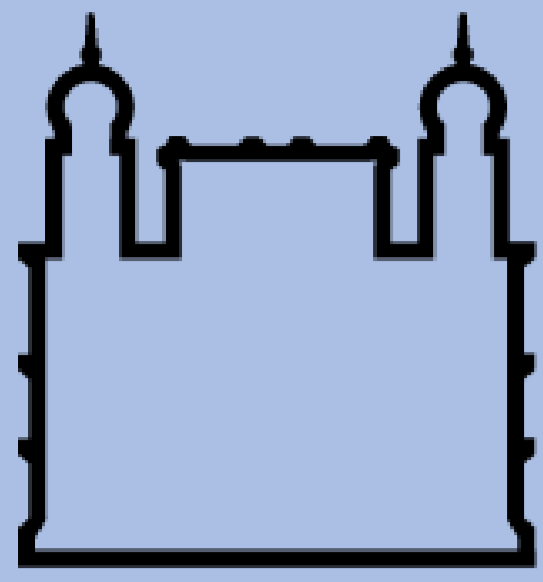


RECONSTRUÇÃO TRIDIMENSIONAL DE *TRYPANOSOMA CRUZI* POR TOMOGRAFIA ELETRÔNICA



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

Marcelo Correa Motta Roriz

Orientador: Wendell Girard Dias

Colégio Pedro II – Campus Duque de Caxias

Plataforma de Microscopia eletrônica Rudolph Barth – IOC/ Fiocruz



ESCOLA POLITÉCNICA DE SAÚDE
JOAQUIM VENÂNCIO

INTRODUÇÃO

Com o avanço tecnológico, os microscópios eletrônicos e suas metodologias foram aprimoradas, possibilitando a obtenção de imagens com resolução cada vez maiores e uma compreensão melhor da microanatomia celular. Surgiram diversas ferramentas que contribuíram com essa finalidade e se consolidaram no meio acadêmico, como a reconstrução tridimensional (3D). Diferentes metodologias foram desenvolvidas para isso, como a de cortes seriados, tomografia eletrônica e FIB (*focused ion beam*). Estas duas últimas consolidaram-se como as principais técnicas atuais, graças aos avanços obtidos, devido principalmente ao aumento na capacidade de aquisição de cortes seriados e séries tomográficas no microscópio. Nesse trabalho, a técnica estudada foi a tomografia eletrônica, que somente pode ser feito em um microscópio eletrônico de transmissão (MET).

De modo análogo ao exame de tomografia computadorizada da medicina, a tomografia eletrônica produz uma sequência de imagens da amostra em diferentes ângulos ao longo de um eixo (Frank, 2005). Mais detalhadamente, nesse método é obtido uma sequência de imagens da amostra em diferentes ângulos, abrangendo uma faixa angular de aproximadamente -70° até 70° (figura 1). No entanto, enquanto no exame médico a lente e a fonte de iluminação se movimentam, na tomografia eletrônica é a amostra que muda sua angulação ao longo do processo, sendo as imagens posteriormente utilizadas para formar um volume 3D por algoritmos de retroprojeção, que acrescentam um terceiro eixo, denominado eixo z. O feixe de elétrons deve atravessar a amostra, e por conta disso, a espessura do corte deve ser ultrafino (~ 300 nm em um microscópio de 200kV). Caso a amostra seja mais espessa, o feixe não atravessa, saindo uma imagem totalmente preta. Para poder, portanto, observar amostras muito volumosas, é possível fazer diversos cortes ultrafinos e fazer um tomograma de cada um deles, unindo e alinhando cada um deles no processo computacional. Essa técnica é chamada de tomografia eletrônica seriada.

