

Estratégias avançadas de corte e preparo de tecidos biológicos para experimentos de nanotomografia e microscopia óptica

Orientadores:

Carla Cristina Polo (DMB- LNLS) e Humberto Cavalcante Joca (Bioimagem- LNBio)

Introdução

A obtenção de imagens de tecidos biológicos desempenha um papel crucial em diversos aspectos da pesquisa biomédica e aplicações clínicas. A análise de alterações histológicas nos tecidos é de importância fundamental na patologia para diagnósticos precisos e robustos [1]. Técnicas avançadas de imagem têm possibilitado o estudo da estrutura de tecidos biológicos em três dimensões. A visualização tridimensional de estruturas celulares e intracelulares, de forma íntegra, em estado nativo e em escala nanométrica é particularmente desejável para alcançar uma compreensão mais fisiologicamente relevante dos marcadores de doenças e dos processos celulares. Técnicas de imageamento por microscopia de raio-X e microscopia óptica têm se tornado cada vez mais importantes para o estudo de células e tecidos biológicos, oferecendo diversas vantagens como a visualização não invasiva e de alta resolução de amostras espessas, possibilitando a obtenção de imagens estruturais de ossos, implantes metálicos e cavidades de tecidos moles [2]. No caso dos raios -X, a Tomografia Computadorizada Pticográfica por Raios X (PXCT), é uma técnica poderosa, que cada vez mais se beneficia de fontes de ultra-baixa emitância, como a instalação Sirius (LNLS-CNPEM), que fornecendo contraste quantitativo para observação de estruturas subcelulares [3], com resolução espacial de dezenas de nanômetros. Para tanto, são necessárias produção de amostras de tecidos que variam de dezenas a poucas centenas de micrometros e preservando a sua arquitetura funcional. Esta é uma etapa bastante desafiadora e que requer técnicas de isolamento e de validação e nesse sentido os experimentos correlatos baseados em microscopia óptica são cruciais. Ademais a resolução espacial do imageamento por raio-X em amostras biológicas pode ser limitada por danos causados pela radiação, um problema bem conhecido em materiais moles. Em temperatura ambiente, a ionização de ligações químicas e a produção de radicais livres pela irradiação de raios X degradam a estrutura das biomoléculas [4, 5]. Estudos promissores demonstram que, para contornar esse problema, protocolos otimizados utilizando criogenia permitem a obtenção de imagens de grandes fragmentos de tecido cerebral com resolução de até 110 nm [3] (Figura 1). Este é apenas o começo, uma vez que os tecidos possuem diferentes composições celulares e, portanto, propriedades bioquímicas distintas, o que significa que estratégias específicas para cada amostra são necessárias. Portanto, a combinação de corte de amostras e a manutenção da estrutura natural por meio da vitrificação é um tema que carece de maiores investigações.

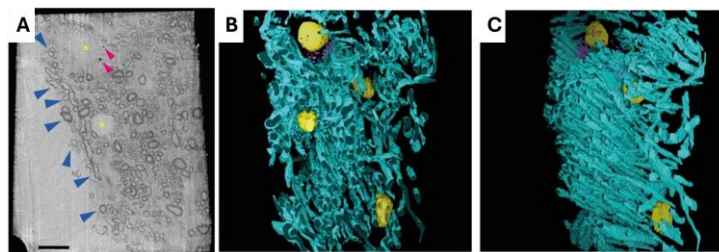


Figura 1. Experimento de PXCT realizado com fragmento de cérebro de rato [ref. 3]. (A) Fatia ortogonal tomograma reconstruído. Variações na espessura da bainha de mielina de axônios mielinizados são visíveis (pontas de seta azul-escuro). Múltiplos núcleos celulares (asteriscos amarelos) são identificados com base no tamanho e nas diferenças de contraste em relação ao citosol

celular circundante. Estruturas pequenas e aproximadamente esféricas (pontas de seta rosas) são visíveis. Barra de escala = 10 μm . (B) e (C) visualização tridimensional do tomograma segmentado onde: amarelo = núcleo, magenta= lisossomos, ciano= axons mielinizados.

Estado da arte

Atualmente, as estratégias de preparação de amostras biológicas são muito bem estabelecidas para experimentos baseados em histologia, e utilizam equipamentos comerciais, onde cortes de espessuras de micrométricos são obtidos em áreas de tecidos milimétricos. Dada a alta resolução dos experimentos de PXCT e sua capacidade tridimensional é necessária que a amostra seja reduzida em todas as dimensões para acomodar a aquisição tomográfica. Além disso, técnicas de congelamento de amostras que incluem a vitrificação são limitados a pequenos tamanhos de amostras, que muitas das vezes não são representativos. A manipulação com precisão de amostras como estas requerem combinação de equipamentos e processamento manual preciso, além de que existem lacunas quanto aos métodos ideais para preservar o estado nativo, tornando essa área muito carente de métodos robustos e com escassez de dados coletados. Consequentemente, é crucial conduzir investigações sistemáticas sobre métodos que possam ser padronizados, minimizando a degradação da estrutura histológica e sendo validados por microscopia óptica e posteriormente por PXCT.

