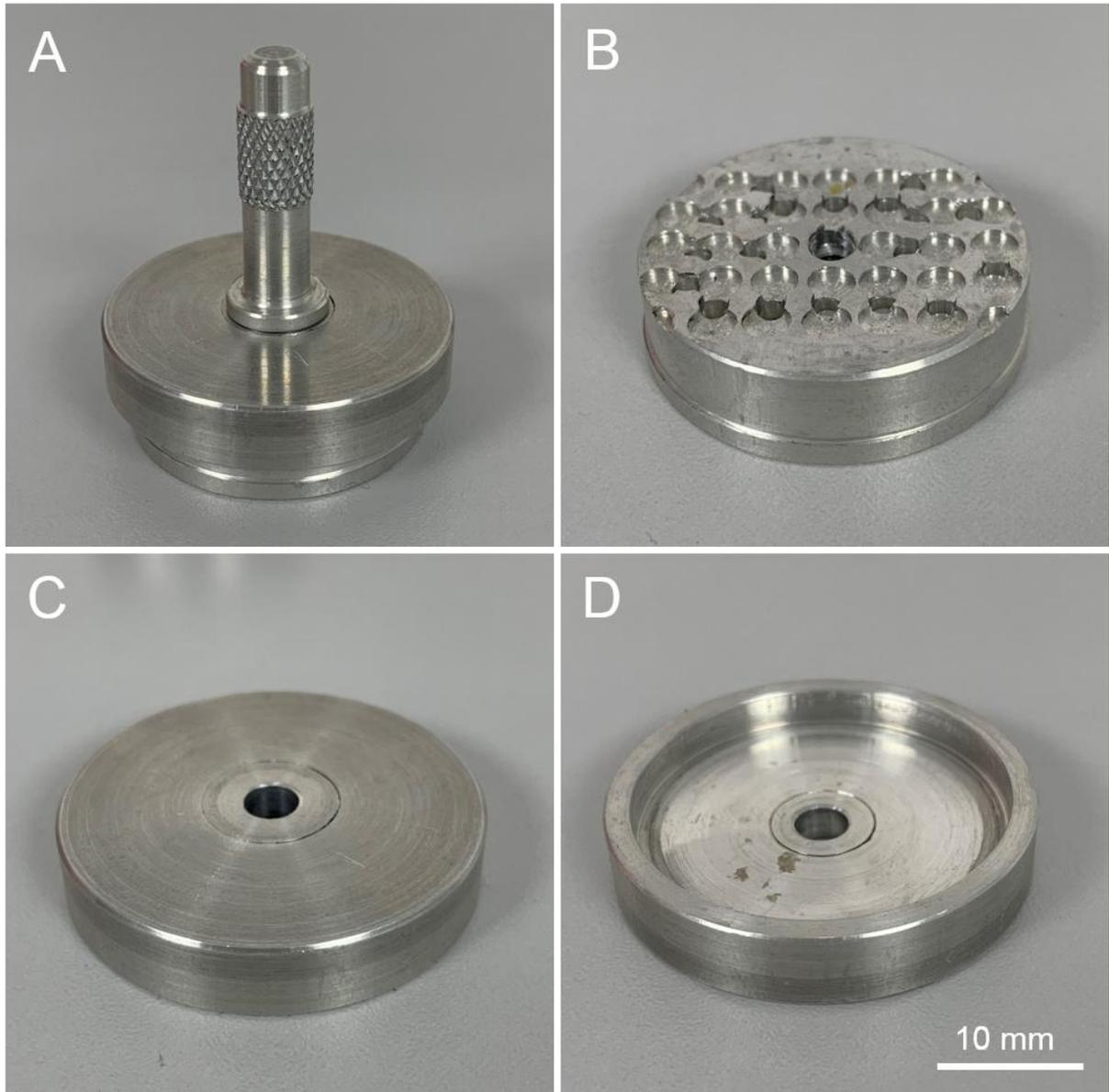


Figura 13. Suporte para secagem por *freeze-drying*. **A**, suporte montado. **B**, vista frontal da base do suporte. **C e D**, tampa do suporte com vista externa e interna, respectivamente.

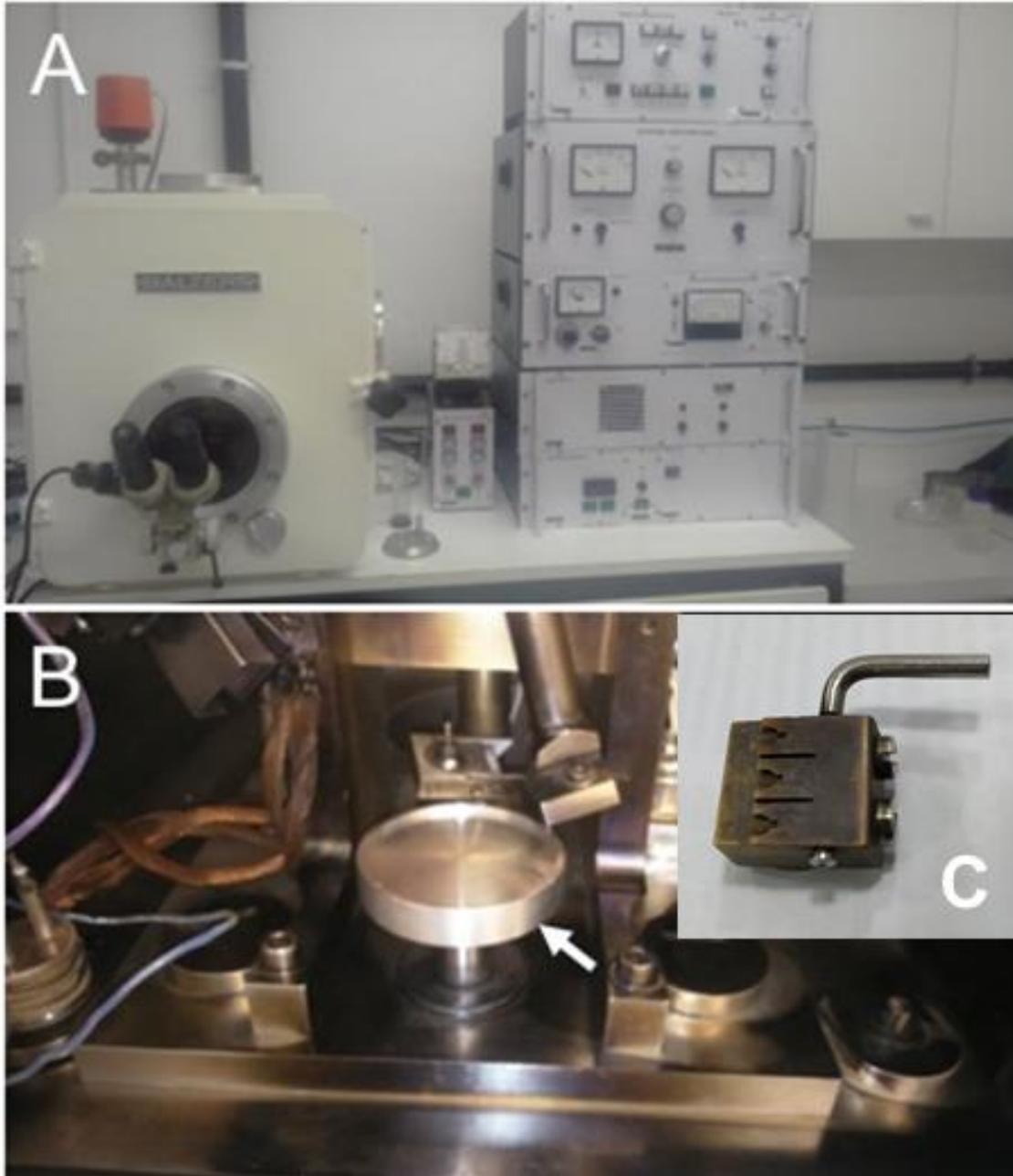


Figura 14. Aparelho de criofatura utilizado para a etapa de *freeze-drying*. **A**, visualização externa do aparelho. **B**, câmara do aparelho com a mesa adaptada inserida (seta). **C**, mesa do aparelho de criofatura antiga, repare que a mesa adaptada favoreceu o resfriamento e a acomodação do suporte da figura 8 para realização do *freeze-drying*. (Confecção realizada na oficina mecânica do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho (UFRJ)).

