

# RECONSTRUÇÃO TRIDIMENSIONAL POR TÉCNICAS AVANÇADAS EM MICROSCOPIA ELETRÔNICA



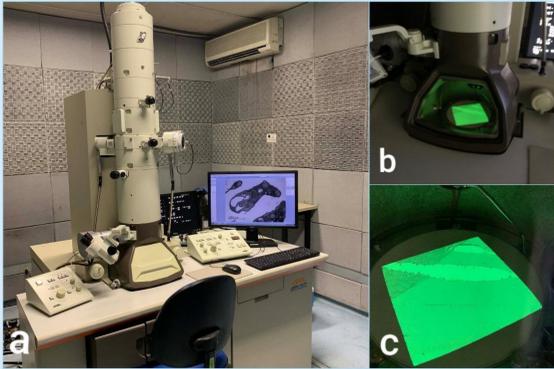
Marcelo Correa Motta Roriz  
Colégio Pedro II – Campus Duque de Caxias

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



## Introdução

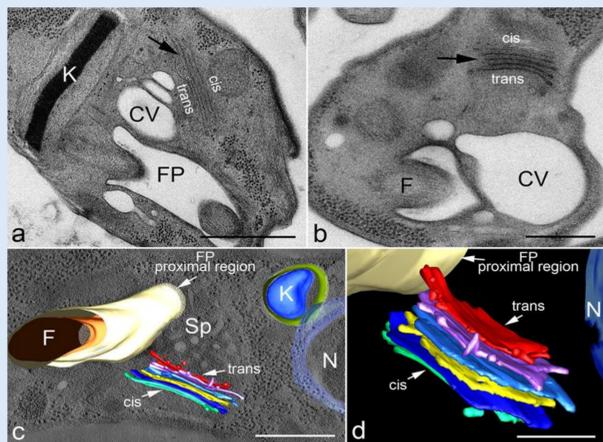
O advento da microscopia eletrônica em 1931 permitiu que pudéssemos observar partes muito menores do que a capacidade dos microscópios ópticos e dessa forma, entender melhor sobre o nível de organização estrutural e funcional de células e tecidos, o que possibilitou uma reavaliação da microanatomia celular. Existem hoje dois principais tipos de Microscópio eletrônico: o de transmissão (Figura 1) e o de varredura. Os dois utilizam do mesmo meio para guiar o feixe, o que difere esses modelos são a forma como vão detectar a interação do feixe com a amostra. Essa diferença de captação faz com que o de transmissão seja melhor para a visualização do interior de células, enquanto que o de Varredura é melhor para o exterior e o formato de células.



**Figura 1. Microscópio eletrônico de transmissão.** A, ângulo que mostra as dimensões do MET. O feixe de elétrons são emitidos na parte mais superior da coluna, atravessando-a por inteiro. B, os elétrons interagem com a amostra, perdendo energia no caminho. C, a ampliação observada através da tela fluorescente. É possível também observar a imagem pelo computador.

Ao longo de anos, várias metodologias de preparo e tecnologias avançadas potencializaram o uso do microscópio para a ciência e se tornaram ferramentas de utilidade ímpar, como a reconstrução tridimensional. Esta metodologia permite que possamos ter uma visão tridimensional de uma organela, célula, ou o instrumento de estudo que está sendo observado, por meio de metodologias como a de cortes seriados, a tomografia eletrônica, e a microscopia eletrônica de duplo feixe, mais conhecida como FIB (do inglês, focused Ion Beam), que surgiu mais recentemente.

A tomografia eletrônica consiste, de forma simplificada, na plataforma onde está a amostra girar em torno de um eixo próprio, possibilitando que uma câmera tire "fotos" de diferentes ângulos daquela amostra, assim como uma tomografia computadorizada é feita, para fins de diagnóstico. Obtida essa série de imagens, um programa de computador as alinha e as reconstrói por algoritmos de retroprojeção, gerando um volume em três dimensões (3D) da amostra. Com esse modelo pronto, é possível visualizar o tomograma em um programa de visualização como o Amira e o IMOD e gerar os modelos 3D (Figura 2).



**Figura 2. Complexo de Golgi de um Trypanosoma cruzi em fase epimastigota.** A e B, imagens feitas em microscópio eletrônico de transmissão. C e D, modelos tridimensionais feitos a partir da tomografia eletrônica. Escalas: 500nm (a), 200nm (b e c) e 100 nm (d). Retirado de Girard-Dias et. al., 2012.

A técnica de microscopia eletrônica de duplo feixe (Focused Ion Beam), consiste na combinação da microscopia eletrônica de varredura e uma segunda coluna que utiliza um feixe de íons focalizados (por isso seu nome em inglês) para desbastar, isto é, remover uma camada da superfície da amostra. Esta segunda coluna é montada em um ângulo de cerca de 50° em relação à coluna de elétrons. O feixe de íons focalizados, ao interagir com a amostra, promove microabrasões controladas, que provoca um desgaste na superfície. Dessa forma, os elétrons retro-espalhados (ou secundários) são captados pelo detector, que gera uma imagem. Após isso, o FIB desbasta a superfície da amostra novamente, e o detector gera mais uma imagem. Esse processo, é repetido várias vezes até que se tenha uma sequência de imagens da amostra, levando o nome de "slice and view". Assim como na tomografia eletrônica, as imagens são segmentadas e renderizadas para gerar o modelo tridimensional a partir de programas computacionais como o Amira e o IMOD. As amostras que serão utilizadas em análise por FIB devem ser fixadas, impregnadas em tetróxido de ósmio e emblocadas em resina epon.

## Objetivos

Este projeto tem como objetivo explorar a arquitetura tridimensional de células através de metodologias avançadas de microscopia eletrônica e estabelecer um fluxo de trabalho para aplicação em amostras biológicas. A partir disso, não só será estabelecido os parâmetros para a aquisição de séries tomográficas, como também serão gerados modelos tridimensionais de organelas a partir dos dados obtidos por tomografia eletrônica e FIB.

## Metodologia

A amostra utilizada neste projeto será uma monocamada de células da linhagem Vero emblocadas em resina Epon. As células serão previamente preparadas a partir da criofixação por imersão e substituição à frio. Já criofixadas e emblocadas, as amostras vão para um ultramicrotomo (Figura 3), onde serão trimadas para ultramicrotomia.

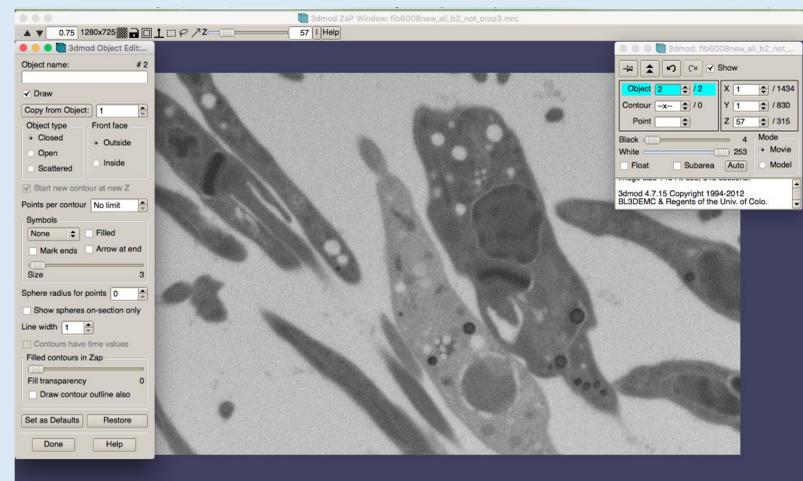
Para a tomografia eletrônica, serão obtidos cortes ultrafinos de 200 nm, que coletaremos em grades de cobre de 200 mesh e então serão contrastados em acetato de Uranila 5% (por 20 minutos) e em citrato de chumbo (por 5 minutos). Após isso, serão incubados com 5 µl de solução de ouro coloidal 10 nm em ambos os lados por 5 minutos, sendo lavados em água destilada em seguida. A partir daí, as amostras estarão preparadas para a tomografia, que serão adquiridos cobrindo uma faixa angular de -70° a +70° no eixo α, com incrementos de 2°. No FIB, será depositada uma camada de platina. A mesa contendo a amostra será inclinada à 54° para que fique perpendicular ao feixe de íons focalizados, que utilizará de Íons Ga+ para desbastar a superfície do bloco em forma de "U", que irá expor a região que será imageada. A técnica denominada "slice and view" será então utilizada. Por conseguinte, a série de imagens obtidas no FIB e na tomografia serão alinhadas, segmentadas e modeladas em três dimensões a partir do programa IMOD (University of Colorado).

## Resultados parciais

Apesar de não ter sido possível preparar as amostras para a continuidade do projeto conforme o cronograma estabelecido, devido à Pandemia do Covid-19, diversas atividades puderam ser desenvolvidas. No período anterior à pandemia, foram apresentados os fundamentos teóricos das metodologias envolvidas no projeto. Além disso, os conhecimentos manuais adquiridos foram muito importantes para a execução das fases posteriores do projeto, como a prática do uso dos microscópios eletrônicos e a trimagem da amostra no ultramicrotomo (Figura 3). Nesse período de quarentena, foram revisados e obtidos conhecimentos teóricos, bem como o treinamento básico no programa IMOD (Figura 4), que será utilizado para reconstrução tridimensional, segmentação e modelagem 3D, o que foi adiantado no cronograma devido às circunstâncias.



**Figura 3. Ultramicrotomo.** Aparelho onde a amostra em resina epon é lapidada para que os cortes ultrafinos (também feitos pelo equipamento) contemham a amostra, e com a resina Epon bem podada, técnica denominada "Trimagem".



**Figura 4. Programa IMOD.** Programa utilizado para a reconstrução 3D dos dados obtidos pelas metodologias de tomografia eletrônica e FIB.

APOIO:

