

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

COMPARAÇÃO ENTRE PROTOCOLOS DE PREPARO DA MEMBRANA AMNIÓTICA PARA ANÁLISE EM MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

Gabriela Antonia Tie Calheiro, Luciana Barros Sant'Anna.

Universidade do Vale do Paraíba/Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento/Faculdade de Ciências da Saúde, Avenida Shishima Hifumi, 2911, Urbanova - 12244-000 - São José dos Campos-SP, Brasil, gabriela.atie@hotmail.com, lucianabsa@gmail.com.

Resumo

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) apresenta a capacidade de ampliação de uma amostra em 300.000 vezes ou superior. A MEV é capaz de fornecer rapidamente informações morfológicas da superfície de ambos os lados da membrana amniótica humana (MAH). Para que as imagens obtidas providenciem informações úteis e preciosas de sua topografia, é necessária a correta preparação das amostras. Objetivou-se comparar diferentes protocolos de preparação da MAH para MEV visando o estudo de sua morfologia em ambos lados (epitelial e mesenquimal). A partir de diferentes metodologias encontradas na literatura, definiu-se um protocolo base e os testes a serem realizados. O cacodilato de sódio foi definido como tampão ideal para as amostras fixadas em glutaraldeído + paraformaldeído. O tempo para reação de fixação é de 2 horas em temperatura ambiente. As amostras necessitam ser desidratadas em etanol 30%, 50%, 70% e 100%. Também deve-se realizar a secagem de ponto crítico utilizando-se de HMDS. Após testes obteve-se um protocolo eficaz, que manteve a integridade estrutural da MAH permitindo resolução satisfatória das imagens para o estudo pelo método da MEV.

Palavras-chave: Placenta. Microscopia Eletrônica de Varredura. Morfologia. Membrana Amniótica.

Área do Conhecimento: Biomedicina

Introdução

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) apresenta a capacidade de ampliação de uma amostra em 300.000 vezes ou superior, dependente do aparelho a ser utilizado, e possui ainda a possibilidade de determinação da composição química de uma amostra sólida (DEDAVID et al., 2007). Para a obtenção de imagens de alta qualidade sem a ocorrência de interferências a MEV utiliza o vácuo para realizar a propagação de um feixe de elétrons sem que haja interação com moléculas de gás e material particulado do ar (NGUYEN; HARBSON, 2017). Podemos dividir as amostras analisadas por MEV em três grupos: (a) amostras secas e condutoras, as quais podem ser fixadas e analisadas por método direto; (b) amostras secas e semicondutoras ou não condutoras, as quais tem que passar pelo processo de metalização (revestimento da amostra com uma fina camada de ouro por meio de pulverização); e (c) amostras úmidas, as quais se utilizam do processo de evaporação/desgaseificação com uso de carbono/nitrogênio que é um procedimento conhecido também por microscopia eletrônica de varredura ambiental ou de pressão variável (NGUYEN; HARBSON, 2017).

A utilização da membrana amniótica humana (MAH) em processos regenerativos seja por meio do cultivo de células ou na engenharia de tecidos como *scaffold*, se dá por suas células possuírem propriedades notáveis como potencial de diferenciação em todas as três camadas germinativas, propriedades imunomoduladoras, anti-inflamatórias, antifibróticas e pela capacidade que a membrana tem de beneficiar o processo de epitelização acelerando o processo cicatricial (WEIDINGER et al., 2021). Assim, a MAH tem se consolidado como adjuvante no tratamento de afecções da superfície ocular, em queimaduras, na prevenção de adesão tecidual em cirurgias da cabeça, abdômen, pelvis, vagina e de laringe, entre outros. Recentemente foi verificadas diferenças nas camadas celulares da MAH obtida das 2 diferentes regiões anatômicas, incluindo o âmnio placentário ou *placental amnion* (PA) (âmnio sobre o disco coriônico) e âmnio refletido ou *reflected amnion* (RA) (âmnio da parte extraplacentária das membranas fetais ou cório liso), porém, ainda não se conhece se essas regiões apresentam diferentes potenciais na regeneração tecidual, e os efeitos dos diferentes métodos de preservação sobre a integridade e morfologia das mesmas.

