

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO  
LUÍS OTÁVIO DA SILVA PACHECO

DESENVOLVIMENTO DE TÉCNICAS EM CRIOFRATURA PARA MICROSCOPIA  
ELETRÔNICA DE VARREDURA DE ULTRA ALTA RESOLUÇÃO E  
MICROSCOPIA DE ÍONS

RIO DE JANEIRO  
2019

Luís Otávio da Silva Pacheco

Desenvolvimento de técnicas em criofratura para microscopia eletrônica de varredura de ultra alta resolução e microscopia de íons

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

Orientador: Wanderley de Souza

Coorientador: Kildare Miranda

Rio de Janeiro

2019

Pacheco, Luís Otávio da Silva.

Desenvolvimento de técnicas em criofatura para microscopia eletrônica de varredura de ultra alta resolução e microscopia de íons. / Luís Otávio da Silva Pacheco. – Rio de Janeiro:Universidade Federal do Rio de Janeiro, Centro de Ciências da Saúde, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho.

71 f.: il.; 31 cm.

Orientador: Wanderley de Souza.

Coorientador: Kildare Rocha de Miranda.

Dissertação (mestrado profissional) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Centro de Ciências da Saúde, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Programa de Pós-Graduação Mestrado Profissional Formação para a Pesquisa Biomédica, 2019.

Referências: f.67-71.

1. Microscopia Eletrônica de Varredura. 2. Trypanosoma cruzi. 3. Congelamento. 4. Microscopia Eletrônica. 5. Formação para a Pesquisa Biomédica - Tese. I. Souza, Wanderley de. II. Miranda, Kildare. III. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Centro de Ciências da Saúde, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Programa de Pós-Graduação Mestrado Profissional Formação para a Pesquisa Biomédica. IV. Título.

Luís Otávio da Silva Pacheco

Desenvolvimento de técnicas em  
criofratura para microscopia eletrônica de  
varredura de ultra alta resolução e  
microscopia de íons

Aprovado em            de            de 2019.

---

(Wanderley de Souza, doutor, orientador, Universidade Federal do Rio de Janeiro)

---

(Kildare Rocha de Miranda, doutor, orientador, Universidade Federal do Rio de Janeiro)

---

(Celso Barbosa de Sant'Anna Filho, doutor, revisor Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e  
Tecnologia)

---

(Tais Hanae Kasai Brunswick, doutora, Universidade Federal do Rio de Janeiro)

---

(Sergio Henrique Seabra, doutor, Universidade Estadual da Zona Oeste)

---

(Eduardo José Lopes Torres, doutor, Universidade Estadual do Rio de Janeiro)

**Não desista!**

## AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a minha família pelo por todo apoio até aqui e pedir desculpas por diversos momentos de ausência durante todo esse período que estive no mestrado, pois está longe deles me mostrou o quanto é importante tê-los ao nosso lado nos momentos de grande ansiedade. Agradecer também minha cunhada Wanessa por ter trazido nesse tempo meu querido sobrinho Heitor que me fez lutar mais ainda por esse mestrado e esse é o maior presente que tenho a oferece-lo.

Agradecer a Daiane Lima por todo o carinho nos dias de dificuldades, mas que agora podemos comemorar sem preocupações.

Agradecer minha amiga Tatiana Guinancio por ter me ajudado na indicação do laboratório logo após a minha formatura. Se não fosse ela não estaria escrevendo essas palavras.

Agradecer a meu grande amigo Yuri Faria e sua família por todo o carinho dedicado a mim e pelas cervejas nos dias de descontração.

Agradecer meus amigos Heloisa Quintas e Rafael Fantasia por sempre estarem ao meu lado e que serão lembrados por mim.

Agradecer aos professores do laboratório de Ultraestrutura Celular Herta Meyer, em destaque aos professores Wanderley de Souza, Kildare Rocha de Miranda e professora Marcia Attias por me orientarem e pela paciência.

Obrigada, Marcia Attias, por ter me levado a conhecer a microscopia eletrônica. Acredito que a sua ajuda tenha o ponto chave para que os experimentos dessem certo.

Agradecer muito também minha amiga Noêmia Rodrigues que me ensinou as técnicas de microscopia eletrônica e pelos dias em que podemos trocar uma ideia enquanto trabalhávamos e digo seus conselhos serão guardados com muito carinho.

Agradecer ao amigo Jean Pierre pelos dias de luta e lhe desejo todo o sucesso do mundo em sua jornada pelo saber.

Agradecer a Vânia e Sara, por sempre está à disposição para as dúvidas.

## RESUMO

de Luis Otavio da Silva Pacheco. Desenvolvimento e aplicação de técnicas em criofatura para microscopia eletrônica de varredura. Rio de Janeiro, 2019. Dissertação (Mestrado Profissional Programa de Pós-Graduação em formação para pesquisa Biomédica (Biofísica) – Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2019.

Com o advento da microscopia eletrônica de alta e ultra resolução, observou-se a necessidade de se desenvolver novos protocolos que acompanhem o nível de detalhes existentes em imagens de alta resolução. Na maioria dos estudos de rotina de microscopia eletrônica de varredura, o material é submetido a um processo de fixação química, desidratação por solventes orgânicos e secagem pelo método de ponto crítico, etapas que podem gerar artefatos. Uma forma de minimizar estes problemas é a substituição de algumas etapas através do uso de criotécnicas. Este método tem como objetivo manter um nível de preservação mais próximo do estado *in vivo*, sem que haja a formação de cristais de gelo que se originam da água presente no meio intracelular e extracelular. Para se alcançar tal estabilização, é necessário a utilização de equipamentos específicos, na sua maior parte de alta complexidade e custo. Técnicas de criofixação como congelamento por imersão (Plunge-freezing), congelamento por jato direto de propano líquido (Liquid-jet freezing), congelamento por impacto e congelamento sob alta pressão são muitos custosos, complexos e não existem em muitos laboratórios de pesquisa, o que pode inviabilizar uma série de experimentos. Em contrapartida, há métodos alternativos menos custosos que podem fornecer informações valiosas, como é o caso da técnica de Fukudome e Tanaka, nesse processo as células são incorporadas a 2% de quitosana em 0,5% de ácido acético juntamente com 1% de gelatina, que será congelada em um criogênio (Freon 22) resfriado por nitrogênio líquido para evitar o efeito leidenfrost para se evitar um mal congelamento e fraturada por umas lâminas de aresta única também a baixa temperatura. Neste trabalho, testamos diferentes tipos de protocolos baseados no método de Fukudome e Tanaka, a fim de encontrar condições otimizadas para a análise por microscopia eletrônica de varredura e microscopia de íons. As formas epimastigota e tripomastigota de *Trypanosoma cruzi*, foram utilizadas como modelo deste trabalho. Embora haja muitos estudos sobre a ultraestrutura do *T. cruzi* com a aplicação de uma variedade de técnicas complexas (tomografia, microscopia eletrônica de varredura de íons focalizados, criofatura, entre outras), a técnica de Fukudome e Tanaka nunca tinha sido utilizada neste parasito. Os dados obtidos revelaram o interior das formas epimastigotas e algumas de suas organelas, como o cinetoplasto e o núcleo, mitocôndria, citostoma além de formas amastigotas e tripomastigotas no interior da célula hospedeira. Portanto, a utilização técnica de FUKUDOME e TANAKA contribuem para melhorar o conhecimento sobre a forma do modelo escolhido e a chegar a resultados que possam ajudar no conhecimento do parasito e sua biologia.

## ABSTRACT

de Luis Otavio da Silva Pacheco. Desenvolvimento e aplicação de técnicas em criofatura para microscopia eletrônica de varredura. Rio de Janeiro, 2019. Dissertação (Mestrado Profissional Programa de Pós-Graduação em formação para pesquisa Biomédica (Biofísica) – Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2019.

With the advent of high and ultra resolution electron microscopy, it was observed the need to develop new protocols that follow the level of detail existing in high resolution images. In most routine studies of scanning electron microscopy, the material is subjected to a process of chemical fixation, dehydration by organic solvents and drying by the critical point method, steps that can generate artifacts. One way to minimize these problems is to replace a few steps through the use of cryotechniques. This method aims to maintain a level of preservation closer to the state in vivo, without the formation of ice crystals that originate from the water present in the intracellular and extracellular environment. To achieve such stabilization, it is necessary to use specific equipment, mostly of high complexity and cost. Cryofixation techniques such as immersion freeze (Plunge-freezing), direct jet freezing of liquid propane (Liquid-jet freezing), impact freezing and freezing under high pressure are many costly, complex and do not exist in many research laboratories, which can make a series of experiments unfeasible. On the other hand, there are less costly alternative methods that can provide valuable information, such as the Fukudome and Tanaka technique, in this process the cells are incorporated into 2% chitosan in 0.5% acetic acid along with 1% gelatin, which in this process will be frozen in a cryogen (Freon 22) cooled by liquid nitrogen to avoid the leidenfrost effect to avoid a bad freeze and fractured by a single edge blades also at low temperature. In this work, we tested different types of protocols based on the Fukudome and Tanaka method in order to find optimized conditions for electron microscopy analysis and ion microscopy. The epimastigote and trypanosoma cruzi forms were used as a model of this work. Although there are many studies on the ultrastructure of T. cruzi with the application of a variety of complex techniques (tomography, electron microscopy of targeted ion scanning, cryofracture, among others), the Fukudome and Tanaka technique had never been used in this parasitus. The data obtained revealed the interior of the epimastigote forms and some of their

organelles, such as kinetoplast and nucleus, mitochondria, cytostoma, as well as amastigote and trypomastigote forms inside the host cell. Therefore, the technical use of FUKUDOME and TANAKA contribute to improving knowledge about the shape of the chosen model and achieving results that can help in the knowledge of the parasite and its biology.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BSE – Elétrons retroespalhados

CRIO-MEV – Crio microscopia eletrônica de varredura

DMSO – Dimetilsulfóxido

HPF – Congelamento por alta pressão do inglês high pressure frezing

LVSEM – Microscopia eletrônica de varredura de baixo vácuo (low vacuum scanning electron microscopy)

MET – Microscopia eletrônica de transmissão

MEV – Microscopia eletrônica de varredura

MEVBV – Microscopia eletrônica de varredura de baixa voltagem (Low voltage scanning electron microscopy).

PBS – Tampão fosfato-salino (Phosphate-Buffered Saline).

PV – Vacúolo parasitóforo (Parasitophore vacúolo).

SE – Elétrons secundários (secondary electrons).

*T. cruzi* – *Trypanosoma cruzi*.

FS – Substituição a Frio (Freezing Substitution).

ESEM – Microscópio eletrônico de varredura ambiental (Environmental scanning electron microscope).

FIB SEM – Microscópio eletrônico de varredura de Feixe íon focalizado (Focus Ion Beam Scanning Electron Microscopes).

HIM – Microscopia eletrônica de varredura de íons de Hélio (Helium Ion Microscopy).

IMPs – Partículas intramembranares (Intramembrane Particles).

DNA – Ácido Desoxirribonucleico (Deoxyribonucleic acid).

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Diferenças básicas entre o microscópio eletrônico de transmissão (MET) e microscópio eletrônico de Varredura (MEV) (pág. 16).

Figura 2: Tipos de radiação emitidos por uma amostra como resultado do impacto com o feixe de elétrons de um MEV (pág. 17).

Figura 3: O diagrama de fase do CO<sub>2</sub> que mostra o ponto crítico no que diz respeito à pressão e à temperatura (pág. 23).

Figura 4: Esquema que representa as quatro situações de congelamento (pág. 25).

Figura 5: Esquema mostrando os efeitos do congelamento realizado a diferentes velocidades (pág. 26).

FIGURA 6: Esquema do aparelho de congelamento por alta pressão HPF 010 da Bal-Tec (pág. 30).

Figura 7: Curva de temperatura e pressão gerada durante no HPF (pág. 30).

Figura 8: Ilustração das duas faces da bicamada lipídica (pág. 31).

Figura 9: Ciclo biológico do *T. cruzi*. (pág. 35).

Figura 10: Ilustração da forma tripomastigota e epimastigota do *T. cruzi* em um corte longitudinal (pág. 35).

Figura 11: Criofratura de células livres para observação (pág. 39).

Figura 12: Processo de congelamento e fratura da amostra (pág. 40).

Figura 13: Epimastigotas não maceradas (pág. 45).

Figura 14: Epimastigotas sem maceração e sem cobertura condutora observadas no microscópio de alta resolução de feixe de íons (pág. 47).

Figura 15: Epimastigotas com maceração de 95 horas por substituição a frio (pág. 48).

Figura 16: LLC-MK<sub>2</sub> infectadas com tripomastigota raspadas e com maceração de 24 e 48 horas (pág. 50).

Figura 17: LLC-MK<sub>2</sub> infectadas com tripomastigota sem maceração observada em microscópio de baixa resolução (pág. 52).

Figura 18: LLC-MK<sub>2</sub> infectadas com Tripomastigota sem maceração observadas no microscópio de alta resolução (pág. 53).

Figura 19: LLC-MK<sub>2</sub> infectadas com tripomastigota sem maceração observadas no microscópio de alta resolução de feixe de íons (pág. 54).

Figura 20: LLC-MK<sub>2</sub> infectados com tripomastigota tripsinizadas e com maceração direta por 24 e 48 horas (pág. 56).

Figura 21 Macrófagos Raw infectados com epimastigota de *T.cruzi* com maceração com trocas (pág. 58).

Figura 22: Macrófagos Raw englobando uma epimastigota de *T.cruzi* (pág. 60).

Figura 23: Macrófagos Raw com preservação do núcleo (pág. 61).

Figura 24: Comparação da extração do material citoplasmático com cobertura condutora e sem cobertura condutora (pág. 62).

## **QUADRO**

QUADRO 1 – Tabela simplificada dos protocolos testados (página 43)

# Sumário

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	16
1.1 Microscopia Eletrônica de Varredura.....	17
1.1.1 Convencional.....	17
1.1.2 Alta Resolução .....	18
1.1.3. Varredura Ambiental (ESEM).....	18
1.1.4 Varredura de baixa voltagem (MEVBV).....	19
1.1.5 Varredura de duplo feixe (FIB-SEM).....	19
1.1.6 Crio Varredura.....	19
1.1.7 Crio varredura.....	20
1.2 Métodos de preparo de amostras biológicas por fixação química.....	21
1.2.1 Desidratação .....	22
1.2.2 Secagem pelo método do ponto crítico.....	23
1.2.3 Cobertura Condutora .....	24
1.3 Métodos de preparo de amostras biológicas por fixação física.....	24
1.3.1 Congelamento Lento .....	27
1.3.2 Congelamento Rápido.....	27
1.3.3 Congelamento Ultra-rápido.....	28
1.3.3.1 Congelamento por Impacto.....	28
1.3.3.2 Congelamento com Jato de Propano ( <i>Propane-Jet-Freezing</i> ).....	28
1.3.3.3 Congelamento por alta pressão (HPF).....	28
1.4 Criofratura.....	30
1.5 Método de observação de estruturas intracelulares de células livres por microscopia eletrônica de varredura.....	31
1.5.1 Método de Fukudome e Tanaka.....	32
1.6 O <i>Trypanosoma cruzi</i> e a doença de Chagas.....	32
<b>2. JUSTIFICATIVA</b> .....	36
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	37
3.1 Objetivo Geral .....	37
3.2 Objetivos específicos .....	37
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	37
4.1 Células utilizadas .....	37
4.2 Processamento para criofratura.....	37
4.2.1 Preparo da amostra.....	37
4.2.2 Fixação.....	38

4.2.3 Mistura de gelatina-quitosana e inclusão da amostra.....	38
4.2.4 Crioproteção.....	39
4.2.5 Congelamento.....	39
4.2.6 Fratura.....	40
4.2.7 Remoção do crioprotetor.....	41
4.2.8 Maceração.....	41
4.2.9 Lavagem.....	41
4.2.10 Desidratação.....	41
4.2.11 Secagem do material.....	41
4.2.12 Cobertura condutora.....	41
4.2.13 Substituição a frio.....	42
4.3 Microscópios utilizados.....	42
<b>5. Resultados.....</b>	<b>44</b>
<b>6. Discussão.....</b>	<b>63</b>
<b>7. Conclusão.....</b>	<b>66</b>
<b>8. Referências Bibliográficas.....</b>	<b>67</b>

## 1. INTRODUÇÃO

O desenvolvimento da microscopia eletrônica aplicada às ciências biomédicas, que teve início na década de 1950, contribuiu significativamente para alcançarmos o estágio atual de conhecimento sobre a organização estrutural dos vários sistemas biológicos. Este desenvolvimento foi feito inicialmente graças a avanços tecnológicos que ocorreram com os microscópios eletrônicos de varredura e de transmissão seguido de avanços significativos nas metodologias utilizadas para o preparo de materiais biológicos para serem examinados por estes equipamentos (GOLDSTEIN et al., 2003).

Tradicionalmente, a microscopia eletrônica se divide em três modalidades – a microscopia eletrônica de transmissão (MET), cujo objetivo é a observação do interior da célula (proporcionando a análise combinando as técnicas de microscopia eletrônica de alta resolução e microanálise de raios-X de alta sensibilidade) e a microscopia eletrônica de varredura (MEV), cujo escopo é a observação das superfícies das amostras biológicas.

O preparo das amostras para observação por MET utiliza a fixação dos sistemas biológicos celulares, com uma fixação do material, pós-fixação, desidratação, inclusão em resina que resulta com o seccionamento das células em cortes ultrafinos (60 – 80nm), que são submetidos ao feixe de elétrons, que os atravessa, gerando uma imagem, que é analisada pelo pesquisador (Figura 1).

As amostras preparadas para observação por MEV também são fixadas, desidratadas e em seguida submetidas à secagem pela técnica do ponto crítico. Como amostras biológicas não são boas condutoras elétricas, faz-se necessário uma cobertura metálica (BOZZOLA; RUSSEL, 1992). As amostras são submetidas ao feixe de elétrons, que incide sobre elas, gerando uma imagem, como é ilustrado na Figura 1.

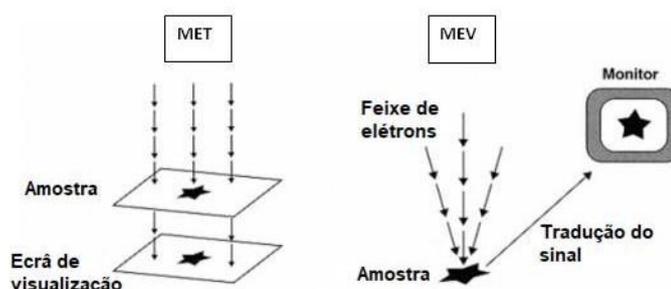


Figura 1: Diferenças básicas entre o microscópio eletrônico de transmissão (MET) e microscópio eletrônico de Varredura (MEV) (Adaptado de Bozzola & Russel, 1992).

## 1.1 Microscopia Eletrônica de Varredura

### 1.1.1 Microscopia Eletrônica de Varredura de Convencional

A microscopia eletrônica de varredura é uma modalidade da microscopia que utiliza um feixe de elétrons que percorre a amostra. Essa interação gera uma diversidade de sinais como elétrons secundários (Secondary Electron - SE), elétrons retroespalhados (Backscattering electron- BSE) que são coletados por seus respectivos detectores (BOZZOLA; RUSSEL, 1992). O MEV é uma importante ferramenta que permite a observação e análise de características microestruturais da superfície de amostras variadas.

As imagens no MEV são formadas quando o feixe de elétrons que parte do canhão de elétrons incide sobre a amostra, varrendo-a. Nessa interação entre o feixe e a amostra são gerados sinais, como elétrons secundários, elétrons retroespalhados, entre outros. Esses elétrons são capturados por detectores específicos, como é mostrado na Figura 2 (GOLDSTEIN et al., 2018). A emissão do feixe primário de elétrons ocorre pela aplicação de uma alta tensão em um filamento, como é o caso do filamento de tungstênio (W) ou do filamento de hexaboreto de lantânio ( $\text{LaB}_6$ ) e também filamento de emissão de campo. Após a emissão, esse feixe de elétrons é focado na amostra por um sistema de bobinas defletoras.