8.2 Avaliação da preservação estrutural e química das amostras

O emprego de técnicas de criofixação promove a imobilização ultraestrutural e química em amostras biológicas, evidenciando a arquitetura celular o mais próximo do seu estado nativo. Após a criofixação, as amostras podem ser processadas de diferentes formas, como por exemplo a observação direta por criomicroscopia, a substituição a frio ou a secagem de criocortes por *freeze-drying*. Esta última modalidade, que foi utilizada neste trabalho, é considerada a mais eficiente para estudos da composição química da amostra por meio dos diferentes métodos analíticos em microscopia eletrônica. Devido a problemas operacionais, criocortes de amostras congeladas pela metodologia de alta pressão não foram observados no microscópio, motivo estes; perda dos criocortes depositados em grades de cobre com formvar durante a etapa de *freeze-drying*, dificuldade da própria coleta dos criocortes devido o surgimento de cargas elétricas estáticas no interior da câmara do crioultramicrotomo, o que causaria sua dispersão, para minimizar a dispersão dos criocortes sugiro o aumento da intensidade da corrente de descarga elétrica do aparelho antiestático que se encontra conectado ao crioultramicrotomo que foi utilizado para obtenção dos resultados, princípio esse já utilizado em modelos mais novos do aparelho de crioultramicrotomia Leica FC6 e FC7, pois a descarga elétrica no momento da coleta dos criocortes seriados favorece a adesão dos mesmos sob a grade com formvar. A falta de um suporte adequado para fixação dos capilares de cobre que possibilita-se a centralização e posterior trimagem para obtenção dos criocortes, Nesta dissertação optamos por realizar uma comparação entre o congelamento por imersão e congelamento por alta pressão, porém problemas de manuseio dificultaram o procedimento experimental como foi abordado acima. Com isso somente é apresentado nesta dissertação os resultados obtidos com a metodologia de congelamento por imersão, entretanto não teríamos grandes novidades caso fosse observado criocortes (congelamento por alta pressão) submetidos ao *freeze-drying*, pois utilizando o mesmo raciocínio da metodologia de imersão obteríamos resultados semelhantes (imagens) aos que são apresentados (Fig 15). Embora amostras congeladas pelas metodologias de criofixação possam apresenta imagens de criocortes semelhantes, o congelamento por alta pressão favorece um volume maior de amostra com água no estado vitrificado, ainda mais quando se realiza o congelamento de amostras em capilar, cujo fator de

congelamento e multiplicado 6x, com isso é possível realizar a crioultramicrotomia e estudar a ultraestrutura com uma espessura maior quando se compara com o congelamento de amostras por imersão, devido essa última técnica de congelamento resulta em uma espessura de até 15 µm de material biológico bem criopreservado (vitrificado), além desta espessura amostras congeladas por imersão tornam-se quebradiças, pois a espessura das amostras bem criofixadas diminui com o volume quando se utiliza a técnica de congelamento por imersão.

A observação por MET de cortes de 120 nm obtidos por crioultramicrotomia e *freeze-drying* evidenciou perfis de diferentes células de *T.cruzi*, onde puderam ser facilmente distinguidos os acidocalcissomos pela sua morfologia circular e alta quantidade de material retido (figura 15). O detalhamento de outras organelas ou perfis de membranas foi de difícil observação para se identificar tais organelas presentes no citoplasma do parasito. De acordo com Zierold (1988), a metodologia de "*freeze-drying*" pode gerar artefatos na ultraestrutura celular devido ao encolhimento da amostra (10-20%) durante o processo de secagem, causado pelo colapso de macromoléculas ao perderem sua camada de solvatação. Isto pode explicar a ausência de detalhes finos da morfologia do *T. cruzi* (figura 15). Apesar disso, como esta metodologia não submete a amostra à fixação química por imersão, desidratação em solventes orgânicos ou contato dos cortes com água, como ocorre na ultramicrotomia convencional, os elementos químicos não são mobilizados. Dessa forma, diferentes acidocalcissomos foram observados majoritariamente com a matriz totalmente preenchida por seu conteúdo iônico.

Para confirmar o perfil iônico dos acidocalcissomos observados, analisamos diferentes cortes por microanálise de raios-X e detectamos os elementos característicos como P, Mg, Ca, Na, K, Fe e Zn em espectros obtidos do interior da organela, e não em espectros coletados no citoplasma e filme de formvar (figura 16). Da mesma forma, o padrão de ferrocianeto de potássio foi observado e a obtenção dos espectros de raios-X evidenciou a presença de seus íons constituintes, especialmente os íons K e Fe, que foram utilizados para comparação quantitativa em relação aos acidocalcissomos (figura 17).

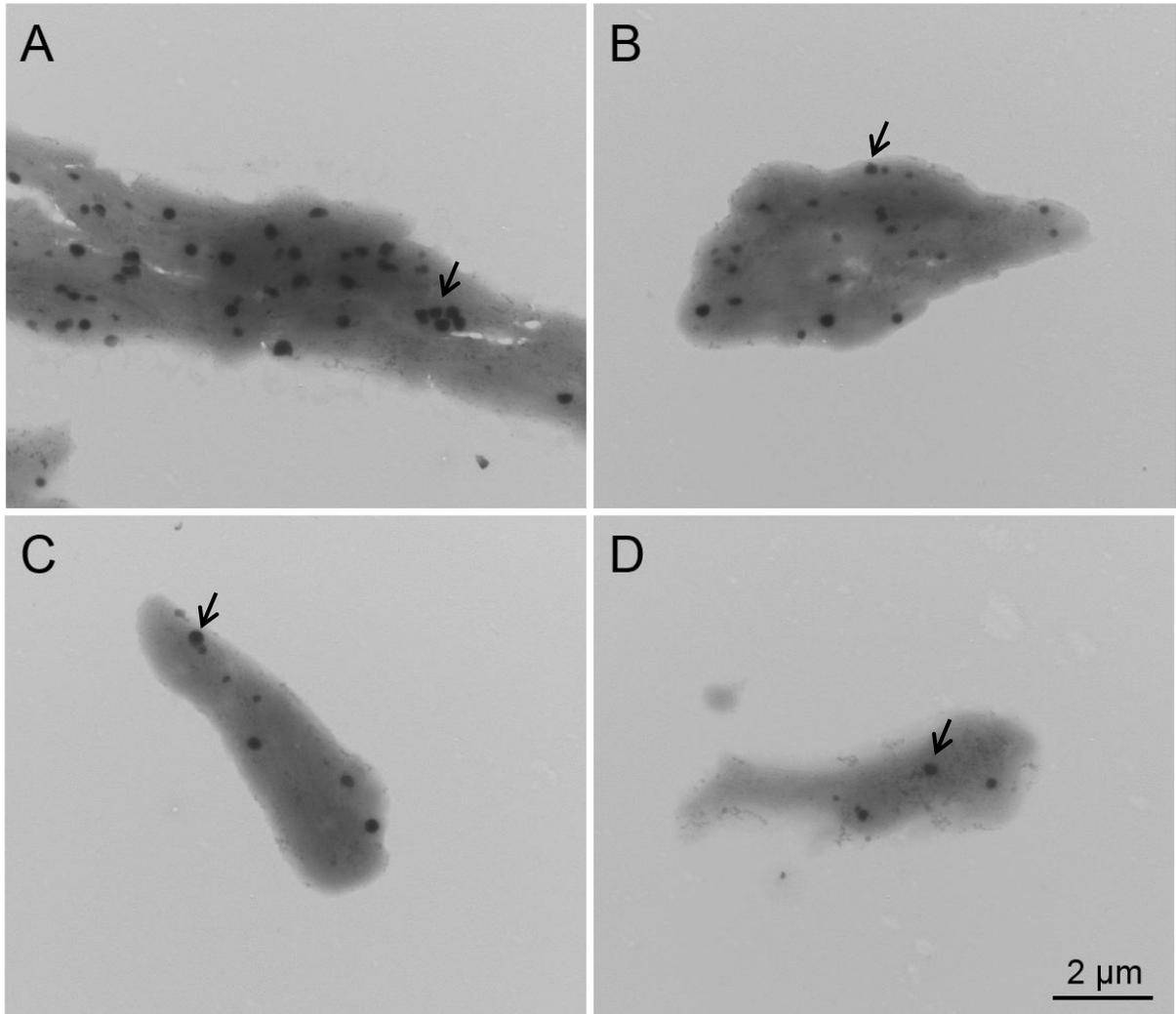


Figura 15. Observação de cortes de 120 nm do *T. cruzi* congelado por imersão seguida de *freeze-drying* imagens obtidas no microscópio Jeol 1200 EX. **A-D**, diferentes perfis de células onde os acidocalcisomos podem ser observados distribuídos pelo citoplasma (organelas eletrondensas esféricas).

