

## MICROTOMOGRAFIA DE RAIOS-X DE ALTA RESOLUÇÃO BASEADA EM LUZ SÍNCROTON PARA O ESTUDO TRIDIMENSIONAL DA MORFOLOGIA NEURAL EM TECIDOS INTEIROS

Dionísio P. Amorim Neto<sup>1\*</sup>, Bruno H. Silva Araujo<sup>2</sup>, Carlos S. Baraldi Dias<sup>3</sup>, Nathaly Lopes Archilha<sup>3</sup>, Esper Cavalheiro<sup>2</sup>, Harry Westfahl Jr<sup>3</sup>, Antônio José Roque da Silva<sup>3</sup>, Kleber Gomes Franchini<sup>2</sup>, Matheus de Castro Fonseca<sup>2\*\*</sup>

1. Estudante do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) e aluno PIBIC de Iniciação Científica no Laboratório Nacional de Biociências – LNBio, CNPEM
2. Pesquisador do Laboratório Nacional de Biociências – LNBio, CNPEM / Orientador\*\*
3. Pesquisador (a) do (a) Laboratório Nacional de Luz Síncrotron – LNLS, CNPEM

### Resumo

Neste trabalho, propomos um protocolo de imageamento que une uma técnica centenária de impregnação de mercúrio em neurônios (Golgi-Cox) e a tecnologia de aceleração de elétrons, aplicada a microtomografia de raios-X, para visualização tridimensional de neurônios *in situ*, de modo não destrutivo e com alto poder de resolução.

A partir de um modelo pré-estabelecido de indução de *Status Epilepticus*, a combinação dessas técnicas permitiu comparar e quantificar neurônios em condições saudáveis e doentes, em alta resolução, sem destruir a amostra ou necessidade de limpar o tecido.

Uma vez bem estabelecido, nosso trabalho abre caminho para o estudo de outros modelos de doenças neuronais, seja a partir da visualização do cérebro como um todo, de regiões específicas, ou de neurônios individuais, o que torna possível compreender melhor os seus impactos e desenvolvimento patológico, a nível celular.

**Autorização legal:** CEUA-CNPEM, License 43/2018.

**Palavras-chave:** neurobiologia; microtomografia; Golgi-Cox

**Apoio financeiro:** MCTIC; CNPq; MCTI/CNPq/CAPES: EAC Instituto de Neurociência Translacional.

### Introdução

Há mais de dois séculos, os cientistas buscam modos de estudar os neurônios de maneira individualizada, e é dessa busca, que resultou a elucidação da Doutrina Neuronal, proposta por Santiago Ramon y Cajal, fundamentado pelas técnicas histológicas desenvolvidas por Camilo Golgi (GOLGI, 1873; CAJAL, 1894; CAJAL et. al, 1888).

Hoje, a maioria das técnicas de imageamento utilizadas apresentam desvantagens e limitações em função da sua falta de contraste, protocolos de preparo de amostras extensos e a sua natureza destrutiva da amostra, em razão do fatiamento em série das mesmas; o que coloca em cheque os principais métodos de visualização 3D de células cerebrais num nível microscópico, como é o caso, da microscopia óptica confocal (LICHTMAN & CONCHELLO, 2005).

Neste aspecto os raios-X se mostram como uma ferramenta promissora, que permite analisar, sem destruição, uma diversidade ampla de amostras, sejam elas densas ou não, como espécimes inteiros ou estruturas biológicas, por exemplo. A microtomografia computadorizada de raios-X, uma técnica recente, se mostra um excelente candidato metodológico para decifrar a citoarquitetura e a conectividade dos neurônios no cérebro, de maneira não destrutiva e com alto poder de penetração (BONSE & BUSCH, 1996; SALOME et. al, 1999).

Por sua vez, o método de coloração de Golgi-Cox, mostra-se uma poderosa técnica para se estudar a conexão neuronal, sua morfologia, e também os componentes gliais (COX, 1981; GIBB & KOLB, 1988). Sendo o método capaz de marcar apenas neurônios e uma pequena fração destes, cerca de 3 a 10%, isto permite a segmentação de neurônios individuais por longas distâncias em imagens ópticas 3D. Embora apenas uma pequena fração de neurônios seja impregnada, esta limitação torna-se uma vantagem, pois as células fazem-se mais visíveis em função do agente de contrastação e mantêm todas as suas características, incluindo o corpo celular, dendritos, espinhos dendríticos e axônios.

Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi desenvolver um protocolo de imageamento, não destrutivo, que permitisse visualizar com alto poder de resolução, a nível celular, neurônios no cérebro em 3D, unindo a microtomografia de raios-X baseada em Luz Síncrotron com o método de coloração histológica de Golgi-Cox baseada na impregnação por mercúrio.