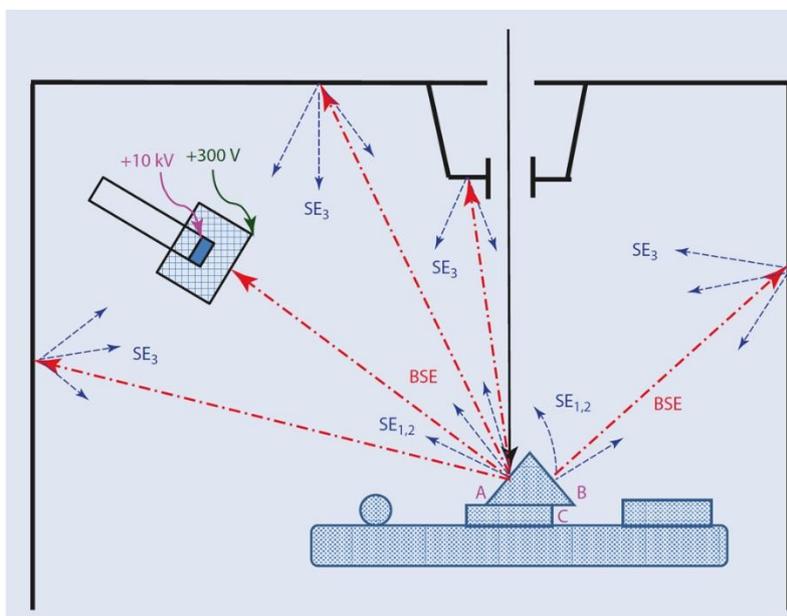


Figura 2: Tipos de radiação emitidos por uma amostra, onde os elétrons secundários (SE) e os elétrons retroespalhados (BSE) como resultado do impacto com o feixe de elétrons de um MEV.

Adaptado de GOLDSTEIN et al., 2018.

A resolução é definida como a distância mínima que pode ser separada como dois pontos distinguíveis na imagem (GOLDSTEIN et al., 2003). A resolução do microscópio de varredura começou com 1  $\mu\text{m}$ , não sendo capaz de superar a resolução de um microscópio óptico que, até então, era capaz de atingir uma resolução de 0,5  $\mu\text{m}$ . Com adaptações e melhorias feitas ao longo dos anos, conseguiu-se atingir uma resolução de 50 nm (GOLDSTEIN et al., 2003). Outra adaptação importante foi a troca das lentes eletrostáticas por lentes eletromagnéticas alcançando-se uma resolução de 25 nm (BOZZOLA; RUSSELL, 1992).

### 1.1.2 Microscopia Eletrônica de Varredura de Alta Resolução

Na microscopia eletrônica de varredura de alta resolução utiliza-se um canhão de emissão de elétrons que é composto por um cristal de tungstênio ou de hexaboreto de lantânio ( $\text{LaB}_6$ ) tendo a medida do raio da ponta de emissão de aproximadamente de 100  $\mu\text{m}$ . No processo de geração de elétrons uma corrente aquece o filamento de tungstênio podendo atingir 2700 K. Outro tipo de canhão é composto de um cristal de  $\text{LaB}_6$  que pode operar em condições diferentes das do tungstênio. Este filamento opera em temperaturas 1.000 K mais baixo do que o tungstênio e têm um brilho diversas vezes maior do que o tungstênio. Nesses canhões, os elétrons são gerados através de um processo conhecido como emissão termiônica de um filamento geralmente tungstênio ou, alternativamente, por emissão de elétrons de campo. Nesse processo os elétrons são acelerados por um potencial elétrico e focados por lentes eletrostáticas e eletromagnéticas na amostra. O brilho da ordem de  $10^9$  A/cm<sup>2</sup> a 20 KeV fez com que ocorresse um grande progresso, já que quanto maior for o brilho maior será a resolução do microscópio eletrônico de varredura (BOZZOLA; RUSSELL, 1992).

### 1.1.3. Microscopia Eletrônica de Varredura Ambiental (Environmental Scanning Electron Microscope) (ESEM)

O ESEM é um equipamento que opera com a pressão na câmara do espécime em um nível de pressão de 609 Pa, que é a pressão de saturação de vapor de água a 0°C ou superior; na qual, os espécimes são mantidos hidratados (DE SOUZA, 2011).

#### 1.1.4 Microscopia Eletrônica de Varredura de baixa voltagem (Low voltage scanning electron microscopy) (MEVBV)

É considerada microscopia eletrônica de baixa voltagem quando se trabalha com feixe de elétrons até 5 kV (JOY; JOY, 1996). É a microscopia que pode analisar a amostra com baixa energia sem a necessidade da cobertura condutora, já que com baixa voltagem não ocorre o acúmulo de carga proveniente do feixe de elétrons. Pode trabalhar com amostras na faixa de milímetros de espessura, mas mesmo assim pode estudar regiões de interesse com uma baixa ampliação.

#### 1.1.5 Microscopia Eletrônica de Varredura de duplo feixe (Focus Ion Beam Scanning Electron Microscopes) (FIB-SEM)

A microscopia eletrônica de varredura de duplo feixe consiste na combinação de um MEV com uma coluna contendo uma fonte de emissão de campo, e feixe de gálio para desgaste da amostra (DE SOUZA; ATTIAS, 2018). O feixe de íons gálio focalizado é emitido em um ângulo de cerca de 50° em relação à coluna de elétrons e, ao interagir com a amostra, pode promover microabrasões controladas. Além de promover o desgaste em áreas específicas, é possível também promover depósitos de camadas condutoras em regiões específicas da amostra, realizando assim processos de nano-prototipagem. Tanto o desgaste quanto o depósito de metais têm sido utilizados intensamente na área de ciências de materiais, para o preparo de amostras para MEV, onde amostras mais finas e com menos artefatos de processamento podem ser obtidas (GOLDSTEIN et al., 2018).

#### 1.1.6 Microscopia de varredura com íons de Hélio (Helium Ion Microscopy) (HIM)

O microscópio de íons de hélio baseia-se na aceleração de um feixe de átomos de hélio que interage com a amostra, gerando elétrons secundários (DE SOUZA; ATTIAS, 2011). Tem como vantagens a formação de imagens com alta resolução, uma maior profundidade de campo, uma elevada produção de elétrons secundários, bem como a observação de amostras sem a necessidade de uma cobertura condutora, etapa que pode potencialmente mascarar a real superfície da amostra estudada (HLAWACEK, 2016).

A emissão do íon hélio é originada somente de três átomos provenientes da fonte de emissão de íons, e somente um íon é selecionado para a formação da imagem. A fonte de ionização do gás de hélio gera um alto brilho, podendo se utilizar

um feixe muito pequeno definido pela abertura, evitando aberrações esféricas e cromáticas, além de resultar numa grande profundidade de campo e resolução estimada de 0,35 nm (CHEN et al., 2011; JOENS et al., 2013). A formação de elétrons secundários é muito maior nesse tipo de microscópio que naqueles com emissão de elétrons, tendo-se assim uma relação sinal ruído melhor na formação da imagem. Outro benefício é que o feixe de hélio que incide na amostra não gera seu carregamento, ou seja, não sendo necessária, portanto, cobertura condutora, o que melhora ainda mais a resolução da imagem. Também é gerada uma maior profundidade de campo devido ao ângulo de convergência menor (BELL et al., 2009).

#### 1.1.7 Criovarredura

A criomicroscopia eletrônica de varredura (Crio-MEV) consiste na observação, em microscópio eletrônico de varredura, de amostras criofixadas em um líquido criogênico que possui uma alta condutividade térmica (NEGRE *et al.*, 2004). Essa técnica fornece uma solução para muitos dos problemas associados ao MEV convencional, como a não utilização de fixadores químicos (SARGENT, 1988). As amostras são estabilizadas através de um congelamento rápido e, além da possibilidade de observação em condições mais próximas do seu estado nativo, a Crio-MEV apresenta a possibilidade de se observar áreas fraturadas com o material ainda congelado, o que não é possível na criofratura convencional. Além disso, a associação de técnicas de Crio-MEV e de microscópios eletrônicos de varredura de alta resolução permite a obtenção de informações em Crio-MEV com qualidade de resolução similar ou superiores à obtida em réplicas de criofratura (BOZZOLA; RUSSELL, 1992).

O congelamento da água mantendo seu estado amorfo chamado de vitrificação trouxe grandes vantagens à microscopia eletrônica de varredura (Moor, 1987). O processo de vitrificação é feito para estabilizar a água em seu estado amorfo, ou seja, ausência de cristais de gelo (DE SOUZA 2011). Esse é o estado mais desejado pelos pesquisadores nos estudos celulares. Uma noção disso, é quando se congela células a velocidade de 170°C/seg tem-se cristais de tamanhos entre 4 e 5 µm. Quando se consegue velocidades superiores, formam-se cristais entre 1 e 2 µm. Durante muito tempo houve discussões sobre ter-se atingido a vitrificação da amostra. Porém, com o melhoramento no limite de resolução dos

microscópios eletrônicos é possível observar cristais de tamanhos inferiores (DE SOUZA 2011). Os cristais com tamanhos entre 1 e 2 nm não apresentam problemas para o pesquisador, pois esses tamanhos não interferem no estudo das células (BENCHIMOL, 2013).

Uma etapa crucial na criomicroscopia eletrônica de varredura é a preservação da amostra, do seu congelamento até a sua observação. Neste caso é utilizado um acessório chamado de criotransfer que mantém a atmosfera em alto vácuo e em baixa temperatura permitindo a retirada da amostra sem que ocorra o descongelamento do material. Para receber as amostras congeladas, o microscópio eletrônico de varredura deve estar equipado com um crio-estágio, que permite a entrada da amostra ainda congelada no microscópio sem que haja a necessidade de abrir câmara do mesmo (SEVERS, 2007).

## 1.2 Métodos de preparo de amostras biológicas por fixação química

O objetivo da fixação química é preservar a ultraestrutura da célula, mantendo-a no estado mais próximo daquele existente *in vivo*. Para isso são utilizadas soluções fixadoras que trarão estabilidade às estruturas celulares. No entanto, dependendo do tipo de fixador utilizado, algumas estruturas podem ser alteradas devido à ação coagulante destes. Os fixadores utilizados de preferência na microscopia eletrônica são os fixadores aditivos, pois estes tornam as estruturas mais estáveis (SESSO, 2011). Uma das vantagens desse processo é que, após serem fixadas por um fixador aditivo, estruturas coaguláveis tornam-se estáveis e não podem mais ser coaguladas por outras substâncias, como é o caso de proteínas que seriam coaguladas pelo etanol ou acetona no processo de desidratação (SESSO, 2011). Glutaraldeído, formaldeído e tetróxido de ósmio são exemplos de fixadores aditivos (DE SOUZA, 2011).

O glutaraldeído é um exemplo de fixador aditivo, geralmente é utilizado como fixador de rotina do preparo para materiais biológicos para microscopia eletrônica. No processo de fixação o glutaraldeído se liga aos grupamentos amina das proteínas, realizando ligações cruzadas, de forma irreversível, sendo, portanto, o responsável pela fixação da porção proteica das células (HAYAT, 1981).

Outro exemplo de fixador aditivo é o tetróxido de ósmio que protege as lipoproteínas dos tecidos, evitando sua coagulação. Sua utilização também tem como

vantagem a estabilização e constatação do material biológico, como os fosfolipídios da membrana plasmática (PALADE, 1952).

Já o formaldeído não é considerado um bom fixador para preservação do material biológico, pois não é eficaz na formação de ligações cruzadas, pois é possível que aconteça a reversão da fixação. Porém, atividades enzimáticas e imunogênicas são menos prejudicadas pelo formaldeído do que pelos demais fixadores. Mas, se a intenção for estudar as atividades enzimáticas, recomendasse a utilização desse fixador. O uso conjugado desses fixadores tem sido o mecanismo de rotina para preservação das estruturas e atividades celulares (GLAUERT, 1975).

É possível fazer com que a difusão dos fixadores nas amostras seja mais rápida utilizando um aparelho de micro-ondas específico para processamento de amostras. Essa metodologia reduz de forma significativa o tempo de fixação, pós-fixação e polimerização da resina a ser utilizada (DE SOUZA, 2011). Isso acontece porque as micro-ondas geradas pelo equipamento são capazes de aquecer substâncias polares como, por exemplo, a água, aumentando o grau de agitação das moléculas que se fazem presente nos processamentos para microscopia eletrônica, já que essas ondas têm um comprimento de onda maior que os raios infravermelhos e menores, que o comprimento de ondas de rádio, aumentando o grau de agitação das substâncias polares. Este equipamento é de utilização exclusiva em laboratório, pois seus acessórios, como exaustão, câmara de vácuo e placas de refrigeração, não são encontrados em modelos domésticos (BENCHIMOL et al., 1993).

### 1.2.1 Desidratação

A desidratação é o processo que substitui a água presente nas células por um agente desidratante, tais como os solventes orgânicos etanol e a acetona (ANDERSON, 1951). A ideia geral desta etapa é substituir gradualmente a água da amostra pelo solvente orgânico, através de uma bateria de concentrações crescentes deste solvente. Esse processo ocorre após a pós-fixação da amostra (DE SOUZA, 2011).

### 1.2.2 Secagem pelo método do ponto crítico

A secagem pelo método do ponto crítico é uma das etapas de processamento de amostras biológicas necessária para que haja remoção do solvente, previamente utilizado na desidratação e secagem das amostras. Tem grande importância, pois quando a amostra é seca ao ar livre podem ocorrer danos a sua morfologia, gerando artefatos. A secagem da amostra pelo método do ponto crítico previne a ocorrência desses danos durante a retirada do agente desidratante. No processo ocorre uma substituição gradual do solvente por dióxido de carbono líquido ( $\text{CO}_2$ ), em trocas realizadas com pressão e temperatura controladas. Segundo Anderson (1951), o ponto crítico da água acontece a uma pressão de 218 atm a uma temperatura de  $374^\circ\text{C}$ , o que não seria favorável para a célula, pois nesses parâmetros a mesma não seria capaz de manter sua estrutura. O uso do  $\text{CO}_2$ , que possui ponto crítico na faixa de  $31^\circ\text{C}$  e 73 atm, permite que a amostra seja seca em condições mais favoráveis de temperatura e pressão. Após a troca de todo solvente presente na câmara do equipamento, onde se encontra a amostra, temperatura e pressão são elevadas até atingir o ponto crítico do  $\text{CO}_2$ , no qual o limite entre os estados líquido e gasoso desaparece (Figura 3). O  $\text{CO}_2$  alcança a fase de gás, sendo liberado de forma controlada pelo equipamento (SILVEIRA, 2011).

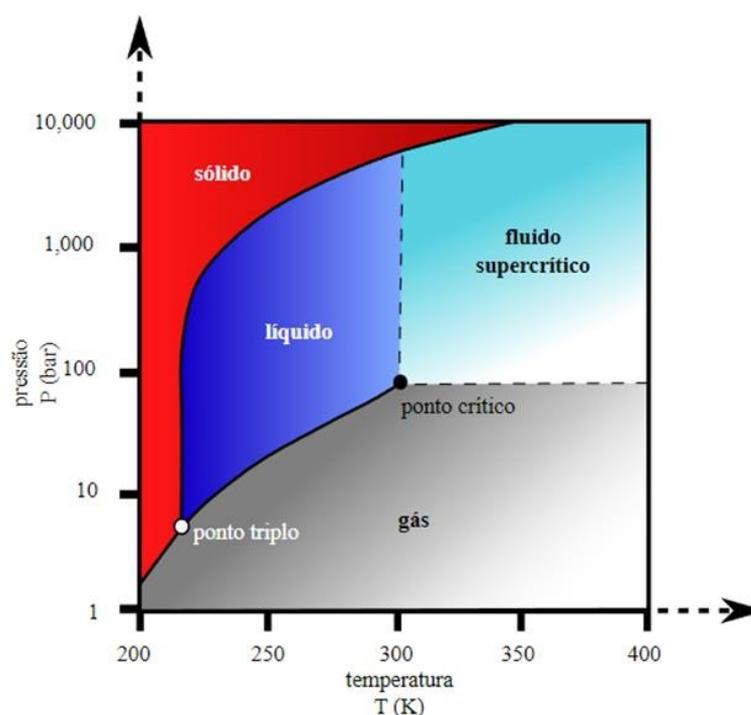


Figura 3: O diagrama fase do  $\text{CO}_2$  que mostra o ponto crítico no que diz respeito à pressão e à temperatura (Adaptado de PAREDES, 2014).

### 1.2.3 Cobertura Condutora

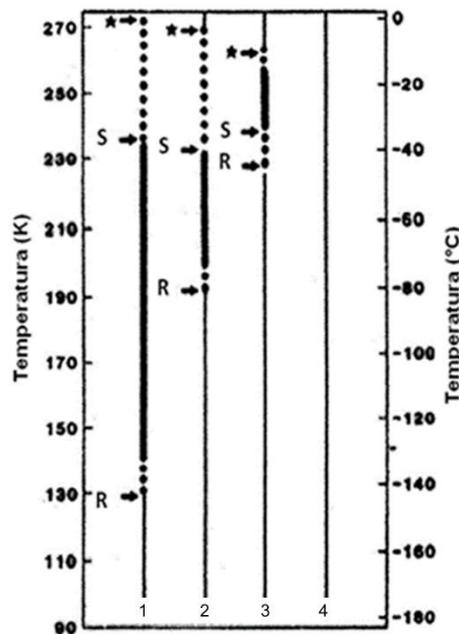
Amostras biológicas não têm boa condutividade elétrica, por isso muitas vezes é necessário inserir uma cobertura metálica (ouro, platina, carbono, paládio, etc) para aumentar essa condutividade de sua superfície. No entanto, a camada depositada sobre a superfície da amostra deve ser bem fina (de 2 a 10 nm), para que não mascare a superfície da amostra (HERMANN; MULLER, 1991). O método mais eficaz de deposição é através de um sistema de vaporização conhecido em inglês como “sputtering” ou pulverização catódica. Existe também o processo de evaporação em alto vácuo, que é mais recomendado para a observação de amostras em microscópio de alta resolução (GOLDSTEIN et al., 2018).

### 1.3 Métodos de preparo de amostras biológicas por fixação física

Os fixadores químicos possuem grande velocidade de penetração na célula, porém não é o suficiente para evitar o aparecimento de alterações na ultraestrutura e composição celular. Além disso, muitos dos fixadores químicos apresentam alta toxicidade para a célula, que altera sua morfologia antes da estabilização de suas estruturas (LOGIN et al., 1991). Por isso, o congelamento se torna uma ferramenta útil na preservação celular. O congelamento de amostras é um exemplo de fixação física, sendo crítico o controle na maneira em que ele ocorre para que seja evitado a formação de cristais de gelo. O ideal para um congelamento é que a amostra alcance o estado de vitrificação, ou seja, que não haja formação de cristais de gelo. No entanto, alcançar o estado amorfo da água é muito difícil, a formação de microcristais aproximadamente de 1 a 2 nm é aceita, pois dependendo de seu tamanho o limite de resolução do microscópio não permite enxergá-los.

A cristalização é tempo-dependente e ela própria gera calor. A faixa crítica para a formação de núcleos de cristais de gelo na água pura é de  $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$  e  $-140\text{ }^{\circ}\text{C}$ , sendo essa a faixa onde os cristais podem voltar a crescer. Por isso, é necessário que durante o congelamento o material a ser congelado passe pela faixa crítica de congelamento o mais rápido possível para que os núcleos de cristais não sejam formados. Já para a água presente nas células e nos tecidos o comportamento é diferente, uma vez que ela conta com a presença de sais e diversos solutos, o que faz a faixa crítica de cristalização diminuir. Com a utilização de aditivos, como os crioprotetores, a faixa de congelamento crítica fica ainda menor, entre  $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$  e  $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Os crioprotetores são substâncias que diminuem a

formação de cristais de gelo no processo de congelamento por formar ligações de hidrogênio com a água, o que altera a faixa crítica de congelamento (Meryman, 1971; Skaer, 1982). A Figura 4 apresenta as diferentes faixas de temperatura para o congelamento da água pura, de células sem e com um crioprotetor, além do congelamento de amostra sem a presença de água (BOZZOLA; RUSSEL, 1992).

