



I Ciclo de Treinamentos

Preparo de Amostras

Laboratório de Imagens Biológicas



CNPq

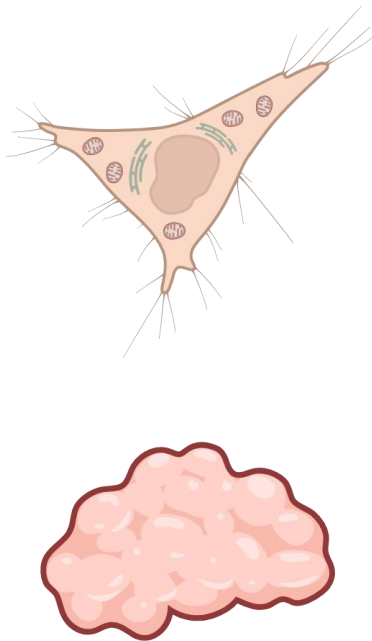
MINISTÉRIO DA
CIÊNCIA, TECNOLOGIA
E INOVAÇÃO



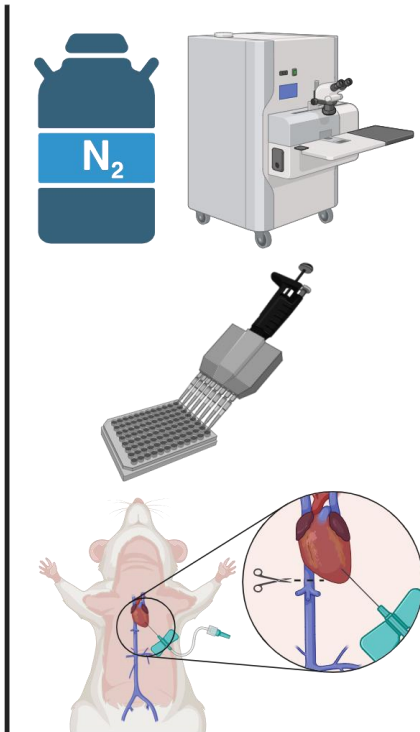
Preparo de Amostras

- Etapas necessárias para assegurar a condição experimental ideal para investigação
- Fixação ou Não.
- Contraste (substâncias fluorescentes).
- Condições experimentais (tampões, temperatura, ambiente atmosférico).

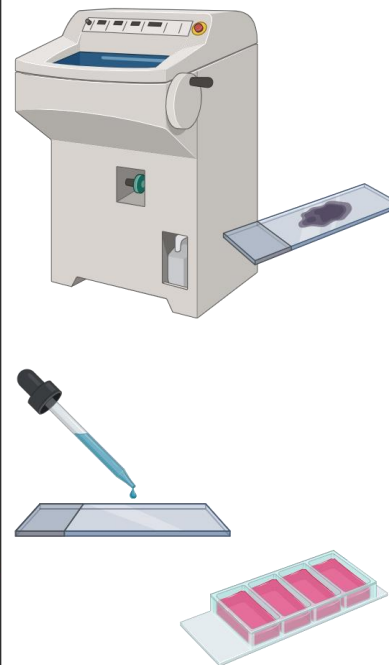
Cell / Tissues



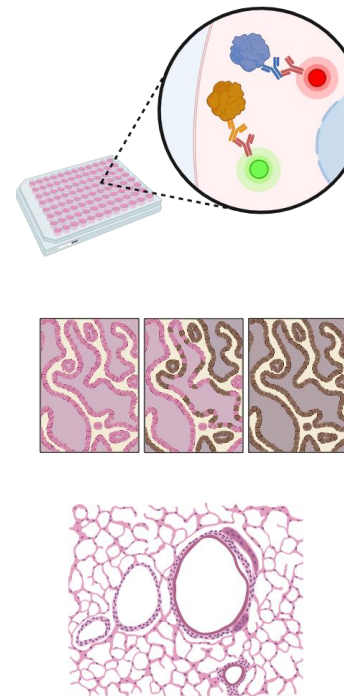
Fixation



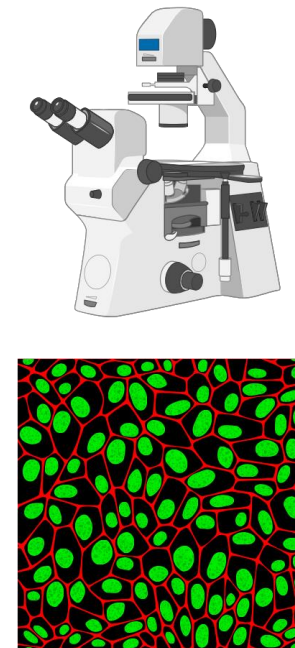
Pre-staining



Staining

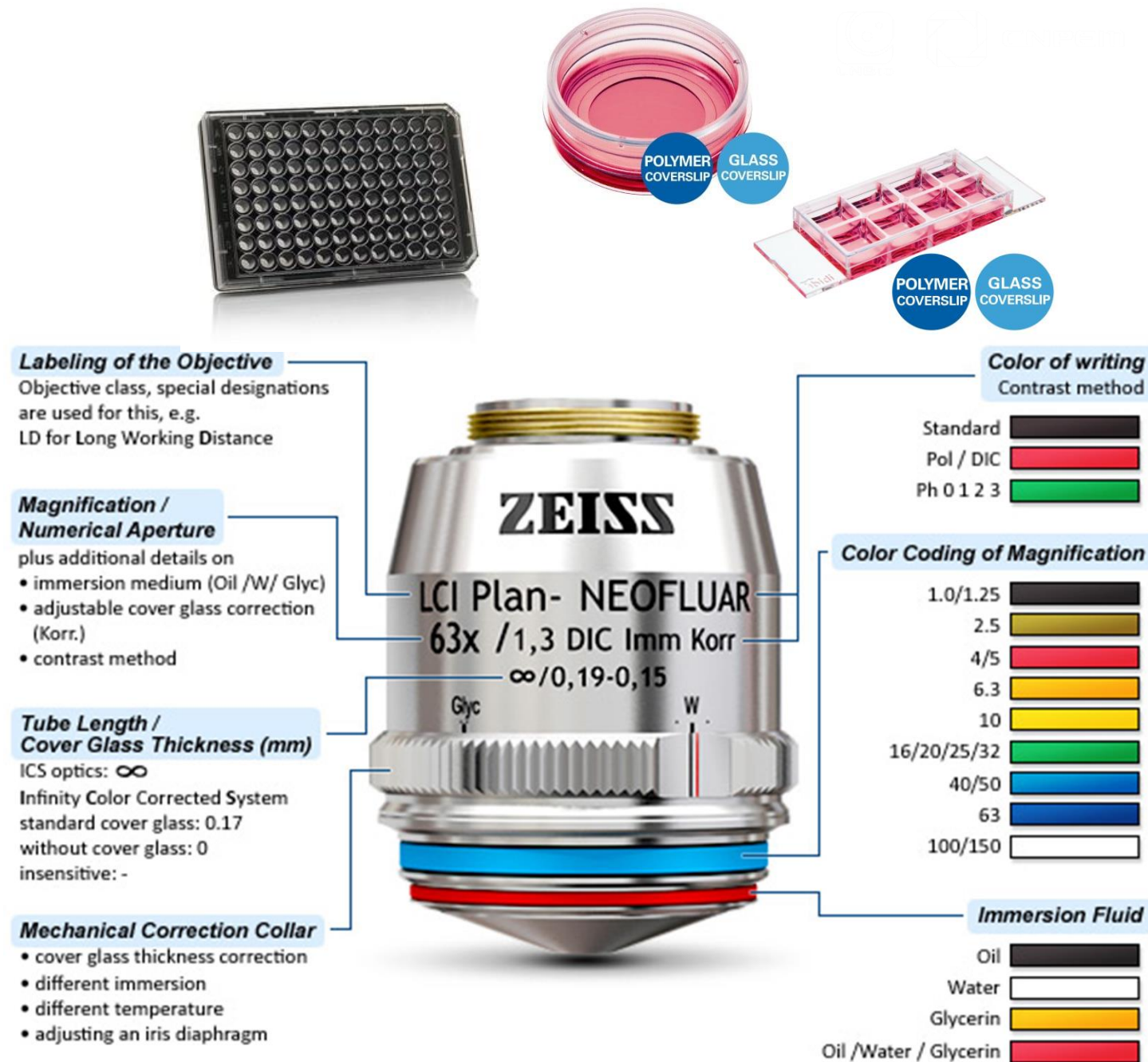


Imaging

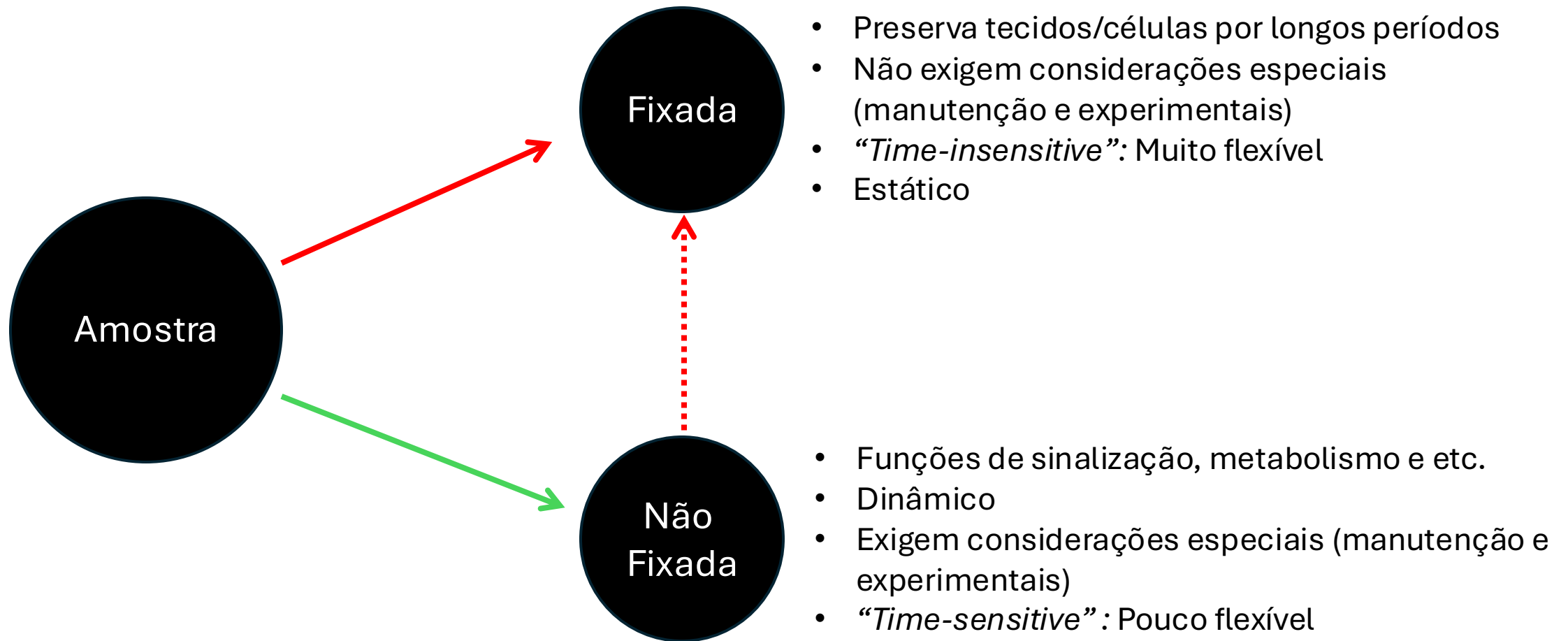


Escolha o material de cultura adequado!

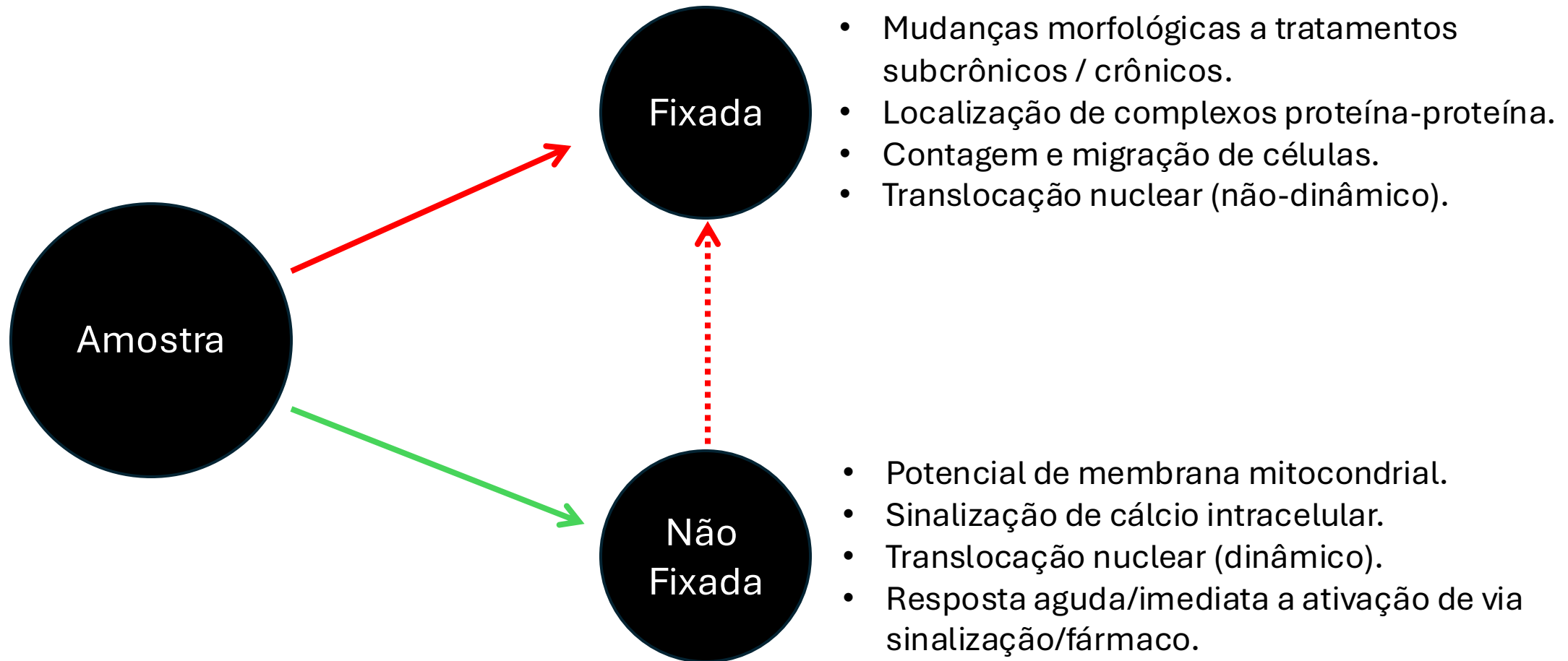
- Tipo de material de cultivo - Compatível com objetiva a ser utilizada.
- 5 a 20x (Dry) – Compatível com plástico.
- 20x-40x (Water) - Compatível com plástico especial (0,19mm) ou vidro (0,17mm).
- 40x,60x,100x (Oil) - Compatível apenas com vidro (0,17mm).



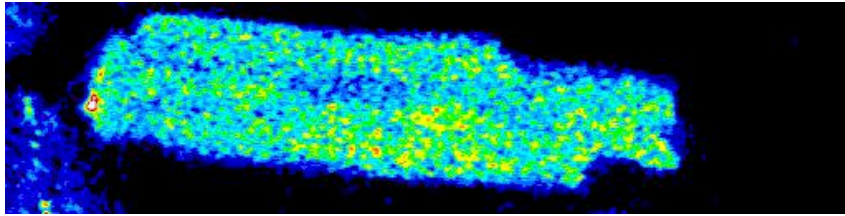
Tipos de Amostras



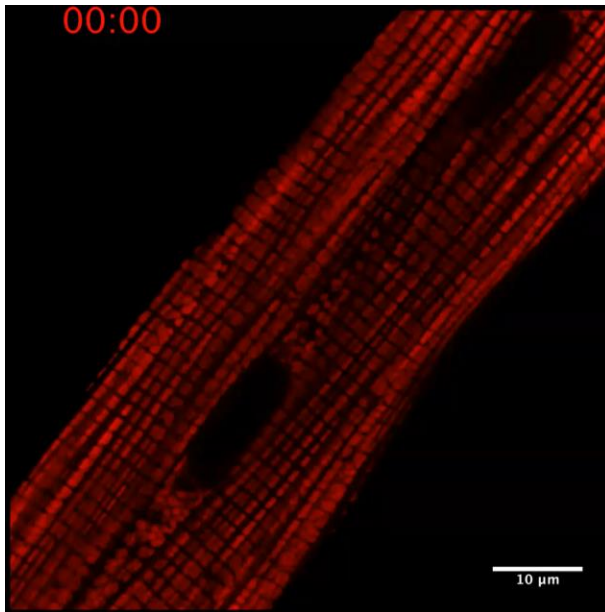
Tipos de Amostras



Amostras vivas (Não fixadas)

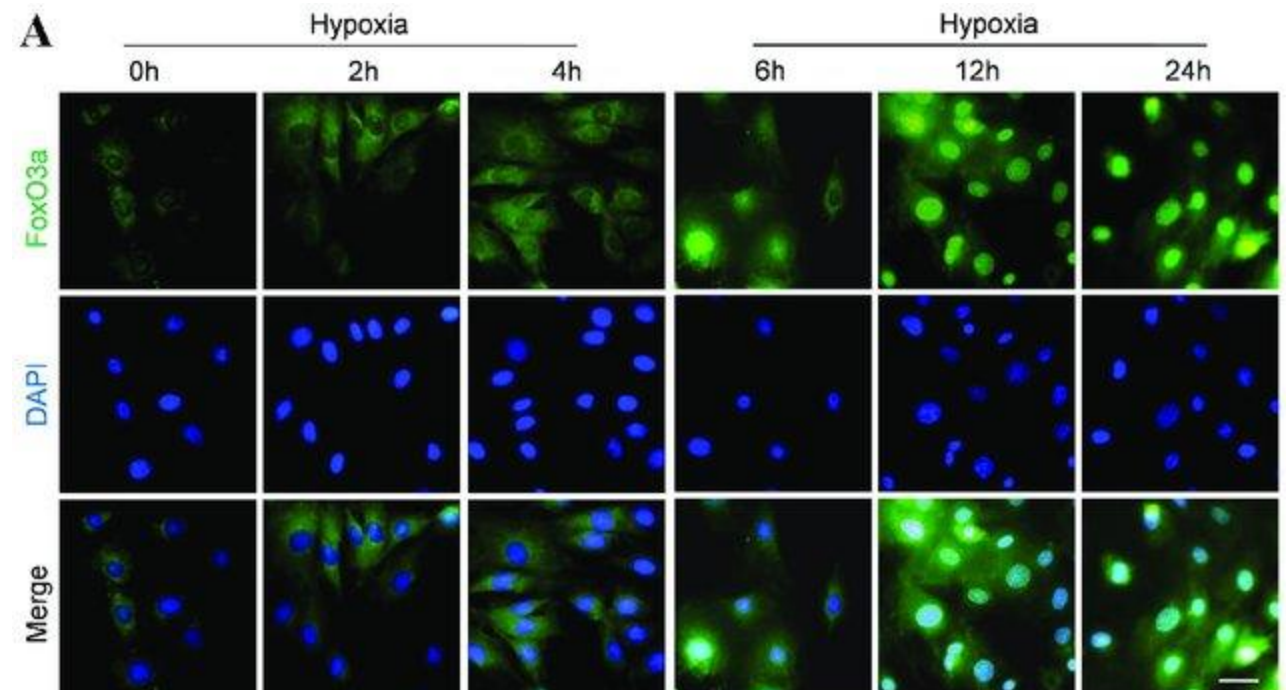


Fluo-4 – Calcium sensitive Dye (Cardiac cell)