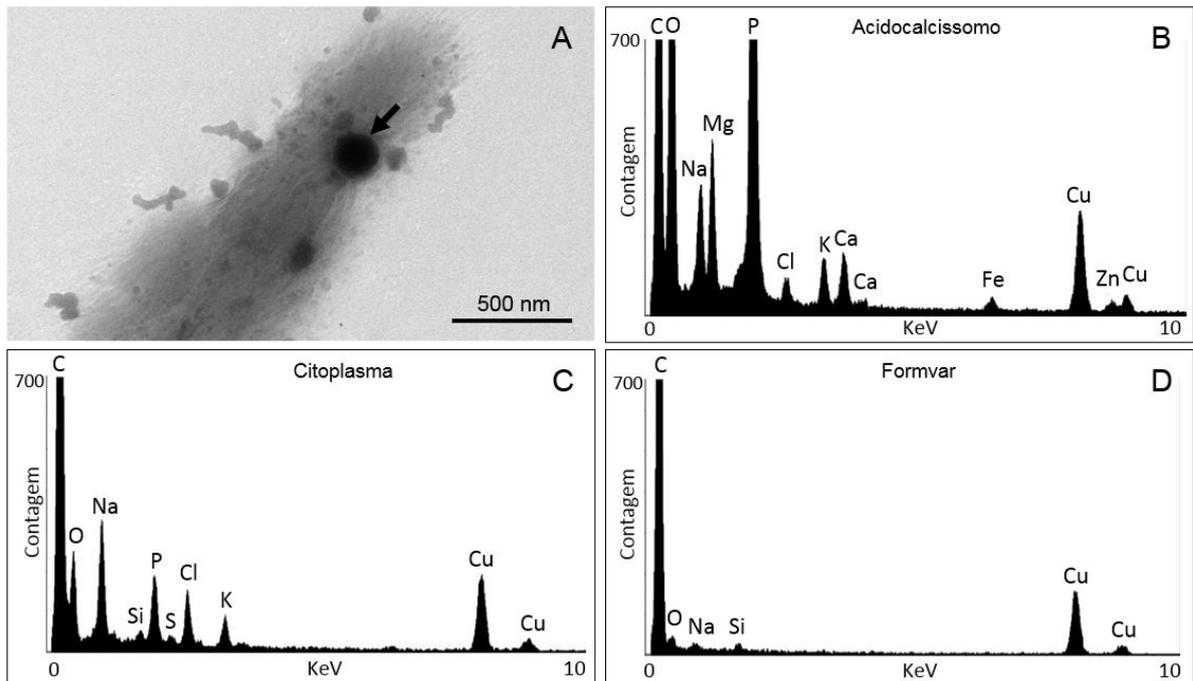


Figura 16. Microanálise de raios-X em acidocalcissomo do *T. cruzi* congelado por imersão obtida nomicroscópio 1200. **A**, imagem de MET de uma região da célula onde um acidocalcissomo pode ser observado (seta). **B**, espectro de raios-X do acidocalcissomo. **C e D**, espectros controle obtidos do citoplasma e filme de formar, respectivamente.

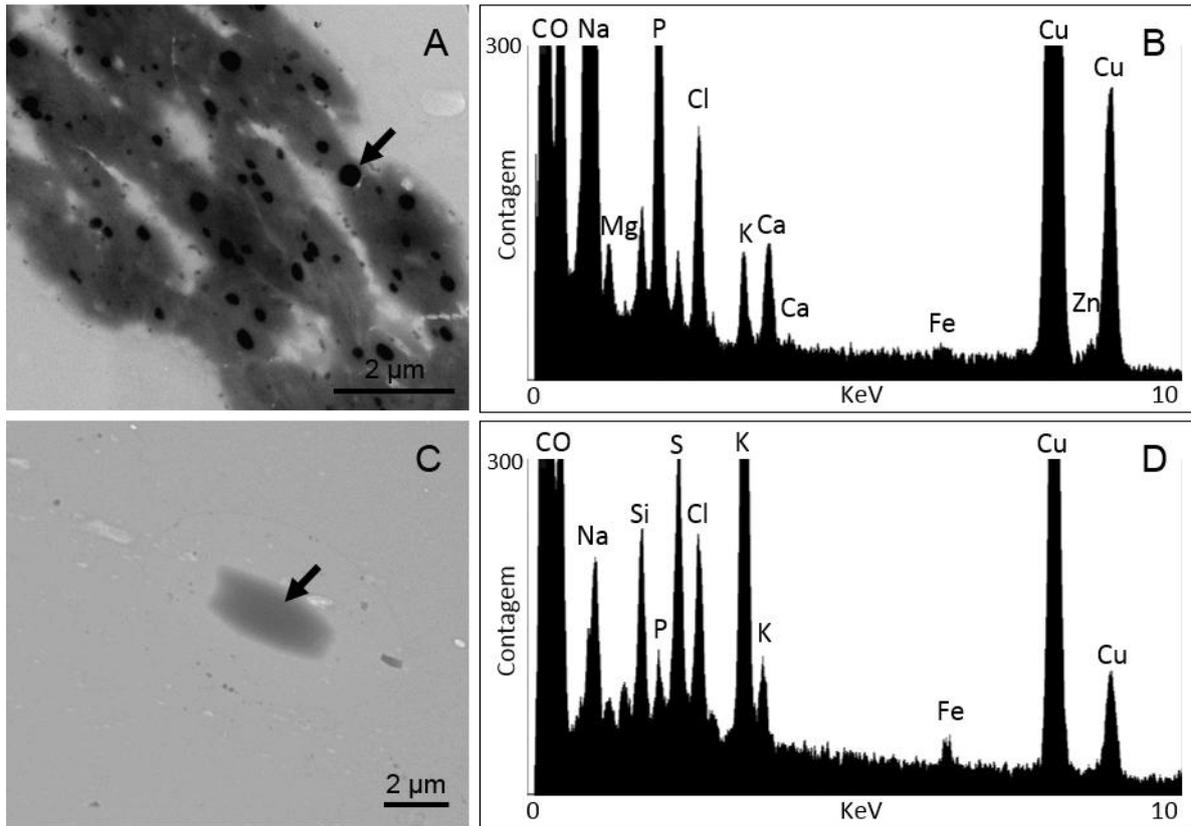


Figura 17. Microanálise de raios-X em acidocalcissomo do *T. cruzi* e padrão de ferrocianeto de potássio ambos congelados por imersão. **A e B**, imagem de *T. cruzi* por MET e espectro obtido de um acidocalcissomo (seta). **C e D**, imagem de MET e espectro obtido do padrão (seta). Ambas as imagens foram obtidas no microscópio Jeol 1200 EX.

O mapeamento de elementos em perfis de diferentes células corroborou que os íons identificados anteriormente nos espectros obtidos dos acidocalcissomos se encontravam concentrados nos limites das organelas (figura 18). Esta característica de localização dos íons pôde ser evidenciada também ao analisarmos acidocalcissomos individualizados (figura 19).

Os resultados obtidos com as metodologias abordadas (criofixação-crioultramicrotomia-*freeze-drying*) demonstraram que esta estratégia possibilitou um alto grau de preservação química da amostra. Esta característica pôde ser confirmada pela preservação da morfologia e do conteúdo iônico dos acidocalcissomos, que apresentaram sua matriz totalmente preenchida. Como demonstrado em diferentes trabalhos onde a fixação química por imersão foi empregada, os acidocalcissomos do *T. cruzi* apresentam geralmente apenas parte de seu conteúdo iônico retido no interior da organela (Girard Dias et al., 2012). Esta é uma característica que pode ser atribuída à mobilização dos íons no interior dos acidocalcissomos devido a diferentes fatores, como a perda de seletividade das membranas, desequilíbrio osmótico no momento da fixação e as subseqüentes lavagens em solventes orgânicos. Diferentemente, em trabalhos onde técnicas de criofixação foram empregadas, os acidocalcissomos foram observados com a matriz eletrondensa íntegra (Scott. A David, Docampo Roberto, Dvorak. A J. et al., 1997).

O fato de outras organelas terem sido observadas com mais dificuldade, com exceção dos acidocalcissomos, que naturalmente possuem grande densidade de massa, traz a necessidade de se aliar metodologias de preparo mais eficientes na preservação ultraestrutural à microanálise de raios-X, quando o objetivo for associar dados analíticos à localização subcelular. Este é o caso da técnica de substituição a frio, que proporciona um alto nível de preservação estrutural e química, como já demonstrado por Hardt e Plattner (1999) em um estudo de quantificação de elementos em amostras processadas por substituição a frio. Diferentes aspectos morfológicos do *T. cruzi* também foram abordados de forma satisfatória com a utilização da substituição a frio em um trabalho de nosso grupo, que demonstrou alta qualidade na preservação ultraestrutural do parasito (Girard-Dias et. al., 2012). Esta metodologia seria mais vantajosa para localização subcelular e quantificação de elementos em organelas que, diferente dos acidocalcissomos, possuam menor eletrondensidade. Porém, não existem dados na literatura que tenham analisado

comparativamente a composição iônica em amostras processadas pelas metodologias de *freeze-drying*, *freeze-drying* embebidas em resina, substituição a frio e congelada e hidratada sem tratamento prévio . Este tipo de estudo poderia elucidar a eficiência da preservação química pela substituição a frio.