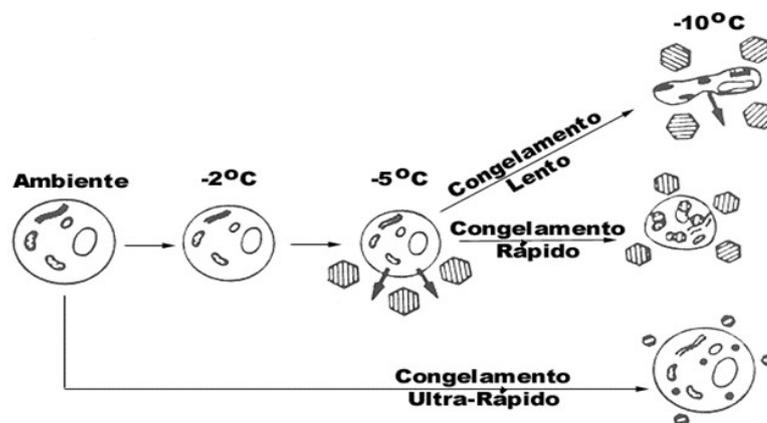


**Figura 4: Esquema que representa as 4 situações de congelamento.** (1) congelamento da água pura; (2) congelamento de células sem crioprotetores; (3) congelamento das células com crioprotetores; (4) congelamento de material sem água. O asterisco representa o ponto de fusão; S, a temperatura de super-resfriamento; R, temperatura de recristalização. A linha reta escura representa a faixa crítica para o crescimento de cristais e que deve ser atravessada muito rapidamente (Segundo Dubochet, 1984)

Segundo H. Moor (1987), o gelo pode ser diferenciado em três formas nos espécimes congelados:

- (a) Macrocrystalinos, onde a espessura dos cristais de gelos pode superar os 100 nm e danificar as estruturas de forma a não ser possível estudar o material congelado, pois esses cristais são artefatos que induzem ao erro.
- (b) Microcrystalinos, os cristais formados podem chegar ao máximo de 20 nm de espessura o que é considerado aceitável, visto que esses cristais podem não danificar uma grande parte de estruturas que se deseja observar.
- (c) Estado amorfo, que representa o estado onde não existe a formação de cristais de gelo, sendo esta a situação ideal.

O congelamento é utilizado para a estabilização da ultraestrutura celular, gerando menos artefatos que a fixação química. Por isso, foram desenvolvidas diferentes técnicas de congelamento visando a não formação de cristais de gelo nesse processo, ou que aqueles formados fossem de tamanho aceitável, ou seja, menores que o limite de resolução. Muitos dos primeiros resultados obtidos foram não satisfatórios, sendo assim novas metodologias foram desenvolvidas para reduzir drasticamente a formação de cristais de gelo (BENEDETTI, 1973). A Figura 5 ilustra o efeito de diferentes velocidades de congelamento na formação de cristais de gelo na célula.



**Figura 5: Esquema mostrando os efeitos do congelamento realizado a diferentes velocidades**  
(Adaptado Dubochet, 1984)

Uma das barreiras enfrentadas para que haja um bom congelamento é a profundidade de congelamento que ele alcança. Alguns métodos só conseguem um bom congelamento de uma fina superfície do material biológico, da ordem de alguns micrômetros. Além disso, no congelamento de amostras que possuem espessura maior, como tecidos, torna-se difícil a troca de calor da amostra, criando regiões mal congeladas (STUDER et al., 1989). Algumas técnicas de congelamento ultrarrápido permitem o congelamento de amostras com espessura entre 200 e 500 micrômetros sem a adição de crioprotetores como é o caso do congelamento por alta pressão (GILKEY; STAEHELIN, 1986). Além disso, outros fatores podem influenciar no processo de criofixação ou congelamento, como a composição da amostra, a forma e a velocidade de congelamento. O tipo de crioprotetor também interfere no processo de congelamento (ECHLIN, 1992).

Além das metodologias convencionais que permitem a visualização de células a temperatura ambiente, é possível observar amostras biológicas no MEV ainda congeladas. A Crio-MEV permite a observação da amostra em seu estado mais próximo possível do *in vivo* (ECHLIN, 1992).

### 1.3.1 Congelamento Lento

É o método mais simples, barato e o mais usado no Brasil. É adequado para estocagem de células vivas em banco de células, utiliza crioprotetores como dimetilsulfóxido (DMSO) e glicerol, dessa forma fazendo com que ocorra a diminuição do volume de água no interior da célula, minimizando a formação de cristais de gelo que pode trazer danos irreversíveis, como a ruptura mecânica de todos os sistemas de membranas celulares (DE SOUZA, 2011).

### 1.3.2 Congelamento Rápido

Este tipo de congelamento que, na maioria das vezes, é feito através da imersão do material em líquido criogênico, como é o caso do Freon 22, etano, propano e nitrogênio líquido. No entanto, ainda se torna necessária a utilização de crioprotetores, pois a velocidade de congelamento ainda possibilita a formação de cristais hexagonais (DE SOUZA, 2011). No congelamento por imersão, o uso de crioprotetores previne a formação de cristais hexagonais e os danos por eles causados. Nessa metodologia, as amostras passam por um processo de fixação química, seguida de infiltração por sacarose, que atua como crioprotetor e em seguida são congeladas por imersão no líquido criogênico escolhido (TOKUYASU, 1973). O líquido criogênico também pode ser resfriado em nitrogênio líquido. Neste caso, o congelamento pode ser considerado ultra-rápido para as camadas mais superficiais da amostra (até 1  $\mu\text{m}$ ) (HUEBINGER, 2016). O congelamento rápido de soluções aquosas é uma ferramenta poderosa, tendo duas importantes aplicações: (I) criofixação de amostras para investigação (ultra-) estrutural por (crio-) microscopia e (II) criopreservação de amostras vivas para armazenamento de longa duração (HUEBINGER, 2016).

### 1.3.3 Congelamento Ultra-rápido

#### 1.3.3.1 Congelamento por Impacto

Processo em que a amostra é colocada em um suporte que submete ao impacto xxxx na superfície de um bloco metálico de cobre puro e congelado em nitrogênio ou hélio líquido. O método é tão eficaz que dispensa a utilização de crioprotetores. Apesar da sua grande eficácia no processamento de amostras, este método apresenta algumas desvantagens, como a baixa profundidade de congelamento, onde apenas uma pequena faixa entre 10 e 20  $\mu\text{m}$  atinge um bom congelamento. Existe também o risco de formação de artefatos devido ao impacto de célula com o bloco metálico, que pode potencialmente levar a deformação das estruturas celulares (DE SOUZA, 2011).

#### 1.3.3.2 Congelamento com Jato de Propano (*Propane-Jet-Freezing*)

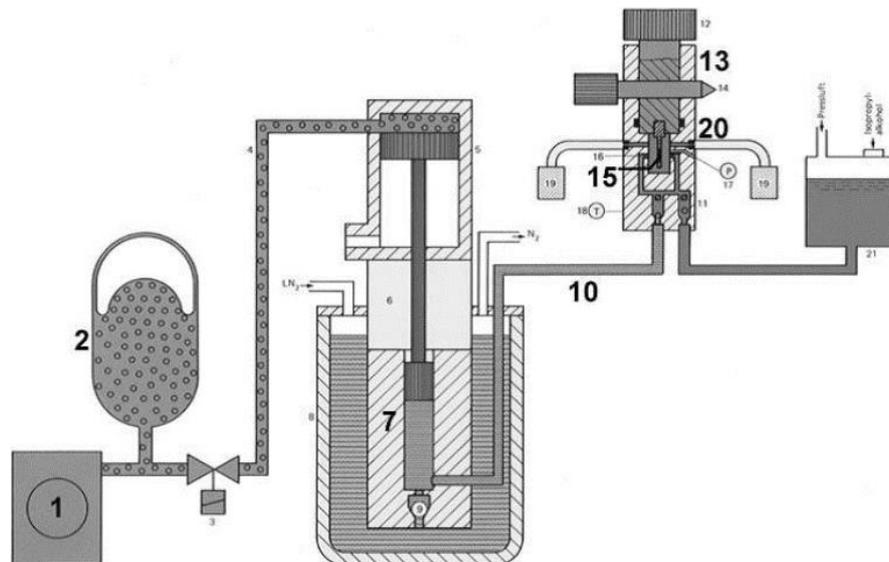
Neste tipo de congelamento, a amostra permanece fixa enquanto o propano, em baixa temperatura entra em contato com a amostra, congelando-a instantaneamente (MOOR et al.1976). Nesse método, o propano é mantido em temperatura abaixo de  $-180^{\circ}\text{C}$ , sendo resfriado por nitrogênio líquido. Após o congelamento, a amostra é armazenada e em um nitrogênio líquido para ser utilizada futuramente em diversas aplicações como criofatura, substituição à frio ou crioultramicrotomia (DE SOUZA, 2011).

#### 1.3.3.3 Congelamento por alta pressão (High Pressure Freezing) (HPF)

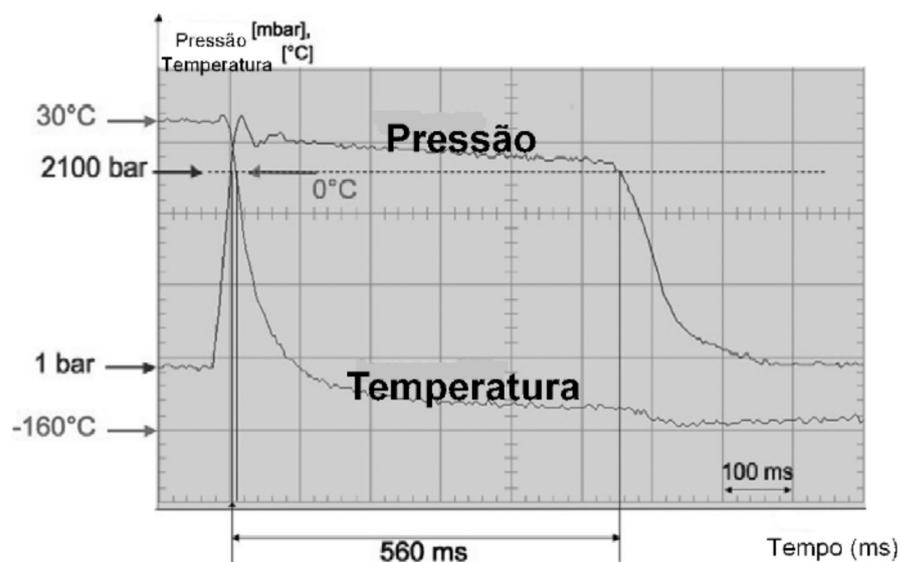
A maior parte das técnicas de congelamento no campo biológico do preparo de amostras para microscopia eletrônica é feita sob pressão atmosférica, permitindo uma profundidade de congelamento muito baixa, entre 10 e 20  $\mu\text{m}$  (DE SOUZA 2011). Assim, para que um volume maior da amostra seja vitrificado, o congelamento por alta pressão se apresenta como alternativa metodológica (MOOR, 1987). Nesse tipo de congelamento, pode-se alcançar uma boa profundidade de congelamento de cerca de 200  $\mu\text{m}$ . Nesse processo, as amostras são colocadas em um suporte de alumínio, cobre ou safira e submetidas a uma pressão de 2100 bar em 20 ms. Para atingir essa condição, jatos de nitrogênio líquido são lançados sobre o suporte contendo a amostra, congelando-o instantaneamente. O material congelado é retirado do equipamento e mantido em

nitrogênio líquido para uso posterior (BENCHIMOL, 2011). Esse método é particularmente útil para a preservação de amostras que são difíceis de se estabilizar com fixadores químicos convencionais e para o estudo de proteínas de membrana ou momentos peculiares da célula como mudança morfologia (DAH; STAEHELIN, 1989).

O laboratório onde os congelamentos são feitos é bem didático no quesito de entender como funciona. Esse equipamento funciona da seguinte forma: Um cilindro (2) acumulador de pressão (em torno de 150 bar) de nitrogênio gasoso; com o auxílio de uma bomba essa pressão passa para 300 bar (1); o aparelho começa um procedimento de resfriamento que acontece de forma rápida na câmara onde o suporte contendo o material irá entrar é injetado um volume de isso-propanol (13); quando o pistão é acionado o nitrogênio líquido que está no cilindro de alta pressão (7) entra na linha de alta pressão (10) levando a pressão para a câmara de congelamento (13). Com isso, o nitrogênio líquido que está sendo pressurizado comprime o etanol expulsando-o pelos orifícios de saída (20); dentro da câmara a pressão atinge 2100 bar na temperatura ambiente antes do congelamento do material (15) pelo nitrogênio líquido. Todo esse procedimento é ilustrado na figura 6. A Figura 7 mostra a relação entre temperatura e pressão desejáveis durante esse processo para que seja atingido um bom congelamento. A manutenção da pressão indica o tempo da pressão superior a 2100 barras em 560 ms. A temperatura cai abaixo de 0°C somente depois que a pressão alcança 2100 barras. A taxa de fluxo de nitrogênio líquido pode ser controlada pelo tamanho das aberturas de saída - maior taxa de fluxo de nitrogênio líquido igual a maior taxa de resfriamento igual a manutenção de pressão mais curta (HUMBEL, 2009).



**Figura 6: Esquema do aparelho de HPF HPM 010 da Bal-Tec.** A figura acima representa um esquema mostrando o funcionamento básico do aparelho de HPF da Bal-Tec HPM 010. 1- bomba de alta pressão; 2- compartimento de alta pressão; 7- cilindro de alta pressão; 10- linha de alta pressão; 13- câmara de congelamento da amostra; 15- orifício de entrada do Nitrogênio líquido; 20- orifício de saída do etanol (Adaptado de HUMBEL, 2009).

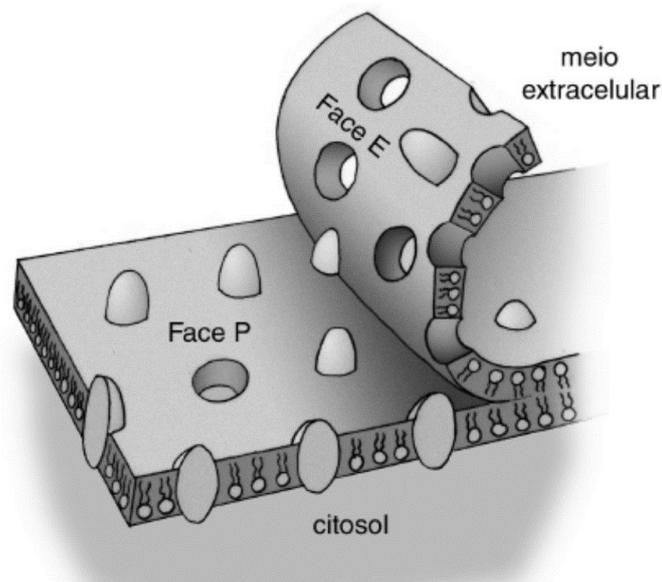


**Figura 7: Curva de temperatura e pressão gerada durante no HPF** (Adaptado de HUMBEL, 2009).

#### 1.4 Criofratura

A criofratura é uma técnica que replica a superfície fraturada de espécimes congelados para posterior observação nos microscópios de varredura ou transmissão. Essa técnica traz informações sobre os aspectos presentes entre as bicamadas lipídicas, bem como a organização interna da célula e sua estrutura

(BOZZOLA & RUSSEL, 1992). Esta técnica é dividida em quatro etapas consecutivas: (1) congelamento da amostra, (2) fratura da amostra, (3) formação de uma réplica em condições de alto vácuo e (4) observação no microscópio eletrônico de varredura ou de transmissão (Nicholas, 2007). Quando a amostra é congelada e fraturada, a fratura ocorre preferencialmente na região hidrofóbica da membrana plasmática, separando seus dois folhetos, sendo as suas duas faces chamadas de face P e face E (Figura 8) (ROBENEK; NICHOLAS, 2008). Essas faces correspondem a face externa do folheto interno da membrana que é a face P e a face interna do folheto externo da membrana é a face E. Após a etapa de fratura, faz-se uma réplica com uma camada bem fina de platina e carbono, sendo utilizado para estabilização da réplica. O aspecto observado da réplica da membrana fraturada de uma célula é o de uma matriz lisa onde se observam várias partículas denominadas partículas associadas à membrana ou partículas intramembranares (IMPs) (DE SOUZA, 2011).



**Figura 8: Ilustração das duas faces da bicamada lipídica.** Adaptado de Fundação CECIERJ, 2010.

Na criofratura existem duas modalidades que melhoram ainda mais a perspectiva de relevo da amostra. Estas são denominadas técnicas de crio-relevo (*freeze-etching*) e crio-relevo acentuado (*deep-etching*). Define-se como *freeze-etching* a remoção de gelo da superfície da amostra fraturada por sublimação a vácuo antes que a réplica seja feita. Já a técnica de *deep-etching* é a técnica de sublimação do gelo com maior tempo de sublimação (DE SOUZA, 2011).

Apesar de ser uma técnica muito bem elaborada, apresentando excelentes resultados, a criofratura clássica deixa a amostra seca quando levada ao microscópio eletrônico. Já em 1960 Fernandes-Moran defendeu a visualização das amostras ainda hidratadas no estado congelado por existirem estruturas que somente são visíveis nessa situação (DUBOCHET. et. al., 1988).

1.5 Método de observação de estruturas intracelulares de células livres por microscopia eletrônica de varredura.

#### 1.5.1 Método de Fukudome e Tanaka

O trabalho pioneiro de Tanaka em 1981 com microscopia eletrônica de varredura de alta resolução mostrou imagens de macromoléculas como imunoglobulinas, proteoglicanas e DNA. Entretanto, diversos entraves técnicos tiveram de ser superados para que a observação de estruturas celulares com grandes aumentos e resolução fossem possíveis. Estes incluem contaminação da amostra, dano causado pelo feixe e contraste das amostras. Estas medidas incluíram aperfeiçoamento no sistema de vácuo dos microscópios, impregnação metálica das amostras, dispensando a cobertura condutora (DE SOSZA 2011).

O método desenvolvido por Fukudome e Tanaka (1985) visa estudar o interior das células com a combinação de técnicas que resultam na extração do material citoplasmático, ao mesmo tempo preservando as membranas internas e as diversas organelas presentes na mesma. Esta metodologia conta com a combinação de fixação química seguida de um congelamento utilizando criogênicos para estabilização das células e seus componentes, e também para que não ocorra a formação de cristais de gelo. Os criogênicos são usados em vez do mergulho direto da amostra em nitrogênio líquido, que tende a ferver quando os espécimes são colocados nele. Os crioprotetores são utilizados para se evitar o mau congelamento, pois na tentativa de um contato direto com a amostra ocorre a fervura do nitrogênio líquido, nessa tentativa a formação de cristais hexagonais de grandes dimensões. A remoção da matriz citoplasmática é realizada com a utilização de  $Os_4O$  em baixa concentração (0,1%).

#### 1.6 O *Trypanosoma cruzi* e a doença de Chagas

O parasito *T. cruzi* é o agente causador da doença de Chagas, também é chamada de tripanossomíase americana, sendo considerada uma doença

negligenciada de grande importância na América Latina (SHANG *et al.*, 2014). Pertencente à família Trypanosomatidae, o *T. cruzi* é um parasito intracelular obrigatório (BARRIAS; BORGES; DE SOUZA., 2018). Na América Latina, 14.000 pessoas morrem por ano por causa dessa doença, e no Brasil aproximadamente 2 milhões de pessoas estão infectadas (TEIXEIRA *et al.*, 2011).