Objetivos

O projeto tem como foco desenvolver estratégias de corte micrométrico de tecidos biológicos e validar a manutenção da histoarquitetura original através de microscopia óptica a serem realizadas no Laboratório Nacional de Biociências (LNBio). As estratégias promissoras serão preparadas em condições ambiente e criogênicas para avaliação da nano-arquitetura através de experimentos e reconstrução de imagens de PXCT no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (Sirius-LNLS).

Métodos

As estratégias propostas para a realização destes estudos estão resumidas na Figura 2 e descritas em detalhe abaixo.

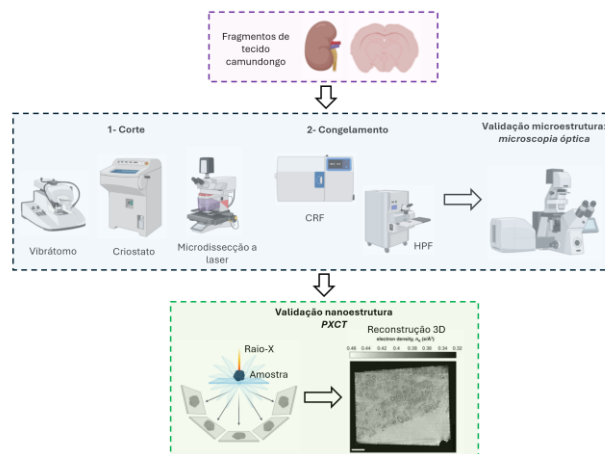


Figura 2. Resumo do fluxo de trabalho experimental a ser testado. As diferentes etapas estão representadas, incluindo as etapas de corte e congelamento de amostras e técnicas de imageamento para validação.

a) Material de tecido

Tecidos biológicos de cérebro, rim e fígado de camundongo (C57BL6) provenientes do biotério do Laboratório de Organismo Modelo, no Laboratório Nacional de Biociências (LNBio). Todos os animais serão mantidos em número de 4 a 5 por gaiola em estante ventilada, com fotoperíodo de ciclo claro/escuro de 12h:12h, a 21–24 °C, e livre acesso a comida e água (CEUA 143/2025). As amostras

serão fragmentos dos órgãos em dimensões de poucos milímetros, obtidas utilizando bisturis e/ou punches de biópsia.

b) Corte de amostras

Equipamentos comerciais de histologia como criostato (LCRIO) e vibrátomo (LIB) serão inicialmente utilizados para os cortes, além de microdissecção a laser (LMD7, Leica) e micromanipulador acoplados a microscopia óptica. Futuramente, também empregaremos o sistema de micro-torno que está sendo desenvolvido atualmente no LNLS.

c) Microscopia Óptica

A avaliação da integridade estrutural e viabilidade celular será realizada através de análise histológica e molecular de cortes teciduais. Para a caracterização morfológica, após o processamento as amostras serão fixadas e submetidas à coloração de hematoxilina e eosina (H&E), visando identificar sinais de danos térmicos ou mecânicos, tais como vacuolização citoplasmática e desorganização da matriz extracelular. A morte celular também será quantificada por ensaio de fluorescência utilizando marcadores de apoptose (ex: ensaio de TUNEL / Caspase-3 clivada / Annexin V). As lâminas serão visualizadas em microscopia de campo claro (H&E) e epifluorescência (Leica DM6 / LIB), onde para os ensaios de apoptose, será quantificado a densidade de células positivas para o marcador de morte e normalizada pela contagem total de núcleos (DAPI). A análise quantitativa será realizada por meio de segmentação automatizada de imagem, comparando-se a taxa de viabilidade entre os diferentes protocolos de congelamento e o grupo controle (tecido fresco).

d) Congelamento de amostras

Serão utilizadas estratégias de congelamento, visando a vitrificação do meio das amostras de tecidos, aplicadas a microscopia eletrônica, como é o caso do congelamento em altas pressões (HPF, Leica ICE EM), e aquelas aplicadas a área clínica, como o congelamento com taxa controlada (CRF, SyLab ICE Cube 14 S). Complementares, essas técnicas permitiram o congelamento de amostras de dezenas a centenas de micrometros.

e) PXCT

Os dados de PXCT serão coletados na linha de luz CATERETE. As reconstruções 3D das amostras terão como objetivo resoluções espaciais de 50 nm. A segmentação e análise de imagens serão realizadas utilizando a instalação TEPUI no LNLS com o software Avizo.

Cronograma de atividades

	Revisão de literatura	Seccionamento de amostras	Validação por histologia	Congelamento de amostras	Validação por PXCT
Primeiro semestre	x	x	x		
Segundo semestre		x	x	x	x

Referências

1. Laurino A. et al. International Journal of Molecular Sciences, 24(7), 6747, 2023
2. Chen H. et al. Phys Chem Chem Phys.14(39):13469-86, 2012.3
3. Shahmoradian S. et al. Sci. Rep. 7, 629, 2017
4. Carroni M. & Saibil H. R. Methods. 15 (95):78-85, 2016
5. Howells M. R. et al. J Electron Spectros Relat Phenomena. 1;170(1-3):4-12, 2009.