A análise morfológica das camadas celulares da MAH pode ser realizada por diferentes métodos, como por microscopia óptica, microscopia eletrônica de varredura (MEV) e microscopia eletrônica de

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

transmissão (MET). A MEV é capaz de fornecer rapidamente informações morfológicas da superfície de ambos os lados da MAH (camada epitelial e mesenquimal) e permite a visualização da aparência tridimensional, incluindo exame em pequenos aumentos e com grande profundidade de foco, o que se faz de extrema utilidade, pois a imagem eletrônica complementa a informação dada pela imagem óptica (DEDAVID et al., 2007). Para que as imagens obtidas da análise da membrana por MEV providenciem informações úteis e preciosas de sua topografia, é necessária a correta preparação das amostras. Analisando os estudos que utilizaram MEV em amostras de MAH foi verificada a heterogeneidade entre os protocolos para a análise (VON VERSEN-HÖYNCK et al., 2004; PENA et al., 2007; AB HAMID et al., 2012; AL SHEHADAT et al., 2018). Assim, antes de estudar os efeitos de diferentes métodos de preservação na integridade morfológica da MAH, é importante otimizar o método da MEV para este tipo de amostra, principalmente as etapas que antecedem a montagem do *stub* (fixação, pós-fixação, desidratação, secagem e metalização) para posteriormente serem submetidas à análise. Assim, o objetivo do presente trabalho foi comparar diferentes protocolos de preparação da MAH para MEV visando estudo da integridade morfológica, em ambos lados (epitelial e mesenquimal).

Metodologia

O presente estudo foi aprovado pelo CEP sob Protocolo No 5.172.755. Para sua realização foram obtidas 7 placentas humanas, advindas de gestação normal, cesárea eletiva, idade gestacional igual ou superior a 39 semanas. Tendo como pré-requisito a anamnese realizada durante a rotina hospitalar pela equipe de enfermagem, a conferência dos exames pré-natal, ausência de sinais gripais e histórico de Covid-19 nos últimos 14 dias, exames negativos para HIV-1 e 2, hepatite B e C e sífilis, e pôr fim a concordância da gestante expressa pela assinatura do Termo de Consentimento Livre Esclarecido.

Após o parto, as placentas foram colocadas em recipiente plástico estéril mantido sob refrigeração a 10°C, e transportadas pelo pesquisador ao laboratório onde em condições estéreis, foi realizada a separação manual da MAH do cório, lavada com solução fisiológica (0,9%), solução antibiótica e antifúngica (100 U/ml penicilina + 100 µg/ml estreptomicina e anfotericina B). Logo, foram cortados fragmentos de 3x3cm², dos quais foram obtidos 2 fragmentos circulares de 1x1cm², sendo um para análise do lado epitelial e outro para o lado mesenquimal, totalizando 168 fragmentos (Figura 1).

Após o processamento, deu-se início aos testes em cada etapa do método para MEV, baseando-se em protocolos encontrados na literatura (KOIZUME et al., 2000; VON VERSEN-HÖYNCK et al., 2004; NIKNEJAD et al., 2011; AB HAMID et al., 2014; AL SHEHADAT et al., 2018; ELAHI et al., 2019). A partir de um protocolo base propriamente definido foi realizada a otimização das etapas, sendo elas: fixação, pós-fixação, desidratação, secagem antecedendo a montagem do *stub* e metalização utilizando-se da MAH sem a aplicação de nenhum método de preservação. O protocolo base consistiu na fixação com glutaraldeído a 2,5%, paraformaldeído a 2,5% e tampão cacodilato de sódio a 0,05M em pH 7,2, por 12h a 4°C. Seguindo-se de lavagem em tampão *Phosphate-buffered saline* (PBS) 1X por meio de uma simples passagem. Para a desidratação das amostras realizaram-se três banhos de 10 minutos cada em concentrações diferentes de etanol (30%, 50% e 100%). Inicialmente as amostras foram secas em placas de 24 poços fechadas em estufa a 60°C por um período de 4 horas. Após a secagem as amostras foram revestidas com ouro (10nm) por meio de pulverização (*sputtering*) e montadas no suporte porta-amostra para MEV (*stub*) com auxílio de fita de carbono, e analisadas ao Microscópio Eletrônico de Varredura ZEISS EVO MA 10.