TMRM – Mitochondrial Potential (Cardiac cell)

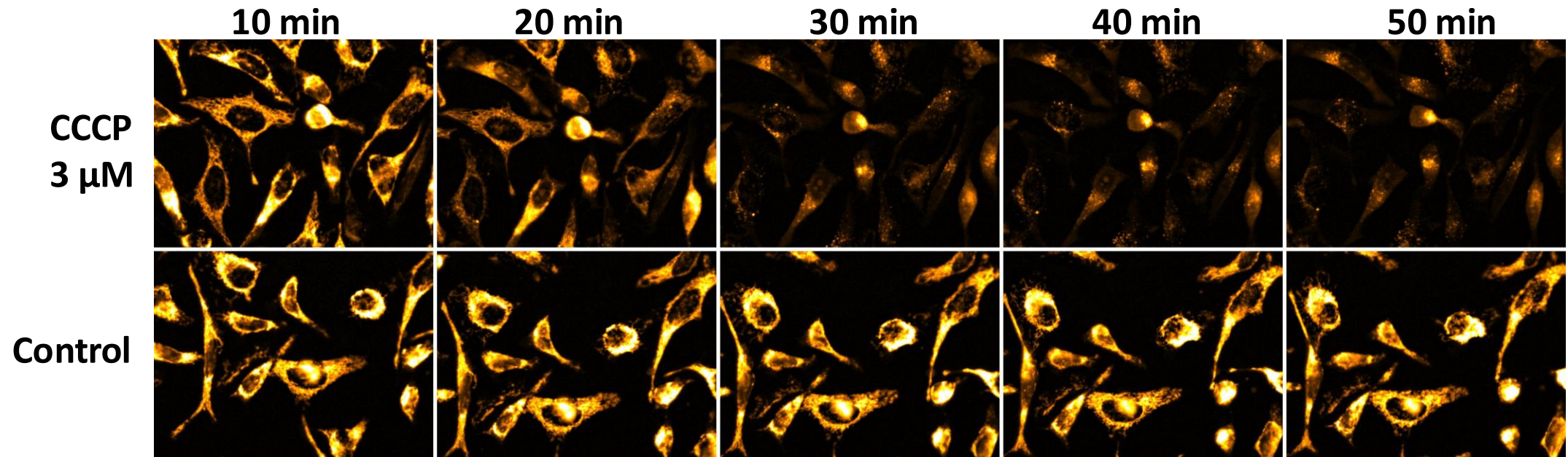
- Funções fisiológicas (sinalização, metabolismo) preservadas.
- ***Precisa ser mantido dessa forma!***
- Ambiente
- Nutrientes
- Pouca flexibilidade



•DOI: [10.1371/journal.pone.0080342](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0080342)

Amostras vivas (Não fixadas)

- Funções fisiológicas (sinalização, metabolismo) preservadas.
- ***Testes farmacológicos agudos.***



Mitochondrial Membrane Potential
(TMRM)

Amostras vivas (Não fixadas)

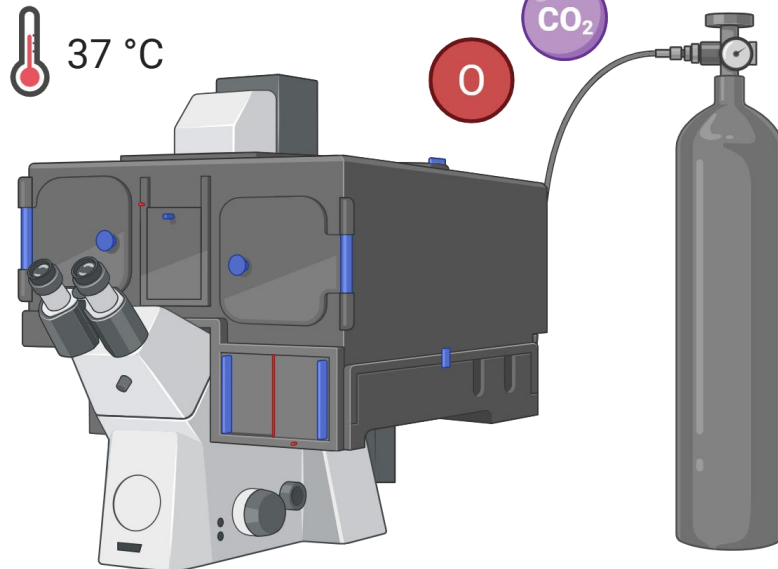
Ideal Solution



Ideal pH



Correct Environment



- PBS não é ideal para medidas de células vivas, não contem nutrientes (glicose, aa).
- Médio prazo (minutos a poucas horas), soluções salinas fisiológicas. (Ex. 140 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 1.8 mM CaCl₂, 1.0 mM MgCl₂, 20 mM HEPES, 5 mM glicose, pH = 7.4)
- Longo prazo (horas a dias): Meio de cultura (Sem vermelho de fenol).

Amostras vivas (Não fixadas)

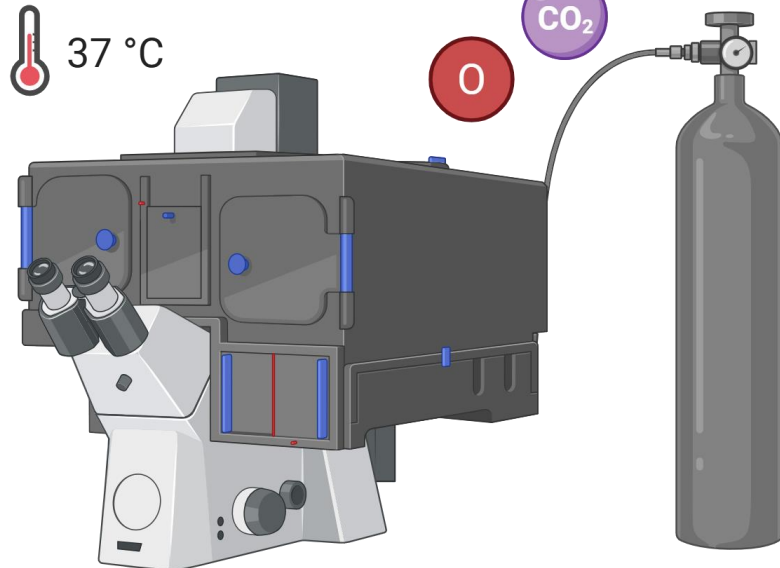
Ideal Solution



Ideal pH



Correct Environment



HENDERSON-HASSELBALCH

$$\text{pH} = \text{6.1} + \log \left[\frac{\text{HCO}_3^-}{0.03 \times \text{pCO}_2} \right]$$

Dissociation Constant

Bicarbonate (mmol/L)

CO₂ Solubility Constant

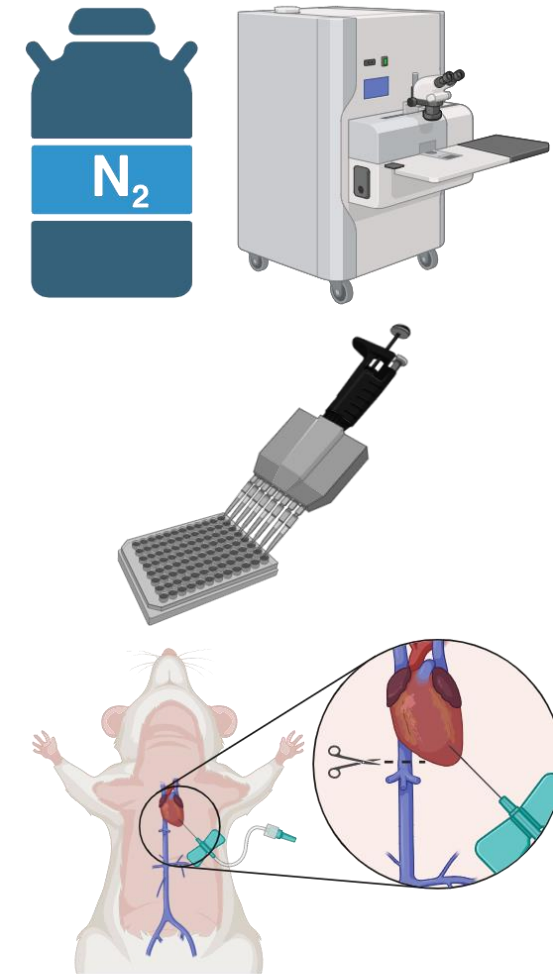
CO₂ Partial Pressure (mmHg)

- Dependência de CO₂:
- Meios de cultura: Bicarbonato (23 a 25mM).
- 5% CO₂ – pCO₂: ~ 40 mmHg.
- Sem CO₂: HEPES - 6.8 a 8.2 (pKa = 7.48)
Baixa interação com íons.
5 a 25 mM (10-20mM).

Fixação

- Preservar tecido/células próximo ao estado natural.
- Estabilidade química e física da amostra para permitir o preparo que seria difícil/impraticável *in vivo/ex vivo*.
- Muito flexível em termos de técnicas.

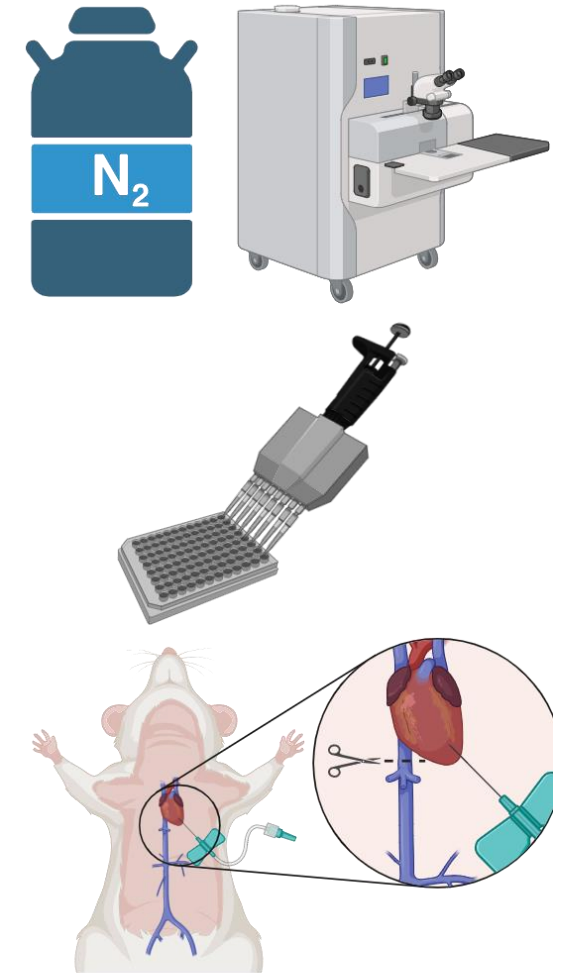
Fixation



Fixação

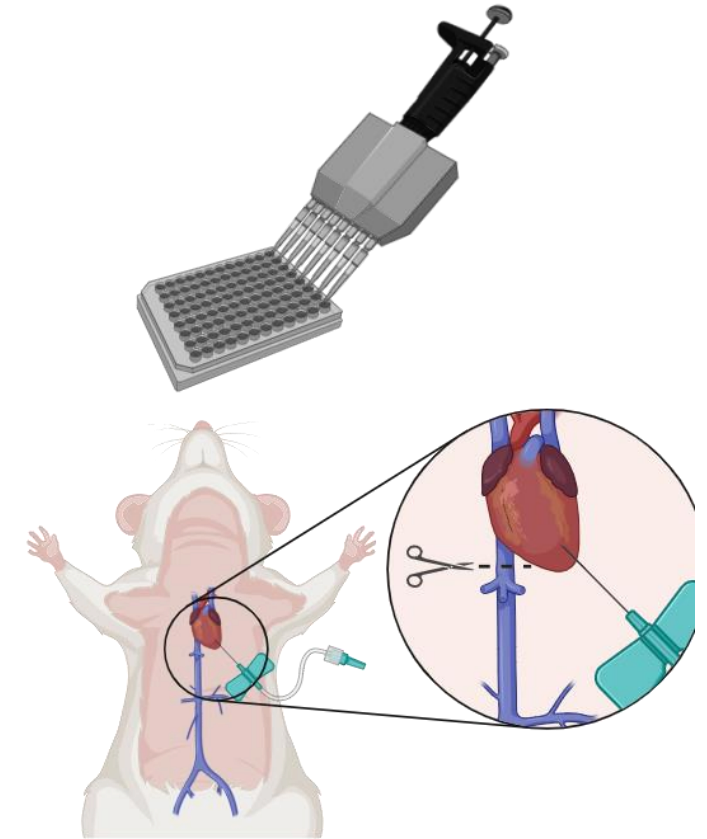
- Física:
 - Congelamento – Evitar danos por congelamento (formação de cristais de gelo). Congelamento rápido (Plunging / HPF / Isopentano-2metilbutano) - Crioprotetores.
 - Evitar nitrogênio líquido para tecidos, tendencia de formar rachaduras.
- Químicos:
 - Cross-linking (Aldeídos): Formalina (10%), Paraformaldeído (4%), Glutaraldeído.
 - Precipitação (Etanol, Metanol, Acetona – em geral gelados 4 a -20°C).

Fixation



Fixação

- Químicos:
 - Formalina: Estável. Ideal para histologia convencional. Formulações podem conter metanol e outros aditivos que podem reduzir a compatibilidade da imunomarcação.
 - Para formaldeído (em PBS): Fixador de escolha para imuno marcação. Não tão estável em solução, mantido por curtos períodos de tempo (descartar caso tenha precipitação).
 - Glutaraldeído: Molécula maior que apresenta maior fixação necessária para métodos de altíssima resolução, sendo método de escolha para microscopia eletrônica. Porém apresenta menor permeabilidade, menor compatibilidade com imuno marcação. Pode ser combinado com para formaldeído para melhor balanço entre fixação e compatibilidade.



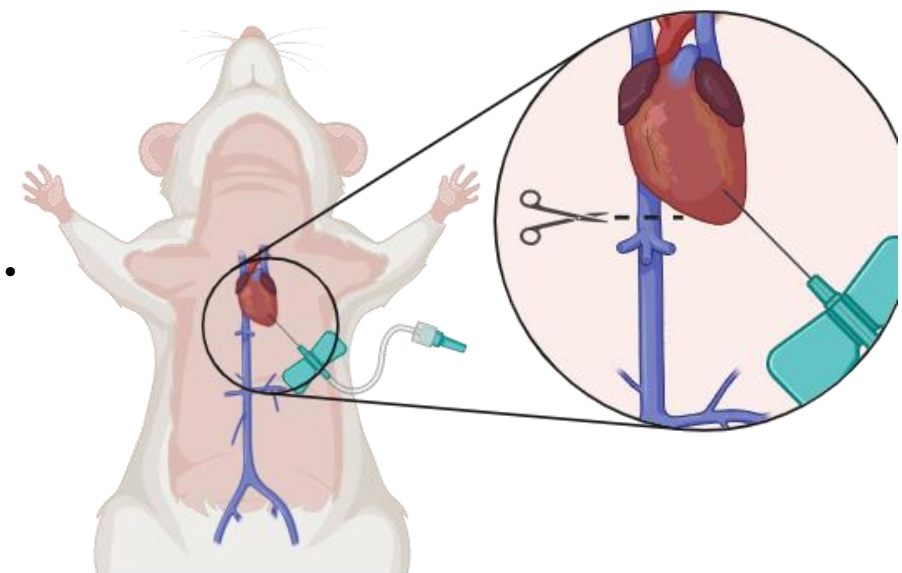
Fixação

- Imersão
 - Simples e pratico.
 - Ideal para células (monocamadas ou organoides).
 - Tecidos pequenos (biopsias) e cortes histológicos (< 100 um).
 - Penetração lenta.
 - Ex. Monocamada de células:
PFA 4% por 15min.
Metanol gelado (-20°C) por 10 minutos.
PFA 3 % / 0.1% Glutaraldeído.



Fixação

- Perfusão *in situ* ou *ex vivo*
 - Usar o sistema vascular para distribuir a solução fixadora.
 - Necessita treinamento.
 - Volumes maiores de fixadores.
 - Ideal para órgãos inteiros e tecidos maiores.
 - Ex. Camundongo *in situ*:
PBS + Heparina (15 a 20ml)
PFA 4% (15ml).
Imersão por 24h+ em PFA 4% (4°C)



Preparação

- Tecidos:
 - Em geral precisam ser cortados em cortes finos para melhor visualização nos microscópios.
 - Estabilizar o tecido para o corte:
 - Congelados: OCT – Criostato.
 - Fixados: Parafina – Micrótomo.
 - Tecidos vivos e fixados (grossos): Agarose – Vibratomo (usar tampão adequado). Tecidos cortados vivos podem ser usados para experimentos in vivo ou fixados para processamento.

Pre-staining



Preparação

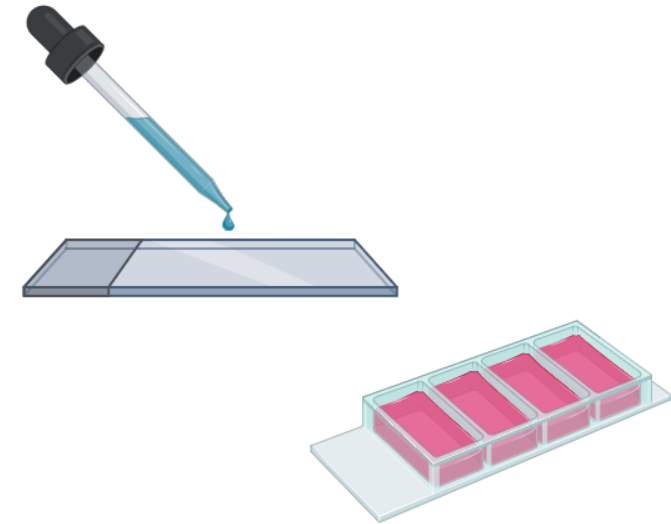
- Congelar ou emblocar em Parafina?
 - Ambos tem vantagens e desvantagens.
- Parafina: Método de escolha para histologia convencional. Armazenamento pratico e de longa duração. Equipamentos e reagentes de rotina.
- Congelar: Método de escolha para imuno marcação. Cortes devem ser mantidos em -80°C.