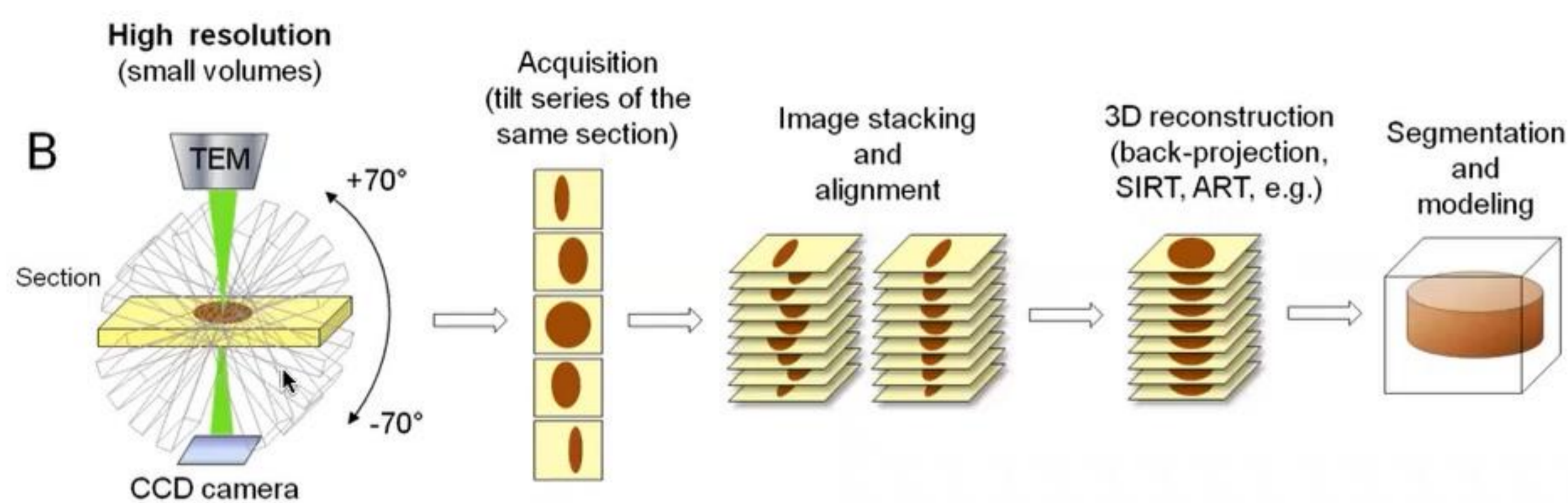


Figura 1. Processo esquemático de reconstrução tridimensional por tomografia eletrônica. Retirado de Miranda et al., 2015.

OBJETIVOS

Explorar a arquitetura tridimensional de células através da aplicação de metodologias avançadas em microscopia eletrônica e estabelecer um fluxo de trabalho para aplicação em amostras biológicas.

METODOLOGIA

Foi utilizado como modelo de estudo o *Trypanosoma cruzi*, protozoário parasita causador da doença de Chagas, em sua forma amastigota. Para essa finalidade, foram utilizados métodos de criofixação (congelamento por alta pressão e substituição a frio) no preparo da amostra, para uma melhor preservação das estruturas de interesse. Após isso, a amostra foi emblocada, trimada e seus cortes ultrafinos coletados com as grades de cobre, sendo depois levada ao microscópio eletrônico de transmissão para a aquisição das séries tomográficas. O tomograma utilizado nesse projeto foi cedido pelo orientador Wendell Girard Dias, sendo esses referentes à sua dissertação de mestrado. Após obter o conjunto de imagens de diferentes ângulos, o IMOD (*software* gratuito mantido pela universidade de Colorado) foi utilizado para alinhar, reconstruir e segmentá-las, para a geração do modelo 3D.

RESULTADOS ALCANÇADOS E DISCUSSÃO

Os resultados alcançados foram modelos 3D do núcleo e da membrana plasmática que, por conta do tamanho dessas estruturas, não puderam ser vistas em totalidade. Ainda assim, foi possível observar dados interessantes, como a morfologia dessas duas estruturas (figura 4). De modo geral, o núcleo tende a ter um formato mais arredondado, e a membrana plasmática, mais rugosa. Além disso, evidencia-se o uma invaginação na membrana – nada mais é que a bolsa flagelar.