A partir do protocolo base foram determinadas as etapas a serem testadas para a otimização do protocolo de preparação da MAH para sua análise no MEV. Assim, na etapa da fixação a solução de glutaraldeído a 2,5% e paraformaldeído a 2,5% foi mantida, porém com alteração do tampão, sendo comparados os efeitos do tampão cacodilato de sódio a 0,05M em pH 7,2 (AB HAMID et al., 2014), e PBS 1X, pH 7,2 (KOIZUME et al., 2000; VON VERSEN-HÖYNCK et al., 2004; ELAHI et al., 2019). Durante a fixação, diferentes tempos e temperaturas foram testados, incluindo 12 horas a 4°C (AB HAMID et al., 2014), 2 horas a 4°C (AL SHEHADAT et al., 2018) e 2 horas a temperatura ambiente (ELAHI et al., 2019). Logo após a realização da fixação, as amostras foram submetidas a lavagens em solução tampão PBS 1X, pH 7,2. Neste protocolo, a etapa da pós-fixação com ósmio não foi realizada uma vez que o objetivo do trabalho foi a análise da superfície da MAH (VON VERSEN-HÖYNCK et al., 2004; AL SHEHADAT et al., 2018; ELAHI et al., 2019), e não visando o estudo da sua ultraestrutura.

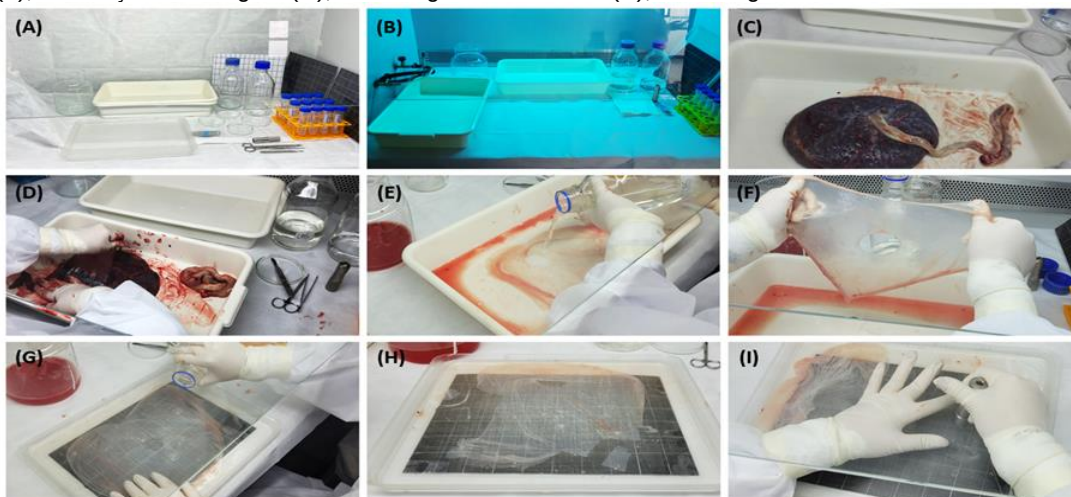
Em seguida à etapa da fixação/lavagem com tampão, foi realizado o processo de desidratação das amostras de MAH. Para isto foram realizados testes com diferentes concentrações crescentes de etanol

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

(de 30% a 100%) e diferentes tempos em cada concentração, além da adição da secagem de ponto crítico (química) como etapa final da desidratação. Sendo a MAH um tecido de espessura muito fina, e consequentemente susceptível à secagem extrema foi utilizada a combinação de etanol 100% + hexamethyldisilazane (HMDS) em concentração (1:1) visando maior controle do tempo de secagem das amostras (KOIZUME et al., 2000; AL SHEHADAT et al., 2018; ELAHI et al., 2019). Ademais, na etapa de secagem foram testadas diferentes superfícies de secagem para as amostras de MAH, incluindo lâmina de vidro, papel de nitrocelulose disposto no interior de placa de petri e placa de 24 poços. E, em seguida foi realizada a comparação da qualidade da secagem em temperatura ambiente comparada à secagem em estufa.