Pre-staining



Preparação

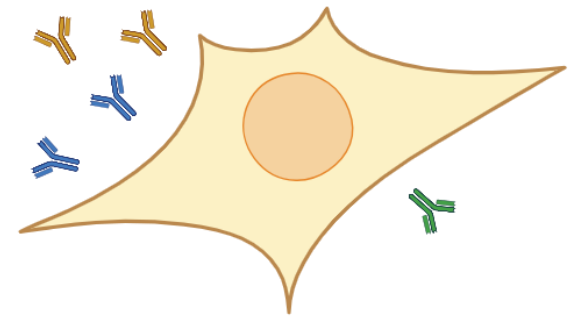
- Inclusão em parafina exige processamento antes e depois dos cortes para uso tanto para histologia convencional como para imuno marcação.
 - Desidratação (etanol) > Diafanização (xilol) > Parafina > Desparafinização (xilol) > Rehidratação.
 - É comum precisar de um procedimento de recuperação de antígeno.
- Não requer uma etapa inicial de fixação. Não exige processamento adicional. Cortes congelados de tecidos não-fixados exigem fixação química antes de continuar o processamento.



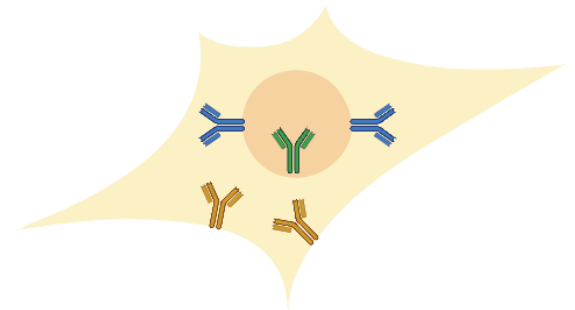
Preparação

- Para Imunomarcacão / Hibridização:
 - Anticorpos, Ac. Nucleicos, proteínas não tem acesso.
 - Membranas (Plasmática, nuclear) - Permeabilização.
- Triton X-100 (0.1–0.5%): Dissolve os lipídios da membrana. Detergente de escolha - eficaz para antígenos citoplasmáticos e nucleares. Risco de danos aos proteínas da superfície celular.
- Saponina: Interage o colesterol para criar poros. Ideal para as proteínas de membrana (Golgi ou do retículo endoplasmático). É menos eficiente em membranas pobres em colesterol (envelope nuclear ou mitocôndria).
- Tween-20: Detergente suave, usado como alternativa delicada ao Triton X-100. Mais usado reduzir background quando adicionado ao tampão de lavagem (imuno marcação).

Normal Membrane



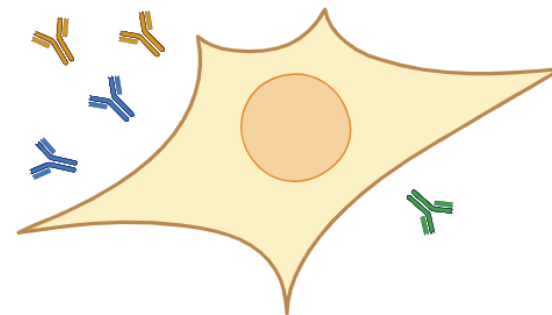
Permeabilized



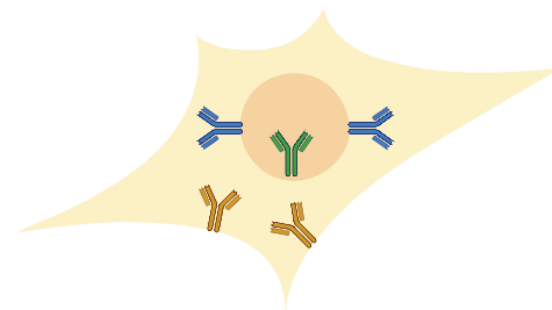
Preparação

- Para Imunomarcação / Hibridização:
 - Solventes Orgânicos causam permeabilização: Metanol e Acetona.
 - ***Depende da preparação / métodos / reagentes.***
 - Ex. Monocamada de células:
 - Triton-X 0.1% por 10min.
 - Ex. Cortes de tecidos (> 100um):
 - Triton-X 0.5% / Saponina 0.1% por 24h.

Normal Membrane



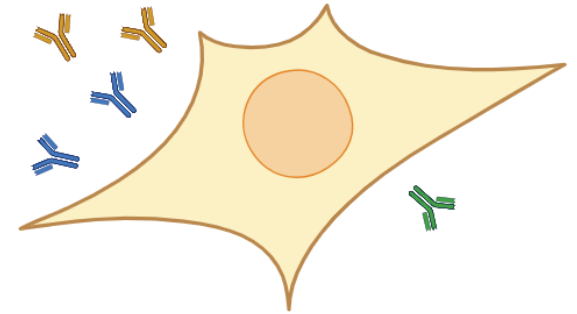
Permeabilized



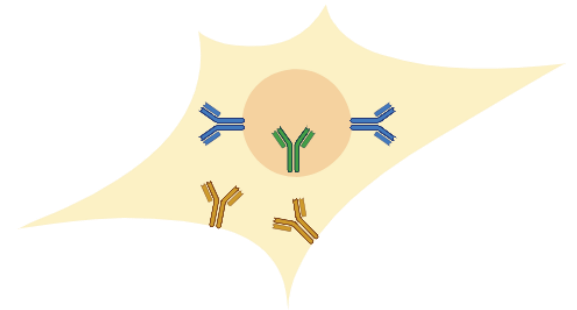
Preparação

- Bloqueio:
 - Inibir Ligação inespecífica de anticorpos / Ac. Nucleicos.
 - Reduzir sinal de fundo / inespecífico.
 - Saturar amostra.
 - Albumina (1-5% em PBST).
 - Soro (1-5+%) – Ideal host do secundário.
 - Soluções Comerciais: SuperBlock (Thermo).
 - DNA do esperma de salmão.

Normal Membrane



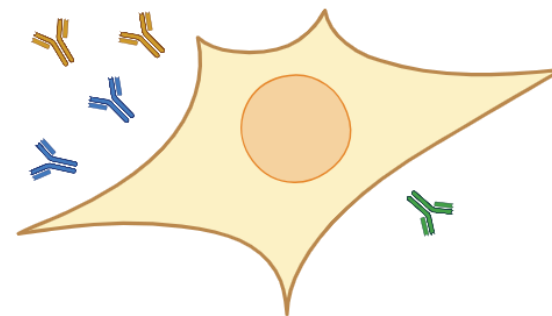
Permeabilized



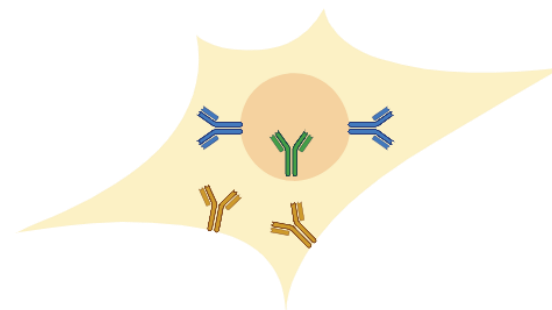
Preparação

- Redução de fundo / autofluorescência:
 - Redução do sinal tecidual.
- Aldeídos não reagidos.
- Glicina (0.1 M) adicionada ao bloqueio ou isolado.
- Borohidreto de Sódio (0.1%) - 10 min.

Normal Membrane

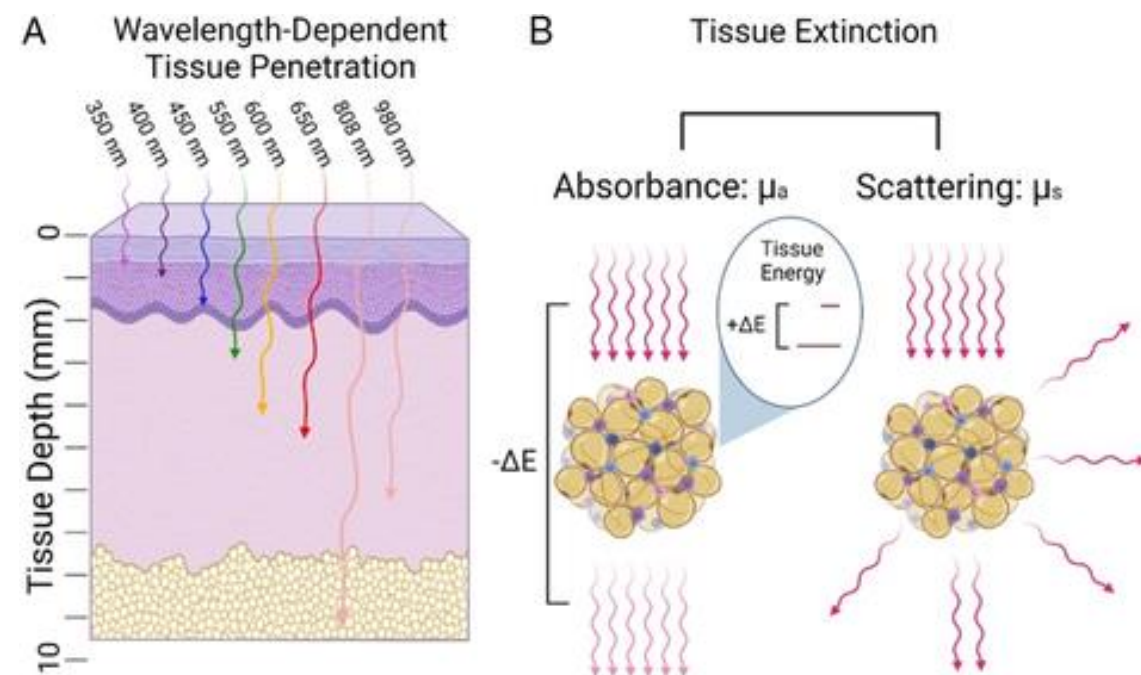
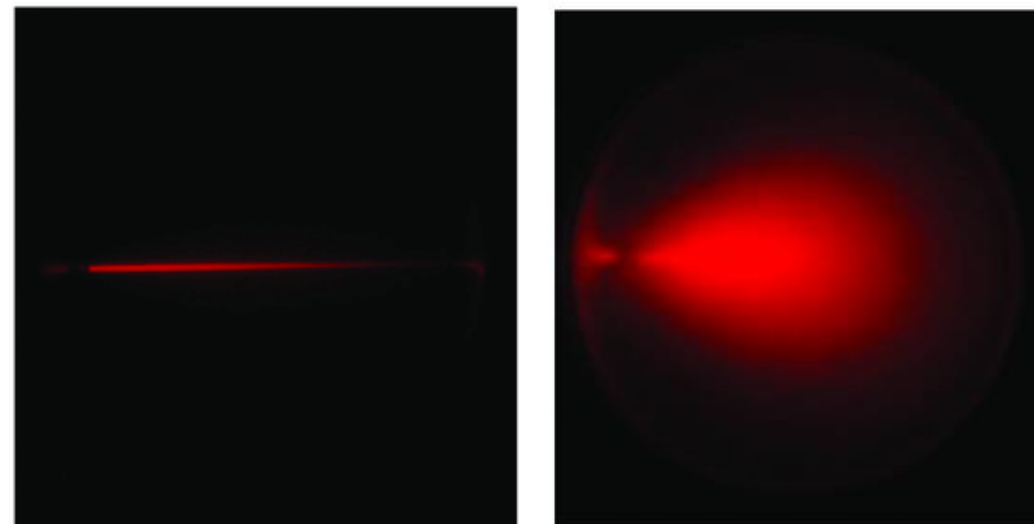


Permeabilized



Preparação

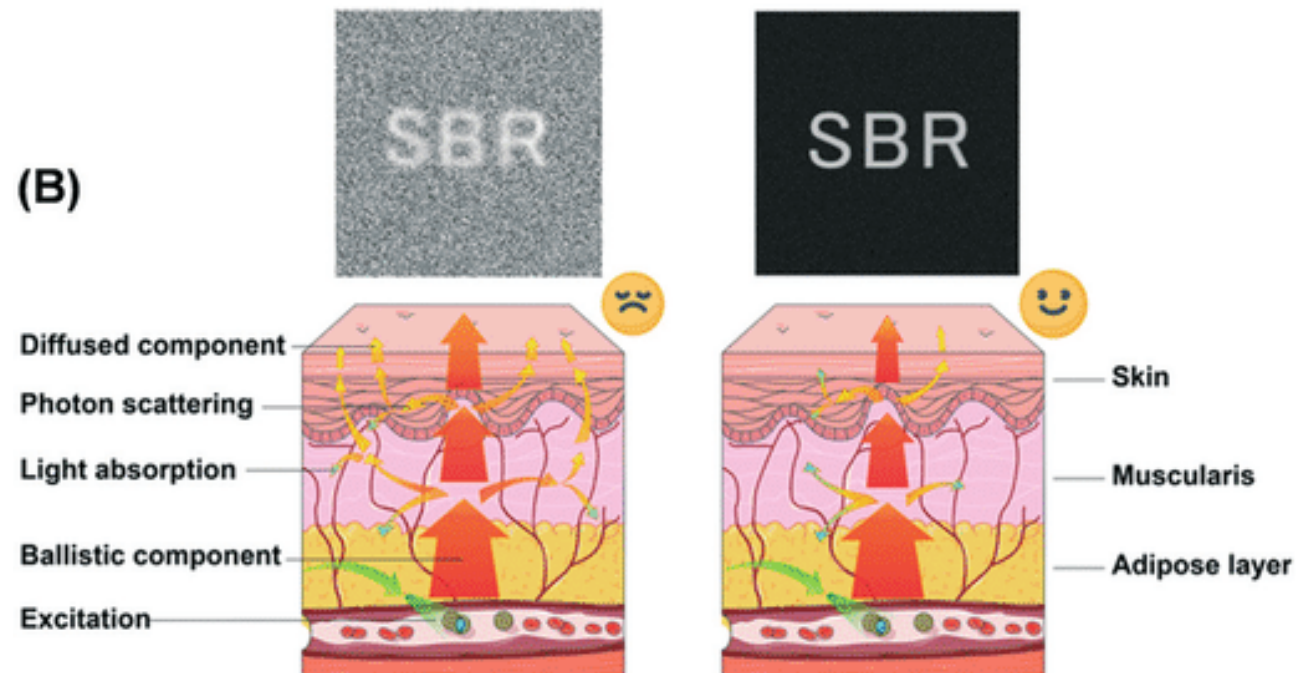
- Tecidos e Organoides:
 - Interação Luz – tecido
 - Limita a penetração no tecido
 - Absorção
 - Espalhamento
 - Autofluorescência



Preparação

- Tecidos e Organoides:
 - Interação Luz – tecido
 - Limita a penetração no tecido
 - Absorção
 - Espalhamento
 - Autofluorescência

(B)



TrkA
Alexa 488

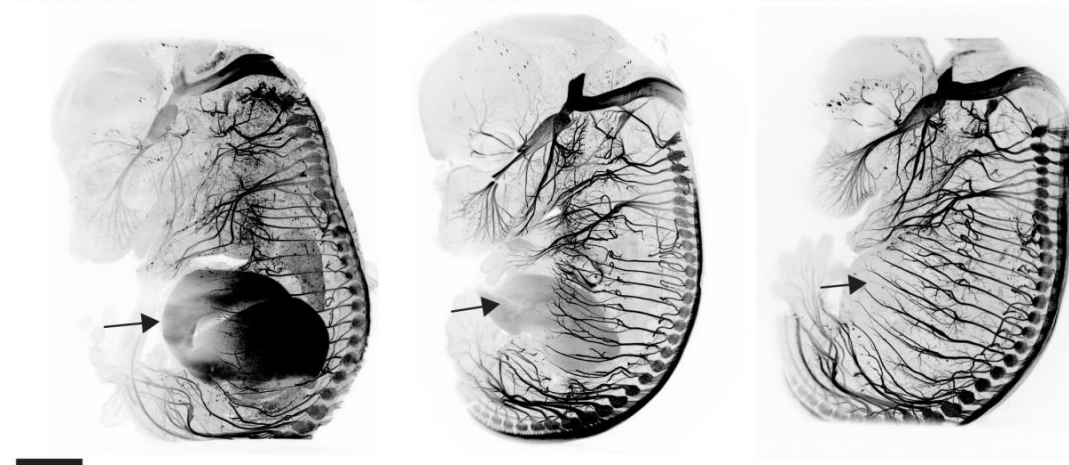
E14

TrkA
Alexa 568

E14

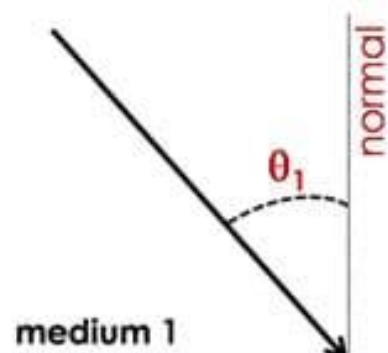
TrkA
Alexa 647

E14



Preparação

- Como resolver?