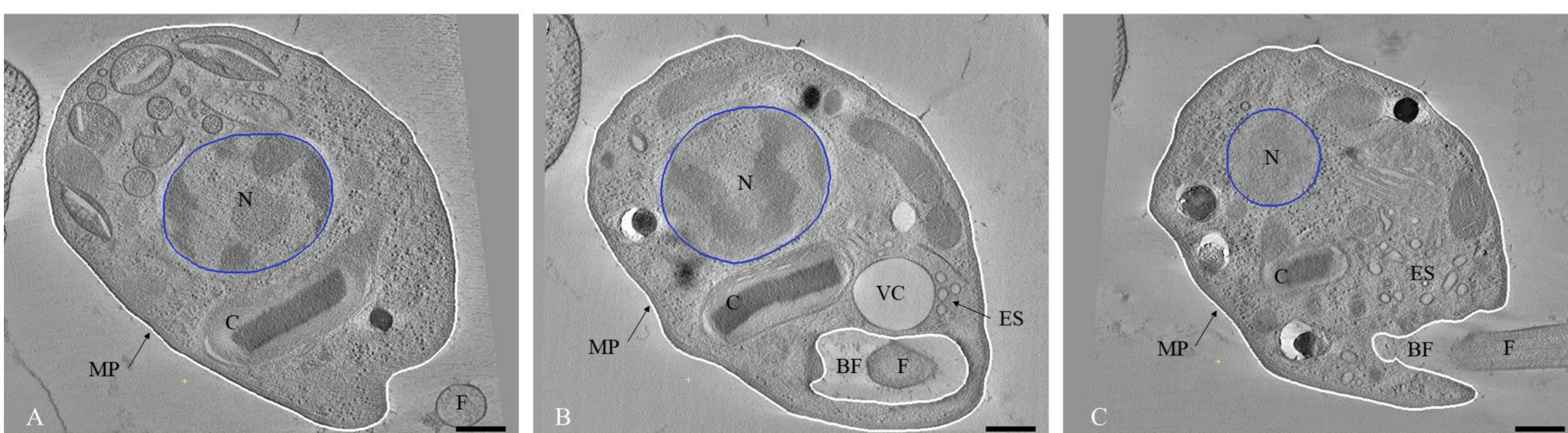


Figura 2. Segmentação das estruturas de interesse ao longo do tomograma. A-C, em azul, segmentação referente ao núcleo, e em branco, referente à membrana plasmática. (N) núcleo, (C) cinetoplasto, (F) flagelo, (MP) membrana plasmática, (VC) vacúolo contrátil e (ES) espongioma. Barra de escala: 200 nm.

