

ORIENTAÇÕES PARA COLHEITA E FIXAÇÃO PRIMÁRIA DE AMOSTRAS BIOLÓGICAS

COLHEITA E FIXAÇÃO DE **TECIDOS ANIMAIS** PARA PREPARAÇÕES DE ROTINA (TEMPERATURA AMBIENTE)

Existem diferentes tipos de amostras biológicas e é importante que o usuário se informe sobre o melhor método de colheita e fixação de suas amostras, antes de entregá-las para preparação. Descrevemos abaixo as técnicas de colheita e fixação mais amplamente utilizadas para microscopia eletrônica de transmissão e de varredura. Existem dois métodos principais de fixação, a fixação química e a fixação por congelamento. No caso da fixação química, dois métodos são comumente usados:

Fixação por imersão: esse é o método mais usado para colheita de tecidos, onde uma amostra do órgão ou tecido de interesse é imersa em solução fixadora, em volume aproximadamente 15 vezes maior que o da amostra, devendo permanecer nesse fixador por um período de 24 a 72 horas. Períodos menores promovem baixa fixação do tecido, enquanto que permanência em tempo excessivo no fixador pode gerar ressecamento da amostra, que se torna friável. Além disso, os componentes da solução fixadora podem se alterar com o tempo, como por oxidação, o que pode causar danos à amostra. Após o tempo de fixação, o fixador é substituído por solução tampão, geralmente a mesma na qual foi preparado o fixador. Faça esse processo de lavagem por três vezes. A amostra pode então ser armazenada na geladeira. O tempo de armazenamento é variável, mas quanto mais prolongado, maior a chance de ocorrer deterioração da amostra. O ideal é que não permaneça mais de uma semana. As amostras devem ficar refrigeradas até serem entregues no CM-UFMG (doravante denominado CM) para preparação.

Fixação por perfusão: nesse método, a solução fixadora é perfundida no sistema circulatório do animal, com controle da pressão da perfusão. Isto faz com que a solução fixadora atinja mais ampla e homogênea as células do órgão/tecido, garantindo uma melhor preservação da ultraestrutura. O usuário deve possuir prática na execução desse procedimento, que pode ser observado em laboratórios de histologia. Ainda, o método é usado normalmente em animais de pequeno porte, pois abrange região muito mais ampla que a de interesse, exigindo volumes de solução fixadora bem maiores, e implica em sacrifício do animal.

Nesse processo, antes de perfundir a solução fixadora, é necessária a perfusão de uma solução de lavagem do sangue, normalmente solução salina. Esse procedimento evita a formação de coágulos dentro dos vasos sanguíneos, o que pode prejudicar a perfusão do fixador. A perfusão pode ser feita em todo o animal, geralmente pela injeção de salina, seguida de solução fixadora, no ventrículo esquerdo do coração do animal. A solução é então distribuída pelo corpo e retorna ao coração, no átrio direito. Este é cortado parcialmente, para dar vazão

à solução perfundida. Assim, o fixador é distribuído para todo o corpo do animal; ou pode ser feita em parte do animal, onde encontra-se o órgão ou tecido de interesse, e, nesse caso, as soluções são injetadas em uma artéria que irriga esse órgão ou tecido e a vazão é feita por uma veia de drenagem. A perfusão parcial permite uma economia de solução fixadora e tempo. Após a perfusão, fragmentos da amostra são retirados, reduzidos a dimensões desejadas (máximo 2mm) e imersos no mesmo fixador, por um período de aproximadamente 24h. Após esse tempo, a solução fixadora é substituída por solução tampão, a mesma na qual foi preparada o fixador. As amostras são então armazenadas na geladeira até o momento da entrega no CM, para preparação. A amostra nunca deve ser congelada ou ficar seca.