Índice de Refração



H_2O

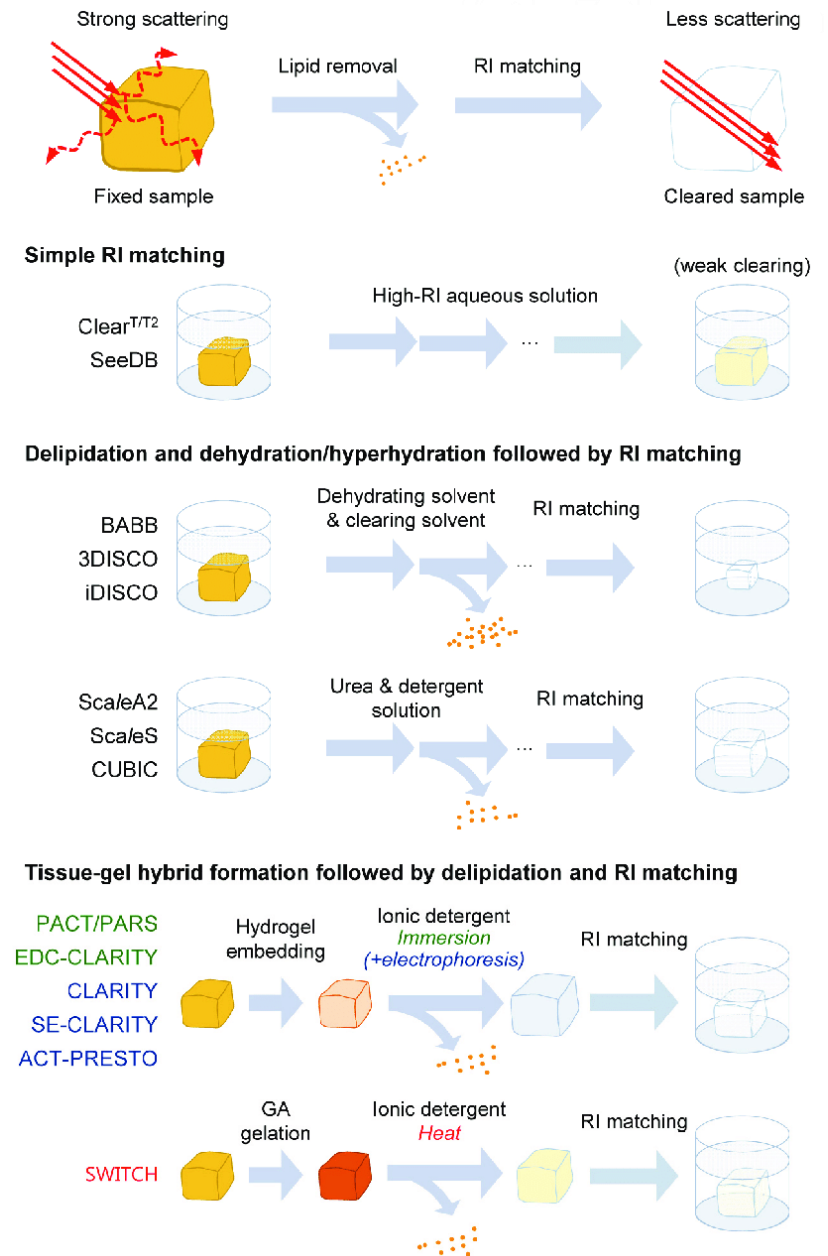
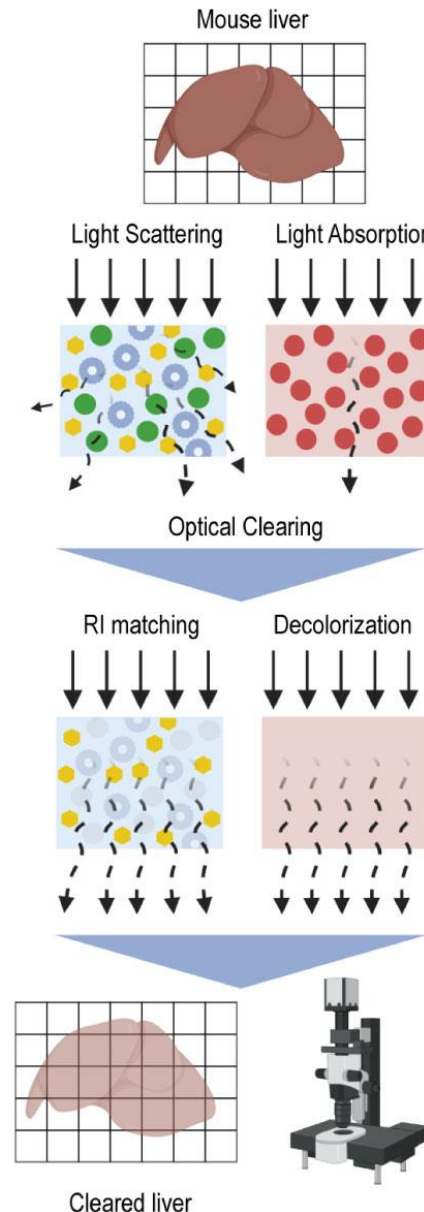
Glycerin

Liquid	Refractive Index
water	1.33
acetone	1.36
glycerin	1.47
benzene	1.50
silicone oil	1.52
sodium chloride	1.54

Preparação

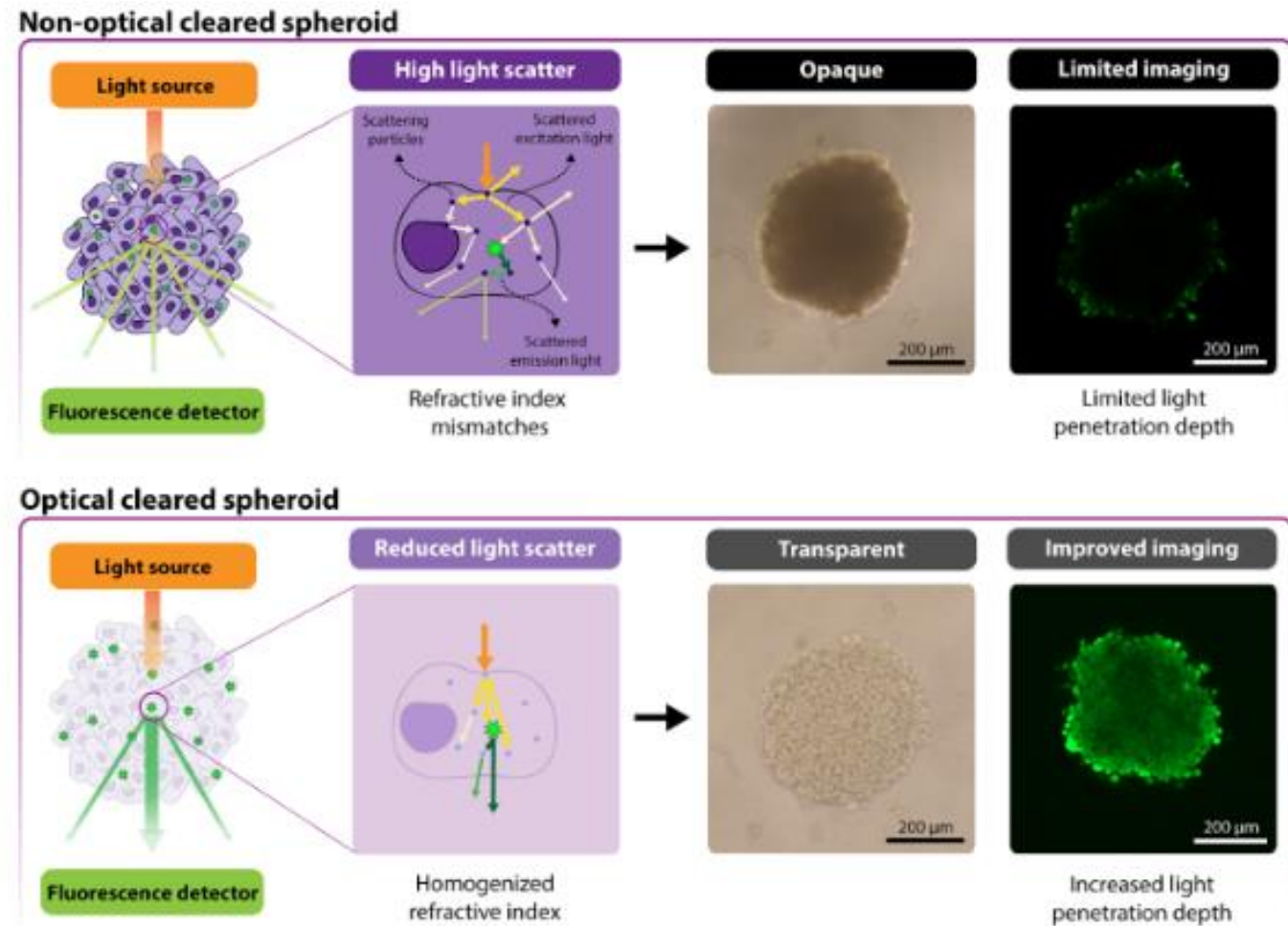
- Clareamento:
 - Remover substancias que causem absorção da luz.
 - Refractive Index matching: homogeneizar os índices de refração nos tecidos.
 - Aumenta a penetração da luz visível: melhora a excitação e emissão.

A Whole organ tissue clearing



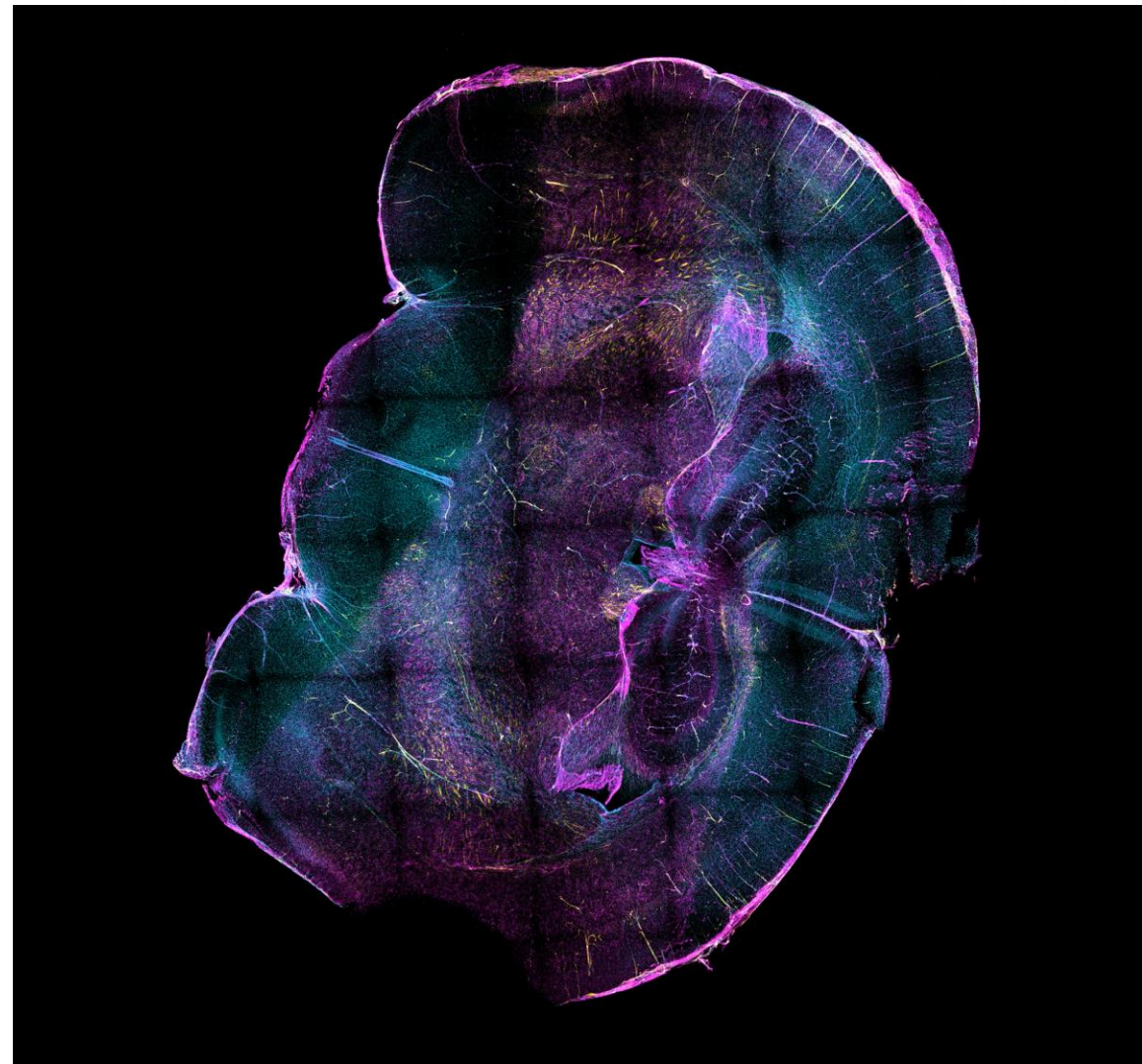
Preparação

- Clareamento:
 - Remover substâncias que causem absorção da luz.
 - Refractive Index matching: homogeneizar os índices de refração nos tecidos.
 - Aumenta a penetração da luz visível: melhora a excitação e emissão.



Preparação

- Clareamento:
 - LIB: SP8 / SP8 STED.
 - Organoides.
 - Tecidos menores ($\sim 500\mu\text{m}$).
 - Incompatível com órgãos inteiros.
- iDISCO:
 - Delipidação (Metanol/DCM – 1 dias).
 - Permeabilização e Bloqueio (3 dias).
 - Imunomarcacão (7 dias).
 - Delipidação (1 dia).
 - Clareamento (RI matching – DBE – 2 dias+).

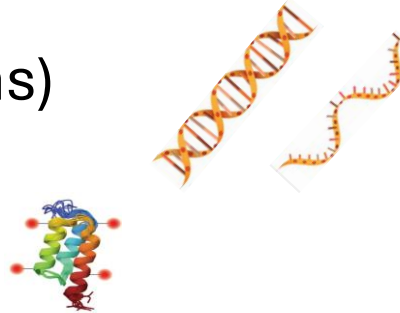
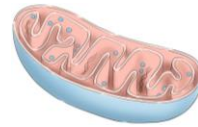
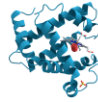


Corte de cérebro (camundongo) marcado para visualização: Núcleos (Ciano - DAPI), Vasos (Amarelo - WGA-AF555), Neurônios (Magenta - Beta-Tubulin3-AF647). Clareado pela técnica de iDISCO e registrado por microscopia confocal: 10x / Z-Stack - 2.5 μm por Stack (500 μm total), 8x8 tiles, 18hrs. *Humberto Joca, LIB/ORION*.



Amostras e seus alvos

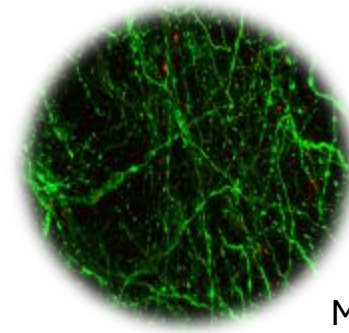
- Proteínas (anticorpos)
- Organelas e estruturas (corantes)
- Ácidos nucleicos (sondas)
- Moléculas marcadas



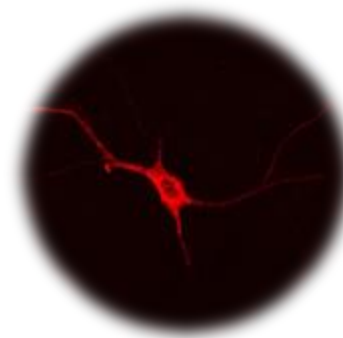


Amostras e seus alvos

- Proteínas
 - Endógenas (anticorpos)
 - Fluorescentes

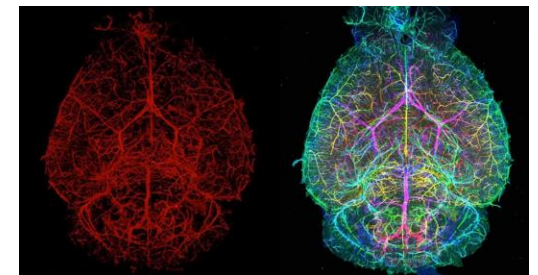


MAP2

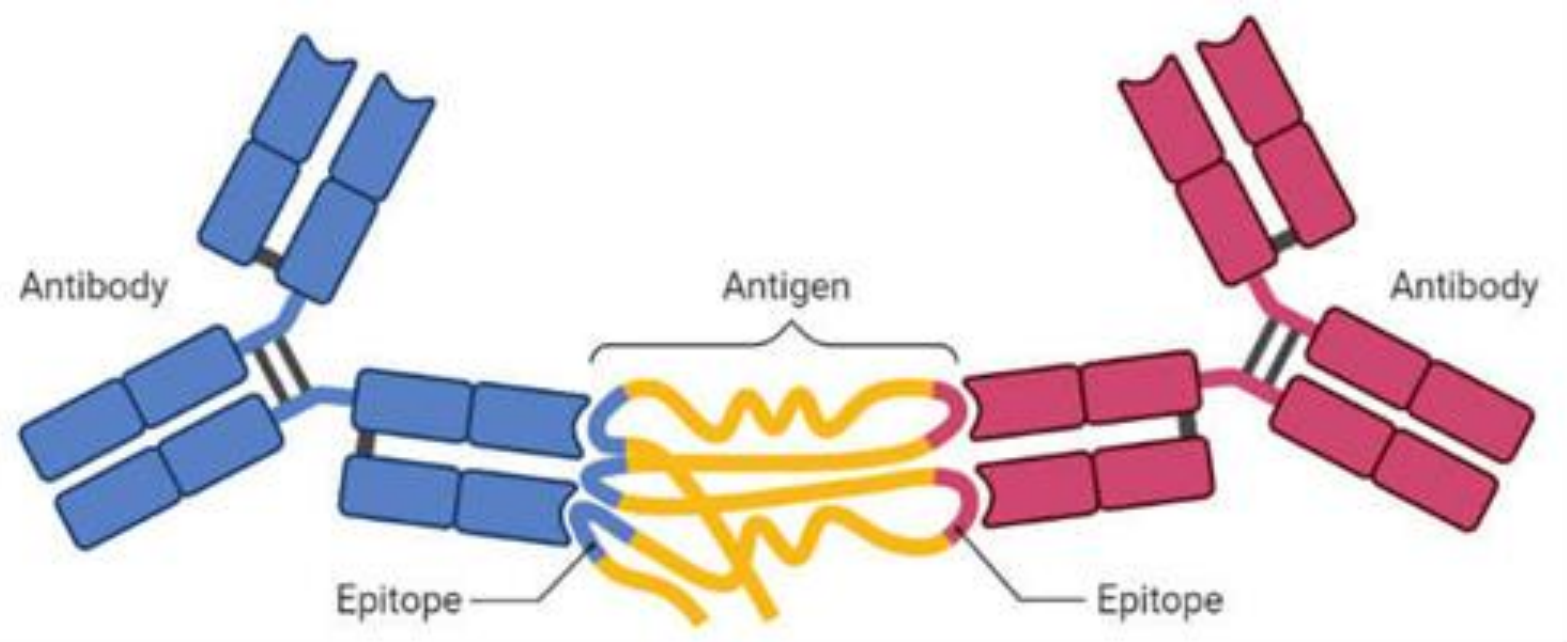
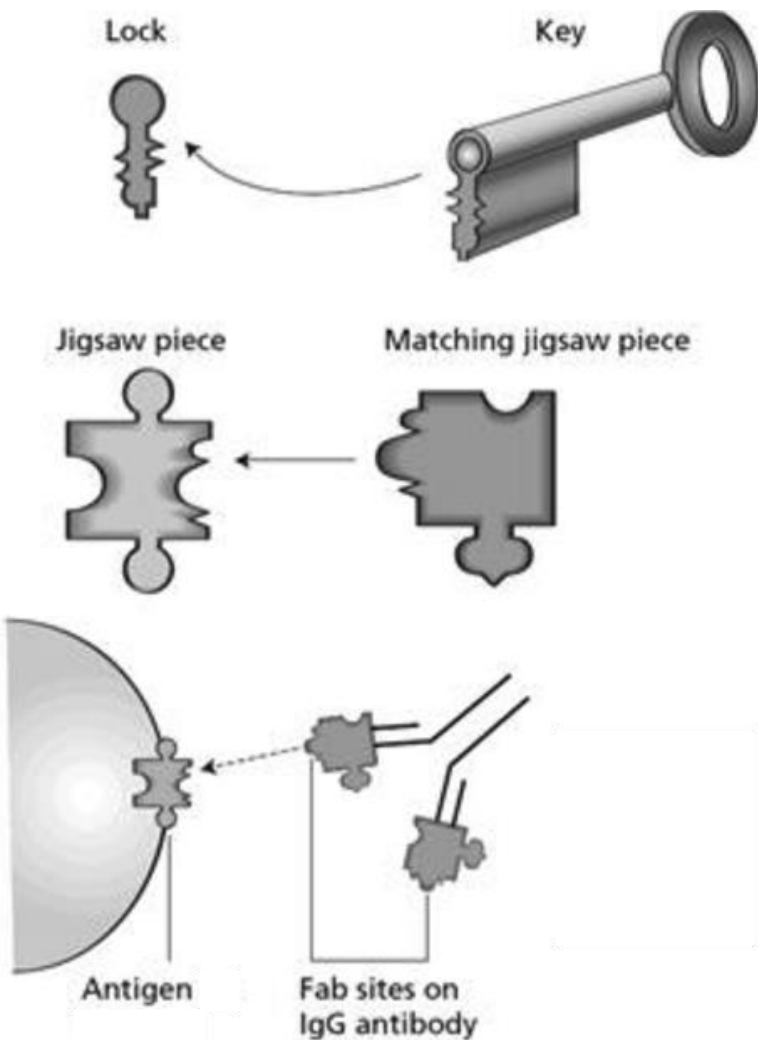


