

Para além da membrana celular: o uso de crio-seções de células para validação de protocolos de preparação de amostras biológicas para técnicas Síncrotron

Pesquisador responsável: Renata Santos Rabelo
LNLS- Laboratório Nacional de Luz Síncrotron
DMB - Divisão de Matéria Mole e Biológica

Introdução

A técnica de fratura por congelamento é um método tradicional utilizado para criar planos de secção transversal que permitam a visualização de estruturas intracelulares, como o núcleo, mitocôndrias, retículos e complexo de Golgi (MACDONALD *et al.*, 2018). Essa técnica envolve o congelamento rápido de tecidos, células ou suspensões celulares com o uso de crioprotetores para garantir a preservação adequada da ultraestrutura celular. Os crioprotetores tem a função de evitar a formação de cristais de gelo durante o congelamento, que por sua vez é feito submergindo a amostra em um líquido criogênico (por exemplo, nitrogênio líquido, etano ou propano subresfriados).

Após o congelamento, a amostra é fraturada em um plano específico, permitindo a observação detalhada das estruturas internas das células por meio da microscopia eletrônica de varredura (MEV). A caracterização da amostra por MEV convencional é um procedimento rápido, porém o equipamento requer condições de alto vácuo, exigindo que a água presente na amostra seja previamente removida. Nesse sentido, diferentes métodos de secagem, como a secagem química, a secagem no ponto crítico do CO₂ e a liofilização, podem ser utilizados. A possibilidade de visualizar estruturas presentes no interior de células por meio dessa técnica torna-a útil em diversas áreas, como pesquisa médica e biotecnologia, e nos últimos anos, a técnica ganhou destaque também na área de biologia molecular por permitir a identificação ultraestrutural de conjuntos de proteínas em combinação com a identificação molecular de proteínas constituintes usando anticorpos específicos (MEIER; BECKMANN, 2018).

No preparo de amostras para linhas de luz como a Cateretê, que trabalha com técnicas de imagem por difração coerente, a fratura por congelamento é interessante, pois a linha de luz trabalha na caracterização de amostras biológicas em condições criogênicas e à temperatura ambiente. Dessa forma, a fratura por congelamento poderia ser utilizada para validar a preparação de amostras para ambas as condições de operação. Para as operações em condições criogênicas, a concentração de crioprotetor e a espessura da amostra a ser congelada precisam ser otimizadas para garantir que a água no interior da amostra esteja em seu estado vítreo (sem a presença de cristais de gelo, os quais por sua vez danificam a ultraestrutura celular). Por outro lado, para a caracterização de amostras a temperatura ambiente, também é necessário validar como os diferentes modos de secagem da amostra atuam na preservação do interior celular. Com base nisso, pretendemos validar para cada um dos três métodos de secagem listados (secagem química, no ponto crítico do CO₂ e liofilização) a concentração de três diferentes crioprotetores (sacarose, PVP e DMSO) na criopreservação de células em pellets de agarose esféricos com diâmetro médio de 0.5, 1.0 e 2.0 µm. As condições experimentais serão validadas por MEV. O dano causado pela ocorrência de formação de cristais de gelo na amostra será monitorado de forma quantitativa a partir da medida da variação do tamanho dos poros presentes na estrutura do núcleo celular imageado por MEV. Artefatos de secagem serão monitorados quantitativamente pela comparação do tamanho de organelas, como as mitocôndrias, em cada uma das três condições de secagem. Hipotetizamos que essa estratégia irá permitir construir um protocolo adequado, tanto para a caracterização de células de mamíferos em condições criogênicas, quanto à temperatura ambiente. Estudos sistemáticos desse tipo, que avaliaram quantitativamente os efeitos do preparo de amostra em protocolos de fratura por congelamento são limitados, e até onde sabemos, somos pioneiros nesse tipo de estudo para validação de protocolos para técnicas síncrotron.