Todos os testes durante cada etapa do preparo das amostras da MAH para a análise em MEV foram realizados levando em conta os resultados obtidos nas etapas teste antecedentes, considerando-se as características macroscópicas e microscópicas (micrografias eletrônicas) obtidas ao final de cada procedimento de otimização, assim estabelecendo um protocolo otimizado. A etapa de pulverização e montagem do *stub* não sofreu nenhuma alteração, mantendo-se como descrito no protocolo base durante todas as etapas teste.

Figura 1 – Etapas do processamento da MAH contendo: preparação de fluxo laminar (A); desinfecção com luz U.V. (B); placenta in natura (C); separação da MA do córion materno (D); Lavagem com solução fisiológica, antibiótica e antifúngica (E); MAH com corte circular em porção central referente a posição do cordão umbilical (F); finalização da lavagem (G); corte fragmentos 3x3cm² (H); corte fragmentos circulares de 1x1cm² (I).



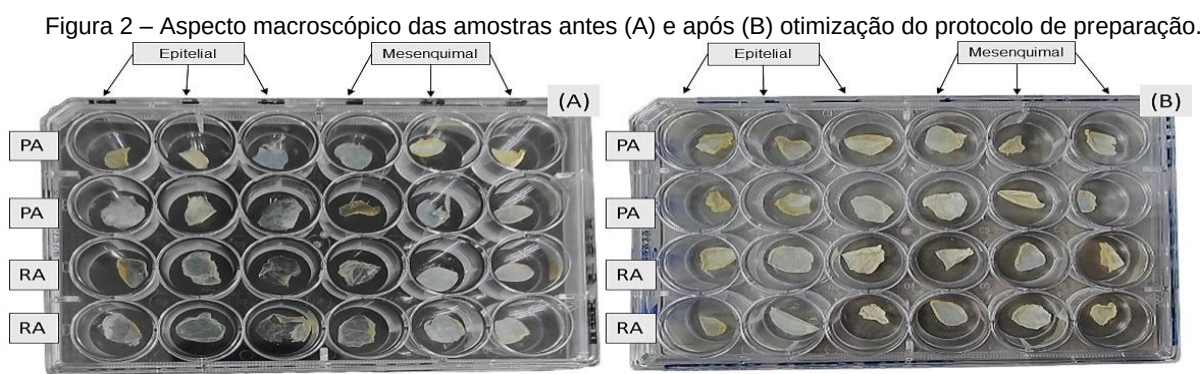
Fonte: o autor.

Resultados

Após a realização dos testes em cada etapa, notou-se que a fixação das amostras deve ser realizada com glutaraldeído (2,5%), paraformaldeído (2,5%) e tampão cacodilato de sódio 0,05M, em pH 7,2, por 2 horas em temperatura ambiente. Seguida de uma simples passagem em tampão PBS 1X, pH 7,2, desidratação em concentrações crescentes de etanol 30%, 50%, 70%, 100% e o procedimento de secagem de ponto crítico em 100% de etanol + HDMS por 5 minutos cada. Por fim, sua secagem realizada em temperatura ambiente por 12 horas, em placa de 24 poços fechada.