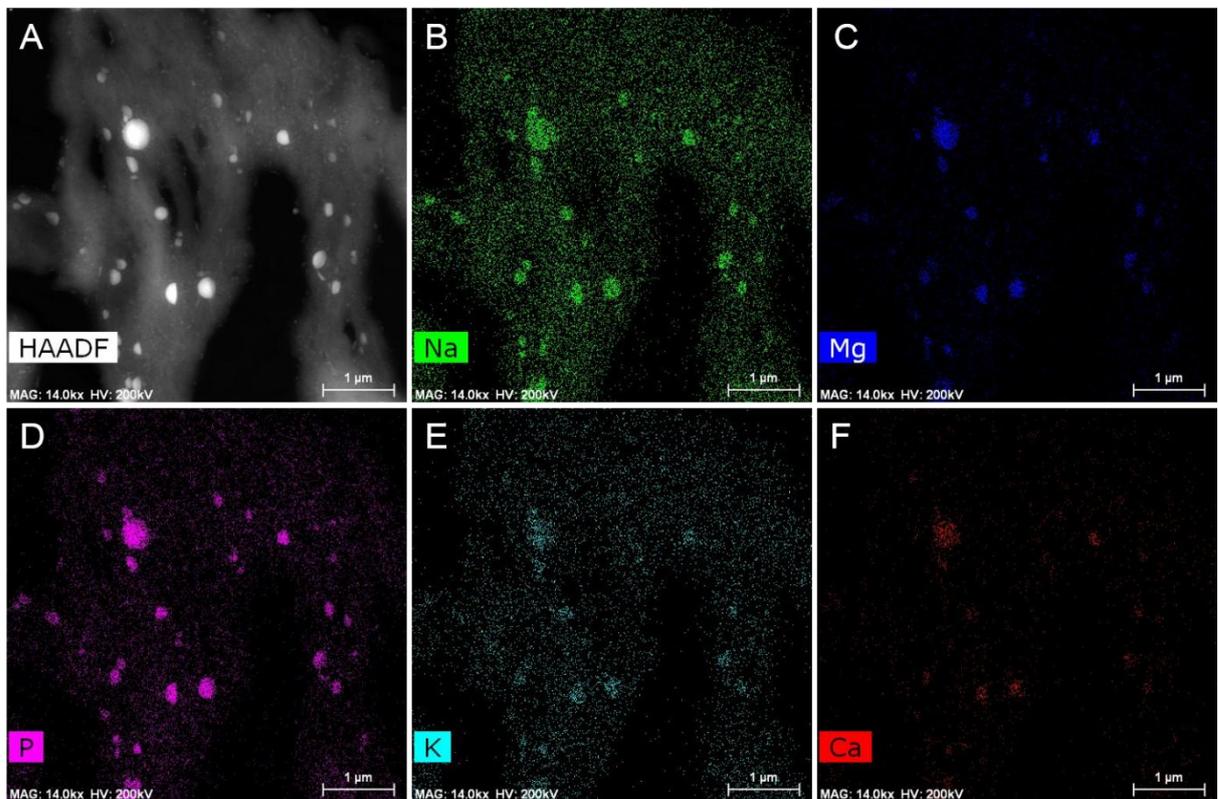


Figura 18. Mapeamento de elementos em células de *T. cruzi* congelado por imersão. **A**, imagem de transmissão-varredura obtidas no microscópio Titan de diferentes íons. **B-F**, mapeamento de elementos onde diferentes elementos (indicados no canto inferior esquerdo) podem ser observados concentrados nos acidocalcissomos.

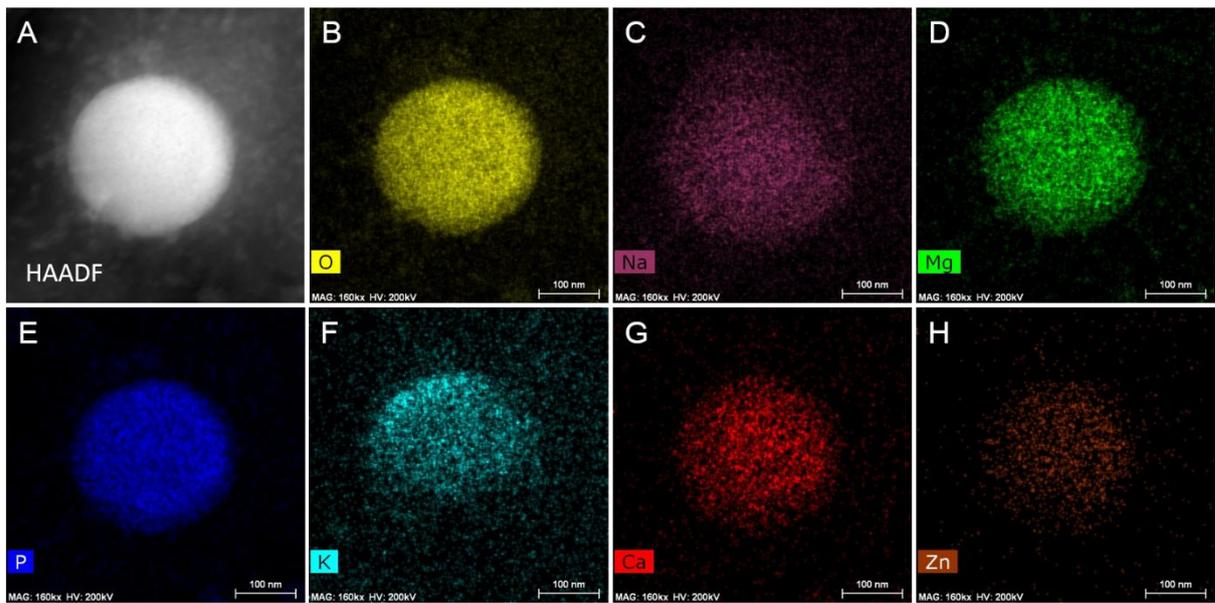


Figura 19. Mapeamento de elementos em acidocalcissomo individualizado da figura 18. **A**, imagem de transmissão-varredura de um acidocalcissomo obtida no microscópio Titan. **B-H**, mapeamento de elementos onde diferentes íons (indicados no canto inferior esquerdo) podem ser observados concentrados nos limites da organela.

8.3 Quantificação de elementos em acidocalcissomos

Para quantificar os elementos nos acidocalcissomos, primeiramente, realizamos a calibração do sistema analítico através da análise do padrão de ferrocianeto de potássio. Para isto, a concentração dos elementos de interesse (em mmol/kg) contidos na massa total utilizada na preparação da solução padrão foi calculada, onde encontramos valores de 1393 mmol/kg para o potássio e 348 mmol/kg para o ferro. Com base nestes dados, utilizamos a equação abaixo para calcular a constante de calibração para o sistema utilizado:

$$K_x = C_{xp} / (P_{xp} / W)_p \cdot G_p \quad (10)$$

Onde, C se refere à concentração do elemento no padrão; P, a intensidade do pico; W, a intensidade do contínuo e G, ou fator-G, que é determinado pela fração de massa de todos os elementos constituintes. A representação do padrão é feita por “p”.

Considerando a composição protéica do padrão utilizado e a aplicação dos mesmos parâmetros utilizados para amostras (espessura, tempo de contagem dos raios X, voltagem, densidade de corrente, spot size e magnificação) pudemos considerar o fator-G muito semelhante para amostra e padrão, como descrito por Warley (2016). Desta forma, os valores de K_x encontrados foram de 92,8 para o potássio e 145 para o ferro.

Após a calibração do sistema, realizamos a análise dos acidocalcissomos. Com os espectros gerados, pudemos obter os valores das concentrações dos elementos de interesse, como potássio e ferro, baseados na quantificação pelo método de Hall (1979), demonstrado abaixo:

$$C_{xa} = C_{xp} \cdot [(P_x / W)_a / (P_x / W)_p] \quad (11)$$

Como obtivemos os valores de K_x para cada elemento de interesse, reagrupamos a equação da seguinte forma:

$$C_x = P_x / W_a \cdot K_x \quad (12)$$

Dessa forma, encontramos valores de 332 mmol/kg para o potássio e 232 mmol/kg para o ferro. Devido problemas no funcionamento do microscópio somente foi realizado microanálise do padrão de ferrocianeto de potássio para aferição da concentração dos elementos ferro e potássio em um acidocalcissomo apenas.

