

# AVALIAÇÃO DA APLICABILIDADE DA CRIOFIXAÇÃO POR IMERSÃO E SUBSTITUIÇÃO A FRIO PARA ESTUDOS DA ULTRAESTRUTURA CELULAR EM CULTURA DE CÉLULAS

Andressa Santos de Almeida  
Colégio Pedro II- Campus Duque de Caxias

Orientador: Wendell Girard Dias  
Plataforma de Microscopia Eletrônica Rudolf Barth – IOC/Fiocruz

Ministério da Saúde  
FIOCRUZ  
Fundação Oswaldo Cruz

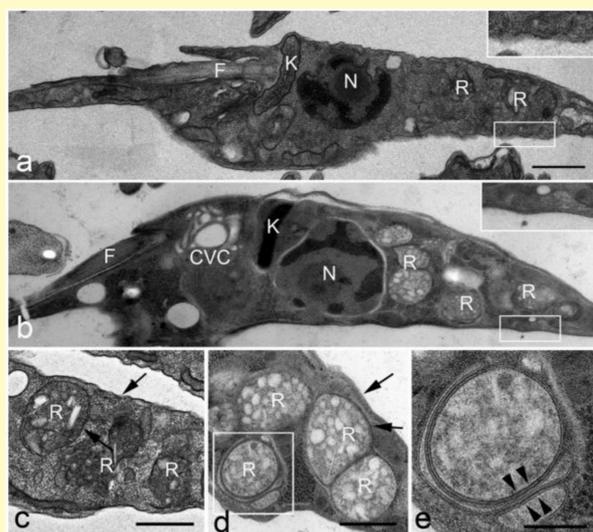


## INTRODUÇÃO

O surgimento do microscópio eletrônico em 1930, proporcionou um grande avanço na compreensão da estrutura da célula e sua função. Diversos métodos têm sido desenvolvidos para obter uma melhor preservação da estrutura da célula, de forma que a danifique o menos possível. Atualmente, o método mais utilizado é a imersão do material biológico em fixadores químicos (fixação química) em temperatura ambiente. Porém, este tipo de fixação gera diversos artefatos causados por diferentes fatores, como por exemplo, a taxa de difusão, a osmolaridade e a seletividade do fixador. Dessa forma, componentes da estrutura da célula sofrem variações na sua estrutura e composição em consequência da morte celular lenta. Durante as etapas de lavagem e desidratação, várias moléculas podem ser extraídas, gerando alterações tanto na morfologia como na composição de moléculas (Small, 1981). Diferentemente da fixação química, as técnicas de criofixação possibilitam a imobilização instantânea dos componentes celulares através do congelamento ultrarrápido, mantendo a composição e a arquitetura celular mais próxima do seu estado nativo. Apesar das etapas de lavagem e desidratação, várias moléculas podem ser extraídas, gerando alterações tanto na morfologia como na composição de moléculas (Small, 1981). Diferentemente da fixação química, as técnicas de criofixação possibilitam a imobilização instantânea dos componentes celulares através do congelamento ultrarrápido, mantendo a composição e a arquitetura celular mais próxima do seu estado nativo. Apesar das etapas de lavagem e desidratação, várias moléculas podem ser extraídas, gerando alterações tanto na morfologia como na composição de moléculas (Small, 1981). Diferentemente da fixação química, as técnicas de criofixação possibilitam a imobilização instantânea dos componentes celulares através do congelamento ultrarrápido, mantendo a composição e a arquitetura celular mais próxima do seu estado nativo. Apesar das etapas de lavagem e desidratação, várias moléculas podem ser extraídas, gerando alterações tanto na morfologia como na composição de moléculas (Small, 1981).

As metodologias de criofixação podem ser separadas em duas categorias: (1) criofixação à pressão ambiente e (2) criofixação à alta pressão. O congelamento por imersão é um exemplo de técnica realizada à pressão ambiente. No congelamento por imersão, o material biológico é imerso rapidamente em um agente criogênico (por exemplo, propano resfriado por nitrogênio líquido (-196 °C)), atingindo taxas de congelamento de 105 °C/s, com profundidade de vitrificação de aproximadamente 10 µm. O congelamento por alta pressão é a técnica de criofixação mais utilizada atualmente. Nesta técnica, o material é inserido na câmara de alta pressão do aparelho e submetido ao congelamento com nitrogênio líquido a uma pressão de 2.100 bar, o que reduz significativamente a formação de cristais de gelo, apesar da relativamente baixa taxa de congelamento obtida (~104 °C/s). A aplicação da alta pressão dificulta a formação de cristais de gelo e permite que a vitrificação ocorra em uma profundidade entre 100 e 300 µm (Steinbrecht & Zierold, 1987).