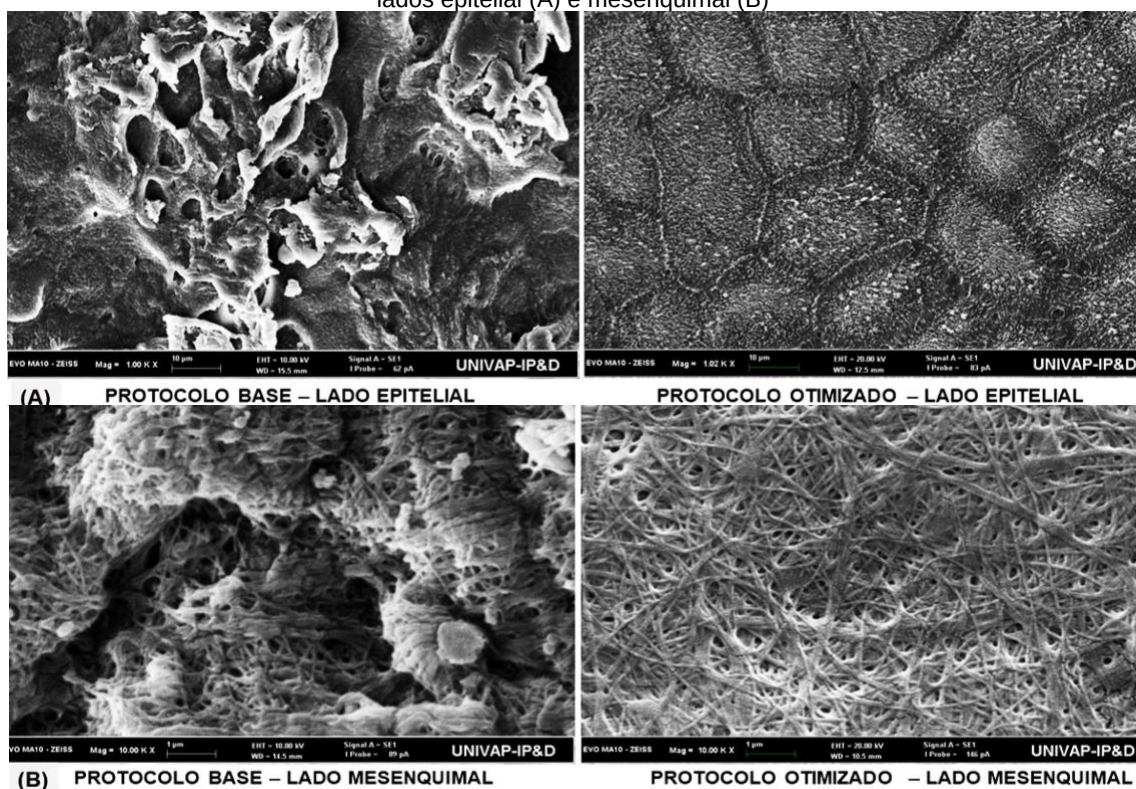
Pode-se definir por meio da macroscopia das amostras após a otimização do protocolo que seu aspecto ideal é composto por amostras brancas leitosas, soltas da placa, caracterizando a eficácia da preparação (Figura 2). Observou-se nas micrografias eletrônicas do protocolo base presença de deformação tecidual em ambos os lados, com descaracterização das células em seu lado epitelial. No lado mesenquimal a trama de fibras colágenas apresentou-se densa, com superfície ondulada e formação de fendas entres as fibras (Figura 3). As micrografias eletrônicas referentes ao protocolo otimizado, apresentaram células hexagonais, globosas, com microvilos roliços, densos e aglomerados na região apical das células, e nas bordas das células estabelecendo as ligações celulares ou pontes citoplasmáticas em seu lado epitelial. Em seu lado mesenquimal, visualizou-se presença de trama de fibras colágenas densa, bem definida, assim como homogênea e de superfície lisa (Figura 3).

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições



Fonte: o autor.

Figura 3 – Micrografias eletrônicas da MAH antes e após a otimização do protocolo do método para MEV nos lados epitelial (A) e mesenquimal (B)



Fonte: o autor.

Discussão

A resolução final obtida pela análise das amostras submetidas a MEV é controlada pela otimização do processo de preparação dessas, e dos parâmetros instrumentais utilizados. As amostras biológicas, em sua maioria são compostas de material não condutor, apresentando sensibilidade térmica e fragilidade, com a necessidade de estabilização para não a danificar e não gerar artefatos de imagem. Assim sendo, as amostras da MAH analisadas por meio da MEV necessitam passar por procedimento de fixação química, para preservação e estabilização de sua estrutura. Para isso agentes aldeídos como o glutaraldeído e formaldeído/paraformaldeído são utilizados, podendo também ser combinados entre si ou com outros fixadores (AL SHEHADAT et al., 2018).