8.4 Fluxo de trabalho para quantificação de elementos em células

A figura 15 ilustra de forma simplificada as etapas envolvidas neste trabalho. Como demonstrado, tanto as células como os padrões utilizados para as quantificações seguiram a mesma estratégia metodológica. A criofixação foi realizada de diferentes formas, como a imersão em meio criogênico ou o congelamento por alta pressão em capilares de cobre, através do suporte confeccionado para esta finalidade (figuras 9 e 10). As etapas de crioultramicrotomia e *freeze-drying* foram otimizadas pelo acondicionamento das grades nos suportes detalhados nas figuras 9, 10 e 13. O correto acondicionamento das grades e sua transferência com a manutenção de baixa temperatura entre os equipamentos de crioultramicrotomia e *freeze-drying* foram pontos cruciais para o desenvolvimento do trabalho.

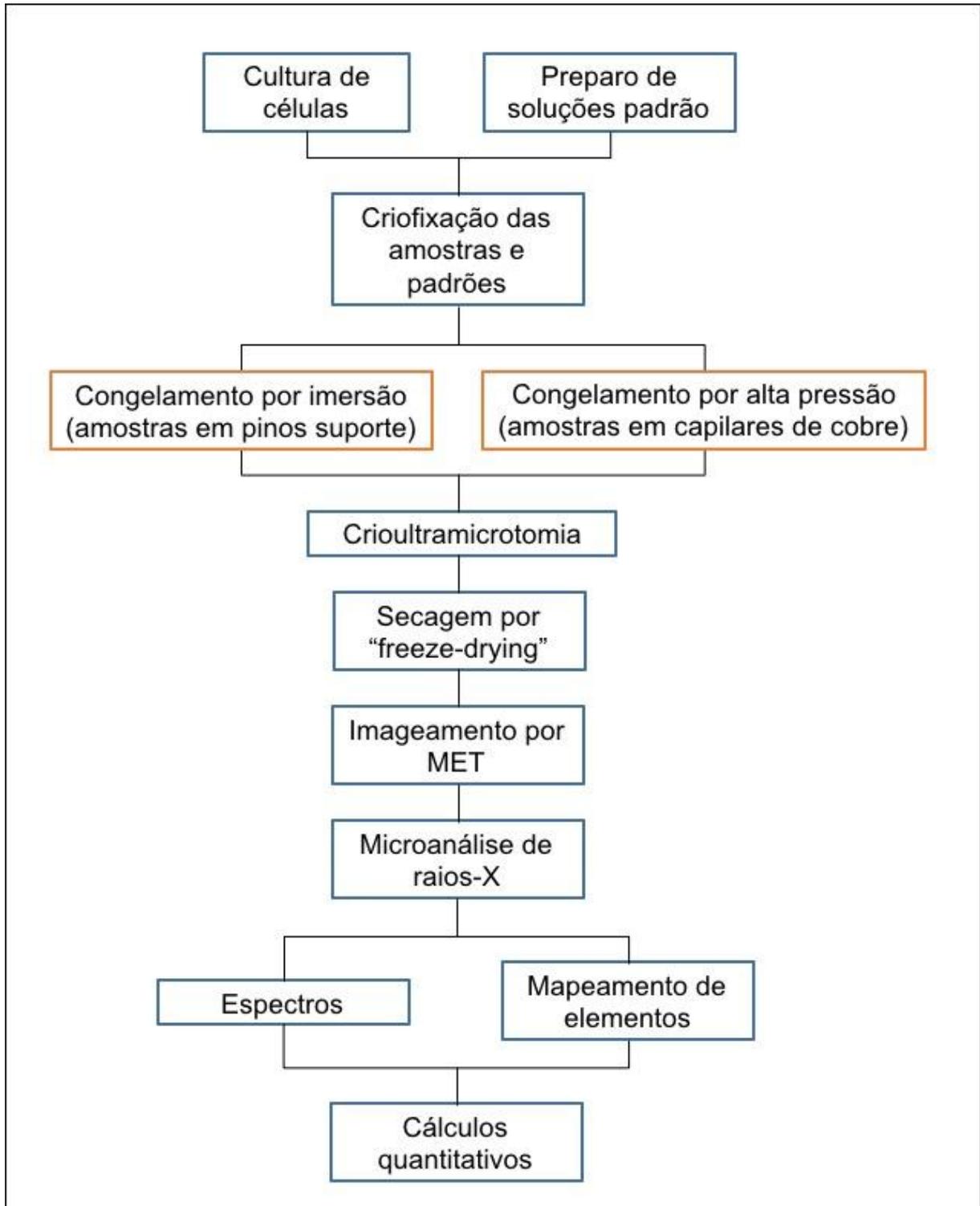


Figura 20. Fluxograma demonstrando em ordem cronológica as diferentes etapas envolvidas neste trabalho.

9. Conclusão

Como não se encontram grupos de pesquisa no país realizando quantificação química em modelos biológicos com técnicas de microscopia analítica, essa dissertação estabelece um novo protocolo que poderá ser expandido e adaptado para outros modelos estudados no país.

Foram projetados e confeccionados suportes (figuras 9 e10) para obtenção dos resultados apresentados nesta dissertação, fato esse que deverá se tornar rotineiro para a continuidade das pesquisas de diferentes grupos ligados a microscopia no país. Tendo em vista que a inovação é essencial para o desenvolvimento das diversas linhas de pesquisa.

Também houve a necessidade de se realizar a adaptação do suporte de congelamento em discos do equipamento de alta pressão para amostras em capilares de cobre, o que facilitou a trimagem para obtenção de criocortes das células de *T. cruzi*, bem como o aumento do tempo de vida útil da faca de diamante, assim como a redução do tempo de trimagem para a obtenção dos criocortes.

10. Referências

- BALD, W. B. **Optimising the cooling block for the quick freeze method.** Journal Microscopy. 131:11-23, 1983.
- BALD, W. B. **The relative efficiency of cryogenic fluids used in the rapid quench cooling of biological samples.** Journal Microscopy. 134: 261-270, 1984.
- BALD, W. B. **The relative merits of various cooling methods.** Journal Microscopy. 140: 17-40, 1985.
- BALD, W. B. **On crystal size and cooling rate.** Journal Microscopy. 143:89-102, 1986.
- BALD, W. B. **QUANTITATIVE CRYOFIXATION.** 1.ed. Philadelphia: CRC Press, 1987. 1-158p.
- BENCHIMOL, M. de et al. **Functional expression of a vacuolar-type H⁺-ATPase in the plasma membrane and intracellular vacuoles of *Trypanosoma cruzi*.** Biochem. J. 332:695-702, 1998.
- CARSLAW, H. S; JAEGER. J. C. **Conduction of Heat in Solids** (Oxford: Clarendon) Inglad 1959. 258p.
- CAVALIER; SPEHNER & HUMBEL, M. BRUNO. **Handbook of Cryo- Preparation Methods for Electron Microscopy.** 1.ed. Lausanne: CRC Press Switzerland, 2013. 706p.
- SCOTT. A DAVID, DOCAMPO ROBERTO, DVORAK. A J. et a. **In Situ Composition Analysis of Acidocalcisomes in *Trypanosoma cruzi*.** The Journal of Biological Chemistry. 272:28020-28029, 1997.
- GROOT DE, M.G.DIDIMA. **Comparison of methods for the estimation of thickness of ultrathin tissue sections.** Journal Microscopy. 151:23-42, 1988.
- DE SOUZA et al. **Técnicas de Microscopia Eletrônica Aplicadas às Ciências Biológicas.** 3 ed. Rio de Janeiro: SBMM (Sociedade Brasileira de Microscopia e Microanálise) Brasil 2011. 423p.

DOCAMPO, ROBERTO; MORENO N.J SILVIA, **The acidocalcisome**. Molecular and Biochemical. Parasitology. 114:151-159, 2001.

DUBOCHET, J. **High-pressure freezing for cryoelectron microscopy**. TrendsCellBiol, 5(9):366–368, 1995..

ECHLIN, PATRICK. **Low-Temperature Microscopy and Analysis**. 1.ed. New York: Plenum Press U.S.A, 1992. 538p.77, 217.

EISBERG, ROBERT.; RESNICK, ROBERT. **Quantum physics of atoms, molecules, solids, nucleid and particles**. 2 .ed. New York: John Wiley & Sons U.S.A, 1979. 917p. 87-114, 385-392.

FLETCHER, N.H. **The Chemical Physics of ice**. 1.ed. Great Britain,1970. 288p.

FRANK, JOACHIM. **ELECTRON TOMOGRAPHY**. 2.ed. New York: Springer U.S.A, 2006. 455 p. 53.