IMPORTANTE: em qualquer um dos casos de fixação, para **ESTUDO POR MICROSCOPIA DE TRANSMISSÃO, A AMOSTRA COLHIDA NÃO DEVE TER DIMENSÕES MAIORES QUE 2mm**. Amostras com dimensões maiores que a indicada não serão bem fixadas, o que interferirá em todo o processamento e comprometerá a análise da ultraestrutura. Algumas amostras já possuem dimensões próximas a 2mm e podem, portanto, serem fixadas inteiras (larvas de insetos, óvulos de pequenos animais, etc.). Caso o tecido a ser colhido seja muito mole, pode-se retirar um fragmento um pouco maior e imergi-lo no fixador por uns 10 minutos, após os quais o tecido poderá ser fragmentado, com auxílio de um bisturi, em pedaços menores, que serão transferidos para um tubo, contendo a solução fixadora. Normalmente é usado um tubo tipo Eppendorf, de 1,5 ou 2mL, preenchido com a solução fixadora, onde vários fragmentos da amostra podem ser imersos. Após 24-72 horas, a solução fixadora é substituída pelo tampão. O CM, como padrão, processa até 4 fragmentos de cada amostra, mas a entrega de maior quantidade de fragmentos assegura uma reserva em caso de necessidade de repetição do processo. Maior número de fragmentos só será processado quando solicitado.



No caso de **AMOSTRAS PARA MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA, AS DIMENSÕES PODEM SER MAIORES**, no limite das dimensões do suporte em que as mesmas serão montadas (STUB, ou placa de silício, ou outro).

Quanto à **SOLUÇÃO FIXADORA**, a mais utilizada para órgãos/tecidos é a solução de Karnovsky modificada, que é uma solução de glutaraldeído a 2,5% e formaldeído a 2% em tampão fosfato

0,1M pH7,2-7,4. O formaldeído possui melhor taxa de penetração no tecido, porém menor capacidade de formar ligações com as moléculas do mesmo e garantir a preservação. O contrário acontece com o glutaraldeído, que penetra mais lentamente, porém forma maior número de ligações com o tecido e estas são mais estáveis. Assim, enquanto o formaldeído penetra mais rápido evitando degeneração das células, o glutaraldeído segue garantindo a fixação. Entretanto, é ideal que se faça a pesquisa de artigos que tratam de amostras semelhantes às que serão avaliadas pelo usuário, pois algumas variações na solução fixadora podem render melhor conservação das estruturas. Por exemplo, é comum em tecidos moles, cuja taxa de penetração da solução é facilitada, utilizar uma solução contendo somente glutaraldeído. Também no caso de tecidos muito moles e com alto teor de água, como tecidos embrionários, pode-se utilizar tampões com molaridade menor. Ainda, existem casos em que determinados tipos de células não reagem bem em contato com um dos componentes da solução de Karnovsky, principalmente com o formaldeído e, portanto, o mesmo não deve ser utilizado. Por outro lado, quando se prepara amostras para imunomarcação, é o glutaraldeído que deve ser evitado, pois suas ligações no tecido indisponibilizam os radicais para ligação dos anticorpos. Assim, é sempre muito importante a escolha cuidadosa do fixador que será utilizado na fixação primária de suas amostras.

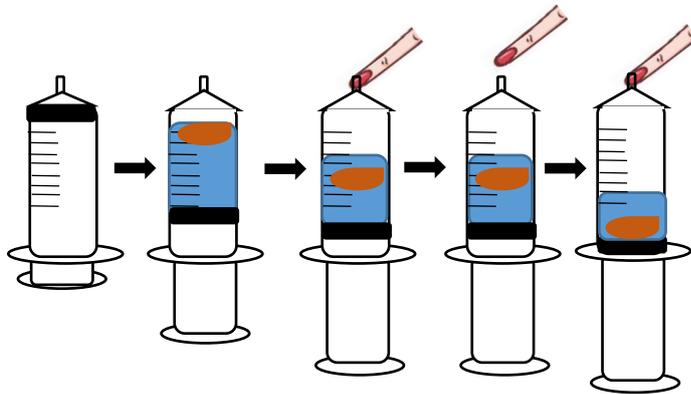
No preparo do fixador, é muito importante que o glutaraldeído usado seja de grau I, para microscopia eletrônica. O formaldeído, por sua vez, deve ser preparado a partir de paraformaldeído (não utilizar formol ou formalina, pois são produtos que contêm metanol em sua fórmula, que interfere na preservação da ultraestrutura). O ideal é que a solução fixadora seja fresca ou, então, congelada até o momento da sua utilização, em frascos completamente cheios da solução (o ar oxida os reagentes, levando à formação de ácidos que degradam a estrutura). Ainda, deve-se evitar descongelar e congelar novamente a solução, o que acelera sua degradação. Atenção: os fixadores são tóxicos e devem ser manuseados com máscara e sob capela de exaustão!