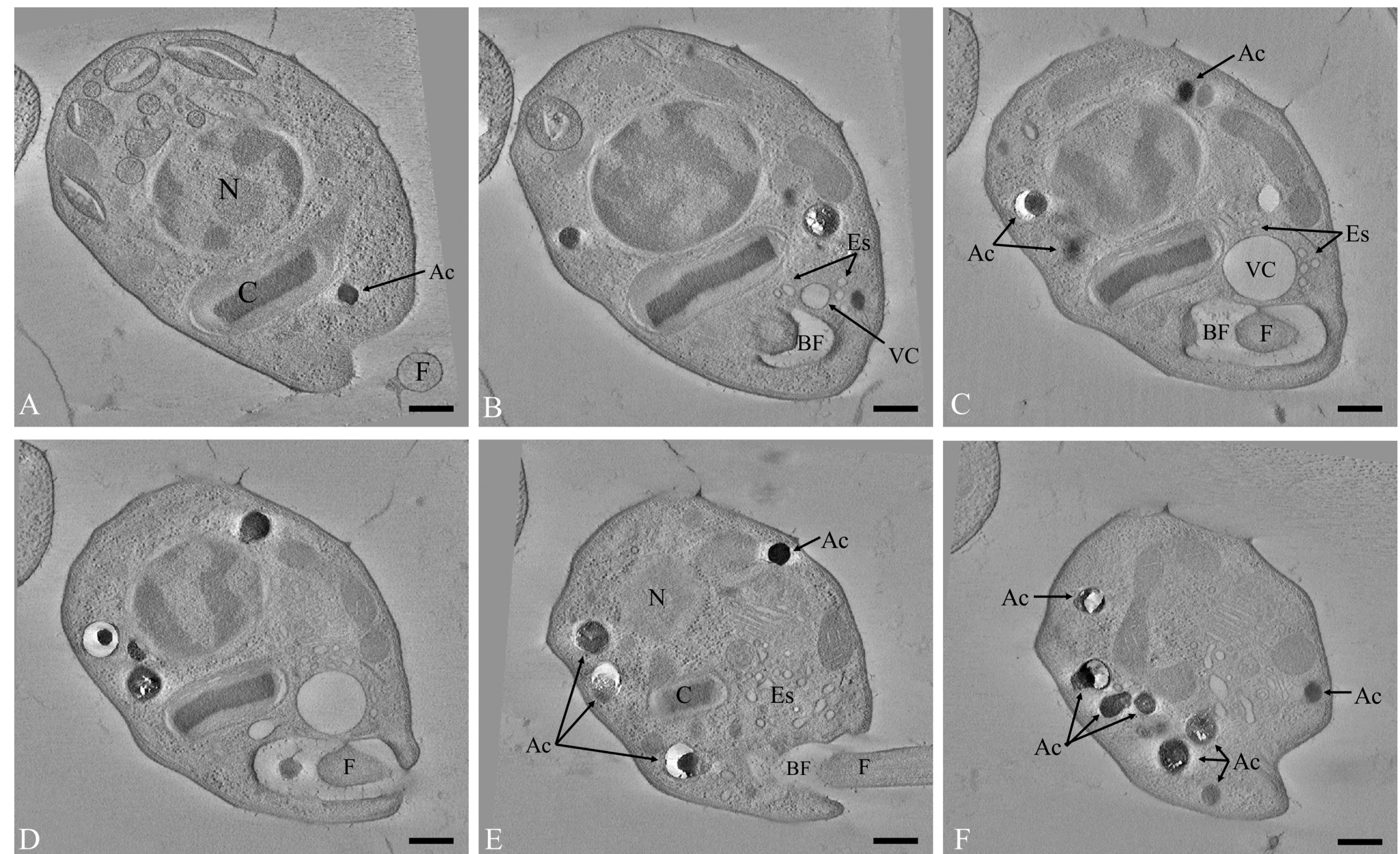


Figura 3. Imagens de diferentes partes do tomograma já reconstruído. A-F, célula do *T. cruzi* ao longo do tomograma. (N) núcleo, (C) cinetoplasto, (F) flagelo, (Ac) acidocalcissomo, (Es) espongioma, (VC) vacúolo central e (BF) bolsa flagelar. Barra de escala: 200 nm.