mCherry

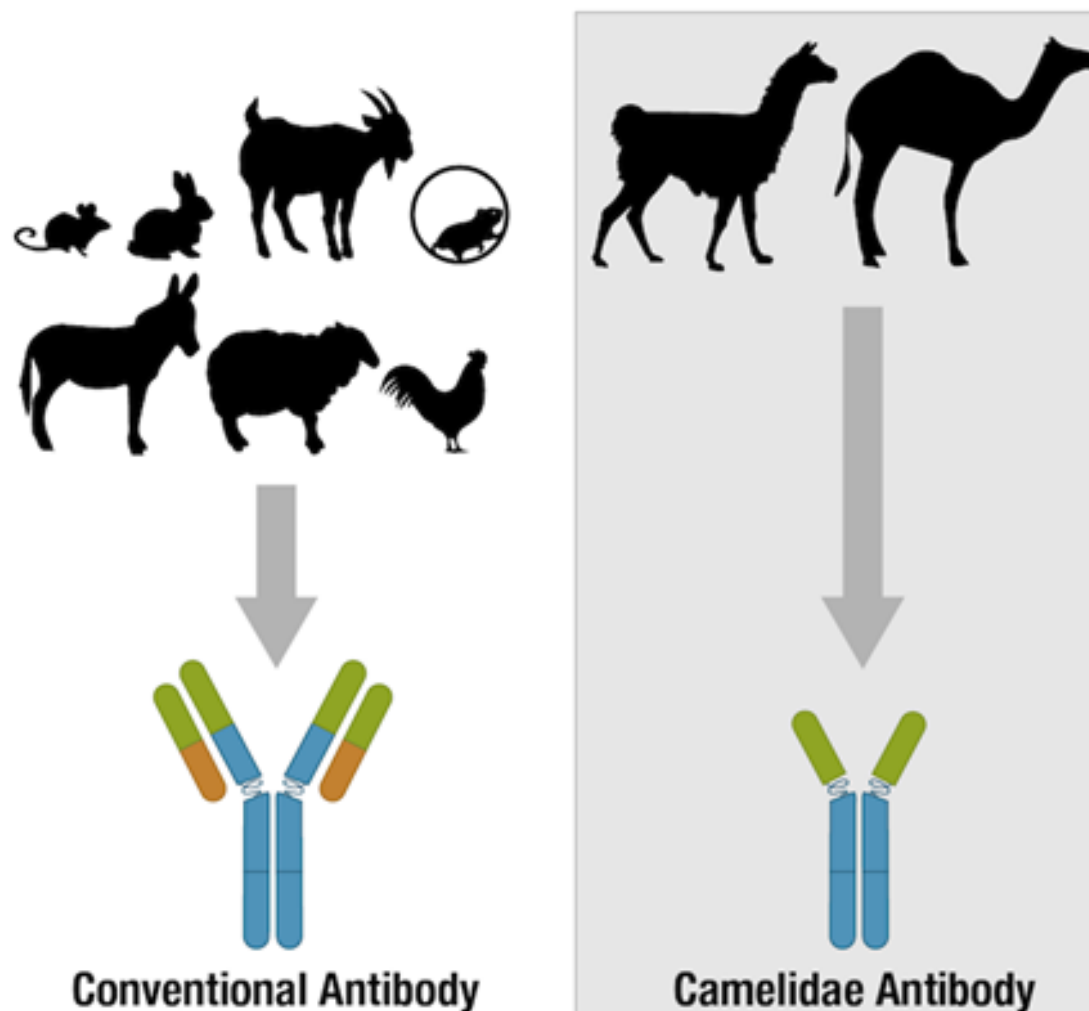
** Cultura de células, cortes fixados congelados ou em parafina, *whole mounting***



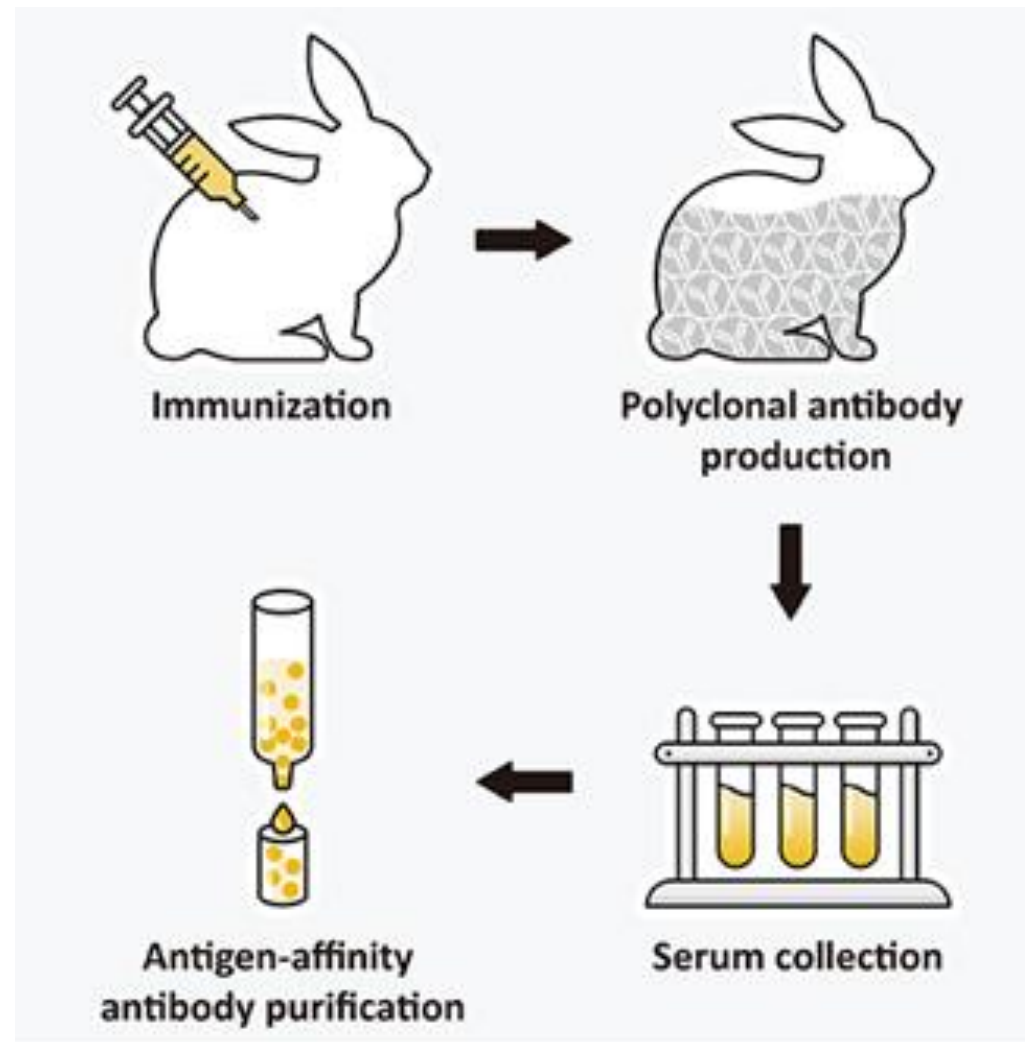
Reconhecimento da proteína endógena alvo - Anticorpo + Antígeno



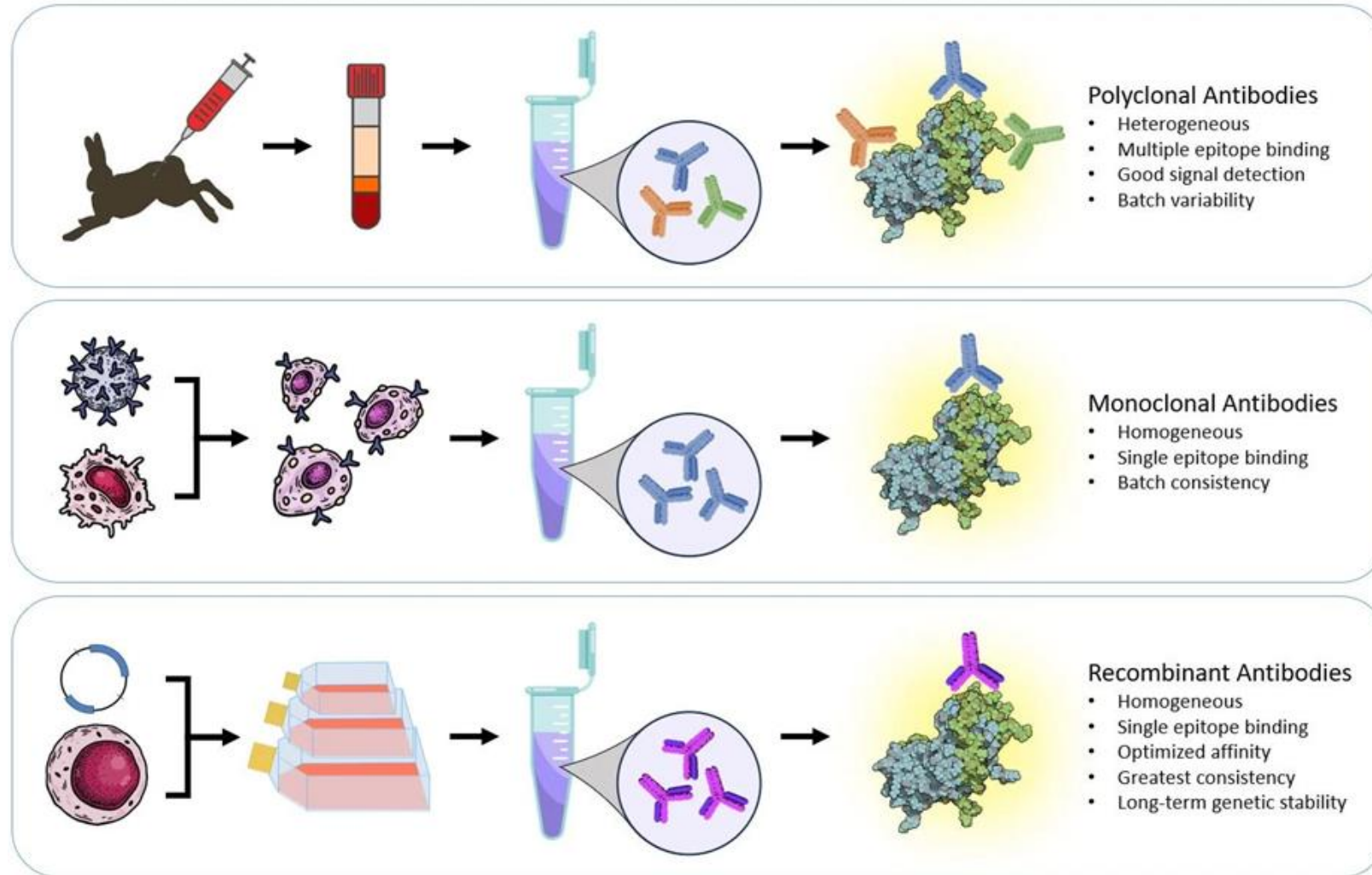
Anticorpos



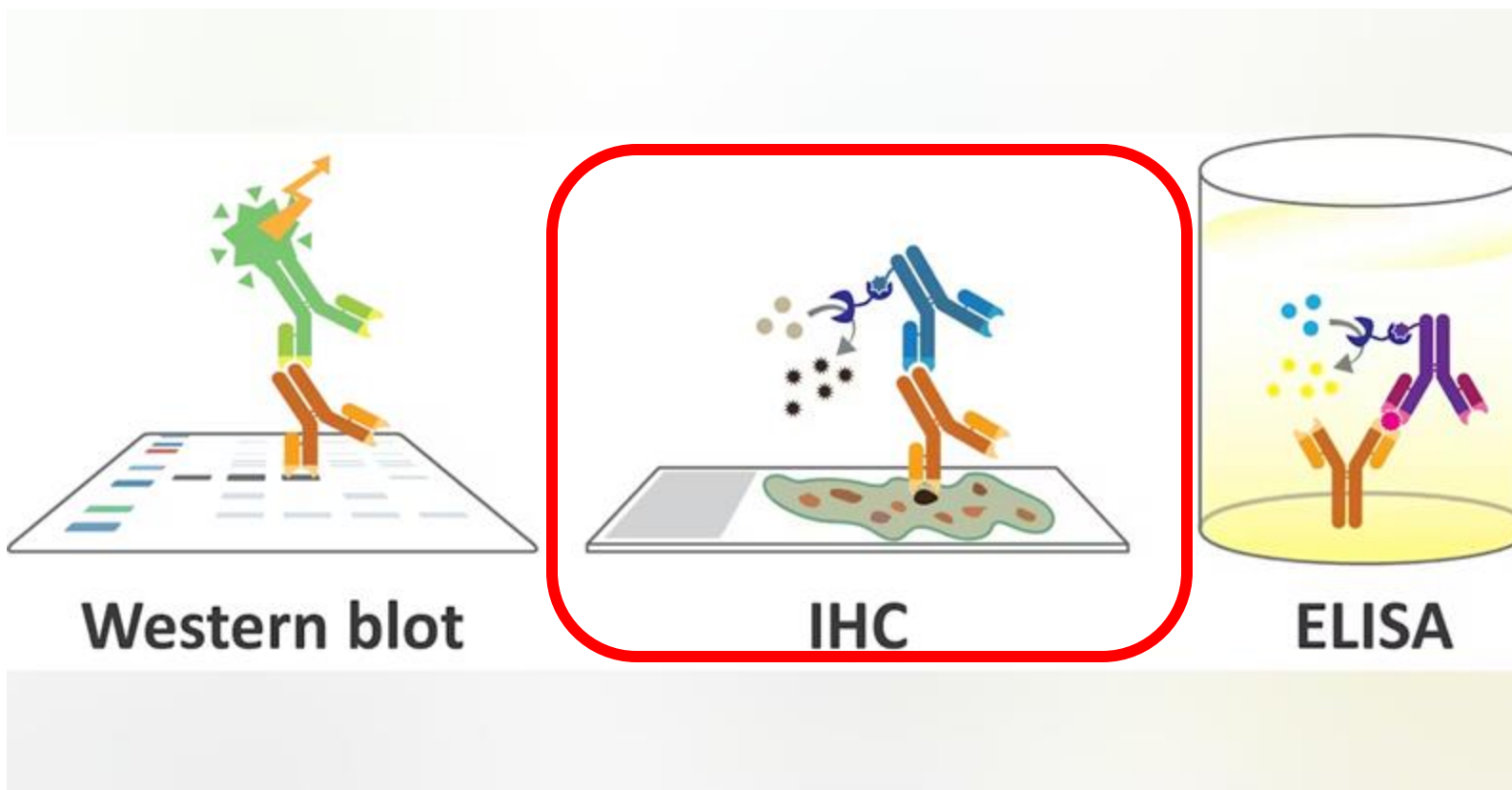
Anticorpos



Anticorpos



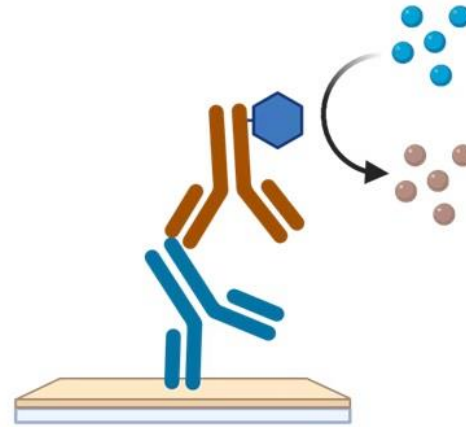
Imunohistoquímica (IHC)



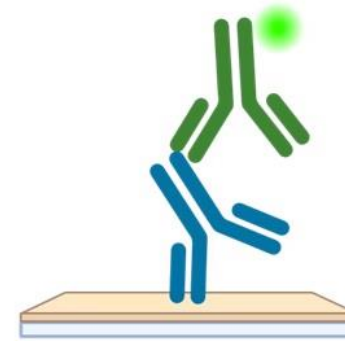
Imunohistoquímica (IHC)



Chromogenic



Fluorescent



Unconjugated
primary antibody



HRP-conjugated
secondary antibody



Fluorescence-conjugated
secondary antibody



Enzyme
(HRP or AP)