Entre as formas de desenvolvimento encontradas no ciclo biológico do *T. cruzi*, a forma tripomastigota é a mais infectante, estando presente em mamíferos e no inseto vetor conhecido popularmente como barbeiro (Figura 9 e 10) (DIRCEU, 2011). A partir do momento em que a célula hospedeira é infectada, forma-se um vacúolo parasitóforo (PV) (Figura 9). Dentro da célula hospedeira, o protozoário se desvencilha desse vacúolo e alcança o citoplasma, se diferenciando para a forma amastigota, passando a se multiplicar dezenas de vezes até retornar a forma tripomastigota, rompendo a membrana celular e caindo na corrente sanguínea, podendo infectar novas células ou ser sugado pelo barbeiro durante o repasto sanguíneo (CUETO. *et al.*, 2018).

Apesar de não ser uma forma infectiva (TEIXEIRA *et al.*, 2011), a forma epimastigota pode fornecer informações quando é fagocitada pela célula hospedeira. No processo ocorrem as etapas de adesão e reconhecimento onde moléculas tanto no parasito quanto da célula hospedeira interagem. Em seguida, um processo de endocítico leva à internalização do parasita com formação do vacúolo parasitóforo. Durante este processo, lisossomos da célula hospedeira se fundem com o vacúolo parasitóforo. No interior do vacúolo a forma tripomastigota se transforma em amastigota e ocorre lise da membrana vacuolar (Barrias *et al.*, 2018).

A contaminação do barbeiro (1), que é um inseto hematófago, ocorre quando este pica um mamífero infectado e ingere formas tripomastigotas sanguíneas (2) que são conduzidas à porção anterior do estômago. Neste novo ambiente, os tripomastigotas se diferenciam em epimastigotas e algumas formas esferomastigotas (3). Ainda no estômago, formas de transição, esferomastigotas e epimastigotas são digeridas. As formas epimastigotas sobreviventes, quando alcançam o intestino, começam a se multiplicar sucessivamente por divisão binária (4) e aderem-se às membranas perimicrovilares que são secretadas pelas células intestinais. Esta adesão ocorre predominantemente pela região do flagelo. Posteriormente, os epimastigotas se soltam e movem-se para o intestino posterior,

onde iniciam o processo de diferenciação em tripomastigota metacíclicos (5) que aderem à cutícula que reveste o epitélio do reto e do saco retal do inseto. Ao se soltarem do epitélio, podem ser eliminados na urina ou fezes do inseto em seu próximo repasto sanguíneo. A contaminação de um hospedeiro vertebrado ocorre quando o barbeiro infectado pica o mamífero. Neste processo, o inseto geralmente defeca e urina (6), depositando, assim, sobre a pele ou mucosa do mamífero a forma tripomastigota metacíclica, que é a forma infectiva (7), porém não replicativa. A invasão do parasito ocorre quando o hospedeiro se coça, o que gera lesões da pele por onde o parasito pode penetrar ou quando ele entre em contato com a mucosa. Os tripomastigotas metacíclicos acessam a circulação sanguínea, aderindo e invadindo uma gama de células nucleadas como, por exemplo, macrófagos (8), células musculares e epiteliais. Inicialmente, a forma tripomastigota é fagocitada pelo macrófago, seguindo-se a formação do vacúolo parasitóforo (9). No interior do vacúolo parasitóforo, a forma tripomastigota se diferencia para a forma amastigota e ocorre a lise da membrana do vacúolo parasitóforo (10). No citoplasma, esta forma se multiplica por fissões binárias sucessivas, podendo tomar todo o citoplasma (11). Após as sucessivas divisões, os amastigotas iniciam sua diferenciação passando por uma transição (12) e se diferenciando na forma tripomastigota antes da célula hospedeira pode ser rompida pelo excesso de parasito (13). A lise da célula hospedeira pode ocorrer antes da total diferenciação de amastigotas para tripomastigotas, o que gera o aparecimento de diferentes formas no meio externo (14). No meio extracelular, os tripomastigotas (15a) e amastigota (15b) podem infectar novas células que ali estejam presentes (TEIXEIRA *et al.*, 2011).

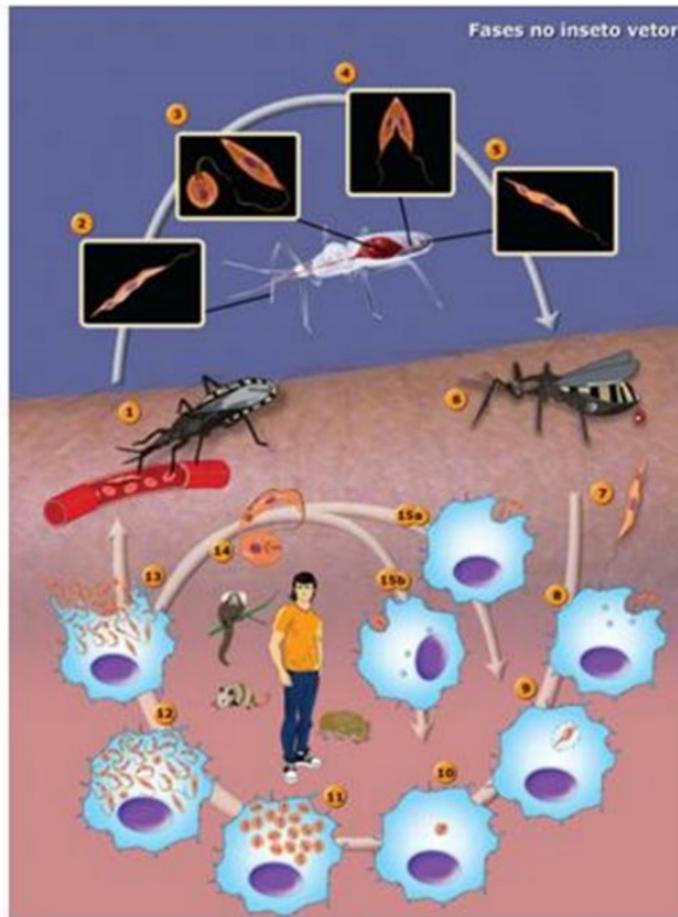


Figura 9: Ciclo biológico do *T. cruzi* (Adaptado de TEIXEIRA *et al.*, 2011)

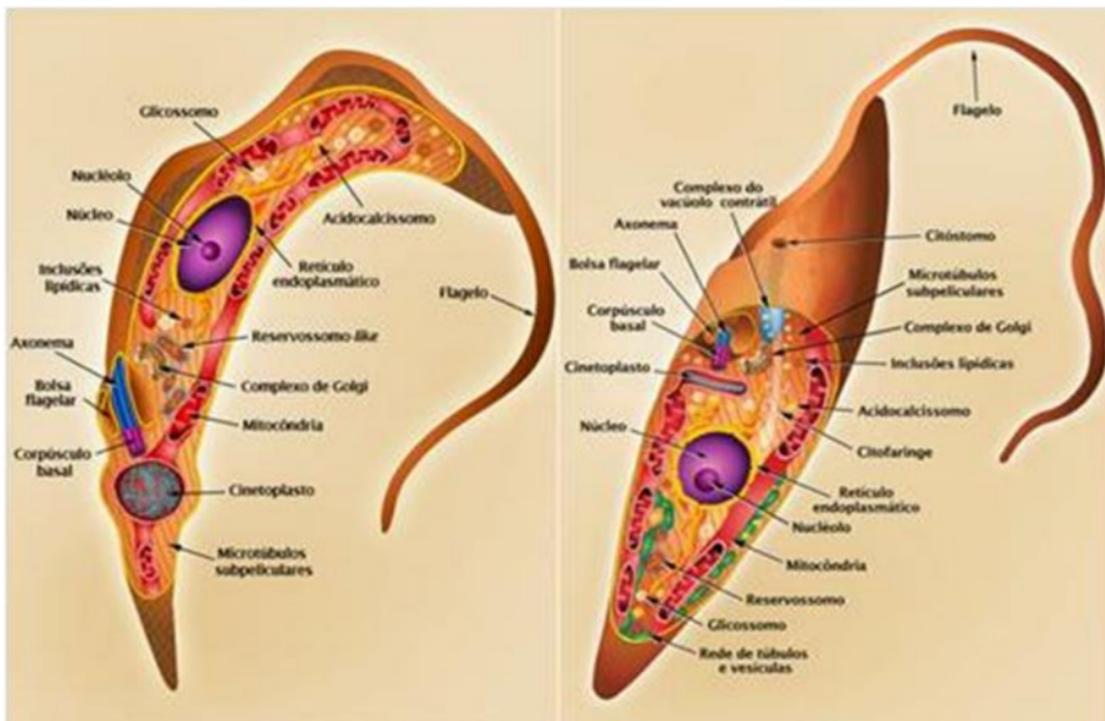


Figura 10: Ilustração da forma tripomastigota e epimastigota de *T. cruzi* em corte longitudinal (Adaptado de TEIXEIRA *et al.*, 2011).

## 2. JUSTIFICATIVA

A microscopia eletrônica de varredura contemporânea vem cada vez mais se impondo com método sofisticado de análise de superfície celular – membrana plasmática íntegra ou fraturada – ou o ambiente intracelular. Neste último, métodos mais modernos se baseiam na análise de amostras congeladas, fraturadas e observadas à baixa temperatura no microscópio. Isso requer uma série de instrumentos de (1) congelamento, (2) fratura e metalização à baixa temperatura e (3) observação à baixas temperaturas (crioestágio adaptado ao MEV de alta resolução). Este fluxo de trabalho compreende o que há de mais moderno em MEV de alta ou ultra-alta resolução de amostras biológicas, e dependente de infraestrutura de equipamentos custosos e sofisticados, existentes apenas nos grandes centros de microscopia. Por outro lado, técnicas alternativas de preparo de amostras, como a de FUKUDOME e TANAKA podem ser adaptadas à diferentes modelos biológicos e substituir, assim, as 3 etapas mencionadas acima requerendo apenas o MEV de alta e ultra-alta resolução existente em vários centros de microscopia avançada.

Além disso, novas modalidades de microscópio de varredura de alta resolução, como a microscopia de íons podem prover valiosos resultados quando aplicadas em associação com o método de FUKUDOME e TANAKA.

Dessa forma justifica-se a abordagem experimental proposta nessa dissertação que tem como foco principal a aplicação de metodologia de FUKUDOME e TANAKA adaptada para modelos de estudo em biologia celular de doença de Chagas (Epimastigota e células hospedeiras infectadas) para análise por MEV de alta e ultra-alta resolução e microscopia de íons.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo Geral

Adaptar o protocolo desenvolvido por FUDUKOME e TANAKA para o *Trypanosoma cruzi*, epimastigotas isoladas e células infectadas.

Aplicar uma série de variações de protocolos para observar a ultraestrutura de superfícies fraturadas usando diversas combinações de técnicas já conhecidas.

#### 3.2 Objetivos Específicos

3.2.1 Avaliar qual é o protocolo de preparo de amostra mais adequado para o modelo *T. cruzi*, tanto em sua forma tripomastigota quanto em interação com célula hospedeira e fagocitose da forma epimastigota de *T. cruzi* pelo macrófago.

3.2.2 Avaliar qual dos protocolos testados permite maior preservação estrutural.

### 4 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 4.1 Células utilizadas

Durante os estudos, foram utilizados parasitos da espécie *Trypanosoma cruzi* na forma epimastigota, células de mamífero da linhagem LLC-MK<sub>2</sub> infectadas por tripomastigota de *T. cruzi*, e macrófagos Raw infectadas por epimastigota de *T. cruzi*. Todas as células utilizadas foram mantidas no laboratório de Ultraestrutura Celular Hertha Meyer e gentilmente cedidas pela MSc Verônica Santos. As células foram separadas em dois grupos experimentais, sendo as formas epimastigotas classificadas como grupo I e as células de mamífero (linhagem LLC-MK<sub>2</sub> e macrófago raw) infectadas com formas tripomastigota e epimastigota como sendo o grupo II.

#### 4.2 Processamento para criofratura

##### 4.2.1 Preparo da amostra

Nesta etapa as células do grupo 1 foram centrifugadas a 2.6 G, por 10 minutos. O pellet foi ressuspenso em phosphate buffered saline (PBS) (pH 7,2), e

as células foram novamente centrifugadas por 10 minutos, a 2.6 G. Esse processo foi repetido três vezes.

As células do grupo 2, que foram cultivadas em garrafa de cultura, foram colocadas em suspensão com o auxílio da tripsina e na sequência os procedimentos do grupo 1.

#### 4.2.2 Fixação

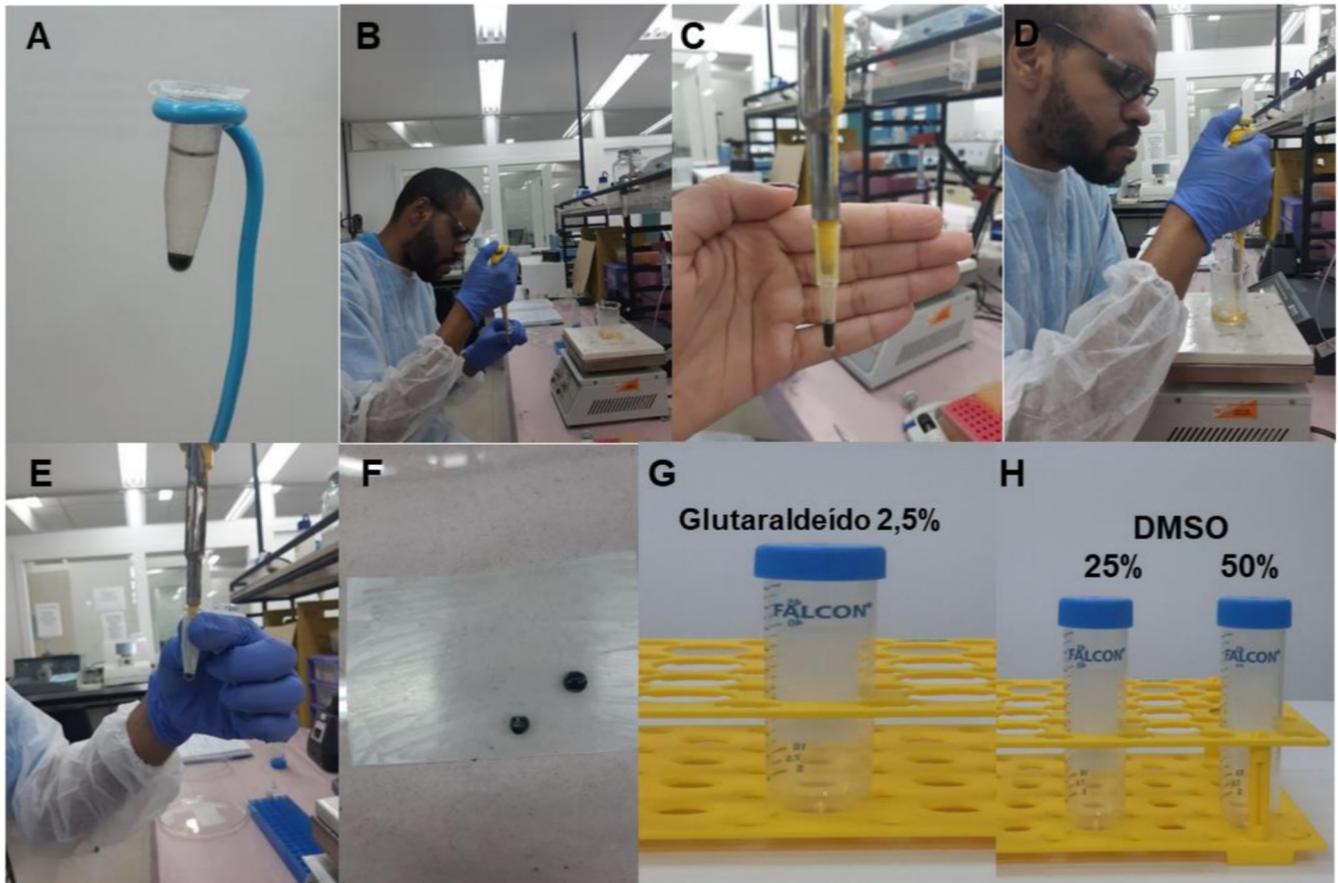
Todas as amostras foram fixadas em solução contendo 2% de glutaraldeído e 0,5% de formaldeído em cacodilato de sódio 0,1M (pH 7,2), por um período mínimo de 2 horas, seguido de lavagem em tampão cacodilato de sódio a 0,1 e pós-fixação em 1 % de tetróxido de ósmio em água por 1 hora.

#### 4.2.3 Mistura de gelatina-quitosana e inclusão da amostra

As amostras (11 A, 11 B, 11 C); foram incluídas em uma mistura 1:1 de quitosana com gelatina (11 D e 11 E), sendo a quitosana preparada previamente a 2% em 0,5% de ácido acético. Com essa nova mistura entra quitosana-gelatina mais o *pellet* de células na proporção de 1:1, a partir dessa nova mistura fez-se uma gota com um volume de 35 µl para facilitar o momento da fratura (11 F). Essa gota é colocada em glutaraldeído 2,5% para endurecer

#### 4.2.4 Crioproteção

A amostra foi infiltrada com DMSO diluído em água (25% e 50%, por 30 minutos cada) para crioproteção antes do congelamento (11 H) (FUKUDOME & TANAKA, 1996).



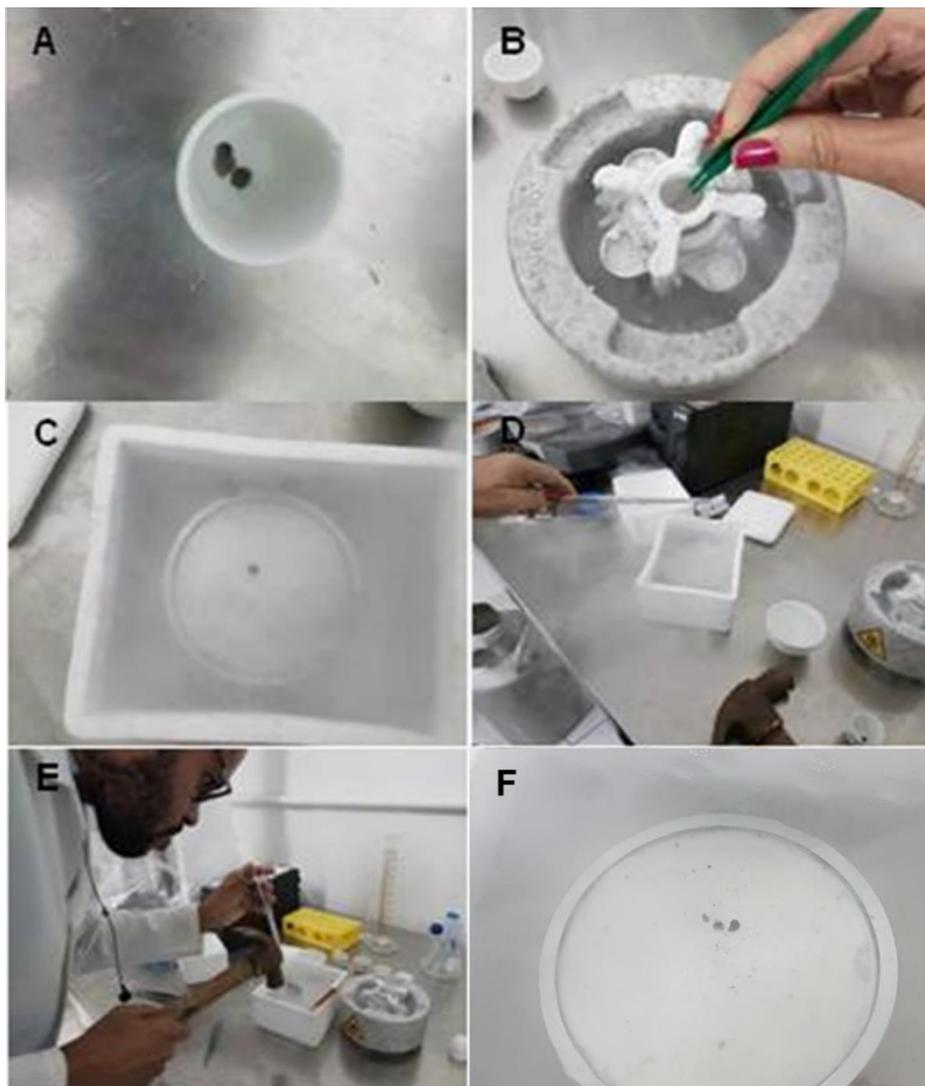
**Figura 11: Criofatura de células livres para observação** (Adaptado de Fukudome & Tanaka, 1986).