GIRARD DIAS.; ALCÂNTARA CAROLINA L.; CUNHA-E- SILVA.; DE SOUZA WANDERLEY.; MIRANDA KILDARE. **On the ultrastructural organization of Trypanosoma cruzi using cryopreparation methods and electron tomography**. Histochemistry Cell Biology. 138:821-831, 2012.

HARDT, MARTIN.; PLATTNER, HELMUT. **Quantitative Energy-Dispersive X-ray Microanalysis of Calcium Dynamic in Cell Suspensions during Stimulation on a Subsecond Time Scale: Preparative and Analytical Aspects as Exemplified with Paramecium Cells**. Journal of Structural Biology. 128:187-199, 1999.

HALL, T. A.; ANDERSON, H. C.; APPLETON, T. **The use of thin specimens for X-ray microanalysis in biology**. Journal of Microscopy. 99:177-182, 1973.

HALL, T. A.; GUPTA, B.L. **Beam-induced loss of organic mass under electron-microprobe conditions**. Journal Microscopy. 100:177-188, 1974.

HALL, T. A: **Suggestions for the quantitative X- ray microanalysis of thin sections of frozen-dried and embedded biological tissues**. Journal Microscopy.164:67-69, 1991.

HUMBEL, B.M.; MILLER, M. **Freeze-substitution and low temperature embedding**. The Science of Biological Specimen Preparation 1985 (ed. by M. Miiller, R.P. Becker, A. Boyde and J. J. Wolosewick), pp. 175-183. SEM, AMF O'Hare, IL.

HODSON. STUART., WILLIAMS. **Ultracryotomy of biological tissues to preserve membrane structure**. J. Cell Sci.20: 687-698, 1976.

INGRAM, PETER. **BIOMEDICAL APPLICATIONS OF MICROPROBE ANALYSIS**. 1.ed. North Carolina: Academic Press U.S.A, 1999. 545 p. 73.

KIRK. GARY., KNOFF. LAURA., LEE. PING: **Surfaces of cryosections: is cryosectioning cutting or fracturing?** Journal of Microscopy. 161:445-453, 1991.

KUO, JOHN. **Electron Microscopy: Methods and Protocols**. 2ed. New Jersey: Humana Press Inc., Totowa U.S.A, 2007.593p. 67-95.

LEUNISSEN, J.L.M., YI, H. **A novel sample freezing method (tutorial)**. Microscopy Microanalysis, 13(Suppl2),444–445, 2007.

LEUNISSEN, J.L.M., YI, H. **Self-pressurized rapid freezing (SPRF): a novel cryofixation method for specimen preparation in electron microscopy**. Journal of Microscopy. 235:25–35, 2009.

LEFURGEY ANN; INGRAM PETER; BLUM JOSEPH. **Elemental composition of polyphosphate-containing vacuoles and cytoplasm of Leishmania major**. Molecular and Biochemical. Parasitology. 40:77-86, 1990.

LU, H.G. de et al. **Ca²⁺ content and expression of an acidocalcisomal calcium pump are elevated in intracellular forms of Trypanosoma cruzi**. Molecular and Cell Biology. 18:2309-2323, 1998.

LUCKEY, MARY. **Membrane Structural Biology with Biochemical and Biophysical Foundations**. 2ed. San Francisco: Cambridge University Press U.S.A, 2014. 399p. 248.

EDELMANN, LUDWIG. **Freeze-substitution and the preservation of diffusible ions**. Journal Microscopy., 161:217- 228, 1991.

LYMAN, E. CHARLES; GOLDSTEIN, I. JOSEPH; JR. ROMIG, D. ALTON; ECHILIN, PATRICK; JOY, C. DAVID; NEWBURY, E. DALE; WILLIAMS, B. DAVID; ARMSTRONG, T. JOHN; FIORI, E. CHARLES; PETERS, RUEDIGER-KLAUS. **Scanning Electron Microscopy, X-Ray Microanalysis, and Analytical Electron Microscopy**. 1ed. New York: Plenum Press U.S.A, 1990. 441p. 3-108.

MIRANDA, KILDARE. de et al. **The fine structure of acidocalcisomes in *Trypanosoma cruzi***. Parasitol Res. 86:373-384, 2000.

MIRANDA, KILDARE. de et al. **Acidocalcisomes of Trypanosomatids have Species-Specific Elemental Composition**. Protist. 155:395–405, 2004.

MIRANDA, KILDARE. de et al. **Dynamics of polymorphism of acidocalcisomes in *Leishmania* parasites**. Histochem Cell Bio. 121:407–418; 2004.

MIRANDA, KILDARE. de et al. **Acidocalcisomes of *Phytomonas françai* Possess Distinct Morphological Characteristics and Contain Iron**. Microsc. Microanal. 10, 647–655, 2004.

MCDONALD, K, KL, AUER, M. **Out with the old and in with the new: rapid specimen preparation procedure for electron microscopy of sectioned biological material**. Photoplasma. 251:429-448, 2014.

MOOR, H. **Etching and related problems, in: Freeze-etching, techniques and applications**, E. L. Benedetti & P. Favard, eds (Soc. Française de microscopie Electronique, Paris), p.21, 1973.

N, R. SILVESTER; S. MARCHESE-RAGONA; D. N. JOHNST. **The relative efficiency of various fluids in the rapid freezing of protozoa**. 128:175-186, 1982.

NELSON, M, DAVID.; COX, M. MICHAEL. **Principles of Biochemistry**. 4 ed. New York: Freeman U.S.A, 2005.

PENNYCOOK, J. STEPHEN; NELLIST. D PETER. **Scanning Transmission Electron Microscopy Imaging and Analysis**. 1. ed. New York: Springer U.S.A, 2011. 757p. 1-291.

QUERIDO, W.; ROSSI, AL.; FARINA, M. **The effects of strontium on bone mineral: A review on current knowledge and microanalytical approaches.** ELSEVIER. 80:122-134, 2016.

RAMOS, IB. de et al. **Calcium- and polyphosphate-containing acidocalcisomes in chicken egg yolk.** *Biology of the Cell.* 102:421-434, 2010.

REED, B. J. S. **Electron microprobe analysis.** 2. ed. New York: Cambridge University Press U.S.A, 1993. 326p. 63-186.

RIEGE-HAN, P. STEFAN. **Hight- intensity X-rays-interaction with Matter.** 1. ed. CA: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co.KGaA U.S.A, 2011. 263p. 3-24.

REED, GARRATT, J. A; BELL. C. D. **Energy-dispersive X-ray Analysis in the Electrons Microscope.** 1. ed. New York: Bios Scientific Publisher Limited U.S.A, 2005. 145p. 1-88.

RIEHLE. **Schnellgefrieren organischer Präparate für die Elektronen-Mikroskopie.** *Chemie-1ng:Techn.* 40. Jahrg. 1968.

ROOMANS, G. M.; KUYPERS, G. A. J. **Background determination in X-ray microanalysis of biological thin sections.** *Ultramicroscopy.* 5:81-83, 1980.

SAUBERMAN, ALBERT.; ECHLI, PATRICK. **The preparation, examination and analysis of frozen hydrated tissue sections by scanning transmission electron microscopy and X-ray microanalysis.** *Journal of Microscopy.* 105:155-191, 1975.

SCOTT, A. DAVID.; DOCAMPO, ROBERTO.; DVORAK, A.; JAMES et al. **In situ compositional Analysis of acidocalcisomes in trypanosoma cruzi.** *The Journal of Biological Chemistry.* 272:28020- 28029, 1997.

SCOTT, A. D. de et al. **Presence of a plant-like proton-pumping pyrophosphatase in acidocalcisomes of Trypanosoma cruzi.,** *J.Biol.Chem.* 273:22151-22158, 1998.

SHUMAN, H.; SOMLYO, A.V.; SOMLYO, A.P. **Quantitative electron probe microanalysis of biological thin sections: Methods and validity.** *Ultramicroscopy.* 1:317–339, 1976.

SILVA, J. G. **Introdução à Tecnologia da Refrigeração e da Climatização**. 1ª edição. Editora Artliber, São Paulo, 2003.

SILVA, T.; KAREN de et al. **Optimization of Magnetosome Production and Growth by the Magnetotactic *Vibrio Magnetovibrio blakemorei* Strain MV-1 through a Statistics-Based Experimental Design**. Applied and Environmental Microbiology: 79:2823-2827, 2013.

SITTE, HELLMUTH. **ULTRAMICROTOMY**: common problems and mistakes. Hamburg-Sacar: University of Saarland, 1981. SKAER, H. Chemical cryoprotection for structural studies. Journal Microscopy., 125-137, 1982.

STEINBRECHT, R. A.; ZIEROLD. **Cryotechnique in Biological Electron Microscopy**. 1ª .ed. Berlin: Springer- Verlag, 1987. 289 p. 151- 167.