O processo de fixação química foi realizado com a combinação dos aldeídos glutaraldeído e paraformaldeído, que demonstraram eficácia e capacidade de fornecer estabilidade e preservar

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

estruturalmente as amostras da MAH. A fixação através de formaldeído leva um maior tempo devido ao seu caráter polimérico (maior parte apresenta-se como polímero baixo), sua ligação inicial a proteína não é concluída antes de 24h (HELANDER, 1994). Já o glutaraldeído por possuir uma molécula maior, apresenta ação fixadora química mais rápida devido à presença de mais grupos aldeídos livres ($-CHO$) (MONSAN et al., 1975; KIERNAN, 2000).

A redução do tempo de fixação de 12 horas para 2 horas, e a alteração na temperatura de 4°C para temperatura ambiente mostraram-se eficientes para a preservação morfológica da MAH. A partir do aumento da temperatura durante o procedimento houve a potencialização da ação dos agentes fixadores (aldeídos) se comparados a temperatura anteriormente utilizada, contribuindo para a diminuição do tempo empregado para a fixação. O princípio da distribuição de Maxwell-Boltzmann explica que em qualquer temperatura existe uma distribuição, em que energias cinéticas moleculares sob temperaturas mais elevadas, deslocam-se no sentido de obtenção de um número maior de moléculas rápidas e menor de moléculas lentas (RUSSEL, 1994), sendo assim o aumento da temperatura deve produzir um aumento de velocidade de reação.

A MAH possui composição prevalescente de moléculas proteicas, sendo colágenos, fibronectina, proteoglicanos além de ácido hialurônico (LEAL-MARIN et al., 2021). O uso da solução tampão de cocodilato de sódio associada a manutenção do pH em 7,2 durante a fixação permitiu a neutralização e tamponamento, não causando acidificação da amostra e evitou a modificação estrutural das proteínas da MAH, assim como a lavagem em tampão PBS entre as etapas de fixação e desidratação.

A desidratação em volumes crescentes de álcool (solvente orgânico) permitiu a secagem das amostras por reação intermolecular (substituição das moléculas de água pelas do etanol), e o aumento de graduações intermediárias e a diminuição do tempo em cada concentração de etanol evitou o colapamento das projeções citoplasmáticas no espaço intercelular visualizado nas micrografias, assim preservando a estrutura celular. Houve a adição da secagem de ponto crítico (química) com HMDS, permitindo um maior controle do tempo de secagem (AL SHEHADAT et al., 2018).

Durante a etapa de secagem de ponto crítico, o HMDS combinado a baixa tensão superficial do etanol (HMDS, 18 mN/m; etanol, 22 mN/m) e a baixa pressão de vapor da água contida no tecido (HMDS, 23 mmHg; água, 17,5 mmHg) possibilitou a secagem do próprio HMDS da amostra (SCHU et al., 2021). Essas propriedades se traduzem em taxas de secagem mais baixas, e a transição líquido-gás induzindo um menor estresse mecânico na microestrutura da MAH. As potenciais propriedades de reticulação do HMDS para amostras biológicas também foram sugeridas como uma razão para o menor encolhimento dos tecidos biológicos durante a secagem (LEE; CHOW, 2011). Sendo uma escolha eficaz para adição no protocolo de preparo das amostras.

Na última etapa, a metalização das amostras se faz necessária devido ao caráter isolante/não condutor das amostras de MAH, sendo realizada a pulverização de fina camada de ouro possibilitando a submissão ao vácuo no interior do MEV sem a ocorrência de distorção durante a ação dos elétrons, possibilitando a formação de imagem clara e de alta resolução (NGUYEN; HARBSON, 2017).