#### 4.2.5 Congelamento

Para esta etapa, foi necessário utilizar dois criogênicos diferentes, o Freon 22 e o nitrogênio líquido. Nessa etapa o Freon 22 foi mantido resfriado em nitrogênio líquido. Após o resfriamento, um bastão de metal foi agitado para liquefazer o Freon 22, com isso, a amostras (12 A) foram imersas em Freon 22 por 15 segundos (12 B), e logo após foram rapidamente colocadas em nitrogênio líquido para armazenamento e posterior etapa de fratura.

#### 4.2.6 Fratura

As amostras foram posicionadas em uma placa de alumínio resfriada em nitrogênio líquido (Figura 12C) e fraturadas com uma lâmina, previamente resfriada (Figura 12D), com o auxílio de um martelo (Figura 12E). O material foi mantido em nitrogênio líquido. Alternativamente, a amostra do grupo I foi crioprottegida com etanol.



**Figura 12: Processo de congelamento e fratura da amostra.** (A) A amostra foi incluída em quitosana e gelatina. (B) Congelamento da amostra em Freon 22, resfriado em nitrogênio líquido. (C) A amostra foi transferida para o nitrogênio líquido. (D) Resfriamento da lâmina em nitrogênio líquido. (E) Fratura da amostra com o auxílio de um martelo. (F) Amostra fraturada.

#### 4.2.7 Remoção do crioprotetor

Após a fratura, os fragmentos foram colocados em água por 10 minutos, três vezes, para que o crioprotetor pudesse ser removido.

#### 4.2.8 Maceração

O quadro 1 apresenta os diferentes tempos de maceração testados. Nos protocolos 1 do grupo I e protocolo 4 do grupo II não foram feitas macerações. No total, foram testados três tempos de maceração. Nos protocolos 3 e 5 o material foi colocado em OsO<sub>4</sub> 0,1% por 24 horas e 48 horas, respectivamente, sem trocas. Já no protocolo 6, a solução de OsO<sub>4</sub> 0,1% foi trocada a cada 24 horas por até 72 e 144 horas. No protocolo 2, as amostras foram mantidas em nitrogênio líquido e transferidas para o equipamento de substituição a frio, em meio de substituição a frio contendo 2% OsO<sub>4</sub>, 0,1% glutaraldeído, e 1% H<sub>2</sub>O em acetona.

#### 4.2.9 Lavagem

Após a etapa de maceração essas amostras foram realizadas as lavagens do material para retirada do excesso do agente de maceração, lavando-as em água 3 vezes, por 10 minutos.

#### 4.2.10 Desidratação

Em todos os protocolos, após a etapa de lavagem, as amostras foram desidratadas em série crescente de etanol por dez minutos cada etapa (30, 50, 70, 90 e 100%), o etanol 100% foi repetido por 3 vezes.

#### 4.2.11 Secagem do material

Para a secagem do material foi utilizado o aparelho de secagem pelo método de ponto crítico de CO<sub>2</sub> líquido, realizando-se 16 trocas com intervalos de 2 minutos cada, seguindo uma curva de aquecimento gradativo após as trocas, com liberação do CO<sub>2</sub> presente na câmara do aparelho de forma controlada.

#### 4.2.12 Cobertura condutora

Uma vez secas, as amostras foram montadas sobre stubs de alumínio e fixadas com fita dupla face de carbono e cola de prata. Foram testadas coberturas de ouro 20 nm de espessura, carbono e platina com 5 nm de espessura. Nos

protocolos 1, 4 e 6 separamos amostras que foram observadas sem cobertura condutora no MEV por íons.

#### 4.2.13 Substituição a frio

No protocolo 2 as amostras foram incluídas na mistura de quitosana-gelatina, desidratadas em série crescente de etanol (como descrito anteriormente), congeladas, clivadas e criosubstituídas no aparelho Leica EM AFS2 com meio de substituição com 2% OsO<sub>4</sub> em acetona, 0,1% GA, 1% água por 95 horas onde a rampa de aquecimento foi de 72 horas a -90°C, 18 horas a -20°C, 4 horas a -20°C, 1 hora a -4 °C e 1 hora a 4 °C.

#### 4.3 Microscópios utilizados

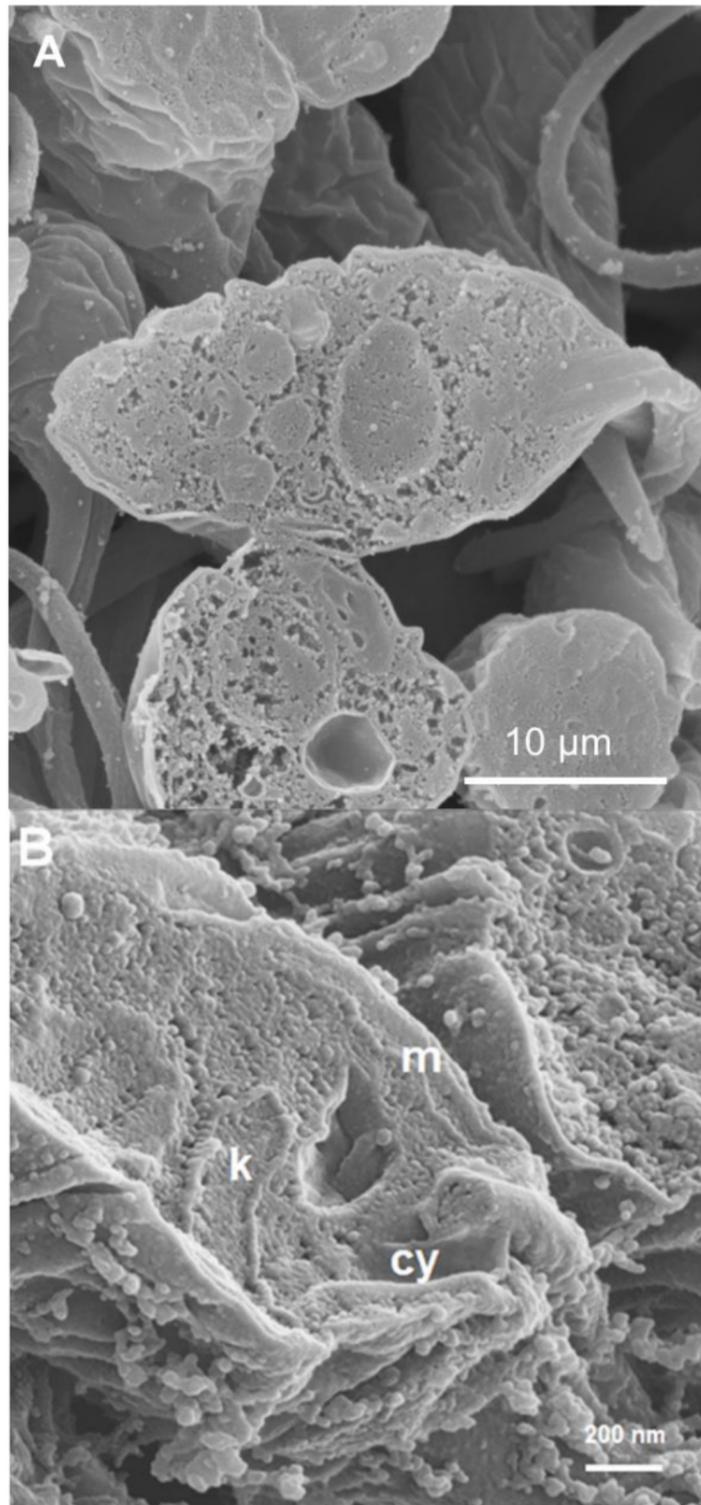
As amostras foram observadas nos microscópios eletrônicos de varredura baixa resolução FEI QUANTA 250 e ZEISS EVO MA 10, com uma a distância de trabalho de 10 mm, Alta resolução ZEISS AURIGA 40, com uma a distância de trabalho de 3 mm, e Alta resolução ORION NanoFab, com uma distância de trabalho de 8,5 mm.

**Quadro 1: Quadro simplificado dos protocolos testados**

<b>MODO</b>	<b>AMOSTRA</b>	<b>Crioprotetor</b>	<b>Maceração</b>	<b>COBERTURA</b>	<b>MEV</b>
<b>Grupo 1</b>					
<b>Protocolo 1</b>	<b>Epimastigotas de <i>T. cruzi</i></b>	<b>DMSO 50%</b>	<b>Não</b>	<b>Au, Sem cobertura</b>	<b>MEV de rotina MEV HR MEV de íons</b>
<b>Protocolo 2</b>	<b>Epimastigotas de <i>T. cruzi</i></b>	<b>Etanol 100%</b>	<b>-90 subst. a frio 95h</b>	<b>Carbono</b>	<b>MEV de rotina</b>
<b>Grupo 2</b>					
<b>Protocolo 3</b>	<b>LLC-MK2 + Tripomastigota de <i>T. cruzi</i></b>	<b>DMSO 50%</b>	<b>24/48 (Sem trocas de ósmio)</b>	<b>Au, Sem cobertura</b>	<b>MEV de rotina</b>
<b>Protocolo 4</b>	<b>LLC-MK2 + Tripomastigota de <i>T. cruzi</i></b>	<b>DMSO 50%</b>	<b>Não</b>	<b>Pt</b>	<b>MEV de rotina MEV HR MEV de íons</b>
<b>Protocolo 5</b>	<b>LLC-MK2 + Tripomastigota de <i>T. cruzi</i></b>	<b>DMSO 50%</b>	<b>24/48 (Sem trocas de ósmio)</b>	<b>Pt</b>	<b>MEV de rotina</b>
<b>Protocolo 6</b>	<b>Macrófago + Epimastigota de <i>T. cruzi</i></b>	<b>DMSO 50%</b>	<b>72h/144h (Trocas de ósmio cada 24h)</b>	<b>Pt, Sem cobertura</b>	<b>MEV de rotina MEV HR MEV de íons</b>

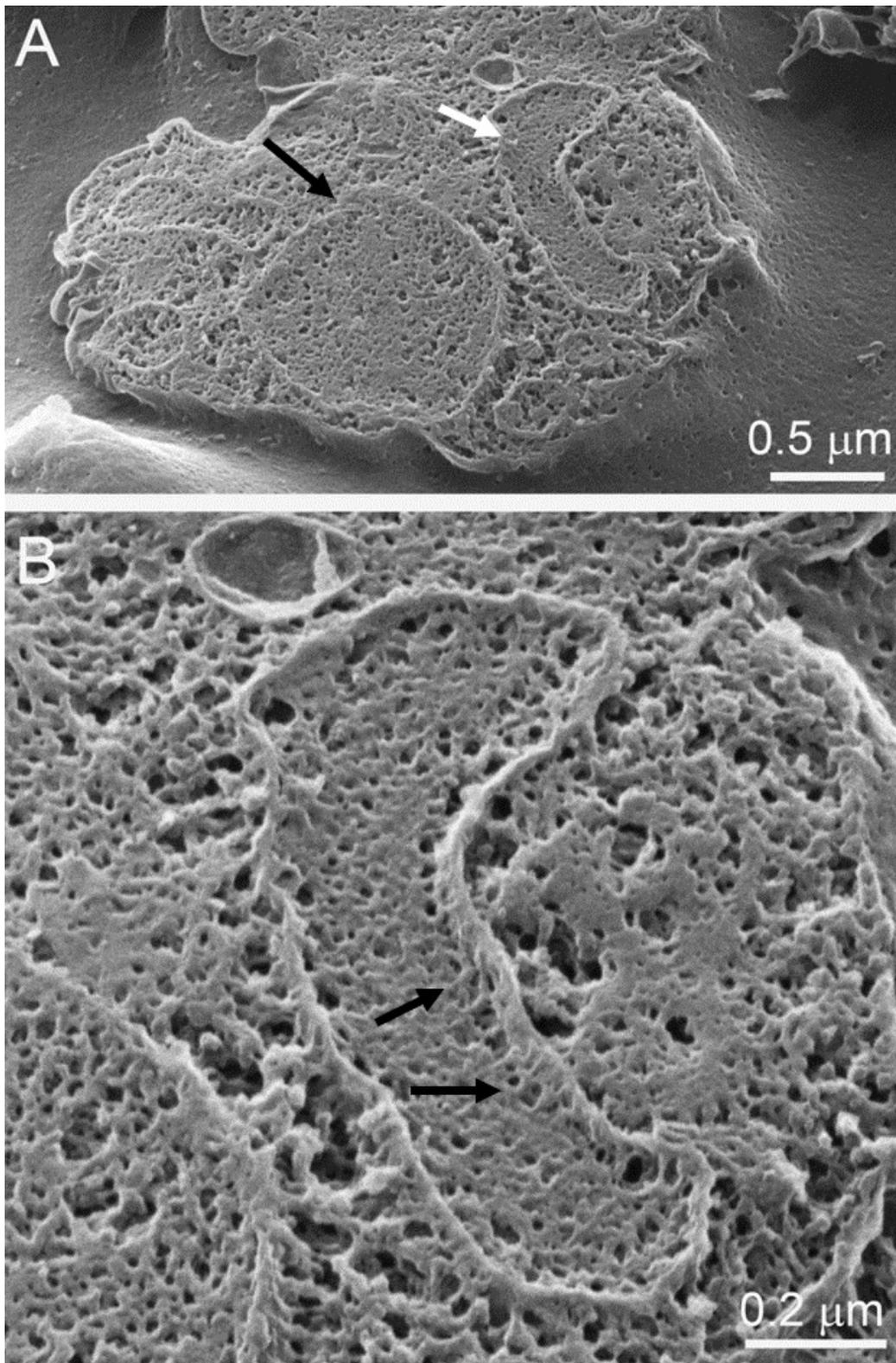
## 5 RESULTADOS

Os experimentos cujos resultados serão descritos a seguir foram planejados seguindo uma ordem hierárquica de complexidade experimental e de observação nos MEVs, de acordo com o quadro 1. Nestes experimentos, epimastigotas em suspensão (grupo 1) e células infectadas com *T. cruzi* (grupo 2) foram submetidas às diferentes rotinas experimentais de congelamento e fratura, obedecendo um critério de observação das amostras inicialmente com cobertura metálica em MEVs com canhão de tungstênio (MEV de rotina), com canhão de emissão de campo (MEV de alta resolução) ou microscopia de íons sem metalização. Amostras submetidas ao protocolo 1 foram observadas inicialmente no MEV de rotina. Os resultados mostraram parasitos clivados e que possuíam a porção intracelular exposta, sendo possível a identificação de estruturas como núcleo, flagelo e perfis da membrana mitocondrial (Figura 13A). Esta amostra foi observada no microscópio de íons, gerando resultados que, apesar da aparência espessa devido a cobertura condutora de ouro (Au) permitiram a identificação de detalhes ultraestruturais de algumas organelas, como do cinetoplasto, da mitocôndria, do núcleo e do citóstoma (Figura 13B). Além disso, o material citoplasmático se apresentou bastante denso e compacto devido a não utilização do ósmio a 0,1% em água para a extração do mesmo. A observação de fragmentos do material fraturado da mesma amostra sem cobertura não eliminou esta condição (citoplasma denso) o que reforça a utilização da maceração com ósmio a 0,1% em água. (Figura 14A, B), porém mostrou detalhes estruturais do cinetoplasto, evidenciando filamentos que parecem se conectar à membrana do mesmo.

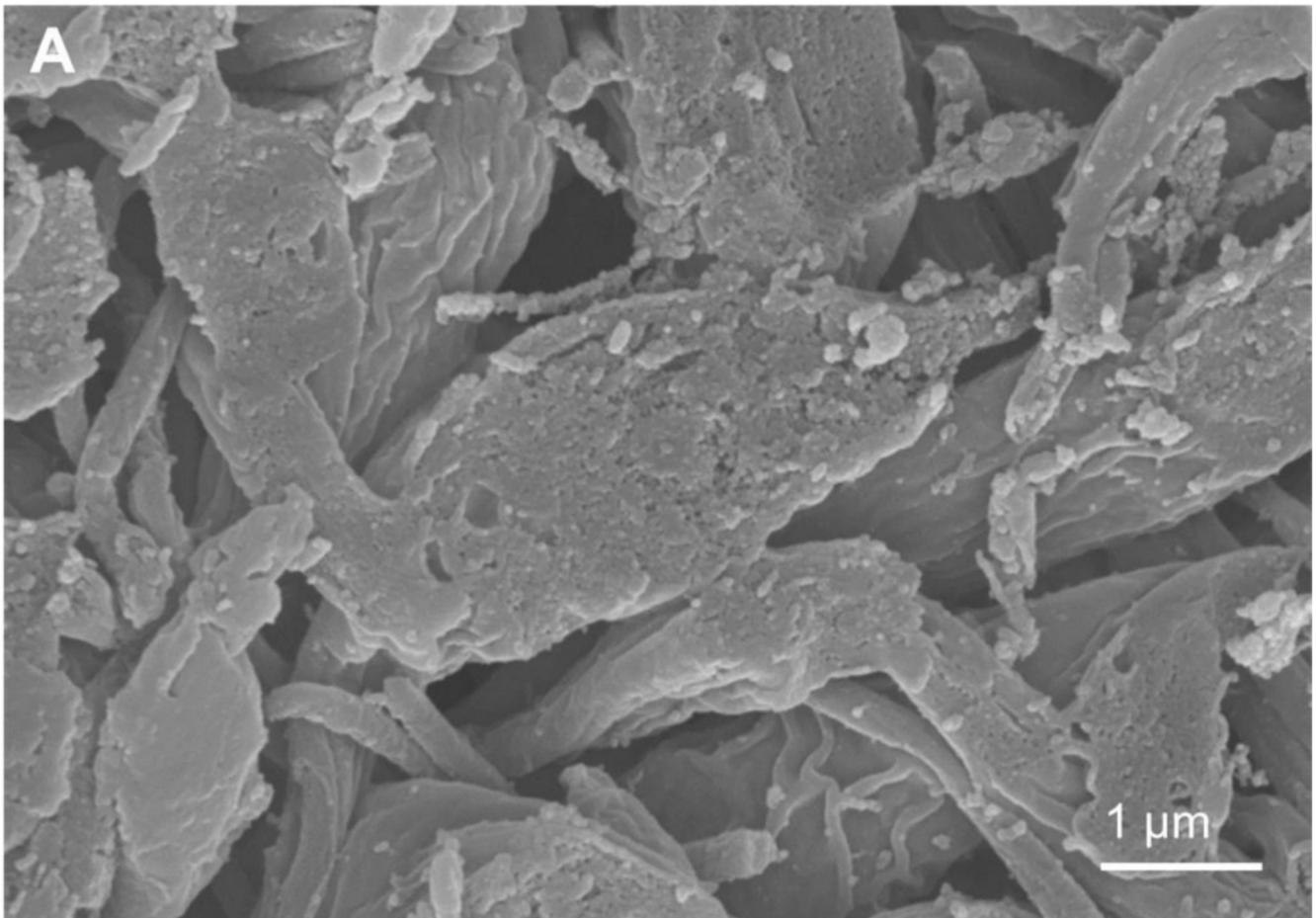


**Figura 13: Protocolo 1 – (A) Epimastigotas não maceradas observados no microscópio eletrônico de varredura de rotina, com cobertura de Au.** Mesmo estando murchas é possível observar o plano de fratura. Não é possível definir completamente as organelas presentes, com exceção do núcleo. **(B) Epimastigota observada no microscópio eletrônico de ultra/alta resolução, com cobertura de Au.** É possível observar algumas estruturas intracelulares, como (m) mitocôndria, (k) cinetoplasto e (cy) citóstoma.