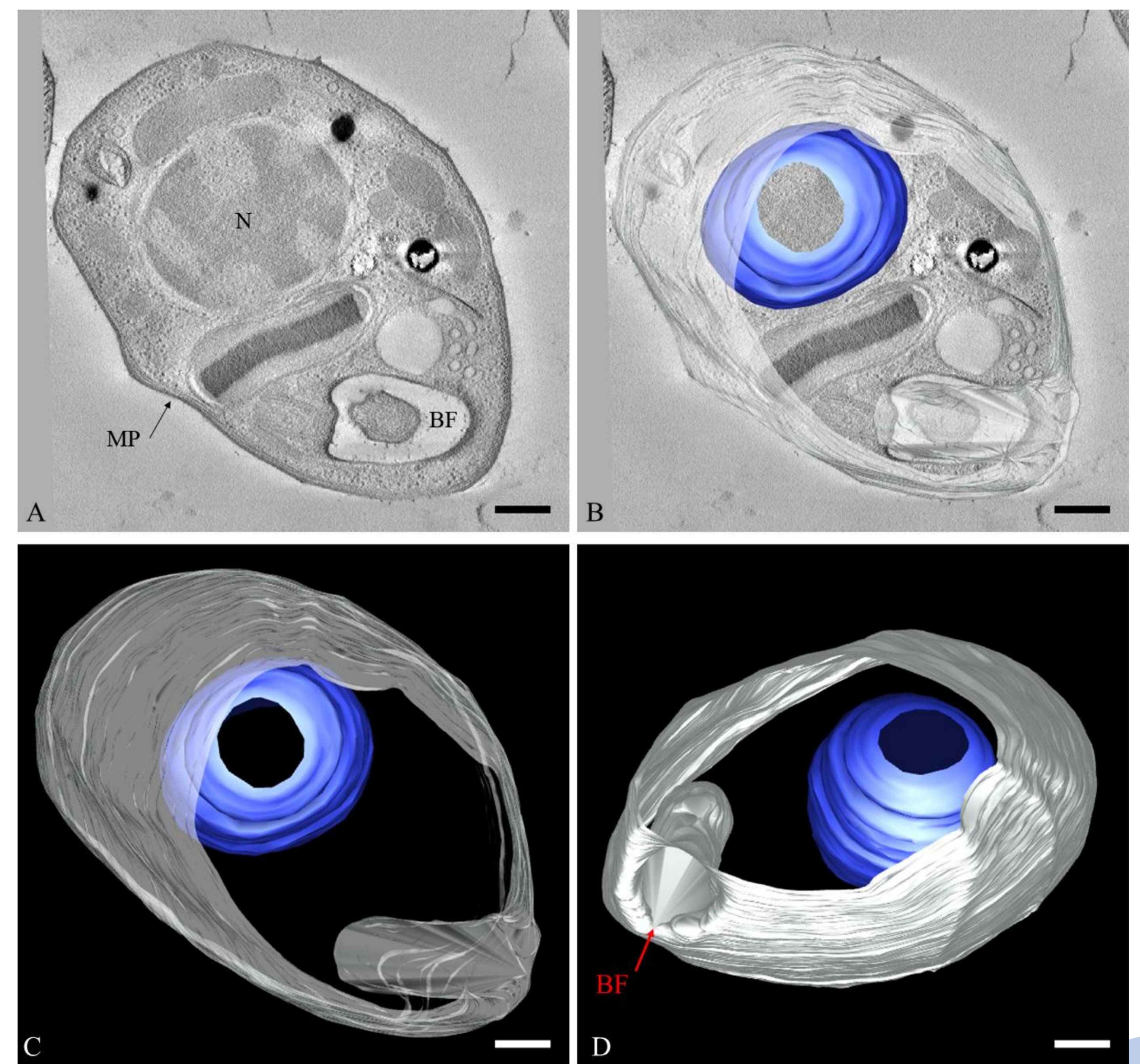


Figura 4. Modelo tridimensional do núcleo e da membrana plasmática. A, imagem do tomograma de uma célula de *T. cruzi* na forma amastigota. B-C, modelos 3D observados, sendo em azul o núcleo e em branco transparente a membrana plasmática. D, modelo 3D observado em um ângulo diferente, sem transparência. (N) núcleo, (MP) membrana plasmática e (BF) bolsa flagelar. Barra de escala: 200 nm.

CONCLUSÃO

Os resultados demonstraram o grande potencial da utilização de técnicas de reconstrução 3D em microscopia eletrônica para o estudo da arquitetura 3D das células, o que pode ser aplicado em uma grande variedade de células e tecidos. É um processo trabalhoso, principalmente a etapa de segmentação das estruturas de interesse, que deve ser feita manualmente, visto que, a depender da estrutura de interesse e da qualidade da imagem, suas delimitações podem não ser tão evidentes. Porém, pode evidenciar aspectos bastante interessantes como a invaginação presente na membrana plasmática (bolsa flagelar), contendo o pequeno flagelo do amastigota, corroborando com os estudos Meyer & De Souza (1976), que apontavam a existência de um curto flagelo nessa diferenciação do *T. cruzi*. Com relação ao tomograma, as diferentes tonalidades de cinza evidenciam diferenças de eletrondensidade nas organelas.