Estado da arte

A técnica de fratura por congelamento é utilizada há décadas para a obtenção de criosecções para a caracterização de amostras biológicas, principalmente tecidos (KOGA *et al.*, 2015). Mas ela também tem sido utilizada para observar a arquitetura intracelular de células em suspensão ou em monocadas, incorporando as em agarose de baixo ponto de fusão (MACDONALD; FOWLE; WOODS PHD, 2017).

A agarose é o principal polissacarídeo presente no ágar, e é um polímero adequado para este tipo de preparo de amostra, pois consegue preencher completamente o espaço entre as células sem penetrá-las. Além disso, a agarose convencional forma um gel abaixo de 37–40°C, enquanto a agarose de baixo ponto de fusão é endurecida abaixo de 28°C. Assim, a viscosidade da agarose de baixo ponto de fusão é adequada para permitir inclusão de amostras mesmo em temperaturas abaixo de 40°C. Como resultado, as células podem ser completamente misturadas no meio a 35–40°C, embora a concentração de agarose seja bastante alta nessa condição (em torno de 5%) (KOGA; NAKAJIMA; USHIKI, 2012).

Outros meios de inclusão também têm sido utilizados para procedimentos de fratura por congelamento (KOGA; NAKAJIMA; USHIKI, 2012). Mas em geral, o protocolo baseado na inclusão em agarose de baixo ponto de fusão tem sido o método de escolha pelo fato desse polímero não permear a amostra, e dessa forma não requerer longas etapas de infiltração, como é o caso de protocolos baseados no uso de gelatina, ou quitosana.

No geral, a maioria dos trabalhos desenvolvidos na literatura para o congelamento por fratura aplicados em células não se baseia na otimização de condições de vitrificação da amostra, pois nesses estudos, a concentração de crioprotetor adicionada à amostra não é um limitante. Mas do ponto de vista do preparo de amostra para microscopia de raio-X, a concentração de crioprotetor adicionado na amostra pode reduzir o contraste durante a aquisição da imagem, sendo necessário otimizar esse parâmetro para um bom compromisso entre a preservação da amostra e a qualidade da aquisição (DIAZ *et al.*, 2015). Dessa forma, sabendo que o diâmetro da gota contendo as células será inversamente proporcional a taxa de congelamento da amostra (ZHAN *et al.*, 2021), pretendemos reduzir ao máximo a necessidade de uso de crioprotetores pela redução do tamanho da amostra a ser vitrificada.

Por fim, a otimização de métodos de secagem para aplicação em técnicas de fratura por congelamento ainda não foi explorada de forma sistemática. Na microscopia de raio-X, a preocupação em relação a esse parâmetro se dá, pois diferente das aquisições 2D adquiridas por microscopia eletrônica (que é a técnica de caracterização geralmente utilizada para amostras fraturadas por congelamento), onde muitas vezes não se tem uma noção clara de um encolhimento irregular da amostra. Na microscopia de raio-X, devido a alta capacidade de penetração do raio-X, podemos reconstruir o volume de células inteiras em 3D, e perceber mais facilmente irregularidades na amostra decorrentes da secagem. Dessa forma, protocolos que não garantam que as proporções da célula sejam mantidas ao longo da secagem são altamente indesejáveis, e devem ser evitados sempre que possível.

Objetivo geral

Este projeto tem como objetivo explorar o seccionamento de células em condições criogênicas para validar, por microscopia eletrônica de varredura, estratégias para criopreservação do interior celular.