Dentre os estudos já realizados com a aplicação do uso da MEV para estudos da MAH o uso do glutaraldeído como agente fixador é predominante (KOIZUME et al., 2000; VON VERSEN-HÖYNCK et al., 2004; NIKNEJAD et al., 2011; AB HAMID et al., 2014) em comparação ao formaldeído/paraformaldeído (ELAHI et al., 2019). Cada protocolo apresentado por seus autores demonstra diferenças entre as etapas, sendo as principais variações no tempo e temperatura de fixação, aplicação da etapa de pós fixação, aplicação de lavagens em solução tampão. A desidratação em etanol em concentrações crescentes foi aplicada em todos os protocolos. Em sua maioria houve a realização da etapa de secagem de supercrítica em HMDS (método químico). A secagem de ponto crítico por meio de secador (método físico) foi aplicada apenas em um dos estudos (NIKNEJAD et al., 2011).

Conclusão

Após realização de testes com variação na temperatura e tempo de fixação, tempo de exposição às soluções de desidratação e suas concentrações, adição de secagem supercrítica e alteração no recipiente (superfície de apoio) das amostras, e sobretudo no modo de secagem, estabeleceu-se um protocolo eficaz, que manteve a integridade estrutural da MAH permitindo resolução satisfatória das imagens da MAH para o estudo de sua integridade morfológica pelo método da MEV.

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

Referências

- AL SHEHADAT, S. et al. Optimization of scanning electron microscope technique for amniotic membrane investigation: A preliminary study. **European journal of dentistry**, v.12, n.4, p. 574-578, 2018.
- AB HAMID, S. S. et al. Scanning electron microscopic assessment on surface morphology of preserved human amniotic membrane after gamma sterilisation. **Cell and tissue banking**, v. 15.1, n.1, p. 15-24, 2012.
- DEDAVID, B. A. et al. Microscopia eletrônica de varredura: aplicações e preparação de amostras: materiais poliméricos, metálicos e semicondutores. **Porto Alegre: EdUPUCRS**, 2007. 60p.
- HELANDER, K. G. Kinetic studies of formaldehyde binding in tissue. **Biotech Histochem**, v. 69, n. 3, p. 177-179, 1994.
- KIERNAN, J. A. Formaldehyde, formalina, paraformaldehyde and glutaraldehyde: What they are and what they do. **Microsc Today**, v.1, p. 8-12, 2000.
- KOIZUMI, N. et al. Cultivation of Corneal Epithelial Cells on Intact and Denuded Human Amniotic Membrane. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 41, n. 9, 2000.
- LEE, J. T. Y.; CHOW, K. L. SEM sample preparation for cells on 3D scaffolds by freeze-drying and HMDS. **Scanning**, v. 34, n. 1, p. 12–25, 2011.
- LEAL-MARIN, S. et al. Human Amniotic Membrane: A review on tissue engineering, application, and storage. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 109, n. 8, p. 1198-1215, 2021
- MONSAN, P. et al. Mechanism of glutaraldehyde-protein bond formation. **Biochimie**, v. 57, p. 1281-1292, 1975.
- NGUYEN, J. N. T.; HARBSON, A. M. Scanning Electron Microscopy Sample Preparation and Imaging. **Methods in Molecular Biology**, v. 1606, n. 1, p. 71-84, 2017.
- NIKNEJAD, H. et al. The effects of preservation procedures on amniotic membrane's ability to serve as a substrate for cultivation of endothelial cells. **Cryobiology**. v. 63, n. 3, p. 145-151, 2011.
- PENA, J. D. de O., et al. Análise ultraestrutural e de fatores de crescimento de diferentes métodos de preservação da membrana amniótica utilizada em cirurgia ocular. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, v. 70, n.1, p.756-762, 2007.
- RUSSEL, J. B. Química geral (2.ed). **São Paulo: Makron Books**, 1994.
- SCHU M. et al. Scanning electron microscopy preparation of the cellular actin cortex: A quantitative comparison between critical point drying and hexamethyldisilazane drying. **PLoS ONE** v.16, n. 7, p. 1-14, 2021.
- VON VERSEN-HÖYNCK, F. et al. The influence of different preservation and sterilisation steps on the histological properties of amnion allografts—light and scanning electron microscopic studies. **Cell and Tissue banking**, v. 5.1, n.1, p. 45- 56, 2004.
- WEIDINGER, A. et al. Sub-Regional Differences of the Human Amniotic Membrane and Their Potential Impact on Tissue Regeneration Application. **Frontiers Media S.A: Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 8, 2021.