Epimastigotas também foram submetidos ao protocolo 2, onde foi utilizado o etanol como crioprotetor (quadro 1). Após a fratura, o material foi inserido em um criotubo com uma solução de substituição a frio, à temperatura de  $-90^{\circ}\text{C}$ , sendo realizada a substituição. A curva de aquecimento utilizada foi de 72 horas a  $-90^{\circ}\text{C}$ , 18 horas a  $-20^{\circ}\text{C}$ , 4 horas a  $4^{\circ}\text{C}$  e 1 hora a temperatura ambiente. A observação preliminar no MEV de rotina mostrou que com essa metodologia o citoplasma não foi extraído, mesmo com um tempo de maceração mais prolongado, como é mostrado na Figura 15, apontando para a necessidade de aprimoramento do protocolo experimental após a curva de substituição utilizar o meio de maceração com a concentração de 0,1% de tetróxido de ósmio em água com trocas a cada 24 horas.

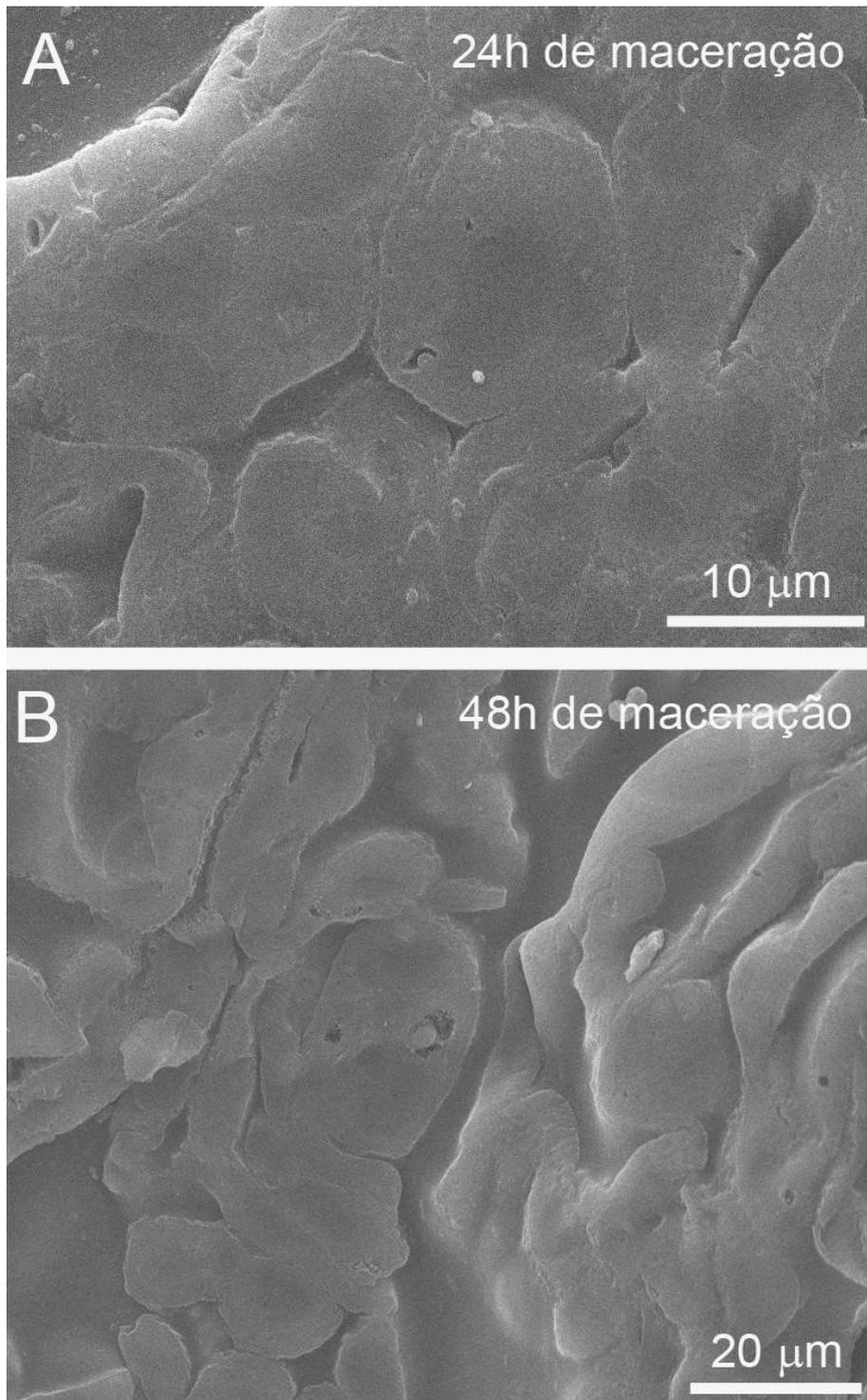


**Figura 14: Protocolo 1 - Epimastigotas de *T. cruzi* clivadas, sem maceração e sem cobertura condutora observadas no microscópio de ultra/alta resolução de feixe de íons. (14A). É possível observar com clareza o núcleo (seta preta) e o cinetoplasto (seta branca). (14B) Cinetoplasto observado em maior aumento.**



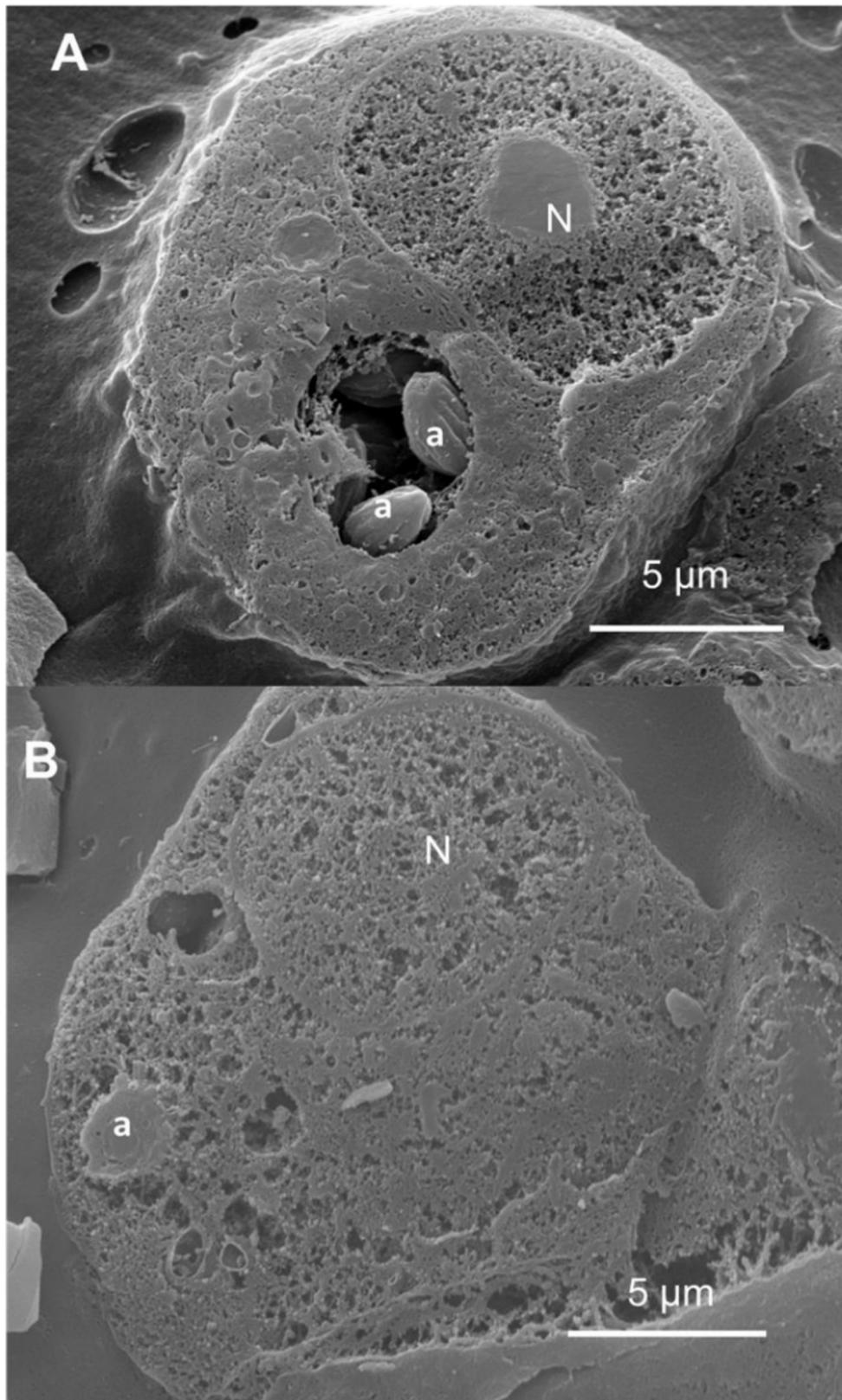
**Figura 15: Protocolo 2 - Epimastigotas de *T. cruzi* maceradas por substituição a frio a -90°C (FS).** Os parasitos foram previamente fixados, clivados, macerados, sendo realizada a substituição a frio por 95 horas, e recobertos por carbono. Nesse processamento não ocorreu a extração do material citoplasmático mesmo tendo sido realizado um tempo maior de maceração.

A rotina experimental seguiu então um aperfeiçoamento metodológico (protocolo 3), onde as células foram fixadas por 24 horas na própria garrafa de cultura e depois raspadas. O processamento incluiu pós-fixação, inclusão em quitosana com gelatina, crioproteção com DMSO 50%, clivagem e maceração por 24 e 48 horas sem que ocorresse trocas com OsO<sub>4</sub>. A cobertura das amostras foi feita com platina. Esta metodologia apresentou vários problemas, como achatamento das células e a não exposição de detalhes ultraestruturais intracelulares, como mostrado nas figuras 16A e 16B.

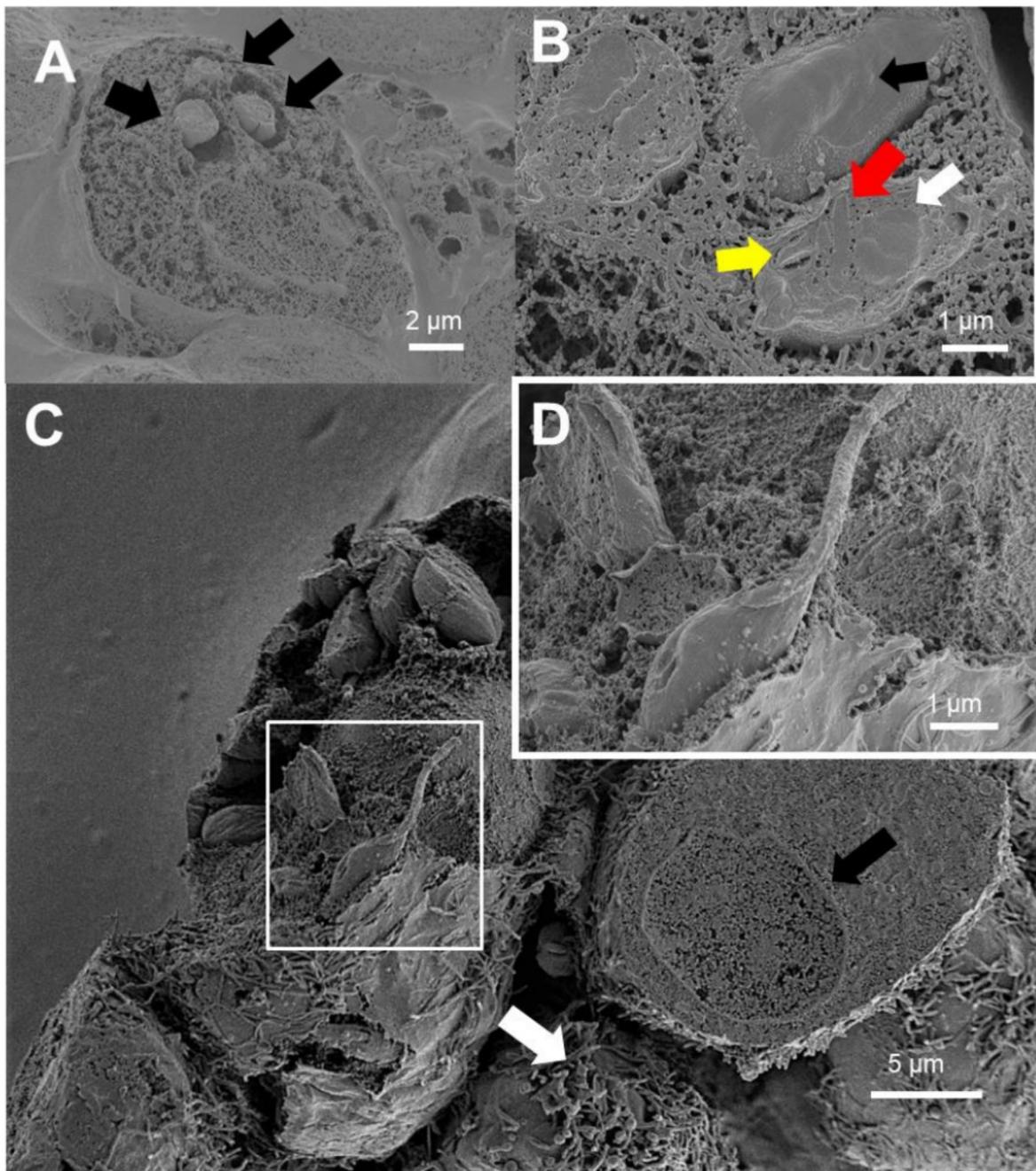


**Figura 16: Protocolo 3 – Células LLCMK2 infectadas com *T. cruzi* raspadas e maceradas por 24 e 48 horas.** As células foram fixadas na própria garrafa, raspadas do fundo da garrafa com raspador de células (cell scraper), clivadas e maceradas por 24h e 48h sem que houvessem trocas com tetróxido de ósmio. A amostra foi recoberta com Pt. A figura mostra que a maceração não ocorreu. Além disso, é possível observar que as células ficaram completamente amassadas.

O protocolo então foi adaptado (protocolo 4) e foi tecnicamente realizado de maneira similar ao protocolo 1, porém feito com culturas de células infectadas com tripomastigotas de *T. cruzi* e posteriormente uma tripsinização. A tripsinização prévia das células permitiu a formação de um “pellet” visualmente mais compacto, o que evitou a aparência achatada observada no protocolo 3 (onde a monocamada foi fixada e raspada). A clivagem expôs o lado intracelular da célula hospedeira, revelando as formas amastigota de *T. cruzi* no interior do vacúolo parasitóforo (Figura 17A) e amastigotas intracelulares clivadas (setas pretas) e núcleo (seta branca) (Figura 17B). Apesar da clivagem, não é possível observar detalhes estruturais das organelas do parasito, mesmo quando observado no microscópio de varredura de alta resolução (Figura 18A). Na figura 18B é possível observar três formas amastigotas intracelulares livres no citoplasma, sendo que duas foram clivadas, expondo a membrana plasmática do parasito (seta preta). Na amastigota intracelular clivada longitudinalmente é possível observar o flagelo (seta amarela), o cinetoplasto (seta vermelha) e o núcleo (seta branca). A Figura 18C apresenta uma preparação com células clivadas (seta preta) e não clivados (seta branca), além da forma tripomastigota de um parasito não clivado. A Figura 18D apresenta uma maior magnificação da região marcada na Figura 18C, onde é possível observar um tripomastigota não clivado. Na Figura 19A, é possível observar, utilizando o microscópio de íons de Hélio, seis parasitos clivados (setas brancas) no interior da célula hospedeira. No entanto, foi observado o núcleo (seta preta) e o cinetoplasto (seta branca), estando as outras organelas não aparentes (Figura 19B).

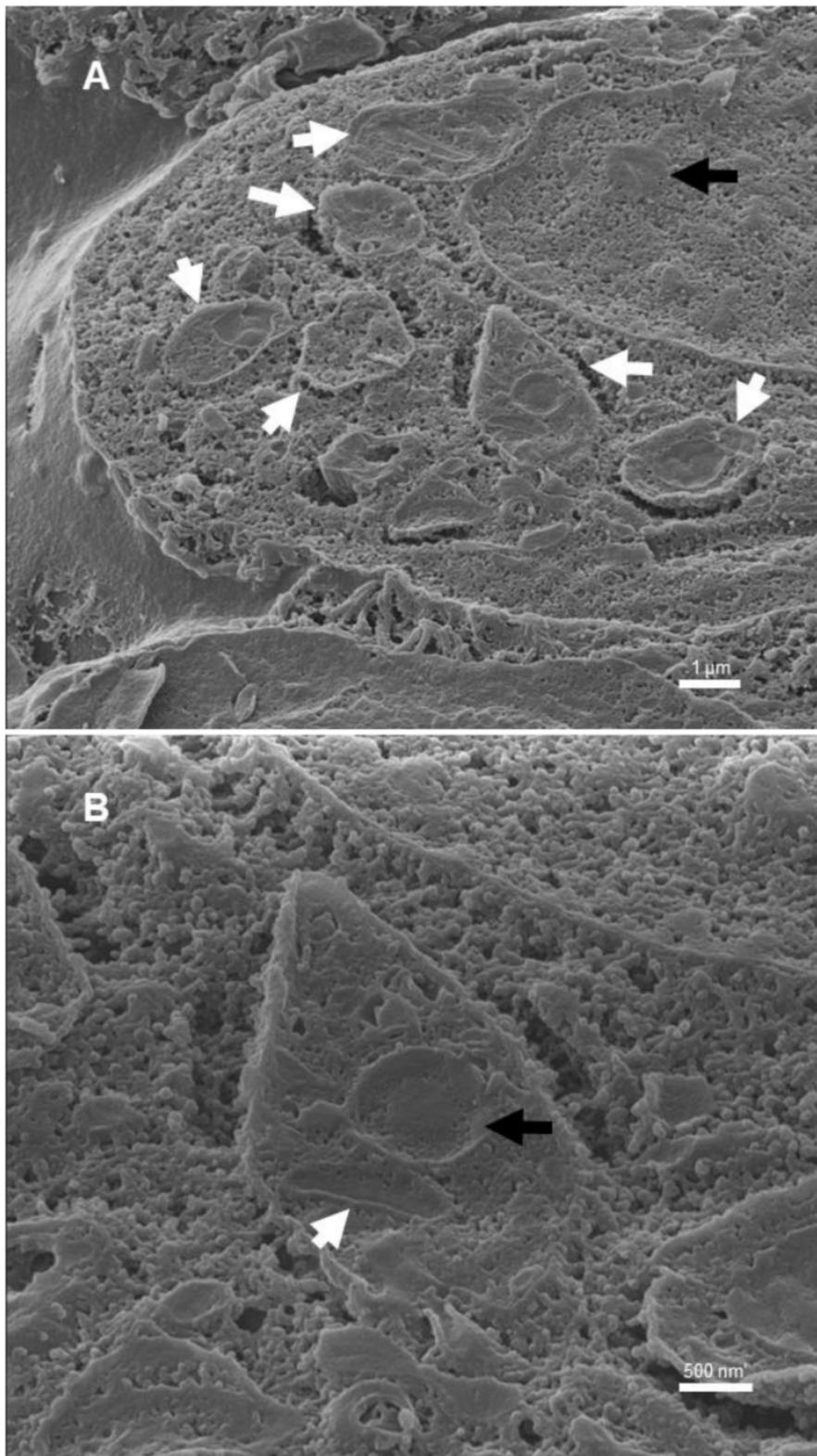


**Figura 17: Protocolo 4 – Célula hospedeira infectadas com *T. cruzi* em técnica sem maceração.** Uma cobertura condutora de Au foi adicionada sobre a amostra para posterior observação em MEV de rotina. (17A). Observam-se dois amastigotas (a) no interior de um vacúolo parasitóforo, sendo possível identificar o núcleo do parasito. (17B). Forma amastigota de *T. cruzi* clivada transversalmente (a).