Objetivos específicos

- Investigar de forma quantitativa o uso de diferentes crioprotetores na preservação do interior celular lotado de células de mamíferos por MEV;
- Caracterizar de forma quantitativa os artefatos resultantes de três diferentes métodos de secagem (secagem química, secagem no ponto crítico do CO₂ e liofilização) na preservação das criosecções obtidas por criofratura (ou fratura por congelamento);

Metodologia

Preparação de amostra e criofratura: Células de mamíferos serão cultivadas e colhidas em frascos de cultura. Na sequência, as células serão destacadas com tripsina e centrifugadas para formar pellets celulares. Os pellets serão suspensos em três diferentes crioprotetores, a saber, sacarose, PVP e DMSO, cada um nas concentrações de 10%, 20% e 30%. As amostras serão misturadas com uma solução de agarose de baixo ponto de fusão e, através de um bico injetor com diâmetros médios de 0,5, 1,0 e 2,0 µm serão gotejadas em nitrogênio líquido formando gotas esféricas vitrificadas. Após a vitrificação, as amostras serão transferidas para uma unidade de criofratura a -196°C e seccionadas.

Secagem: Três métodos de secagem (química, ponto crítico de CO₂ e liofilização) serão usados para preparar as amostras para imagens SEM. Para a secagem química, as amostras seguirão para as etapas de desidratação em série alcoólica ascendente (30%, 50%, 70%, 80%, 90% e 100%, 10 minutos cada), e na sequência, serão secas com HMDS. Para a secagem do ponto crítico de CO₂, as amostras serão transferidas para um secador de ponto crítico Bal-Tec CPD 030 e submetidas à pressão crescente de CO₂ até atingir o ponto crítico. Por fim, para liofilização, as amostras vitrificadas serão transferidas para um liofilizador e liofilizadas por 24 horas.

MEV: As amostras serão revestidas com uma fina camada de ouro e observadas por MEV (INSPECT). Para cada condição experimental serão analisadas pelo menos cinco amostras. As imagens serão avaliadas qualitativa e quantitativamente por meio de software de análise de imagens. Tamanhos de poros no interior do núcleo celular serão medidos para quantificar os danos causados pela ocorrência de formação de cristais de gelo. O tamanho de organelas como mitocôndrias também será medido para quantificar os artefatos de secagem.

Análise de dados: Os dados obtidos serão analisados estatisticamente por meio da análise de variância (ANOVA) seguida do teste de Tukey. Será adotado nível de significância de 5%. Os resultados dos experimentos serão comparados para determinar a melhor combinação de concentração de crioprotetor e método de secagem para a preservação da ultraestrutura celular em amostras criofraturadas.

Referências

- DIAZ, A. et al. Three-dimensional mass density mapping of cellular ultrastructure by ptychographic X-ray nanotomography. *Journal of Structural Biology*, v. 192, n. 3, p. 461–469, 2015.
- KOGA, D. et al. Correlative Light and Scanning Electron Microscopy for Observing the Three-Dimensional Ultrastructure of Membranous Cell Organelles in Relation to Their Molecular Components. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, v. 63, n. 12, p. 968–979, 2015.
- KOGA, D.; NAKAJIMA, M.; USHIKI, T. A useful method for observing intracellular structures of free and cultured cells by scanning electron microscopy. *Journal of Electron Microscopy*, v. 61, p. 105–111, 2012.
- MACDONALD, J. A. et al. A method for freeze-fracture and scanning electron microscopy of isolated mitochondria. *MethodsX*, v. 5, n. October 2017, p. 593–598, 2018.
- MACDONALD, J. A.; FOWLE, W. H.; WOODS PHD, D. C. New insights on mitochondrial heterogeneity observed in prepared mitochondrial samples following a method for freeze-fracture and scanning electron microscopy. *Micron*, v. 101, n. June, p. 25–31, 2017.
- MEIER, C.; BECKMANN, A. Freeze fracture: new avenues for the ultrastructural analysis of cells in vitro. *Histochemistry and Cell Biology*, v. 149, n. 1, p. 3–13, 2018.
- ZHAN, L. et al. Conduction Cooling and Plasmonic Heating Dramatically Increase Droplet Vitrification Volumes for Cell Cryopreservation. *Advanced Science*, v. 8, n. 11, p. 1–14, 2021.