TEIXEIRA. de et al. Atlas didático, **Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi***. 1.ed. Rio de Janeiro: CECIERJ, 2011. 51 p.

VERCESI, A.E.; DOCAMPO, R. **Sodium-proton exchange stimulates Ca^{2+} release from acidocalcisomes of *Trypanosome brucei***. Biochem., 315:265-270,1994.

WARLEY, ALICE. **X-ray Microanalysis for Biologists by Alice Warley**. 1 .ed. London: Portland Press England, 1997. 276 p. 107

WARLEY, ALICE. **Development and comparison of the methods for quantitative electron probe X-ray microanalysis analysis of thin specimens and their application to biological material**. Journal Microscopy., 261:177-184, 2016.

WILLIAMS, B. DAVID.; CARTER, BARRY. C. **Transmission electron Microscopy**. 2.ed: New York U.S.A, 2009. 760p. 7- 735.

WROBLEWSKI, R.; WROBLEWSKI, J. **Freeze drying and freeze substitution combined with low temperature-embedding. Preparation techniques for microprobe analysis of biological soft tissues**. Histochemistry. 81:469-475, 1984.

WROBLEWSKI, J.; WROBLEWSKI, R.; ROOMANS, G. M. **Low temperature techniques for X-ray microanalysis in pathology: alternatives to cryoultramicrotomy**. Journal of Electron Microscopy Technique. 9:83-89, 1988.

ZIEROLD, K. **X-ray microanalysis of freeze-dried and frozen-hydrated cryosections** .Journal of Electron Microscopy Technique. 9:65–82, 1988.

ZS-NAGY, I. **A review on the use of bulk specimen X-ray microanalysis in cancer research**. Scanning Microscopy. 3:473-482, 1989.

**Protocolo de criopreparação e
otimização para quantificação por
microanálise de raio-X de
compartimento rico em íons em
*Trypanosoma cruzi***

Os íons são de vital importância para as células. Eles estão envolvidos em diferentes processos celulares, como controle de reações enzimáticas, sinalização celular, controle de pH, entre outras funções. O estudo da mobilização iônica em células e tecidos é, portanto, importante para a compreensão de diferentes processos celulares, incluindo aqueles envolvidos na infecção e sobrevivência intracelular em parasitas protozoários. A microanálise por raios-X é uma técnica bem conhecida para identificar e quantificar a composição química em amostras de diferentes origens (espécimes biológicos e não biológicos) [1]. Embora poderosa como uma ferramenta de pesquisa em microscopia eletrônica, quando se trata de amostras biológicas (células e tecidos), esta técnica tem sido aplicada principalmente como um método qualitativo devido a (1) limitações nos métodos de preparação de amostras, que geralmente requerem o uso de criotécnicas a mobilização ou extração de íons difusíveis com métodos de temperatura ambiente, e (2) a falta de padrões apropriados para calibrar os instrumentos e fornecer um valor de referência para análise quantitativa. Neste trabalho, otimizamos um protocolo para preparação de amostras e calibração de um sistema de microanálise por raios-X para quantificação de íons em *T. cruzi*. Nós nos concentramos em organelas ricas em íons - acidocalcisomes - que contêm íons diferentes, como fósforo, cálcio, magnésio, potássio, sódio e zinco e, por essa razão, são excelentes modelos para estudar a composição iônica in situ [2]. Células bem como padrões contendo diferentes íons em concentrações conhecidas onde foram criofixados por congelamento por alta pressão e congelamento por imersão, seções congeladas com 120 nm de espessura foram obtidos usando crioultramicrotomia. As seções foram então secas (liofilizadas) em alto vácuo a -190 °C durante 2 horas. Microanálise de raios-X é realizada usando as mesmas condições (tempo de contagem, espessura do corte, spot size, corrente, voltagem, magnificação) para células e padrões e a concentração de elementos poderá ser feita utilizando o método de Hall [3]. O mapeamento químico mostrará que os elementos estão restritos à matriz dos acidocalcisomes (Fig.3, B-F). Dada a importância dos acidocalcisomos para a viabilidade celular do *T. cruzi*, a compreensão da dinâmica envolvida na mobilização iônica dessas estruturas pode auxiliar no desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento da doença de Chagas. Assim, a otimização de um protocolo para quantificação de íons em células isoladas poderá ser aplicado a outros modelos biológicos, contribuindo para o desenvolvimento científico neste campo.

Metodologia

Centrifugar as células por 3 minutos a 1500g;

Descartar o sobrenadante para que o pellet possa ser alocado em pino de alumínio ou em capilar de cobre para crioultramicrotomia;

Congelar o material em etano líquido resfriado por nitrogênio líquido (imersão) com moderada agitação visando evitar o efeito leidenfrost, caso o congelamento seja por alta pressão as células devem ser acomodadas em capilar de cobre em que uma das extremidades deverá estar selada;

Transportar o pino ou o capilar para o aparelho de crioultramicrotomia previamente resfriado, sendo a temperatura da faca -156°C , amostra -161°C e da câmara -166°C ;

Os cortes devem ser recolhidos em grades de cobre (100mesh) com formvar com auxílio de cílio, as mesmas devem ser acondicionadas em suporte de alumínio resfriado para a realização de *freeze-drying*;

Para a realização do *freeze-drying* os cortes com o suporte deve ser transportado ao equipamento de criofatura, cuja temperatura deverá está em -170°C , ambos deverão permanecer sob alto vácuo por 2 horas. Em seguida o bombeamento de nitrogênio é desligado e as amostras então permanecerão no interior do equipamento até atingirem a temperatura ambiente, ressalto que qualquer aparelho que possua controle de temperatura e vácuo poderá ser utilizado para realização de *freeze-drying*;

Término a etapa do *freeze-drying* as grades estarão prontas para serem observadas e analisadas no microscópio analítico de transmissão.

Obs: Para preparação das amostras referentes à calibração do sistema do microscópio, se utiliza 1g de albumina dissolvida em 4ml de solução a 100 mM de diferentes eletrólitos como; CaCl_2 , MgCl_2 , CuCl_2 , K_2HPO_4 , NaCl , KCl , $\text{KFe}(\text{CN})_6\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ e MgSO_4 (Warley, 1997). Estas soluções congeladas pelos dois métodos citados acima e posteriormente submetidas à crioultramicrotomia. Cortes obtidos com espessura de 120 nm coletados em grades de cobre e transportados em porta grades ao equipamento de criofatura, onde ocorrerá a etapa de *freeze-drying* como mencionado acima.

Suporte para alocação de grades para *freezing-drying*

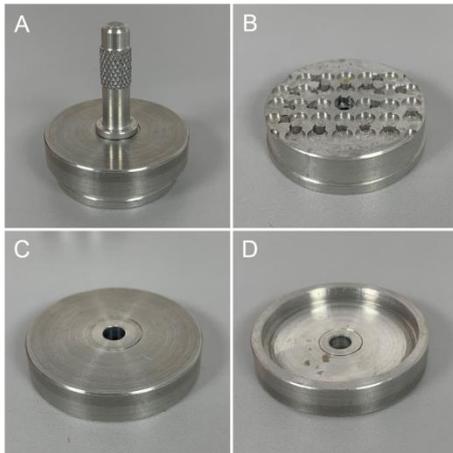


Fig 1. Imagen de suporte para *freeze-drying* (A), (B) representa a base com cavas para deposição das grades, (C) e (D) representa a vista superior e inferior da tampa do suporte para *freeze-drying*.

Adaptação de peças para criofixação em capilar por alta pressão

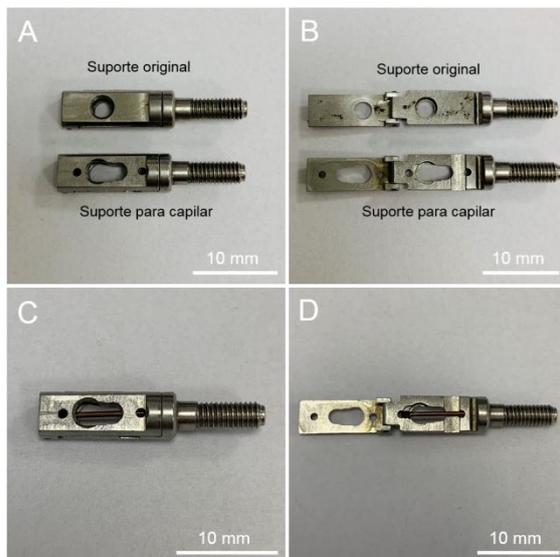


Fig 2. (A) representa o suporte adaptado para o capilar de cobre ao lado do suporte original, (B) representa os suportes abertos, (C) e (D) representam o suporte modificado com o capilar fixo antes do congelamento.