Enzyme
substrate

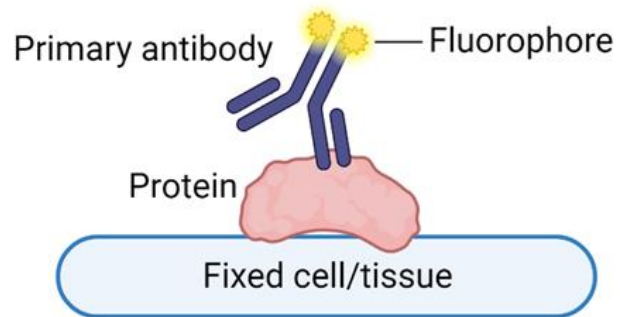


Colored
precipitate

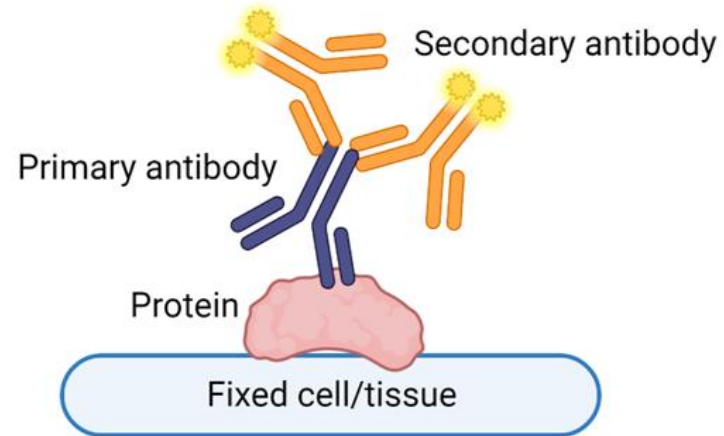


Fluorophore

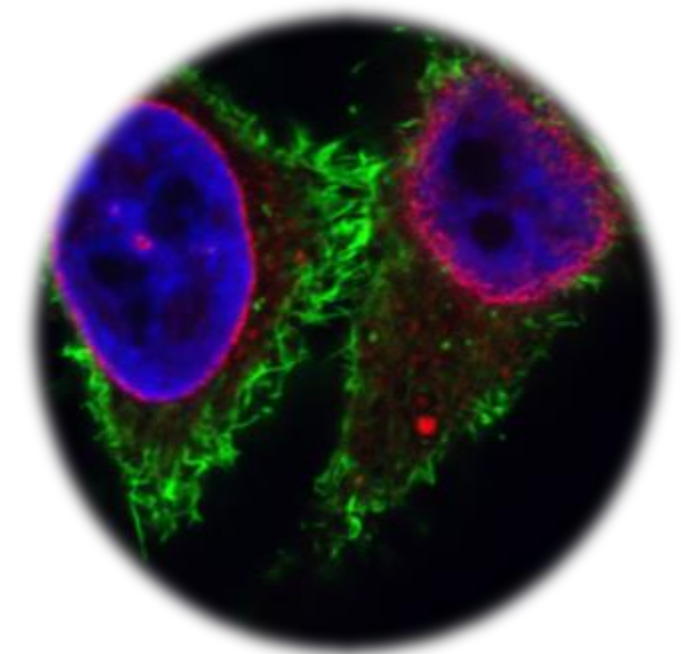
Imunohistoquímica: Detecção Fluorescente



Direct IHC

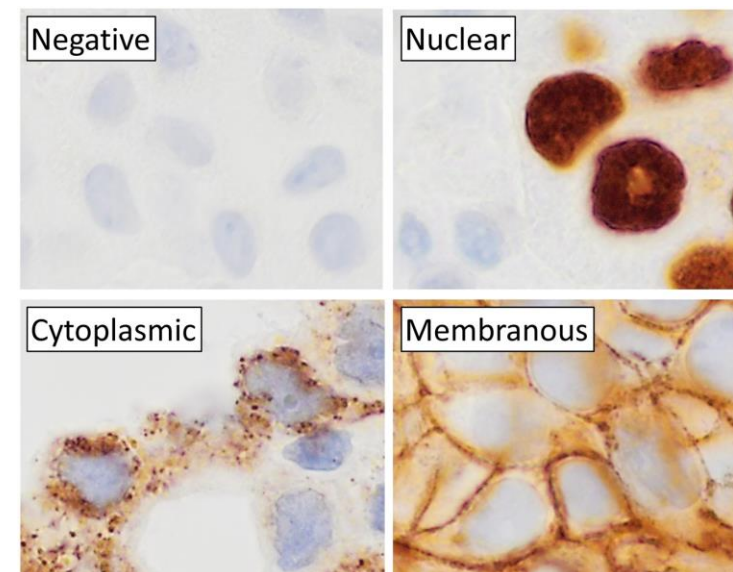
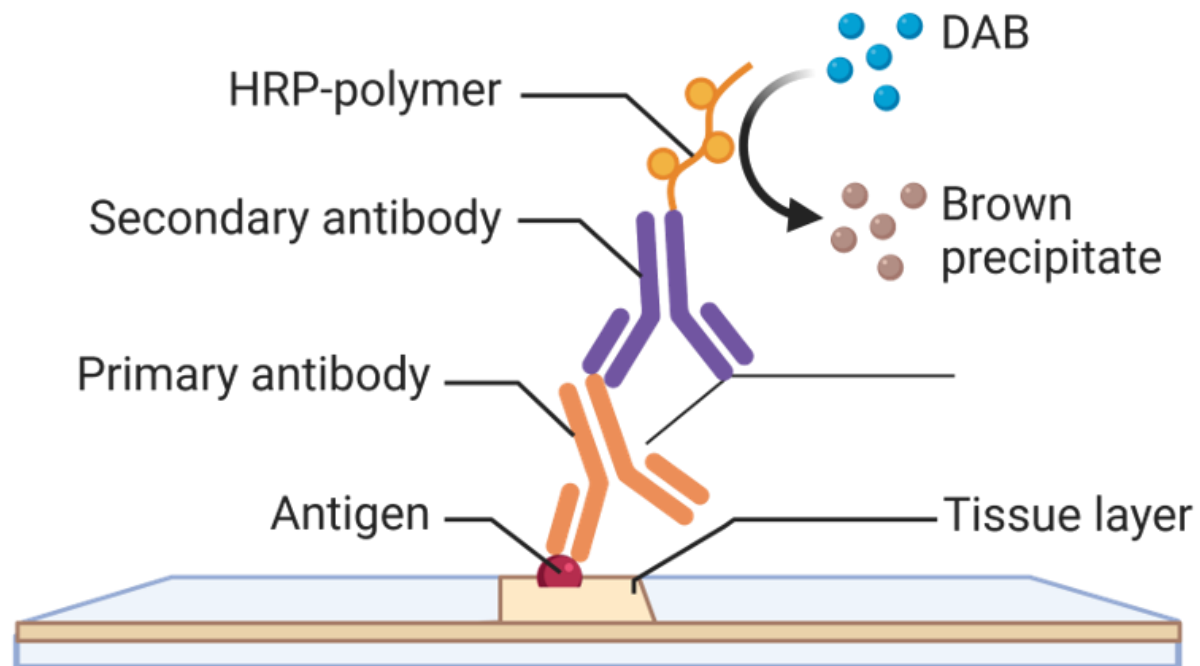


Indirect IHC



NUP107

Imunohistoquímica: Detecção Cromogênica

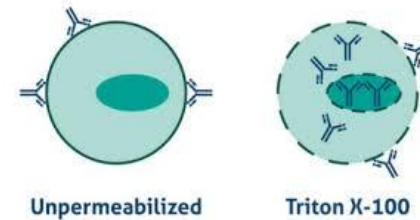


Imunohistoquímica: Um Protocolo?



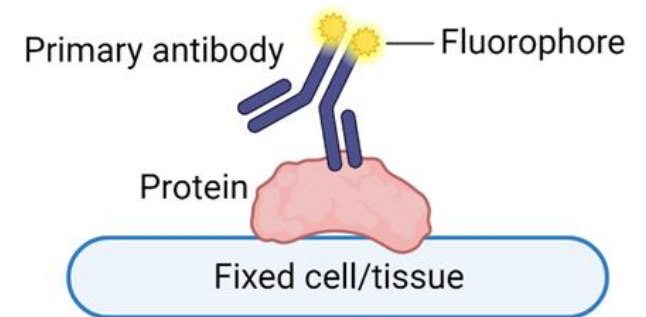
- Órgão, tecido ou células fixadas (Fixação)

- Permeabilização (detergentes)



- Bloqueio de sítios de ligação inespecífica (soro, albumina)

- Anticorpo primário



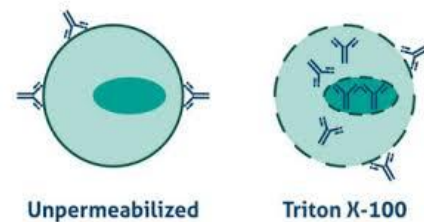
Direct IHC

Imunohistoquímica: Um protocolo?



- Órgão, tecido ou células fixadas (Fixação)

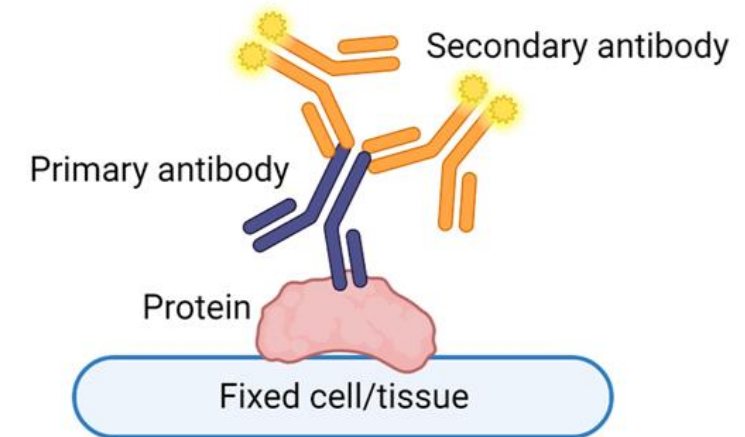
- Permeabilização (detergentes)



- Bloqueio de sítios de ligação inespecífica (soro, albumina)

- Anticorpo primário (solução bloqueio)

- Anticorpo secundário (solução de bloqueio)

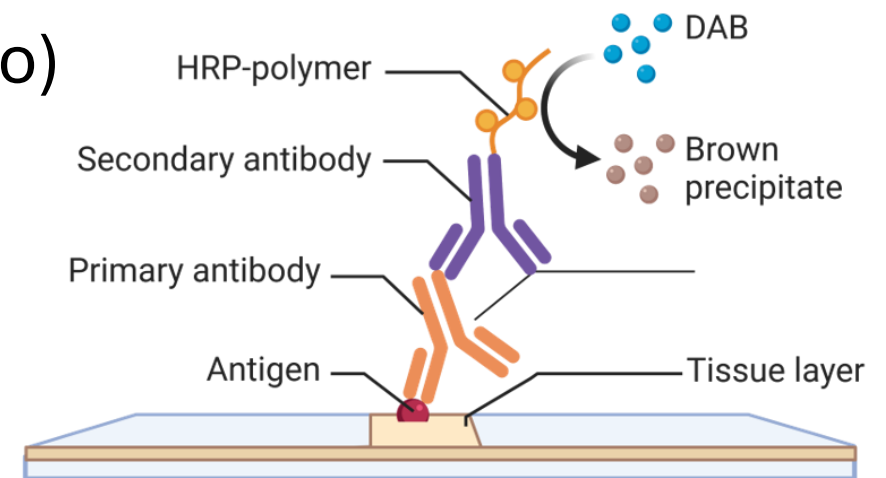


Indirect IHC

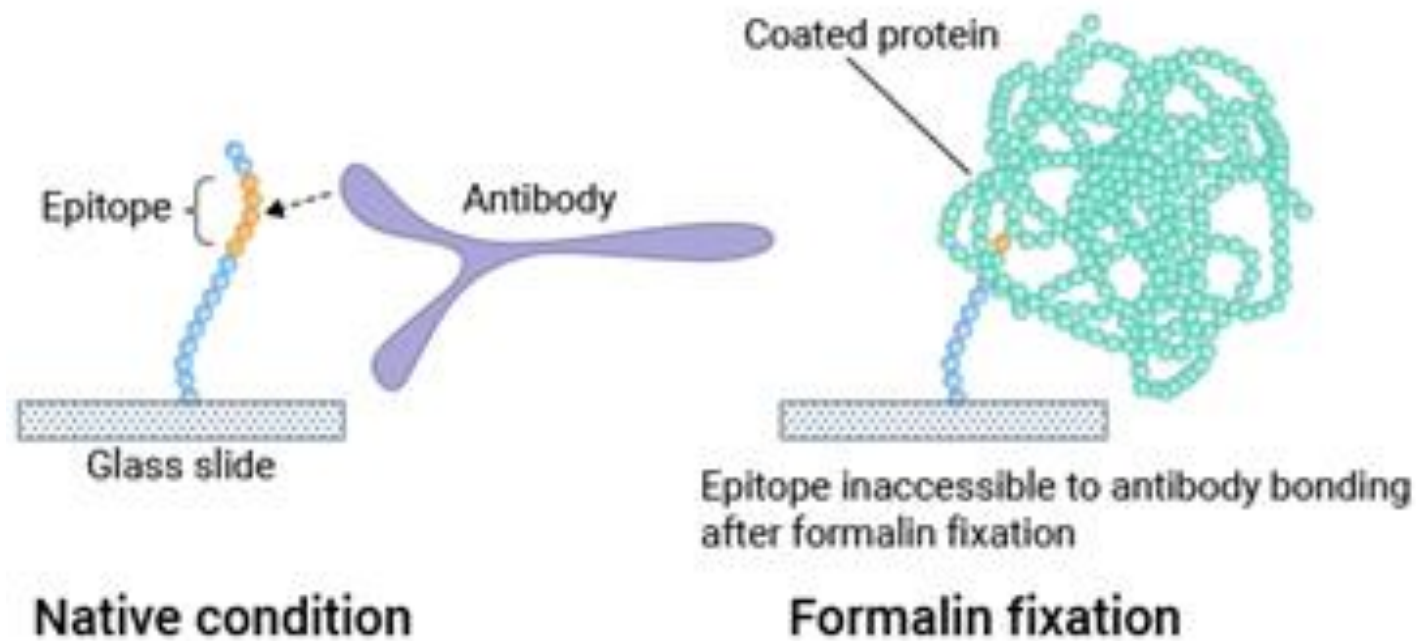
Imunohistoquímica: Um protocolo?



- Órgão, tecido ou células fixadas (Fixação)
- Permeabilização (detergentes)
- Bloqueio de sítios de ligação inespecífica (soro, albumina, +inibidor da enzima endógena)
- Anticorpo primário (solução bloqueio)
- Anticorpo secundário (solução de bloqueio)
- Reação enzimática (HRP, AF)



Imunohistoquímica



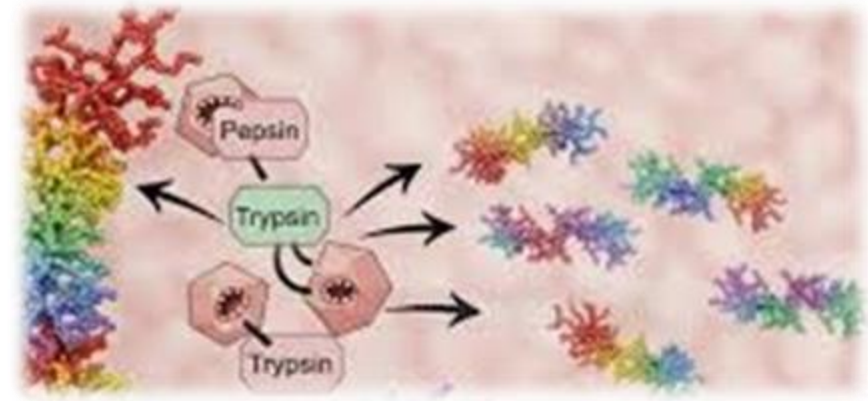
Recuperação de epítopo



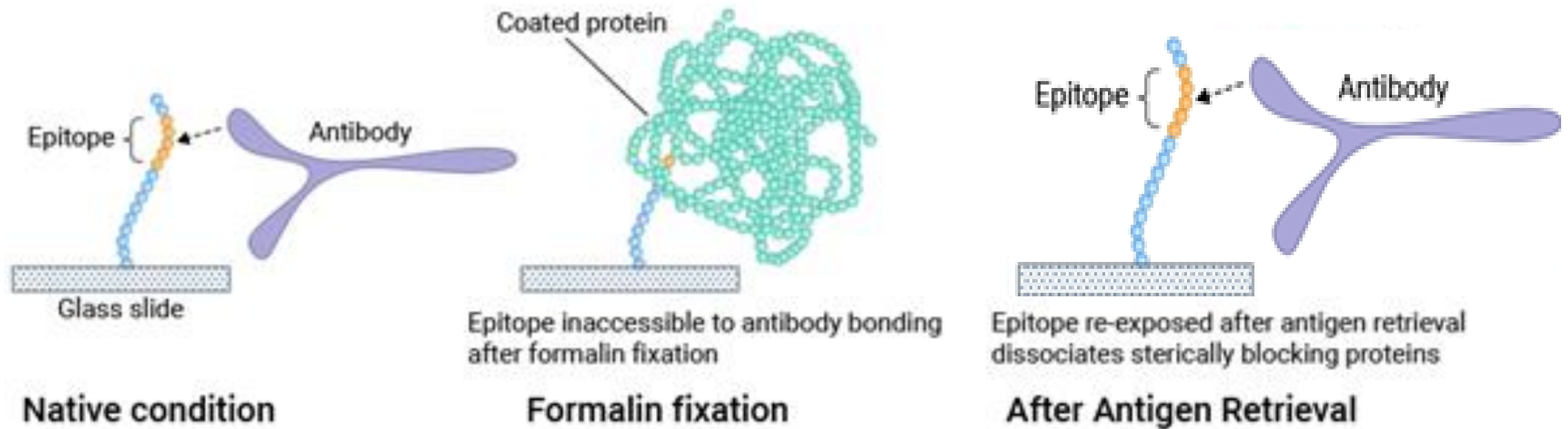
- Mediada pelo calor (HIER)
Tampão em alta temperatura
(citrato pH 6,0 ou tris-EDTA pH 9,0 em 95° - 100°C)



- Mediada por enzima (PIER)
Tripsina, proteinase K, pepsina



Imunohistoquímica

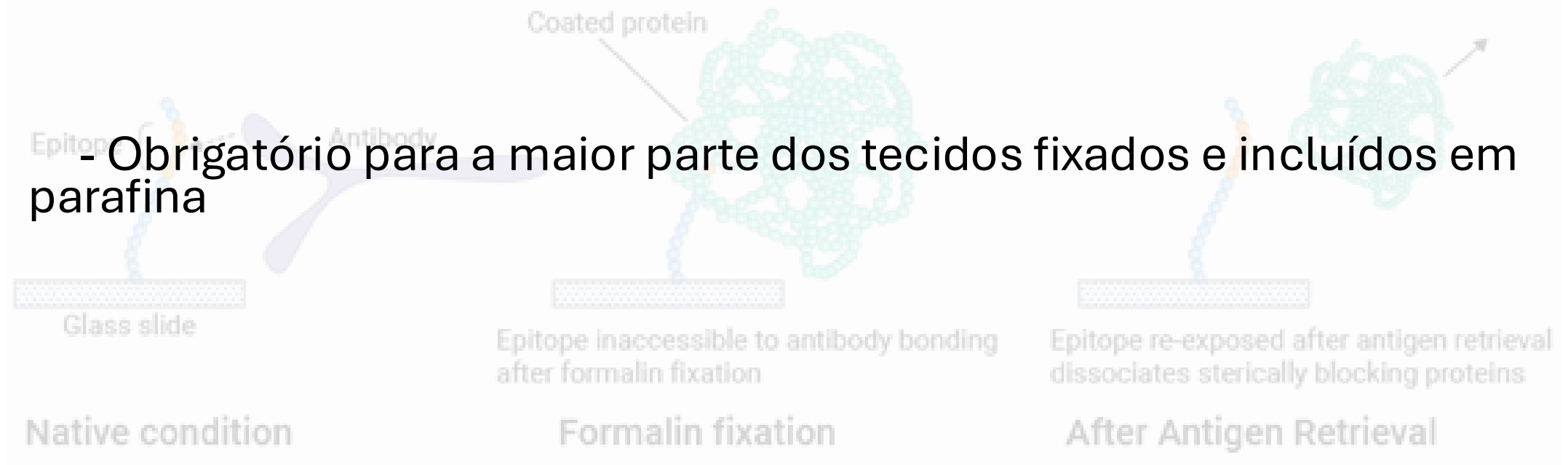


Recuperação de epítopo



- Quando usar:

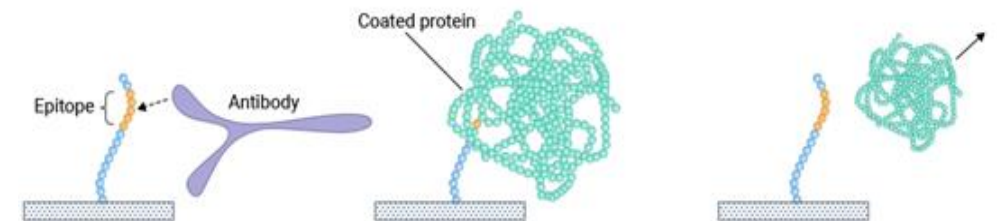
- Obrigatório para a maior parte dos tecidos fixados e incluídos em parafina



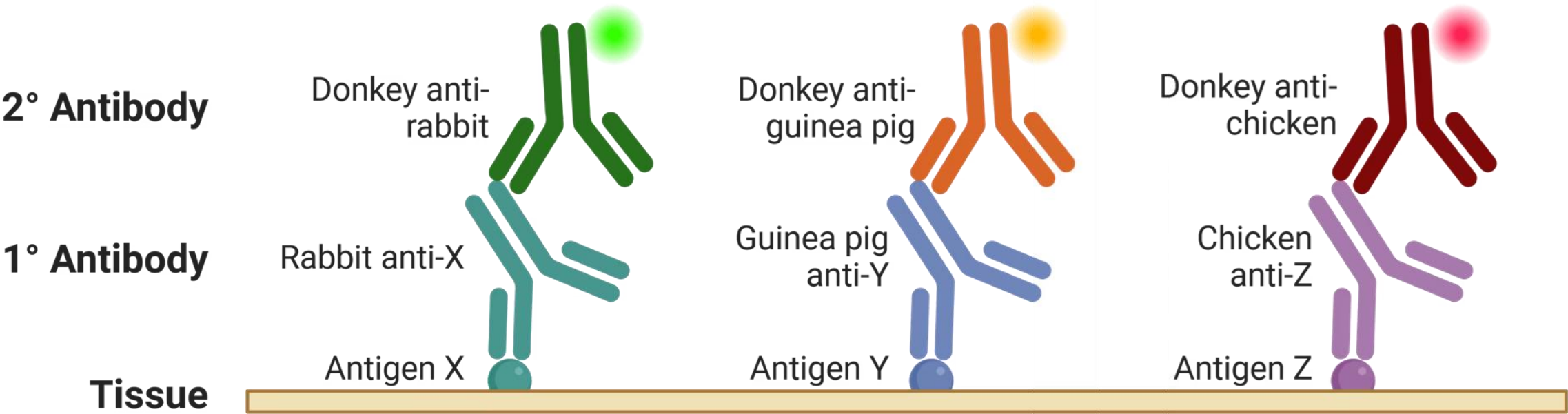
Imunohistoquímica: Um protocolo?



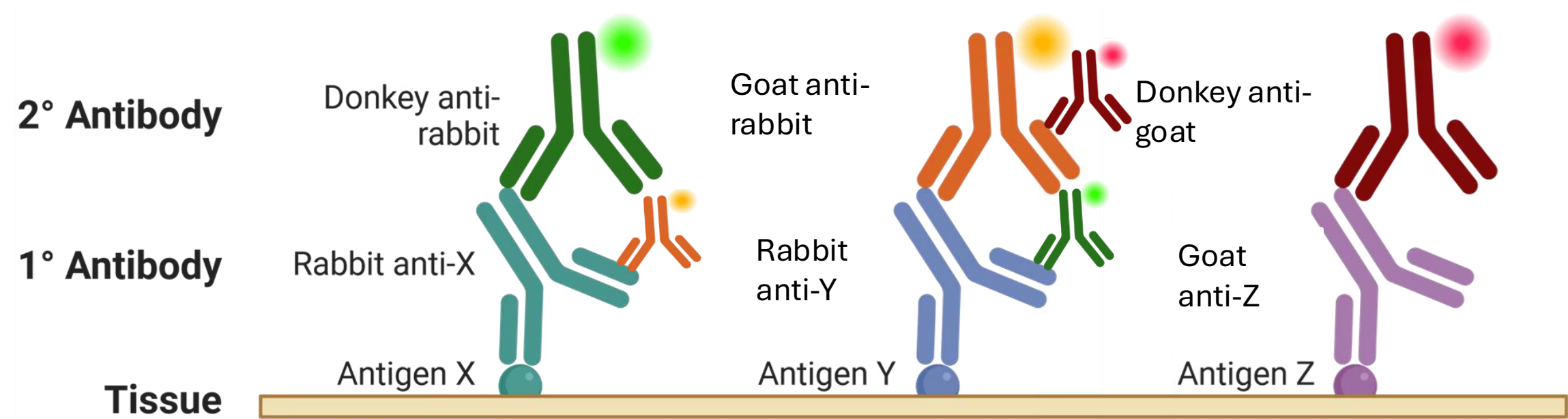
- Órgão, tecido ou células fixadas (Fixação)
- Recuperação de epítopo
- Permeabilização (detergentes)
- Bloqueio de sítios inespecíficos (soro, albumina)
- Anticorpo primário (solução bloqueio)
- Anticorpo secundário (solução de bloqueio)



Imunohistoquímica



Imunohistoquímica

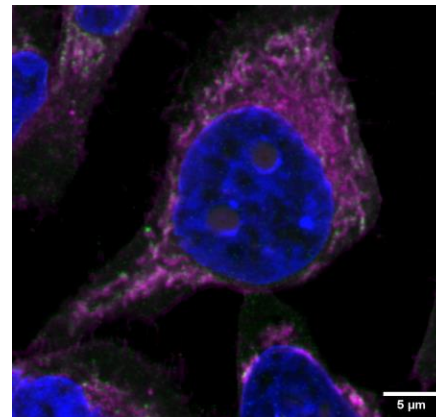




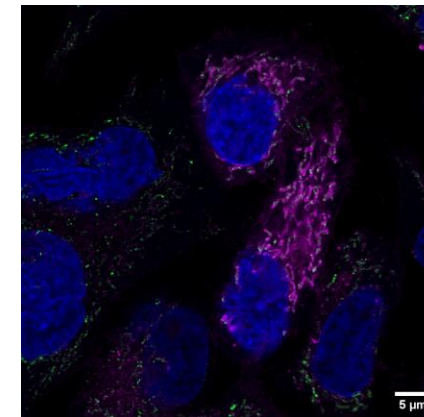
Imunomarcação

- Fixação do tecido: escolha do agente fixador
- Recuperação do epítopo
- Permeabilização
- Concentração dos anticorpos
- Controles

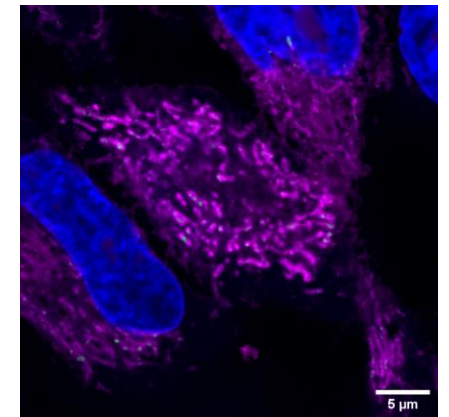
IMPORTANTE



1:100



1:200



1:500

Imunomarcação



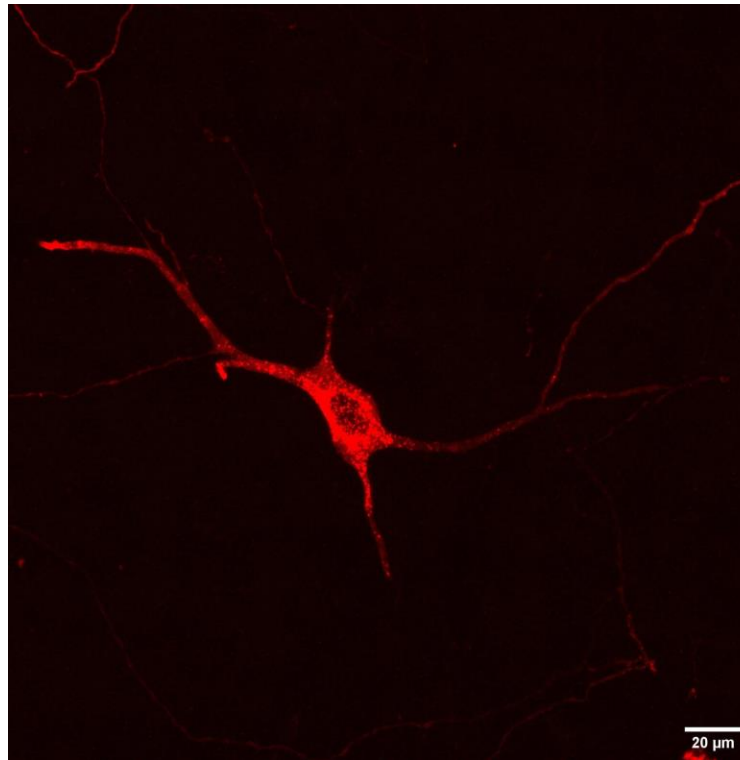
IMPORTANTE

- Controles
 - Controle Anticorpo Negativo: sem anticorpo primário
 - Controle Tecido: Positivo (tecido/célula com proteína alvo)
Negativo (tecido/célula sem proteína alvo)
 - Controle *Background* do Tecido (antes IHC)



Proteínas Fluorescentes

GFP, MCherry, tdTomato, etc. com expressão induzida em tecidos ou células específicas (*reporters*)

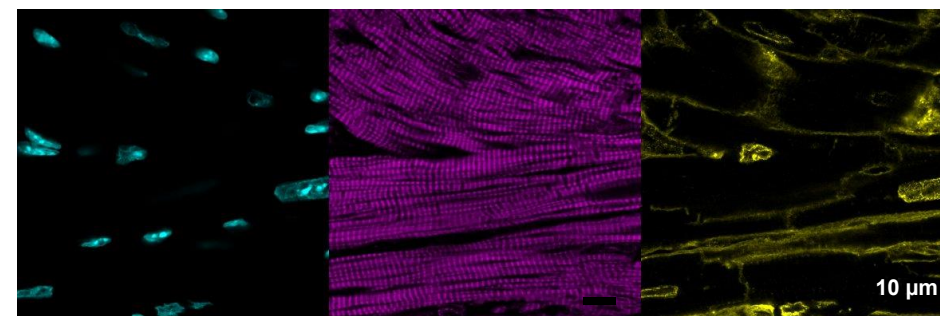
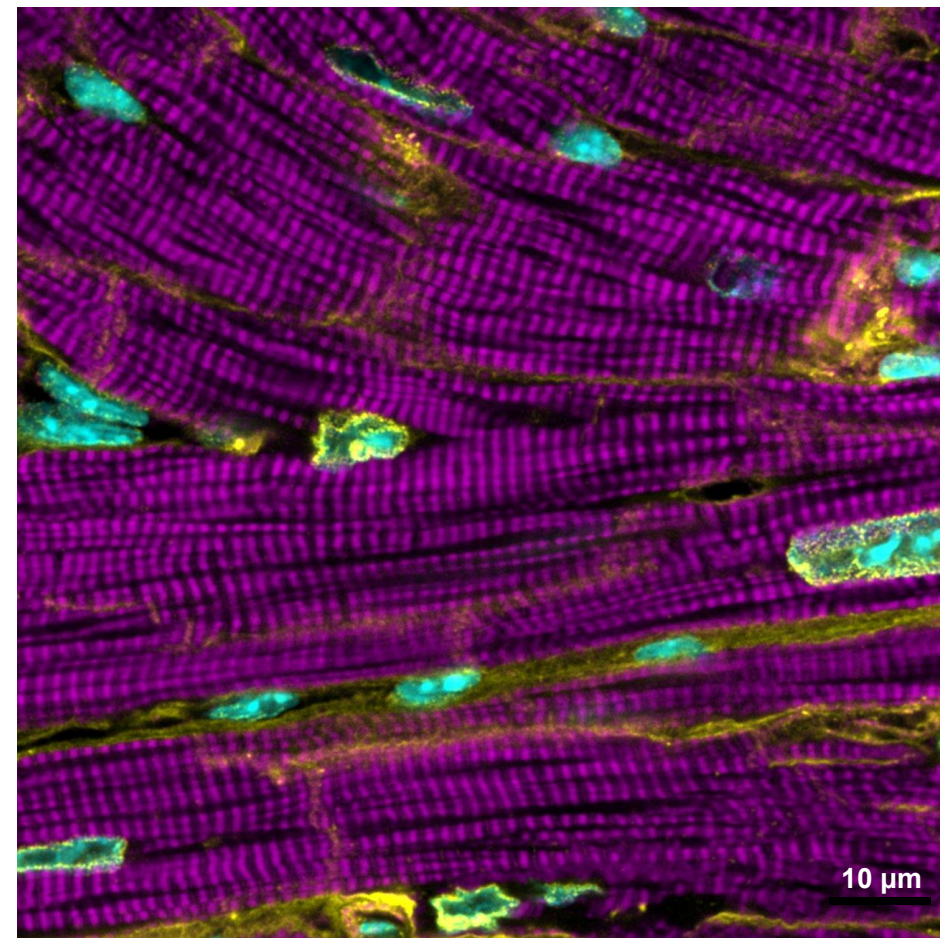


CAV-Cre + AAV2-hsyn-DIO-CHR2-**mCherry**

Amostras e seus alvos

Estrutura e Organelas

- Faloidina - F-actina
- DAPI - Núcleo
- Mito Tracker – Mitocôndria
- WGA – Vasos / Membranas
- ER-Tracker - Retículo endoplasmático



Núcleo

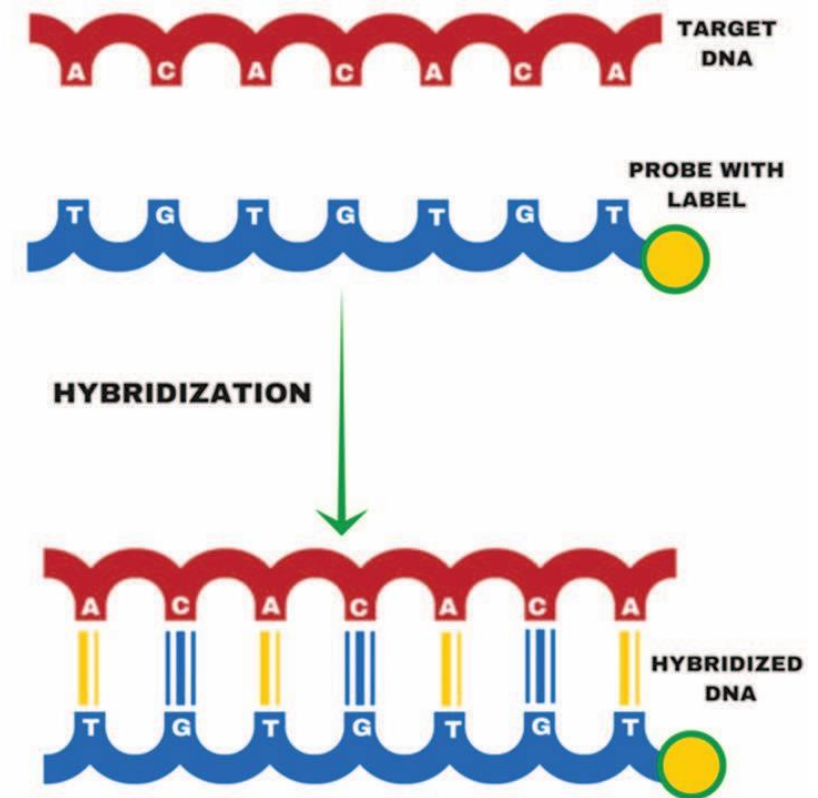
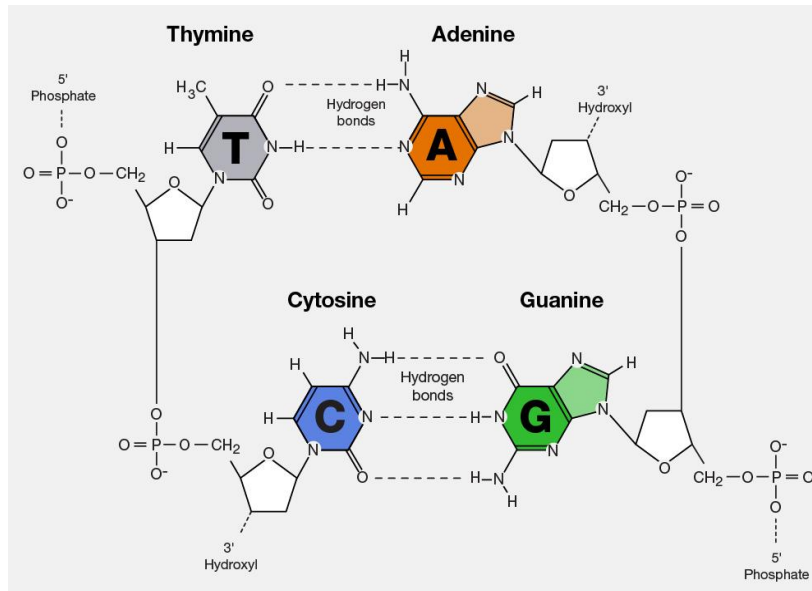
Actina