O material processado por criofixação pode ter diferentes destinos, entre eles, ser observado diretamente no microscópio eletrônico de transmissão (criomicroscopia) após a obtenção de cortes congelados no crioultramicrotomo, ou pode ser imerso em uma solução contendo fixadores diluídos em um solvente orgânico e sua temperatura pode ser elevada gradualmente por um processo chamado substituição a frio (Steinbrecht & Zierold, 1987). Neste processo, a água contida no material biológico é substituída pela solução (meio de substituição) contendo o solvente orgânico (etanol, metanol e acetona) e fixadores químicos, como o glutaraldeído e tetróxido de ósmio a baixas temperaturas. O processo inicia-se à -90 °C, onde ocorre a desidratação do material com o solvente orgânico em fase líquida, e os fixadores químicos inativos são difundidos por toda célula sem fixá-la. À medida que a temperatura é elevada, os fixadores químicos são ativados e, como já estão próximos das moléculas a serem fixadas, este processo é mais eficiente, o que elimina as alterações estruturais geradas por problemas na difusão dos fixadores, como ocorre na fixação química por imersão. Após isso, o material pode ser incluído em resinas epóxi ou metacrilato e observado normalmente no microscópio eletrônico de transmissão.



**Figura 1. Microscopia eletrônica de transmissão de epimastigotas de *T. cruzi*.** Comparação entre fixação química (a) e fixação à alta pressão (b), mostrando diferentes regiões do parasita. (c) Uma célula com fixação química que apresenta um aspecto enrugado da membrana (setas). (d) Uma célula com fixação à alta pressão mostrando reservossomos com contraste e a superfície da membrana que parece mais linear e suave (setas). (e) Imagem ampliada da região selecionada em d. F- Flagelo K- Cinetoplasto N- Núcleo R- Reservossomos, CVC- Complexo Vacúolo Contráctil. Escala: 500 nm (a,b) 200nm (c,d) 100 nm (e). Retirado de Girard-Dias et al., 2012.

## OBJETIVO

O objetivo desse trabalho é avaliar a eficiência da técnica de criofixação por imersão para congelamento e preservação da estrutura de células em cultura, através da análise por microscopia eletrônica de transmissão.

Dentre as técnicas de criofixação disponíveis, o congelamento por imersão não necessita de equipamentos de alto custo, podendo ser realizado até mesmo de forma manual. Devido às limitações desta metodologia em relação ao volume teórico que pode ser criofixado de forma eficiente (aproximadamente 10 µm), avaliaremos a eficiência do congelamento através da análise da preservação ultraestrutural das células por microscopia eletrônica de transmissão (MET).