Quanto ao tampão para preparo do fixador e posterior armazenamento da amostra, é comum o uso do tampão fosfato 0,1M, pH 7,2 a 7,4, o qual possui características mais próximas dos fluidos fisiológicos. No entanto, caso as amostras precisem ser armazenadas por mais tempo, indica-se o tampão cacodilato 0,1M pH 7,2-7,4, já que o mesmo contém arsênio em sua constituição, o que impedirá a contaminação da amostra com microrganismos. No entanto, esse tampão é mais caro e tóxico, devendo ser utilizado somente quando necessário.

O CM fornece as soluções fixadoras mais utilizadas para a microscopia eletrônica e, para solicita-las, o usuário deve enviar mensagem para o e-mail pbiomet@microscopia.ufmg.br ou pbiomev@microscopia.ufmg.br, com, no mínimo, uma semana de antecedência, especificando as soluções, o volume e o número de alíquotas que necessita, além do número da proposta. As soluções fixadoras e tampões fornecidos pelo CM estão detalhados na tabela de custos para preparação de amostras biológicas, disponível em nossa página online.

COLHEITA E FIXAÇÃO DE **TECIDOS VEGETAIS** PARA PREPARAÇÕES DE ROTINA
(TEMPERATURA AMBIENTE)

No caso de tecidos vegetais, os processos de colheita e fixação primária são muito semelhantes aos descritos para tecidos animais, inclusive com o uso das mesmas soluções fixadoras e tampão. Entretanto, existe um fator que dificulta a fixação de amostras vegetais, que é a grande quantidade de ar que pode ser encontrada dentro das células. Por isso, é comum os fragmentos das amostras “boiarem” o que não permite a penetração correta do fixador no tecido. Uma forma de minimizar essa condição é fazer a fixação sob vácuo. As amostras colhidas, com as dimensões adequadas, são imersas no fixador e levadas à uma câmara de vácuo, para eliminação do ar da solução. Caso isso não seja possível (por exemplo, quando a colheita é feita em campo), pode ser feito o uso de uma seringa, sem agulha, com o fixador e a amostra dentro. Ao puxar o êmbolo e controlando a abertura da agulha com o dedo, consegue-se produzir vácuo dentro da seringa. O processo é repetido até que seja observada a amostra “afundar” na solução.



COLHEITA E FIXAÇÃO DE **CÉLULAS EM CULTIVO ADERIDAS OU EM SUSPENSÃO**, PARA
PREPARAÇÕES DE ROTINA (TEMPERATURA AMBIENTE)

Células em cultivo são normalmente fixadas com solução contendo somente glutaraldeído (mais comumente a 2 ou 2,5% em tampão fosfato 0,1M, pH 7,2-7,4), uma vez que são totalmente envolvidas pelo fixador e basta o glutaraldeído para garantir a fixação. O tempo de fixação também é menor, entre 2 e 4 horas, uma vez que a solução fixadora banha diretamente as células.

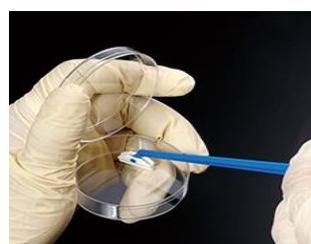
Todas as soluções usadas no processo de fixação das células devem estar, pelo menos, em temperatura ambiente, sendo o mais adequado aquecê-las à temperatura em que as células são cultivadas.