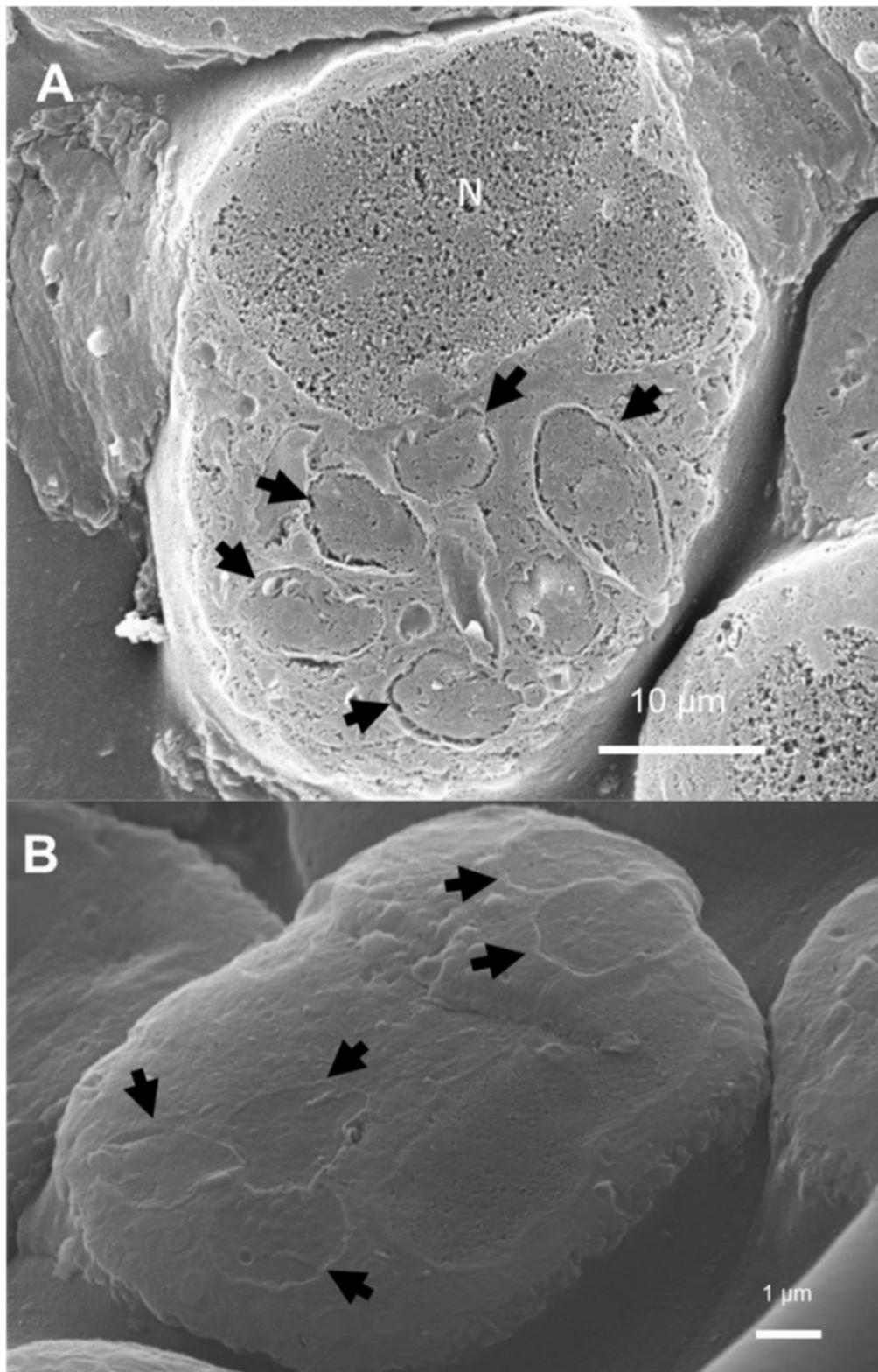
**Figura 18: Protocolo 4 – Célula hospedeira infectada com *T. cruzi* em técnica sem maceração.**

As células foram clivadas, não maceradas, recobertas com Au e observadas no microscópio de alta resolução. (18A) Presença de formas em transição do parasito (setas pretas) no interior de um vacúolo parasitóforo, onde apenas o núcleo do parasito é observado. (18B) Exposição de três formas amastigotas intracelulares livres no citoplasma, sendo uma não clivada e uma clivada longitudinalmente. Na clivada é possível observar o flagelo (seta amarela), cinetoplasto (seta vermelha) e o núcleo (seta branca). No caso do parasito não clivado observa-se a membrana plasmática (seta preta). (18C) A imagem apresenta o resultado da clivagem da amostra, onde observam-se células hospedeiras clivadas (seta preta) e não clivadas (seta branca), além da forma tripomastigota de um parasito não clivado (18D).



**Figura 19: Protocolo 4 – Célula hospedeira infectada com *T. cruzi* em técnica de clivagem sem maceração.** As células foram tripsinizadas, fixadas, clivadas, recobertas com Au, e observadas no MEV de feixe de íons. (19A). Foram observados seis parasitos (setas brancas) no citoplasma da célula hospedeira, sendo possível a identificação do núcleo (seta preta) e o cinetoplasto (seta preta) (19B).

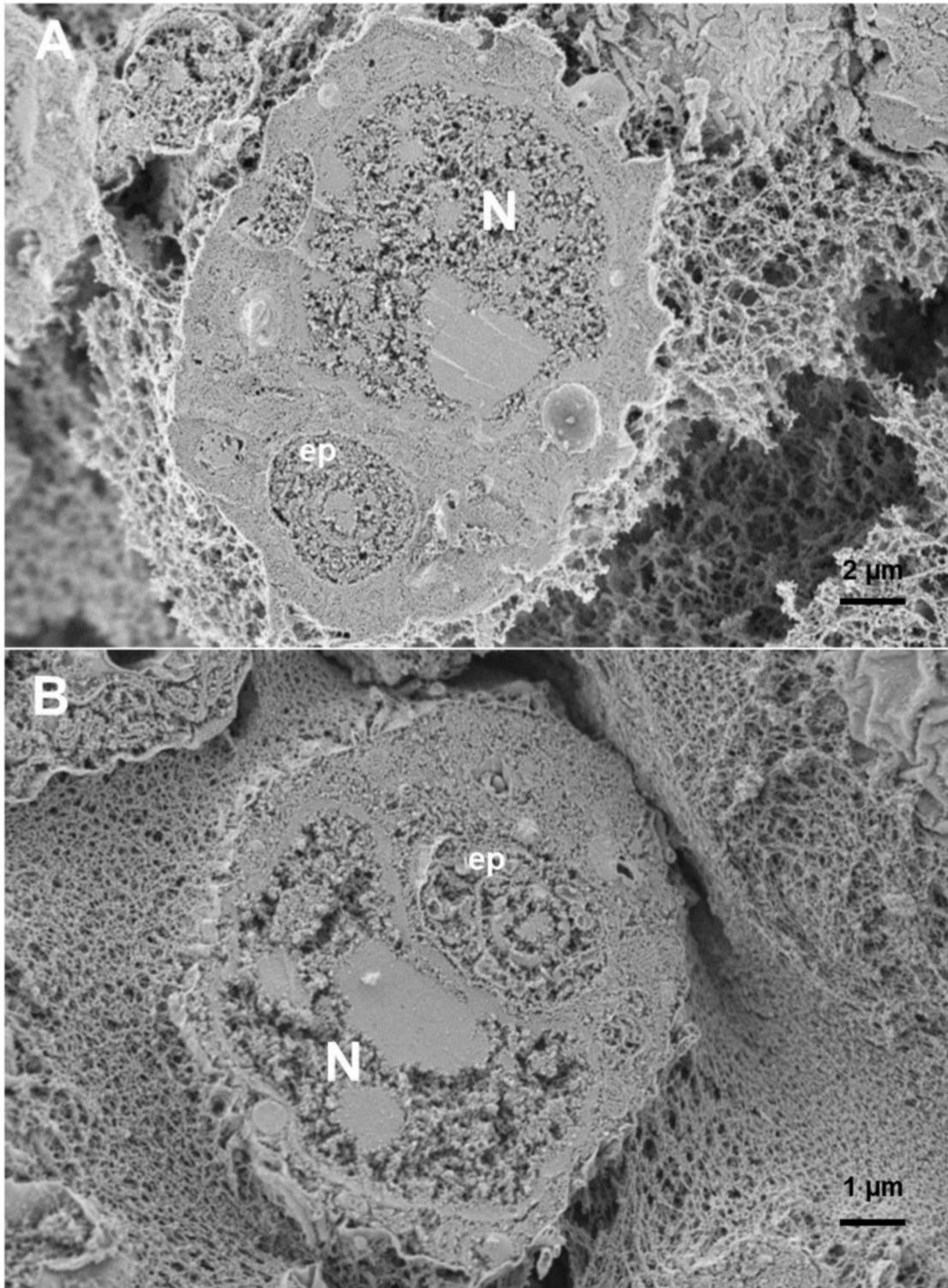
Na tentativa de expandir a capacidade de observação de detalhes ultraestruturais, as células criofixadas foram submetidas ao processo de maceração com ósmio (protocolo 5). Nesse protocolo, as células hospedeiras infectadas com tripomastigota de *T. cruzi* foram tripsinizadas, fixadas por 2 horas com glutaraldeído 2% e formaldeído 0,5%, em cacodilato de sódio 0,1 M, por 2 horas, seguido por pós-fixação em tetróxido de ósmio 1% por 1 hora. Em seguida, foi realizada a inclusão em quitosana 2% com gelatina 10%. A maceração ocorreu nos tempos de 24 horas e 48 horas do material fraturado em tetróxido de ósmio 0,1%, sem trocas. Para observação em MEV de rotina foi colocada uma cobertura condutora de platina sobre a amostra. Nessa metodologia as células hospedeiras não ficaram amassadas, mas não foi observada a extração total do citoplasma. Entretanto, parasitos (setas pretas) são observados na parte fraturada da célula hospedeira (Figura 20).



**Figura 20: Protocolo 5 – Célula hospedeira infectada com *T. cruzi* em técnica de clivagem com maceração direta.** As células foram tripsinizadas, fixadas, clivadas, maceradas após 24h e 48h em tetróxido de ósmio, e recobertas com Pt. (20A) na maceração após 24 horas não foi observado a extração do material citoplasmático, mas é possível se observar as formas inectivas do *T. cruzi* no interior da célula hospedeira. (20B) mesmo com mais tempo de maceração, pois o ósmio perde seu poder de maceração.

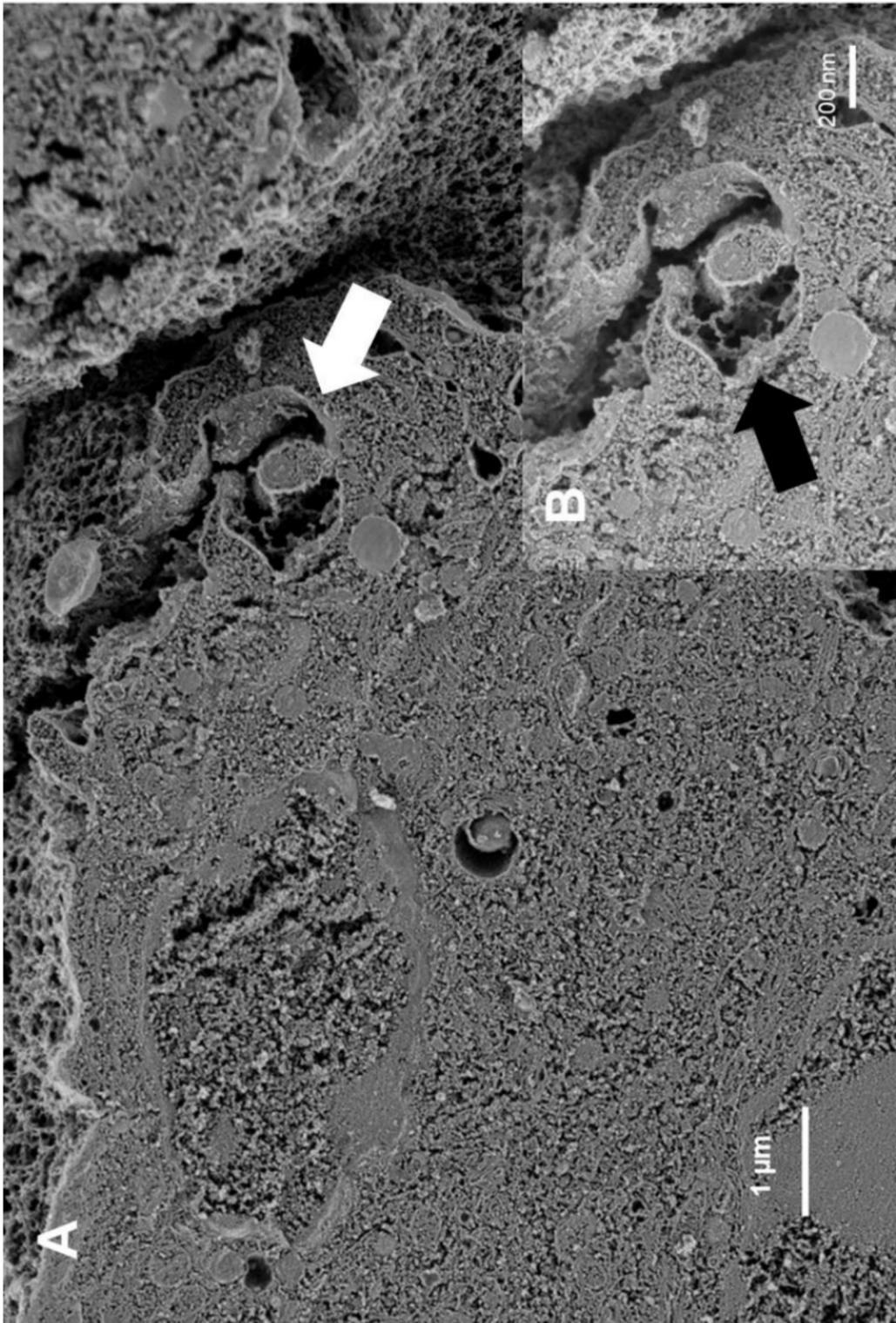
Em função dos resultados obtidos com o protocolo 5, o tempo de maceração foi aumentado (protocolo 6). Nesse protocolo foi realizada a tripsinização da cultura de macrófagos que sofreu interação com epimastigotas de *T. cruzi* por 1 hora. A amostra foi fixada por 2 horas com glutaraldeído e formaldeído em tampão cacodilato de sódio 0,1 M e, então, pós-fixada em tetróxido de ósmio 1% por uma hora. Em seguida, foi realizada a inclusão na mistura de quitosana 2% e gelatina 10%, realizado o processo de maceração por 72 horas e 144 horas, sendo feitas trocas de tetróxido de ósmio 0,1% a cada 24 horas. Esse processo acarretou a extração completa do citoplasma do macerado no tempo de 144 horas.

A Figura 21A, do protocolo 6 mostra que o citoplasma das células foi parcialmente extraído após maceração por 72 horas da amostra e trocas de tetróxido de ósmio a cada 24 horas. Apesar da extração, é possível observar organelas e estruturas intracelulares do macrófago, além do parasito, mostrando que o núcleo foi bem preservado. No entanto, com a maceração da amostra por 144 horas, e trocas com tetróxido de ósmio a cada 24 horas, observou-se uma maior extração do citoplasma, além da alteração de algumas estruturas intracelulares (Figura 21B).

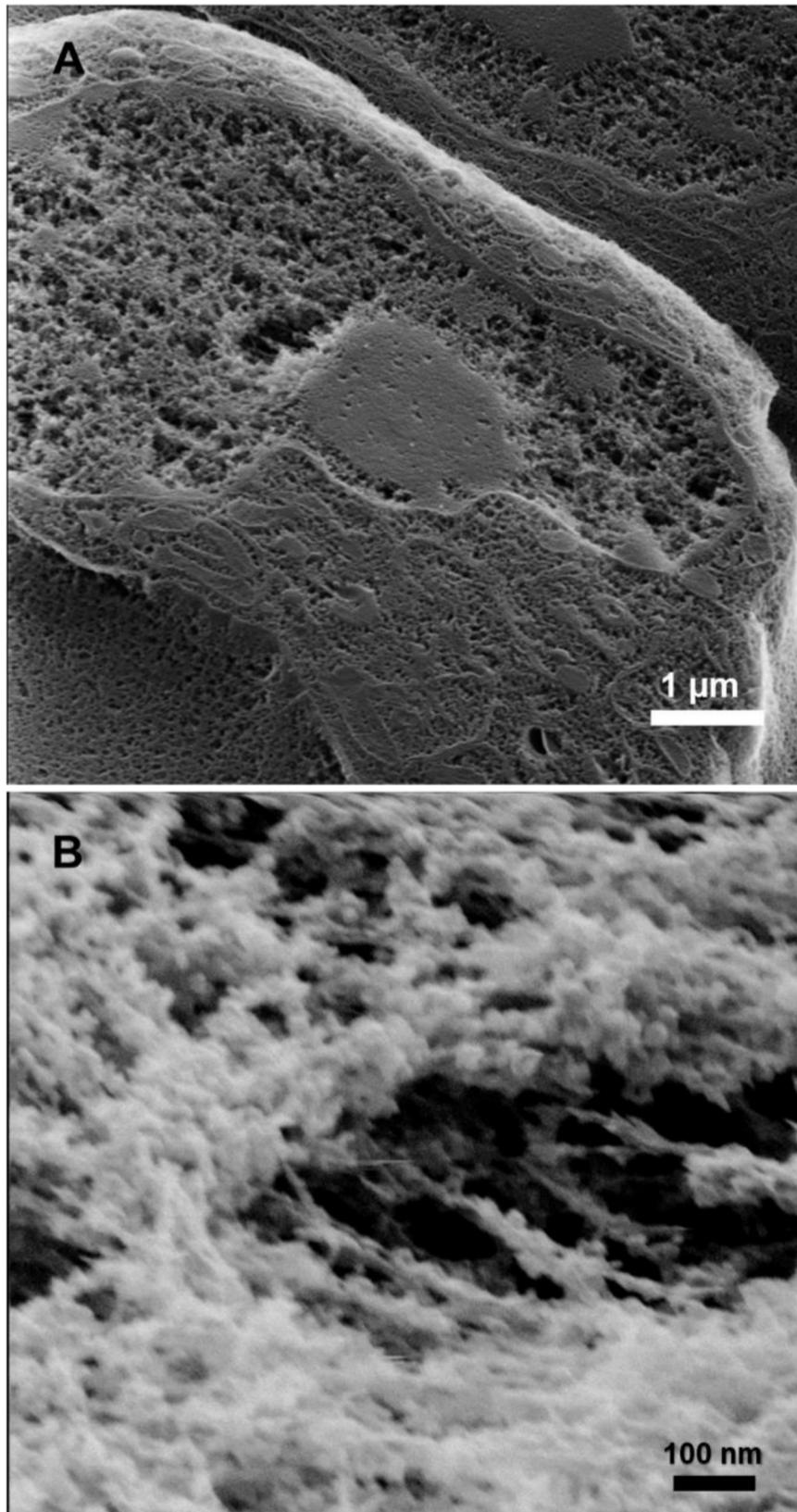


**Figura 21: Protocolo 6 – Imagem de macrófagos Raw incubados na presença de epimastigotas de *T.cruzi* obtidos pela técnica de maceração e trocas com tetróxido de ósmio. (21A) A maceração de 72 h com trocas de tetróxido de ósmio 0,1% a cada 24 horas não causou a extração total do citoplasma. (21B) A maceração feita com 144 horas e trocas de ósmio 0,1% a cada 24 horas proporcionou a extração de grande parte do material citoplasmático da célula e do parasito.**