Mapa de localização e distribuição iônica em *T. cruzi*

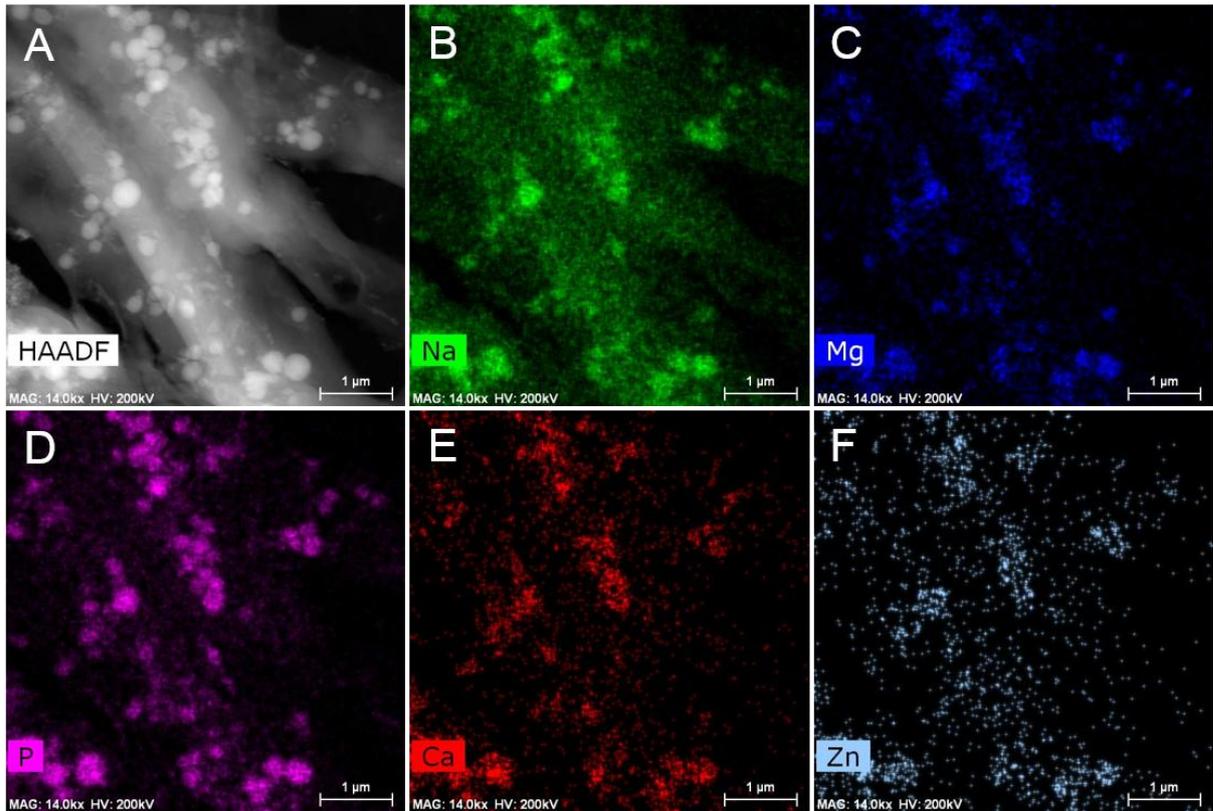


Fig 3. Imagem de células de *T. cruzi* em microscópio de transmissão-varredura Titan Fei Company com detector anular de campo escuro. A, mapa de elementos químicos e sua distribuição no perfil. B, C, D, E e F. Observe o aumento de sinal nos acidocalcissomos.

Equações para determinação da concentração das amostras

Método de Hall

$$C_{xa} = C_{xp} \cdot [(Px / W)_a / (Px / W)_p]$$

C_{xa} = concentração do elemento em mmoles / kg de massa seca (amostra);

C_{xp} = concentração do elemento em mmoles / kg de massa seca (padrão);

$(Px / W)_a$ = intensidade do elemento na amostra / radiação contínua da amostra;

$(Px / W)_p$ = intensidade do elemento no padrão / radiação contínua do padrão;

Equação para determinação da radiação contínua

$$W = n(b1 + b2) / 2$$

W = radiação contínua do material analisado;

$b1$ e $b2$ = altura da radiação contínua;

n = número de canais sob a região da radiação contínua;

Fluxograma da Metodologia

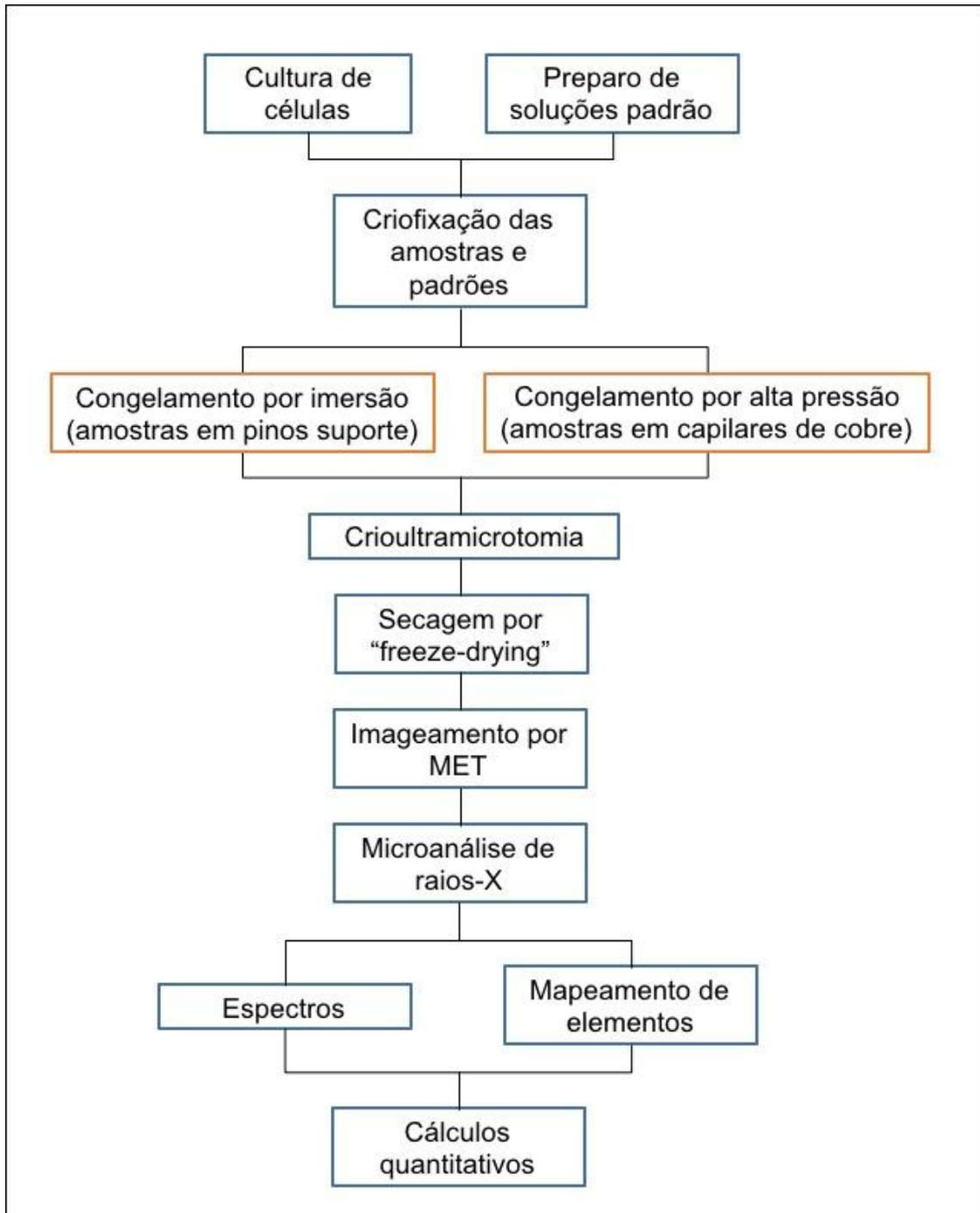


Figura 4. Fluxograma demonstrando em ordem cronológica as diferentes etapas envolvidas neste trabalho.

Referencias

- [1]. Warley, Alice. Development and comparison of the methods for quantitative electron probe X-ray microanalysis analysis of thin specimens and their application to biological material. *Journal Microscopy.*, 261:177-184, 2016.
- [2]. Miranda. Kildare. de et al. The fine structure of acidocalcisomes in *Trypanosome cruzi*. *Parasitol Res.* 86:373-384, 2000.
- [3]. Hall, T. A.; Gupta, B.L. Quantification for the X-ray microanalysis of cryosections. *Journal Microscopy.* 126:333-345, 1982.