Membranas

Amostras e seus alvos

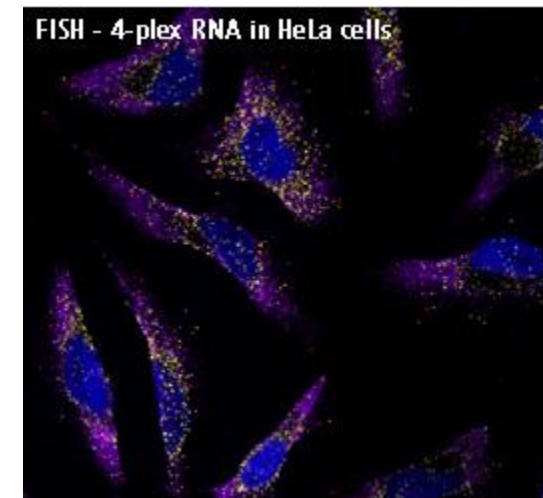
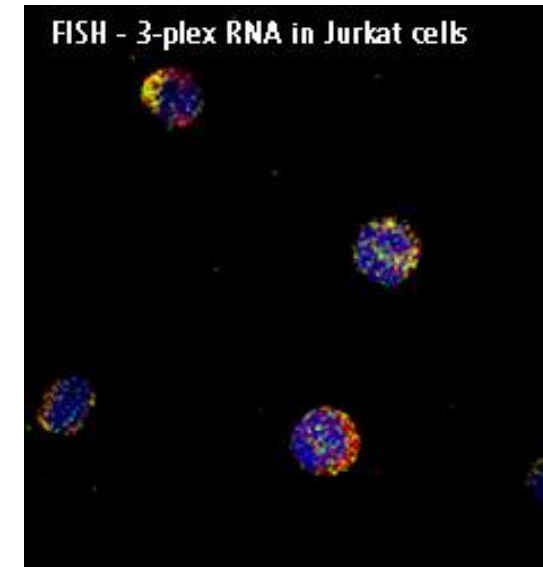
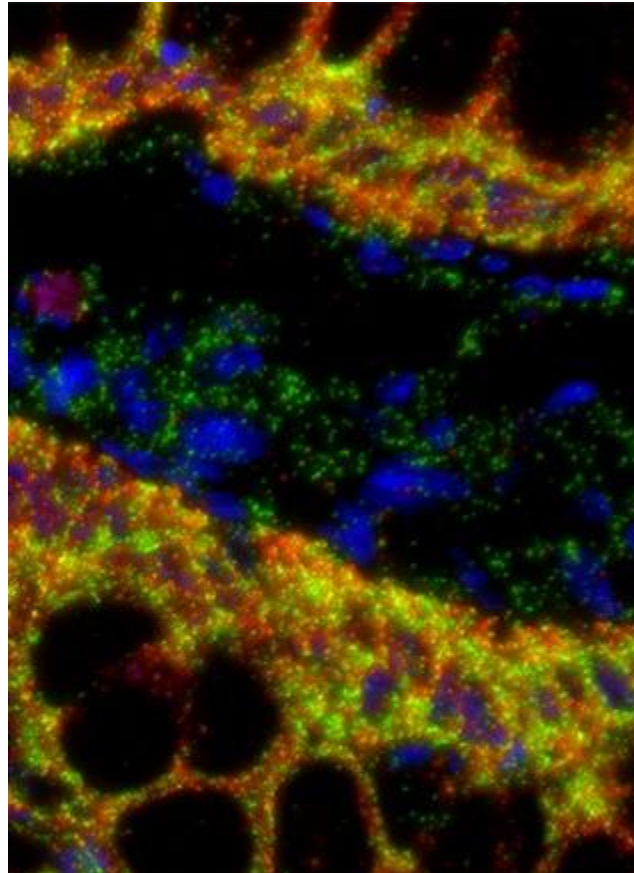
- Ácidos Nucleicos

- RNA e DNA: pareamento de bases



Hibridização *in situ*

- Ácidos Nucleicos
 - RNA
 - Células, tecidos e *whole mounting*

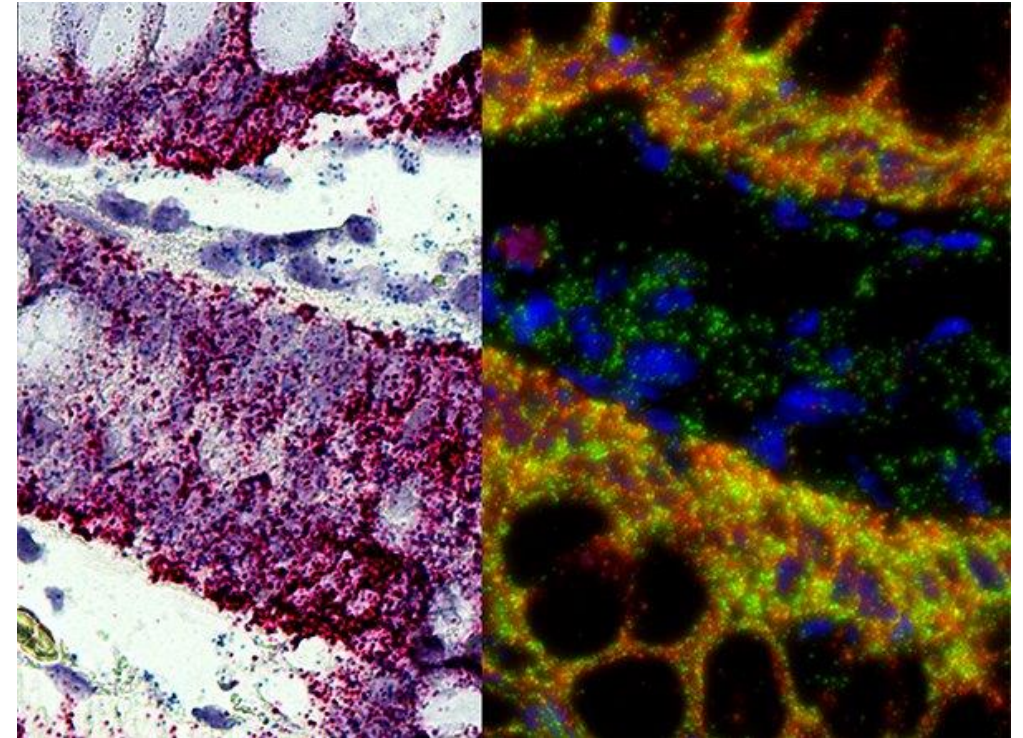


Hibridização *in situ*



Detecção por fluorescência (FISH) ou cromogênica (CISH)

Informação temporal e espacial

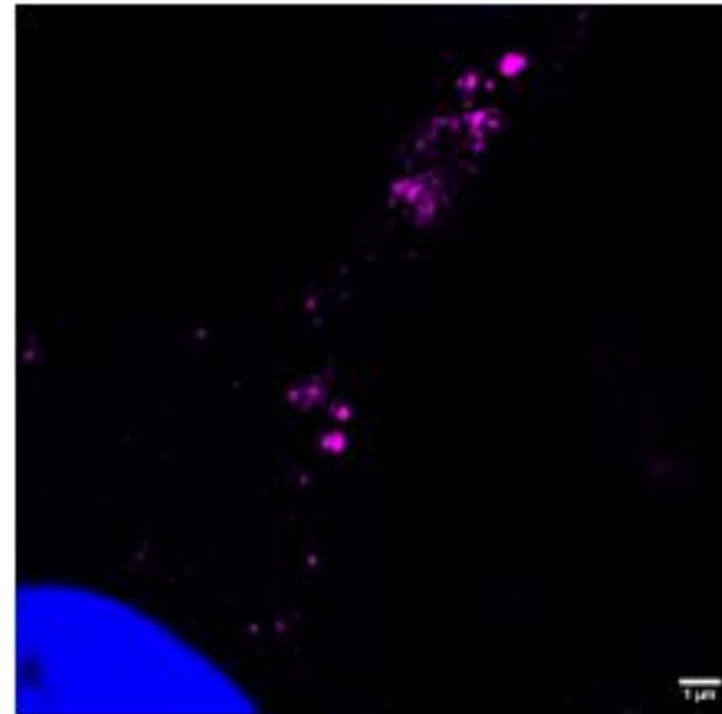
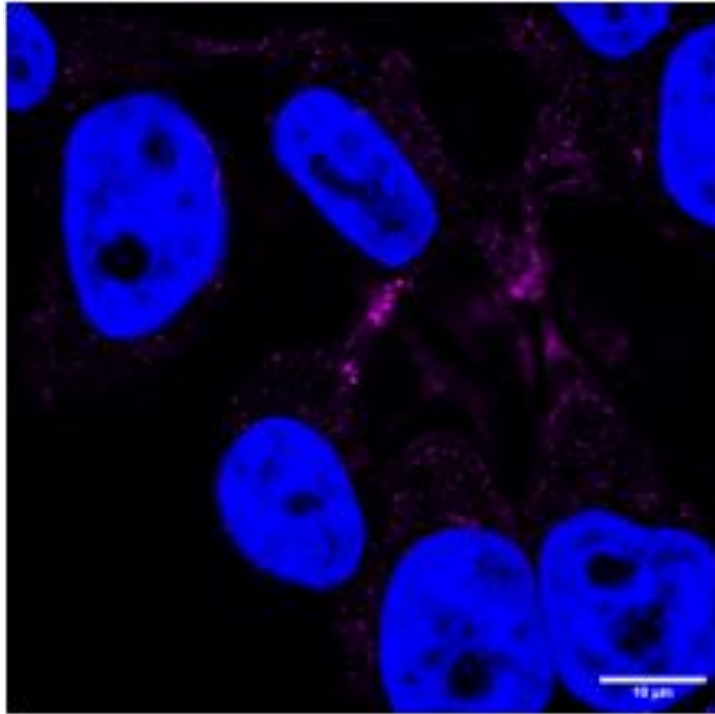




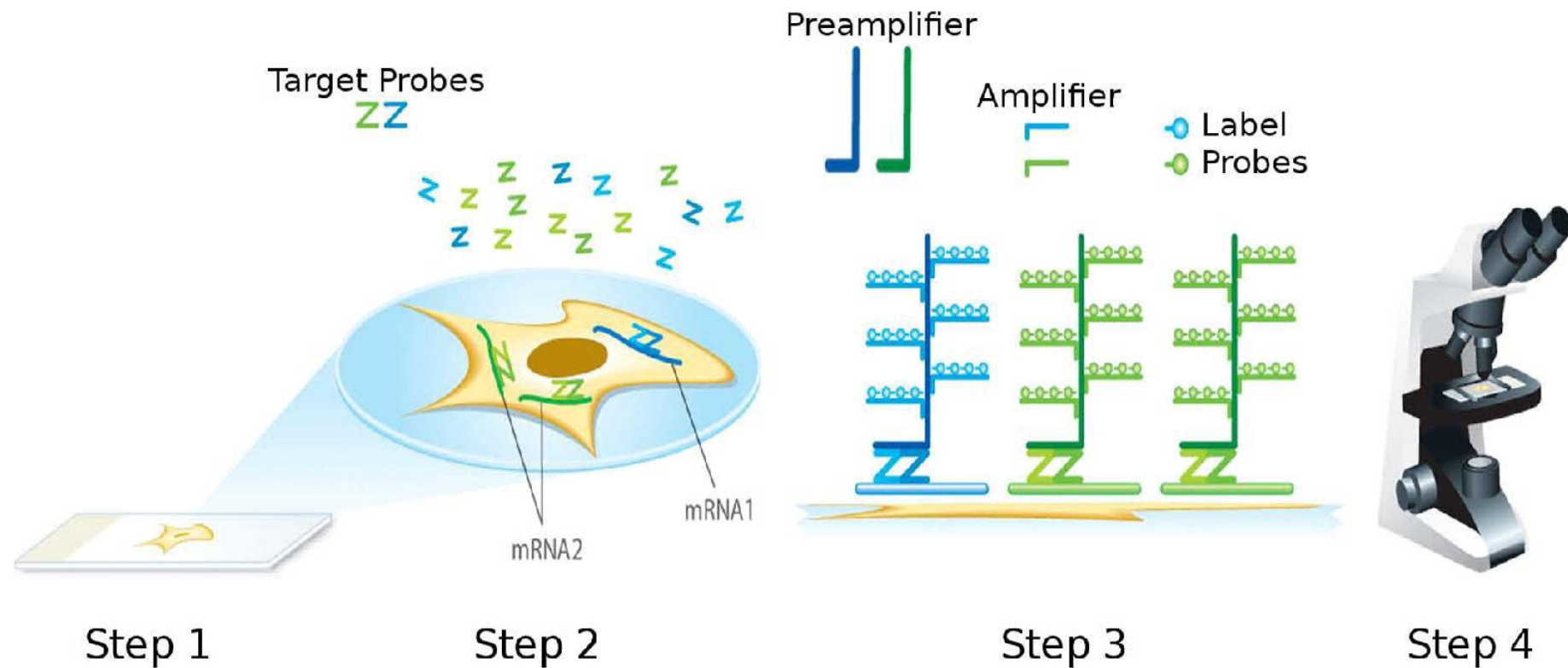
Hibridização *in situ*: Um protocolo?

- Órgão, tecido ou células fixadas (Fixação)
- Permeabilização (detergentes ou proteases) controlada
- Pré-hibridização (tampão de hibridização sem a sonda) - Bloqueio
- Hibridização (37° a 42°C)
- Amplificação do sinal
- Contra-marcação (núcleo, citoplasma, membrana)

Oligonucleotídeos fluorescentes



RNAscope (A new FISH in the sea)

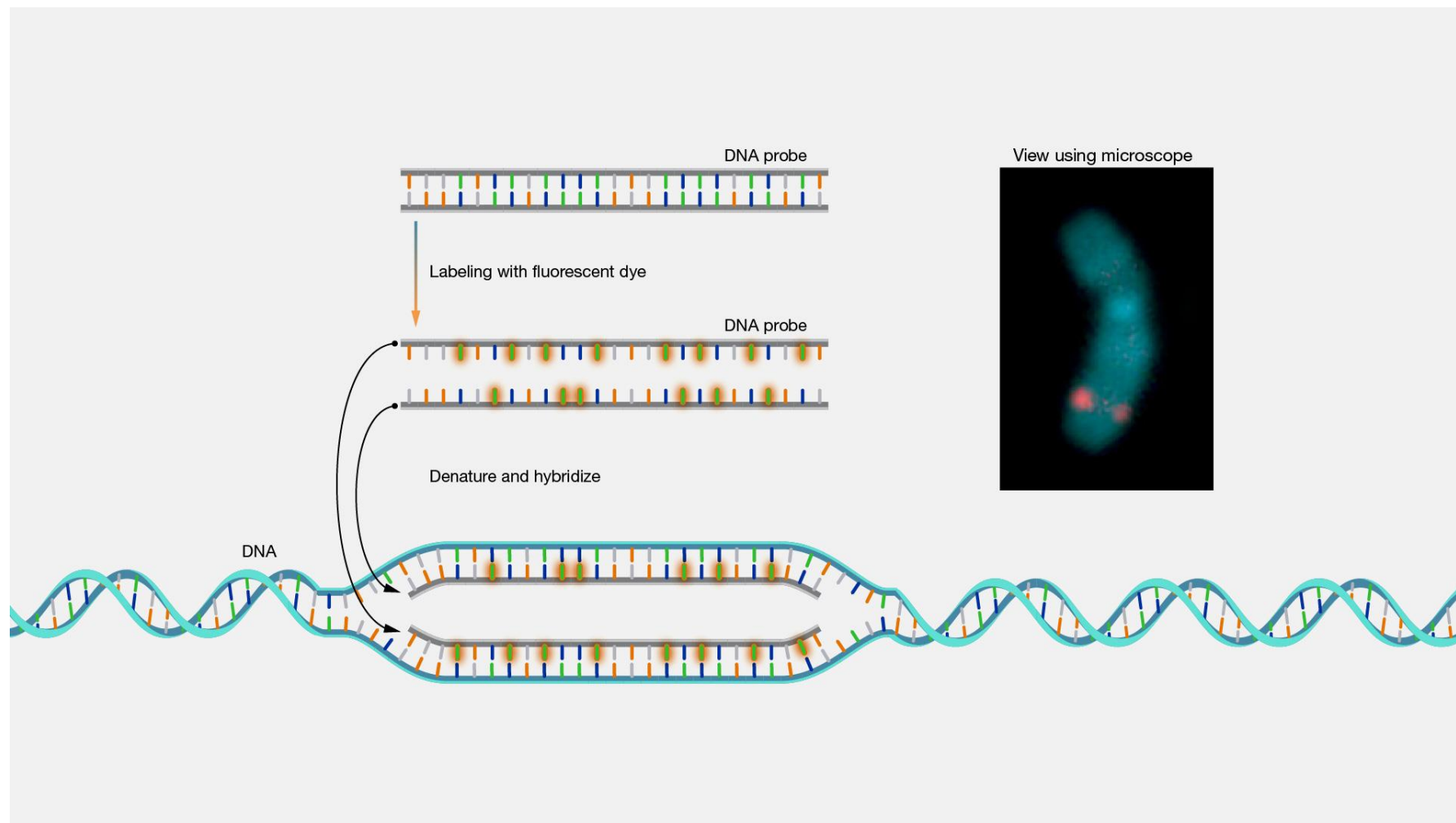


Hibridização *in situ*



- Ácidos Nucleicos

- DNA





RNA Prep

- Manipulação livre de RNase
- Fixação preservando RNA
- Tratamento com protease x morfologia
- Estratégia de amplificação de sinal
- Controle

IMPORTANTE

RNA Prep



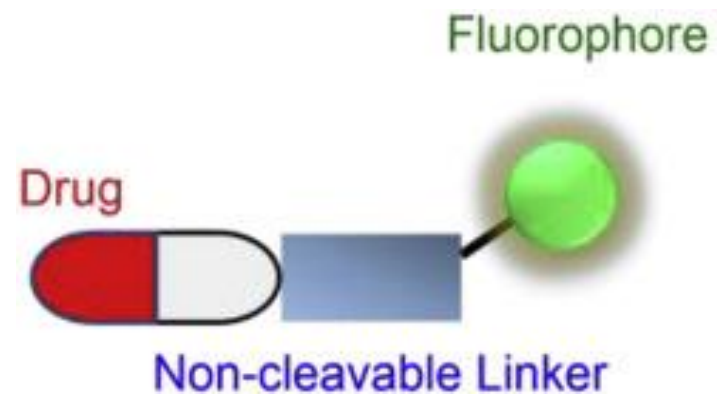
IMPORTANTE

- Controle
- Controle negativo: sem sonda
- Controle negativo amostra: amostra tratada com RNase
- Controle negativo: sonda não-complementar
- Qualidade da amostra: gene *housekeeping*



Amostras e seus alvos

- Moléculas marcadas





Obrigada



CNPq

MINISTÉRIO DA
CIÊNCIA, TECNOLOGIA
E INOVAÇÃO

GOVERNO FEDERAL
BRASIL
UNIÃO E RECONSTRUÇÃO