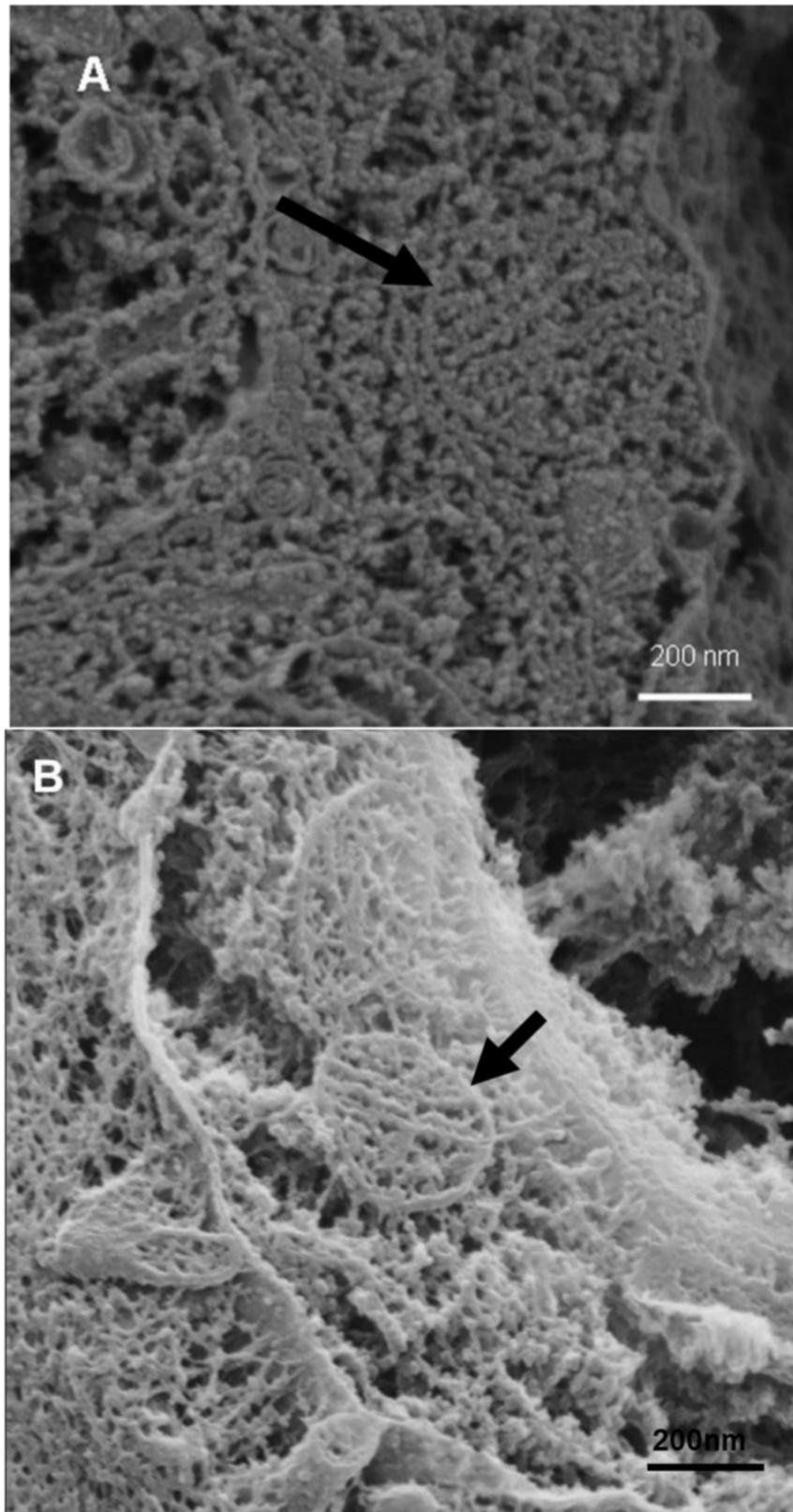
Na Figura 22 é possível observar um epimastigota do *T. cruzi* sendo fagocitado pela célula hospedeira, mais bem observada no detalhe (22B). Na figura 23A é possível observar a célula hospedeira após a maceração de 72 horas. A cromatina também se apresentou bem preservada após a aplicação deste protocolo (Figura 23B). A mitocôndria foi observada após cobertura de platina no microscópio de alta resolução e comparada ao observado sem cobertura condutora no microscópio de ultra-alta resolução (Figura 24) e em ambas as imagens é possível observar a mitocôndria e suas cristas em estado preservado.



**Figura 22: Protocolo 6 – Macrófagos Raw no processo de fagocitose um epimastigota de *T. cruzi* no protocolo de maceração após 72 horas. É possível observar o fagosoma (seta branca) com a maceração da amostra (A), observando-se maiores detalhes da estrutura (seta preta) (B).**



**Figura 23: Protocolo 6 – Macrófago após a técnica de maceração após 72 horas, com observação em MEV sem cobertura condutora. (A) Apesar de não ter ocorrido a extração total do citoplasma, é possível observar o núcleo da célula hospedeira em estado preservado. Em (B) é possível observar a cromatina.**



**Figura 24: Protocolo 6 – Comparação da extração do material citoplasmático da célula após observação com e sem cobertura condutora.** A imagem mostra uma mitocôndria (seta) e o material citoplasmático completamente extraído. A imagem foi feita a partir da observação no microscópio de varredura de alta resolução com cobertura de platina de 5 nm de espessura (A), e observação no MEV de feixe de íons sem cobertura condutora (B).

## 6 Discussão

O trabalho resgatou o método descrito por Fukudome e Tanaka (1986), que tem como propósito expor as membranas internas das células através da fratura por congelamento. No presente trabalho, esse método pode ser aplicado na investigação do desenvolvimento intracelular do *Trypanosoma cruzi*, protozoário que é o agente etiológico da doença de Chagas, além do estudo das formas epimastigotas do parasita. O modelo de células utilizado por Fukudome e Tanaka (1986) foi o de células livres em suspensão, assim como as formas epimastigotas utilizadas no presente trabalho. Além disso, o método foi aplicado a uma monocamada das células infectadas com a forma tripomastigota do parasito, sendo essa monocamada tripsinizada previamente à fixação, estando assim as células também em suspensão para a aplicação do método.

O método proposto por Fukudome e Tanaka (1986) para observação de células livres usando a incorporação de quitosana e posteriormente um congelamento em nitrogênio líquido expôs estruturas intracelulares, podendo ser claramente observadas usando uma combinação da incorporação de quitosana e o método de Ósmio DMSO Ósmio (O-D-O). Em nossa primeira adaptação utilizando a forma epimastigota de *T. cruzi* não foi possível observar todo o conteúdo intracelular, pois não foi realizado o processo de maceração com ósmio, proposto por FUKUDOME e TANAKA, logo não foi possível a extração completa do conteúdo citoplasmático. No entanto, esse protocolo mostrou um grande potencial, visto que foi possível expor algumas organelas, tais como o núcleo, o citóstoma, o cinestoplate e a mitocôndria.

Já no segundo protocolo implementamos o processo de maceração com o auxílio do processo de substituição a frio que se baseia na desidratação química a baixas temperaturas, onde a água no estado sólido é lentamente removida da amostra através de incubação em um solvente orgânico. A estes solventes (normalmente acetona, etanol ou metanol) podem ser previamente adicionados alguns fixadores químicos que se difundem por toda a amostra durante o período de desidratação. Este processo geralmente ocorre a baixas temperaturas (em torno de - 80°C), onde os fixadores ainda permanecem em seu estado inativo, passando a estabelecer ligações cruzadas somente quando submetidos a uma curva de aquecimento, garantindo assim uma melhor estabilidade das estruturas celulares (FERNANDEZ-MORAN, 1955, 1957). No segundo protocolo, utilizamos a técnica de

substituição à frio após o momento da fratura do *pellet* por congelamento, tentando aproveitar a curva de aquecimento para que as células passassem pelo processo de maceração gradativamente e que o citoplasma fosse removido. Como resultado, notou-se que o material citoplasmático não foi removido, sugerindo que, mesmo com um longo período de submissão da amostra à baixas temperaturas, a maceração não ocorreu, pois ósmio só estará ativo acima de  $-70^{\circ}\text{C}$  e ainda seria necessário as trocas do para que o conteúdo citoplasmático fosse extraído o que não foi feito. Porém, é possível se pensar no futuro em uma nova estratégia utilizando a substituição a frio, onde o material seja macerado com ósmio na concentração de 0,1% com trocas a cada 24 horas para que o material citoplasmático seja removido e assim expor as organelas no interior da célula.

No processamento de células aderidas para microscopia eletrônica, é comum realizar a dissociação mecânica das mesmas e coloca-las em suspensão. O método utiliza instrumentos como raspador de células, que remove as células fisicamente, porém sob risco de provocar a lise das células (MOLINARO et al., 2009). Em nossos resultados obtidos a partir do protocolo 3, a técnica de raspagem não se mostrou ideal, pois deixou as células amassadas. No mesmo protocolo, a tentativa de se utilizar ósmio para a maceração não surtiu efeito pois, com o tempo, o ósmio é reduzido quimicamente, perdendo seu potencial de maceração. Como alternativa, pode-se utilizar enzimas, como a tripsina, que é usada para a remoção das células de monocamada que estão na superfície do frasco de cultura e, assim, obtém-se células individualizadas em suspensão. No presente trabalho, no desenvolvimento do protocolo seguinte (protocolo 4), utilizamos a técnica de remoção enzimática com uso da tripsina para obtenção de uma suspensão das células que antes estavam aderidas no frasco de cultivo. Esse processo permitiu a obtenção de um *pellet* visualmente mais coeso e favorável à fratura. Além disso, com esse procedimento as células mantiveram-se mais íntegras.

Baseando-se no protocolo anterior, em que se realizou a tripsinização ao invés de raspagem para que o *pellet* obtido fosse mais coeso, tentamos, após tripsinização e fixação do material seguida da fratura a frio, realizar a maceração do mesmo (protocolo 5). O material foi então posto em contato com a solução de ósmio a 0,1% em temperatura ambiente por 24 horas e 48 horas. Como resultado, foi possível perceber que, independentemente do tempo de maceração, o ósmio em contato direto com a amostra vai reduzindo seu potencial de maceração. Dessa

forma, o perfil de maceração obtido em 24 horas de contato com o ósmio foi similar ao observado nas amostras referentes a 48 horas de maceração. Não se obteve ganho com relação aos protocolos anteriores, resultando a necessidade de um novo protocolo que fizesse mais trocas da solução de ósmio a 0,1% para a maceração.

Com base nas metodologias empregadas anteriormente, e nos resultados obtidos após a desenvolvimento dos protocolos de 1 a 5, desenvolveu-se um último protocolo que consistiu no protocolo 6, onde após o momento da fratura a frio, o *pellet* foi imerso em uma solução de ósmio a 0,1% por 72 e 144 horas, sendo essa solução substituída a cada 24 horas por solução recém-preparada. Como resultado desta variação da técnica, notou-se que a solução de ósmio em baixa concentração sendo trocada a cada 24 horas exerce o efeito esperado que é uma maior remoção do conteúdo citoplasmático do que a obtida nas tentativas anteriores, em que o ósmio não era substituído até o fim do processo. Como pontos positivos, foi possível observar já nas 72 horas de maceração com ósmio sendo trocado a cada 24 horas que o material citoplasmático é mais extraído, sendo possível identificar de forma mais clara a interação do parasita com a célula hospedeira. Já nas amostras que passaram por 144 horas de maceração a troca do ósmio a cada 24 horas mostrou-se tão eficiente que foi possível extrair grande parte do material citoplasmático, dessa forma favorecendo a observação de estruturas internas, como é o caso da mitocôndria e da cromatina da célula hospedeira.

## 7 Conclusão

- Tentamos estabelecer um método de fratura a frio com o auxílio de fixadores para verificar a parte interna das células nos baseando no trabalho de Fukudome e Tanaka, sendo necessário fazer adaptações.
- Não tivemos êxito ao tentar fazer uma inovação com a tentativa de maceração utilizando o método de substituição a frio, mas tem um grande potencial.
- Percebemos que o ideal para o método é utilizar células tripsinizadas, com trocas do meio de maceração, mostrando que essa é uma técnica interessante para ser utilizada em microscopia de alta resolução e microscopia de íons.

## 8 Referências Bibliográficas

BARRIAS E.S, BORGES T.R & DE SOUZA W. Trypanosoma dionisii as an experimental model to study anti-Trypanosoma cruzi drugs: A comparative analysis with benznidazole, posaconazole and amiodarone. **International Journal of Clinical Microbiology and Biochemical Technology**, 14 – 23, 2018

BENCHIMOL, M., MIRANDA, K. Criofixação, criosubstituição e crio eletrôntransferência. In: De Souza **SBMM** cap 24 – 3ª Edição Técnicas de Microscopia Eletrônica Aplicadas Às Ciências Biológicas, 2011.

BENEDETTI, LUCIO, E AND FAVARD, P. Freeze-etching: Techniques and Applications. **societe francaise de microscopie electronique**. 1973

BOZZOLA, J.J. AND RUSSEL L.D. Electron microscopy: principles and techniques for biologists. **Jones and Bartlett Publishers**, Inc., p. 50-56, 1992.

CAVALIER; SPEHNER & HUMBEL, M. BRUNO. Handbook of Cryo- Preparation Methods for Electron Microscopy. 1.ed. Lausanne: **CRC Press Switzerland**, 2013. 706p.

CUETO, J.A, BARRIAS, E.S., De SOUZA, W., ROMANO, P.S. Trypanosoma cruzi invasion in non-phagocytic cells: an ultrastructural study. **BIOCELL**. 42(3): 105-108. 2018.

DAHL, R., & STAEHELIN, L. A. High-pressure freezing for the preservation of biological structure: Theory and practice. **Journal of Electron Microscopy Technique**, 13(3), 165–174, 1989.

DEDAVID, B. A., GOMES, I. C., MACHADO. Microscopia eletrônica de varredura : aplicações e preparação de amostras : materiais poliméricos, metálicos e semicondutores [recurso eletrônico] /. – **Porto Alegre : EDIPUCRS**, 2007.

DE SOUZA, W. Técnicas de Microscopia Eletrônica Aplicadas às Ciências Biológicas. Técnicas de Microscopia Eletrônica Aplicadas às Ciências Biológicas. 3. ed. Rio de Janeiro: **SBMM**, 2011.

DE SOUZA, W., DE CARVALHO, T. M. U., & BARRIAS, E. S. Review on *Trypanosoma cruzi*: Host Cell Interaction. **International Journal of Cell Biology**, 1–18. 2010.

DE SOUZA, W., & ATTIAS, M. New advances in scanning microscopy and its application to study parasitic protozoa. **Experimental Parasitology**, 190, 10–33. 2018.

ECHLIN, P. Low-temperature microscopy and analysis. **Plenum Press. N. York and London**, 1992.

FUKUDOME, H., & TANAKA, K. A method for observing intracellular structures of free cells by scanning electron microscopy. **Journal of Microscopy**, 141(2), 171–178. 1986.

GALLETI, S. R. Introdução a Microscopia Eletrônica. **Biológico, São Paulo**, v.65, n.1/2, p.33-35, jan./dez., 2003

GILKEY, J. C., & STAEHELIN, L. A. Advances in ultrarapid freezing for the preservation of cellular ultrastructure. **Journal of Electron Microscopy Technique**, 3(2), 177–210, 1986.

HAWKES, P.W., SPENCE, J.C.H. Science of Microscopy. Vol I. ed.; **Springer**. 2007

HAYAT, M. A.; GIAQUINTA, R. Rapid fixation and embedding for electron microscopy. **Tissue & cell**, v. 2, n. 2, p. 191–5, 1970.

HAYAT, M.A. Fixation for electron microscopy. **Academic Press, Inc. London – New York**, 1981.

HERMANN, R., MULLER M. Pre-requisites of high-resolution scanning electron microscopy. **Scanning Microscopy**, v.5, p. 653-64, 1991.

HERMANN, R., MULLER M. Pre-requisites of high-resolution scanning electron microscopy. **Scanning Microscopy**, v.5, p. 653-64, 1991.

HUEBINGER, J., HAN H-M., GRABENBAUERM. Reversible Cryopreservation of Living Cells Using an Electron Microscopy Cryo-Fixation Method. **PLoS ONE** 11(10). 2016

Jimenez. J., Dealing with environmental challenges: mechanisms of adaptation in *Trypanosoma cruzi*. **Res Microbiol.**, 165(3):155-65. 2014.

JOY, D. C., & PAWLEY, J. B.. High-resolution scanning electron microscopy. *Ultramicroscopy*, 47(1-3), 80–100. 1992

JOY, D. C., & JOY, C. S. Low voltage scanning electron microscopy. **Micron**, 27(3-4), 247–263. 1996.

KREMER, J.R., MASTRONADE, D.N., E MCINTOSH, J.R. Computer Visualization of Three-Dimensional Image Data Using IMOD. **J. Struct. Biol.**: 71-76. 1996.

LOGIN, G. R., KISSELL, S., DWYER, B. K., & DVORAK, A. M.. A Novel Microwave Device Designed to Preserve Cell Structure in Milliseconds. **MRS Proceedings**. 1990

MANNHEIMER.W. A. Microscopia dos Materiais: Uma Introdução. Sociedade brasileira e Microanalise. **E-papers**. 221p, 2002.

MARTON, L. La microscopie electronique des objects biologiques. **Bull Classe Sci Acad. Roy Belg**, series 5, v.20, p. 439-46, 1934.

Meryman, H. T. Cryoprotective agents. **Cryobiology**, 8(2), 173–183. 1971.

MOOR, H., MÜHLETHALER, K.: Fine structure of frozen-etched yeast cells. **J. Cell Biol.** 17, 609-628.1963.

MOOR, H. Theory and practice of high pressure freezing. In *Cryotechniques in Biological Electron Microscopy* (R. A. Steinbrecht and K. Zierold, eds). **Springer**, Berlin, pp. 175–191, 1987.

NAGATANI, T.; SAITO S.; SATO, M.; YAMADA, M. Development of an ultra high resolution scanning electron microscope by means of a field emission source and in-lens system. **Scanning Microscopy**. v.11, 901-909, 1987

Nègre, M., Leone, P., Trichet, J., Défarge, C., Boero, V., & Gennari, M. Characterization of model soil colloids by cryo-scanning electron microscopy. **Geoderma**. 121, pp.1- 2, 1-16. 2004

PAREDES, A. M. Scanning Electron Microscopy. **Encyclopedia of Food Microbiology**, 693–701, 2014

Pawley, J. Low voltage scanning electron microscopy. **Journal of Microscopy**, 136(1), 45–68. 1984

REY, L. Parasitologia: **Guanabara Koogan**. 3. ed. Rio de Janeiro. 2011.

Skaer, H. 1e B. – Chemical cryoprotection for structural studies. **J. Microscopy** 125, 137. 1982.

SARGENT, J. A. The application of cryo-scanning electron microscopy to food research. **Food Microstructure**, v. 7, p. 123–135, 1988.

SESSO, A. **Técnicas de Microscopia Eletrônica Aplicadas às Ciências Biológicas.** 3. ed. **Rio de Janeiro: SBMM**, 2011.

SEVERS, N. J. Freeze-fracture electron microscopy. **Nature Protocols**, 2(3), 547–576, 2007.

SILVEIRA, M. **Técnicas de Microscopia Eletrônica Aplicadas às Ciências Biológicas.** Técnicas de Microscopia Eletrônica Aplicadas às Ciências Biológicas. 3. ed. **Rio de Janeiro: SBMM**, 2011.

STEERE, R. L. Electron microscopy of structural detail in frozen biological specimens. **The Journal of Cell Biology**, 3(1), 45–60. 1957.

SYNDER JR., W. H. SUTTON, M. F. ISKANDER, AND D. L. JOHNSON (eds.), *Microwave processing of materials II*. **Materials Research Society, Pittsburgh**, 189:329–46. 1991.

TANAKA, K. & NAGURO, T. High resolution scanning electron microscopy of cell organelles by a new specimen preparation method. **Biomed. Res.** 2, Suppl., 63-70. 1981.

TOKUYASU, K.T A technique for ultracryomicrotomy of cell suspensions and tissues. **J. Cell Biol.** 57: 551-565, 1973.

VARGAS, A., MALTA, J. M. A. S., COSTA, V. M. DA, CLÁUDIO, L. D. G., ALVES, R. V., CORDEIRO, G. DA S., PERCIO, J. Investigação de surto de doença de Chagas aguda na região extra-amazônica, Rio Grande do Norte, Brasil, 2016. **Cadernos de Saúde Pública**, 34(1). 2018.