Importante, antes de fixar as células, é importante lavá-las, de preferência, com o próprio meio de cultivo, porém sem acréscimo de soro. A lavagem também é feita com PBS, mas

isso pode ser agressivo para as células. A lavagem eliminará da amostra restos celulares e proteínas do meio que interferem com o processamento, principalmente a formação de precipitados de soluções contrastantes. No caso de células em suspensão, o processo normalmente usado é o de centrifugação das células, com formação de um pellet, e ressuspensão do mesmo na solução de lavagem, repetindo o processo 3 vezes. Para células aderidas, faz-se a retirada do meio e o substitui pela solução de lavagem, por 3 vezes. Posteriormente, retira-se a solução de lavagem e coloca a solução fixadora, por 2 a 4 horas e, então, lava-se novamente as células, por mais 3 x, agora com o tampão puro, o mesmo em que foi preparada a solução fixadora. As células ficam armazenadas em tampão, em geladeira, até serem entregues no Centro de Microscopia para processamento.

No caso de células em suspensão, o processo mais usado é o de centrifugação das células, com formação de um pellet, e ressuspensão do mesmo na solução de lavagem (meio sem soro) e, então, em solução fixadora. Após 2 a 4 horas, centrifugar novamente e substituir o fixador pelo tampão puro. Esse processo deve ser realizado 3 vezes, para lavagem eficiente do fixador. Caso as células sejam muito sensíveis, a solução fixadora pode ser aquecida à temperatura em que o cultivo é mantido. Para análise por **microscopia eletrônica de transmissão**, após a última lavagem com tampão, centrifugar para **formar o pellet** e, então, levar à geladeira para armazenamento e posterior entrega no CM. Para análise por **microscopia eletrônica de varredura**, as células devem ser **depositadas em lamínulas revestidas com poli-L-lisina**, que devem ser mantidas imersas em tampão e levadas dessa forma ao CM. Caso necessite, o CM fornece as lamínulas para o usuário.

No caso de cultivo de células aderidas, para **microscopia eletrônica de transmissão**, uma das opções é a tripsinização das células, que se tornam suspensas e pode-se proceder da mesma forma como descrito para células em suspensão, com formação do **pellet de células**. Entretanto esse processo nem sempre é desejável, por interferir na ultraestrutura das células a serem analisadas. Assim, o método mais usado, para células cultivadas aderidas em placas ou garrafas de cultivo é o de, após fixação e lavagem das células, com o auxílio de um raspador de células, fazer a retirada das mesmas, utilizando uma pressão homogênea, de forma que as células são “descoladas” da placa ou garrafa, porém sem serem danificadas. O ideal é que se utilize garrafas de cultivo ou placas de cultivo com poços de maior diâmetro, que permitem uma raspagem eficiente e uma boa quantidade de células para formar o pellet. As células são então transferidas para tubos com tampão e centrifugadas para formar o pellet. Os pellets podem ser armazenados em geladeira para posterior entrega no CM.



Para **microscopia eletrônica de varredura**, as células deverão ser cultivadas sobre lamínulas revestidas, as quais serão lavadas e fixadas nas lâminas (substituição do meio pela solução fixadora), lavadas 3 vezes com o tampão e levadas dessa forma para preparação no CM.

Finalmente, em alguns casos, os objetivos do estudo por **microscopia eletrônica de transmissão** demandam a manutenção das células na monocamada de cultivo sobre a lamínula, como, por exemplo, quando se quer avaliar interações intercelulares. Neste caso, as células são preparadas pelo método de inclusão do tipo “**flat embedding**” e não podem ser tripsinizadas nem raspadas. A monocamada será processada e analisada no estado de monocamada. Esse processo é bem mais complexo e oneroso que os anteriores e só deve ser usado quando se tem uma justificativa bem clara para fazê-lo. Nesse caso, as células devem ser cultivadas em lâminas com câmaras para cultivo ou sobre lamínulas com espessura igual ou acima de 0,5mm - tipo 5 (O CM fornece lamínulas desse tipo). A fixação e a troca pelo tampão são feitas como explicado para células aderidas e as mesmas são levadas nessas condições para o CM.