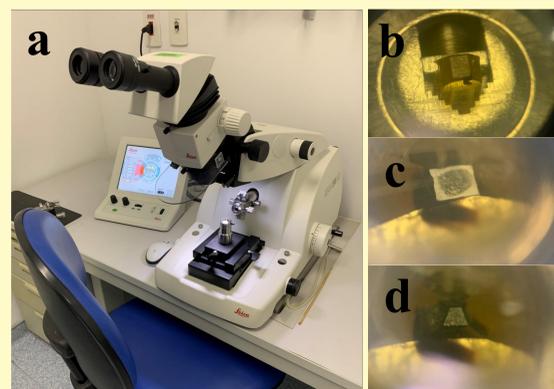
## METODOLOGIA

Uma monocamada de células da linhagem Vero será fixada de duas formas: (1) lavadas duas vezes por 10 minutos em PBS e fixadas por 1 hora, à temperatura ambiente, em glutaraldeído 2,5%, formaldeído 4%, cloreto de cálcio 0,5 mM em tampão cacodilato de sódio 0.1M, pH 7.2. Em seguida, o material será lavado três vezes em PBS e pós-fixado em tetróxido de ósmio (OsO<sub>4</sub>) 1%, ferricianeto de potássio 0,8% e cloreto de cálcio 5 mM em tampão cacodilato de sódio 0.1M, pH 7.2, por 30 minutos no escuro, à temperatura ambiente. As células serão desidratadas em concentrações crescentes de acetona (50, 70, 90 e 100%) e posteriormente infiltradas em Epon e emblocadas. Este método será utilizado de forma comparativa com a criofixação. (2) As células aderidas em substrato serão imersas rapidamente em etano líquido resfriado por nitrogênio líquido a -196°C. Após o congelamento, as amostras serão transferidas para um meio de substituição composto por 2% de tetróxido de ósmio em acetona, resfriado a -90 °C em gelo seco. Este meio com as amostras será mantido a -80/-90 °C em freezer por 72 horas e gradativamente aquecido, sendo transferido para um freezer a -20° C por 12 horas e depois para a geladeira a 4 °C por 4 horas. Após esta curva de aquecimento, as amostras serão lavadas 3 vezes em acetona pura, infiltradas em Epon e emblocadas.

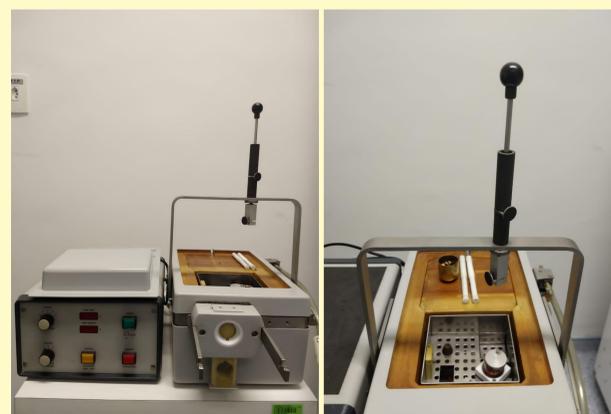
Os blocos com amostras gerados em ambas metodologias serão levados ao ultramicrotomo para obtenção de cortes ultrafinos de 70 nm coletados em grades de cobre. Por fim, essas grades de cobre que serão contrastadas em acetato de uranila e citrato de chumbo e levadas para o microscópio eletrônico de transmissão.

## RESULTADOS PRELIMINARES

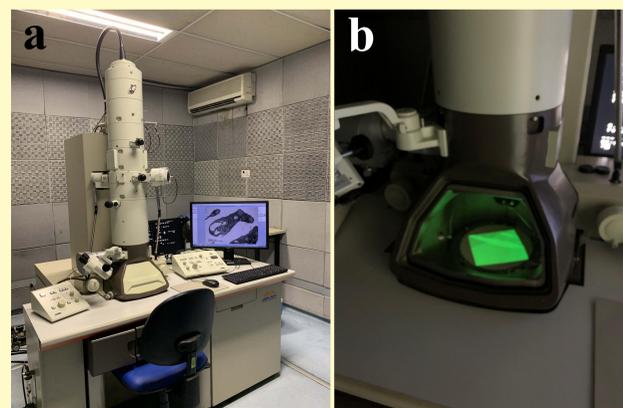
Por conta da pandemia do Covid-19, não foi possível começar o cultivo de células para a continuidade do projeto. Porém, até aqui tivemos ótimos resultados no aprendizado teórico e prático das criotécnicas, que exigem habilidade e precisão. Para isso, foi-se dedicado bastante tempo nessas etapas e também no aperfeiçoamento no uso do ultramicrotomo e preparação dos blocos de Epon (Figura 2). Também foram realizados testes nos equipamentos que serão utilizados na pesquisa, como o aparelho de congelamento por imersão (Figura 3) e o treinamento da operação do microscópio eletrônico de transmissão (Figura 4), etapas que serão fundamentais para a geração dos resultados esperados. As expectativas são de uma avaliação positiva de sua eficiência para estabelecer um protocolo alternativo de fixação.



**Figura 2. Ultramicrotomo.** (a) Aparelho utilizado para a realização dos cortes ultrafinos da amostra e o processo de trimagem de um bloco de Epon (b-d).



**Figura 3. Aparelho de congelamento por imersão.** Aparelho projetado para imersão das amostras em meio criogênico resfriado por nitrogênio líquido..



**Figura 4. Microscópio eletrônico transmissão.** Utilizado para analisar as amostras. (a) Imagem do microscópio eletrônico de transmissão (b) Formação da imagem no ecrã através do feixe de elétrons.

APOIO:

