

GERAÇÃO DE MODELO TRIDIMENSIONAL DO TRYPANOSOMA CRUZI POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DE DUPLO FEIXE



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

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



INTRODUÇÃO

O microscópio eletrônico proporciona, desde seu surgimento, descobertas e avanços em estudos científicos. Com sua criação, a possibilidade de compreender detalhadamente o interior das células, sua composição e organização aumentaram exponencialmente. Sendo assim, foram desenvolvidos diversos métodos de preparo do material para a análise no microscópio eletrônico, como a fixação química por imersão e os métodos de criofixação. Com o grande avanço na resolução das imagens, proporcionado pelo microscópio eletrônico, foi perceptível que seria possível adquirir muitas outras informações que um só corte contém. Sendo então reconhecida a importância e os benefícios que a tridimensionalidade agrega aos estudos da amostra. Com a reconstrução tridimensional (3D) das amostras, é possível analisá-la como um todo, permitindo obter dados como dimensões, volume, posições das organelas e suas possíveis interações. Nesse trabalho, foi utilizado como modelo de estudo formas epimastigotas do *Trypanosoma cruzi* (figura 1), processadas por criofixação e para a geração de modelo tridimensional (3D), utilizando-se a técnica de microscopia eletrônica de varredura de duplo feixe (FIB- MEV) (figura 2). Com o modelo tridimensional renderizado, se tornou perceptível a preservação do material biológico, onde foram observados os relevos na estrutura externa que o *T.cruzi* possui, além de poder confirmar a fase de epimastigota do protozoário através da posição e formato do cinetoplasto, além do posicionamento e distribuição das estruturas estudadas. Estes resultados evidenciam a importância e a aplicabilidade das metodologias de reconstrução 3D em microscopia eletrônica no campo da biologia celular.

OBJETIVO

O objetivo desse trabalho foi gerar um modelo 3D do *T. cruzi* utilizando imagens seriadas adquiridas no microscópio eletrônico de duplo feixe (FIB- MEV).

METODOLOGIA

Formas epimastigotas de *T. cruzi* (cepa Y) foram cultivadas para manutenção em garrafas de plástico estéreis, em estufas à 28° C, a partir de 10% de uma cultura com quatro dias, 80% de meio LIT (Liver Infusion Tryptose) e 10 % de soro fetal bovino (Cutlab). Passagens foram feitas a cada quatro dias.

As células foram então submetidas ao congelamento por alta pressão em nitrogênio líquido (HPM 010 Balzer's) a uma pressão de aproximadamente 2.100 bar. As amostras congeladas foram então transferidas para o meio de substituição à -85 oC, para a realização da técnica de substituição a frio. Após isso, o material foi infiltrado e emblocado em Epon.

O bloco de resina contendo as formas epimastigotas foi montado em um suporte para FIB-MEV e analisado no microscópio Auriga (Zeiss) para a aquisição da série de imagens de um determinado volume do bloco.

As imagens em série foram utilizadas para a reconstrução tridimensional. As imagens foram alinhadas e segmentadas manualmente as organelas de interesse, fazendo conforme cada um dos contornos, como da membrana, por exemplo. Com toda a série de imagens segmentadas, foi possível observar o modelamento 3D, conforme as pranchas de imagens abaixo.

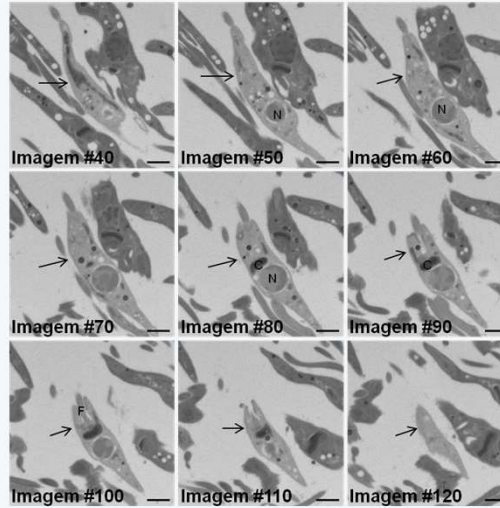


Figura 3. Série de imagens de microscópio eletrônico de varredura com o método de feixe duplo (FIB- MEV). A célula apontada pela seta foi utilizada posteriormente para segmentação e modelamento tridimensional. N- Núcleo, C- Cinetoplasto, F- Flagelo. Escala: 500 nm

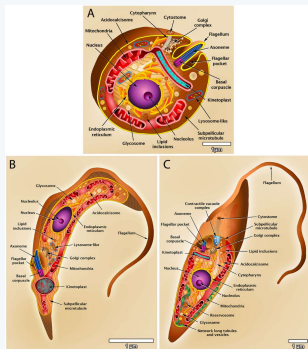


Figura 1. Desenho com as diferentes formas do protozoário *Trypanosoma cruzi*. A) Forma amastigota, B) Forma epimastigota e C) Forma tripomastigota. (Teixeira et al, 2012).

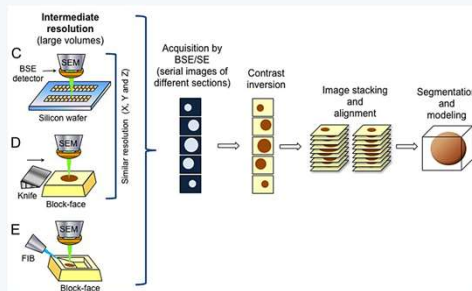


Figura 2. Esquema com etapas de aquisição de imagens pelo método de FIB e Serial Block-face. C) Método não abordado. D) Aquisição de imagens pelo método de Serial Block-face. E) Aquisição de imagens pelo método de feixe duplo (FIB- MEV). (Girard-Dias et al, 2015)

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com a geração da série de imagens pela técnica FIB foi possível abranger o volume total de um epimastigota (figura 3). A partir desta sequência de imagens, as estruturas de interesse foram segmentadas manualmente, como a membrana plasmática, o núcleo e o cinetoplasto, atribuindo-se diferentes cores a cada estrutura (figura 4). Após a segmentação das estruturas de interesse, estas foram então renderizadas para a geração dos modelos 3D (figuras 5 e 6), que nos permitiu identificar a posição do cinetoplasto em relação ao núcleo da célula, além de sua aproximação com a bolsa flagelar.

O modelamento 3D permitiu observar a interação da bolsa flagelar com o flagelo, onde foi visto o flagelo aderido ao corpo celular (figura 5, D). Além disso, a reconstrução do volume total de uma célula possibilitou observar o formato alongado da forma epimastigota, o formato arredondado do núcleo e o cinetoplasto de uma forma mais circular (figura 5 e 6).

Estes resultados evidenciam a importância e a aplicabilidade das metodologias de reconstrução 3D em microscopia eletrônica no campo da biologia celular.

CONCLUSÃO

Através dos estudos de geração do modelo 3D foi possível compreender o quanto o preparo do material influencia na análise da amostra por meio da reconstrução e os efeitos de cada metodologia. O modelo 3D possibilitou a exploração da arquitetura tridimensional da célula, como o estudo de suas morfologias, distribuição das organelas no corpo celular e possíveis interações entre organelas. O fluxo de trabalho utilizado neste projeto pode ser aplicado em diferentes amostras biológicas.

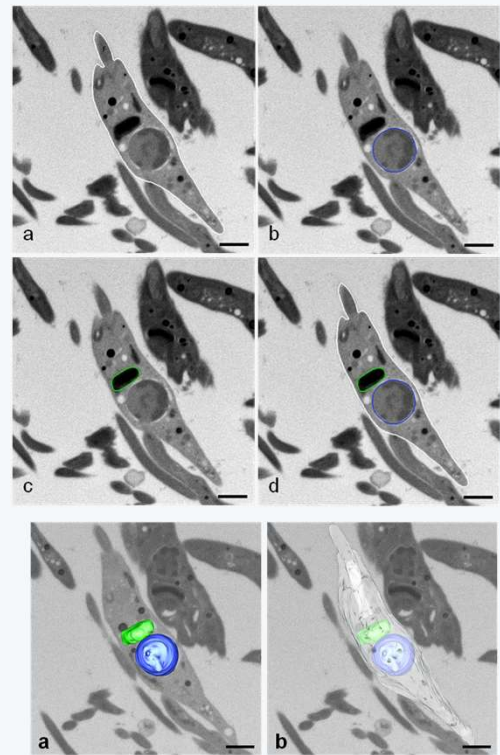


Figura 4. Segmentação das estruturas de interesse. a) Segmentação da membrana; representada pela cor branca. b) Segmentação do núcleo, representado em azul. c) Segmentação do cinetoplasto, representado em verde. d) O núcleo, cinetoplasto e membrana segmentados. F- Flagelo. Escala: 500 nm

Figura 5. Modelamento 3D posicionado sobre a imagem do corte. a) Cinetoplasto e núcleo. b) Cinetoplasto, núcleo e membrana. Verde- Cinetoplasto, Azul- Núcleo, Branco/transparente- Membrana. Escala: 500 nm

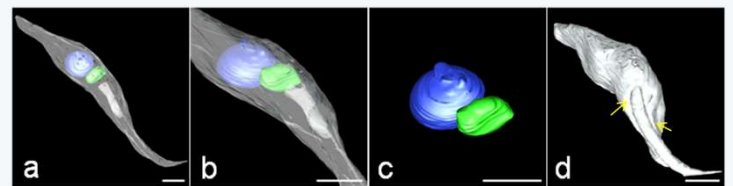


Figura 6. Modelamento tridimensional (3D) da forma epimastigota do *Trypanosoma cruzi*. a) Modelo 3D do parasito inteiro. b) Imagem ampliada da região anterior do *T.cruzi*. c) Modelo tridimensional do núcleo (representado em azul) e do cinetoplasto (representado em verde). d) Modelamento 3D da membrana plasmática. A imagem retrata o relevo presente na estrutura do *T.cruzi* e evidência a interação da bolsa flagelar com o flagelo em sua forma alongada (setas). Escala: 500 nm.