### Metodologia

Foram utilizados dois grupos de camundongos em nosso delineamento experimental, um controle, tratado com uma injeção intraperitoneal de solução salina 0,9% e outro tratado com pilocarpina 280mg/Kg, afim de se induzir nos animais um *Status Epilepticus* (CAVALHEIRO, SANTOS & PRIEL, 1996; ARAÚJO et. al, 2014), e após 14 dias da indução, os animais foram eutanaziados em câmara de CO<sub>2</sub>, decapitados e seus cérebros

foram removidos cuidadosamente. Foram dissecados, um hemisfério, cerebelo, hipocampo e córtex frontal, lavados com água destilada e imersos em solução de Golgi-Cox preparada no dia de uso, segundo o protocolo descrito por ZAQUOT & KAINDL (2016).

Depois de contrastados, as peças cerebrais foram destinadas a três diferentes técnicas de preparo de amostra e imageamento: histologia tradicional, microtomografia de raios-X de bancada ( $\mu$ CT) e microtomografia de raios-X baseada em Luz Síncrotron (UVX-LNLS).

Para o preparo histológico convencional, cérebros saudáveis e enfermos foram seccionados em séries de 150 $\mu$ m utilizando um vibratomo e alocados em lâminas tratadas com gelatina, lavadas em solução de amônia a 28% e em seguida, com água destilada. Os cortes histológicos foram preparados numa outra batelada de lavagens com solução fixadora (15%), água destilada, e então desidratados num gradiente de concentrações de etanol (70%, 80%, 95% e 100%), clarificados em xilol e montados em meios de montagem Entellan, para por fim, serem destinados à observação em microscopia.

Em ambas as técnicas de microtomografia de raios-X, depois de impregnados por mercúrio, as amostras foram desidratadas em gradiente de etanol, 70%, 80%, 95% e 100% e embebidas em Paraplast Plus.

A microtomografia de raios-X de bancada consistiu na digitalização das amostras, utilizando um scanner Brucker Skyscan 1272  $\mu$ CT. O tempo total de aquisição foi de 190min, resolução espacial de 2 $\mu$ m e um tamanho de pixel de 1 $\mu$ m. O tempo de exposição foi fixado em 8,79s. A tensão foi de 45kV e a rotação de 0,20°, com filtros Al 0,5 $\mu$ m + Cu 0,38 $\mu$ m.

Na microtomografia de raios-X baseada em Luz Síncrotron, mais de 2000 imagens de transmissão de raios-X foram obtidas girando a amostra em torno de um eixo de rotação fixo em 360°, em passos angulares uniformemente espaçados, para produzir uma pilha de sinogramas, que posteriormente foram transformados computacionalmente em um mapa 3D.

As imagens de transmissão de todo o cérebro e regiões cerebrais dissecadas foram obtidas usando radiação do magneto de flexão de 1,67T do anel de armazenamento 1,37 GeV UVX, filtrada por filtros de silício de 0,9 ou 0,2mm, respectivamente. Essas configurações produziram um feixe policromático, com pico de energia de aproximadamente 15keV ou 11keV, respectivamente, e aproximadamente 50% de largura de banda. As radiografias foram gravadas por um sistema detector indireto, baseado em um cintilador fino que converte os raios X transmitidos em luz visível.

## Resultados e Discussão

Como prova de conceito, as imagens obtidas através de séries histológicas, demonstram que a impregnação por sais de mercúrio de Golgi-Cox foi eficiente na marcação de neurônios no cérebro, de maneira homogênea e contínua em toda a células. Os camundongos tratados com pilocarpina apresentaram uma redução no número de células, alteração em sua morfologia e distribuição, especialmente no hipocampo e também no córtex frontal do cérebro.

A impregnação de neurônios com solução de Golgi-Cox envolve o uso de uma reação fotossensível fundamentada na redução de íons de mercúrio em um sal insolúvel. Um procedimento histológico tradicional seguiria um processo de duas etapas envolvendo a impregnação do tecido com uma solução iônica de mercúrio seguida por um passo em cuja reação química implique na formação de sulfureto de mercúrio após um tratamento alcalino.

Embora ainda não seja totalmente compreendido o motivo, a concentração de mercúrio durante a impregnação não é homogênea, mas seletiva, priorizando uma pequena fração de neurônios, seguida por algumas células da glia (NARAYANAN et. al, 2014).

Inicialmente, foram feitos os experimentos de microtomografia de raios-X, utilizando um microtomograma de bancada. A resolução alcançada com este sistema não foi tão alta quanto à obtida na linha de luz IMX, permitindo apenas uma análise qualitativa da amostra. Contudo, a diferença marcante entre os grupos controle e tratados com pilocarpina é evidente, demonstrando a versatilidade do procedimento apresentado neste trabalho.

Cabe ressaltar aqui, que até agora, a visualização da morfologia unicelular dos tecidos neuronais intactos, utilizando microtomografias de raios-X não foi completamente definida devido a uma impregnação de neurônios parcialmente heterogênea dos neuritos e artefatos de amostra excessivos. No entanto, a impregnação de neurônios baseada em mercúrio mostrada neste trabalho, permitiu definir claramente os neurônios inteiros principalmente por causa de uma impregnação mais contínua e homogênea das células e uma densidade muito reduzida de artefatos (grânulos reflexivos dispersos) que interferem na segmentação das imagens (CASTANO, 1995). Outra vantagem do método de Golgi-Cox é a maior probabilidade de corar um número aumentado de diferentes tipos neuronais do que o método de Golgi baseado em prata, o que é interessante para uma análise em grande escala da morfologia neuronal em condições de saúde e patologia (RANJAN & MALLICK, 2010).

Como mencionado, córtex e hipocampo são duas das principais regiões afetadas neste modelo de patologia induzida pela administração de pilocarpina, e já observado por outros pesquisadores (CAVALHEIRO, SANTOS & PRIEL, 1996; CLIFFORD et. al, 1987; Honchar, OLNEY & SHERMAN, 1983), o que nos permitiu uma caracterização morfológica em 3D pela primeira vez.

A técnica utilizando a linha de luz IMX, permitiu ainda, fatiar ou renderizar virtualmente, volumes de estruturas específicas no cérebro, como o córtex frontal de animais controles e tratados. Contudo, a espessura de certas regiões das neuritos celulares estava muito próxima do limite de resolução espacial, desfocando os limites das células durante a segmentação automática.

Para uma ótima visualização da arquitetura neuronal, os dados brutos tiveram de ser pré-processados para resolver problemas como ruído periódico e brilho não uniforme (LI et. al, 2010). Em seguida, estes dados puderam ser reconstruídos e o volume renderizado em 3D. Aqui, 2048 projeções de cada estrutura imageada foram reconstruídas.

Sobre as limitações da técnica, em especial a segmentação automática, não fornece muitos detalhes das células. Somente após a segmentação semi-automática, as características completas da célula, incluindo os neuritos, puderam ser detalhadas.

Uma forma de corrigir ou minimizar estas interferências na imagem é realizando a segmentação das estruturas de interesse manualmente, o que lhe confere características extremamente ricas e detalhadas. É possível selecionar uma região de interesse, como o córtex frontal, destacando alguns neurônios dentro da própria estrutura, e isolá-los digitalmente.

A padronização deste tipo de ensaio permitiu, ainda, a realização de uma análise quantitativa em 3D da densidade de neurônios presentes em duas regiões do cérebro, hipocampo e córtex frontal dos animais saudáveis e doentes. Nota-se, conforme esperado, por se tratar de um modelo patológico bem estabelecido, uma redução na densidade de neurônios presentes no córtex frontal (Controle =  $30 \pm 2$  células/mm<sup>3</sup>; Pilocarpina =  $25 \pm 2,7$  células/mm<sup>3</sup>; n = 6; p <0,05), e também no hipocampo (Controle =  $38 \pm 6$  células/mm<sup>3</sup>; pilocarpina =  $18 \pm 2,7$  células/mm<sup>3</sup>; n = 6; p <0,05) em animais tratados com pilocarpina, quando comparados ao grupo controle.

### Conclusões

Em resumo, concluímos que a técnica de impregnação de Golgi-Cox associada ao preparo de amostra para microtomografia é adequada para os dois tipos de tomogramas, sincrotron e "table top"; e também para os estudos em neurobiologia, em especial para um nicho metodológico de mapeamento de neurônios em 3D.

Com um nível de resolução celular, e de maneira não destrutiva, a técnica de imageamento por microtomografia de raios-x baseados em Luz Síncrotron permitiu o estudo da neuromorfologia e da quantificação do número de células em cérebros saudáveis e doentes.

Sob uma perspectiva futurista, que se aproxima próxima, o desenvolvimento e a construção de fontes de Luz Síncrotron mais sofisticadas e potentes, associada com os avanços nos softwares de processamento de imagens, será possível aumentar nossa resolução espacial, o que permitirá a análise de volumes de amostras cada vez maiores e em uma resolução nanométrica.

Nesta mesma linha de raciocínio, antecipamos que o uso de  $\mu$ CT de bancada de alta resolução poderia permitir o uso do protocolo para uma análise quantitativa semelhante à apresentada aqui, o que possibilita o uso da técnica com amostras de biópsia e em instalações médicas.

Assim, este projeto desempenhará um papel fundamental em prol da compreensão da anatomia e da rede neural saudável ou acometida pelas mais diversas patologias neuronais.

### Referências bibliográficas

ARAUJO, Bruno et al. Decreased expression of proteins involved in energy metabolism in the hippocampal granular layer of rats submitted to the pilocarpine epilepsy model. **Neuroscience Letters**, v. 561, p.46-51, 2014.

BONSE, Ulrich; BUSCH, Frank. X-ray computed microtomography ( $\mu$ CT) using synchrotron radiation (SR). **Progress in biophysics and molecular biology**, v. 65, n. 1-2, p. 133-169, 1996.

Cajal, SR *et. al.* Estruturas dos centros nervosos das aves. Rev. Trim. Histol. Norma. Pat 1, 1-10 (1888).

Cajal, SRY La estrutura fina dos centros nervo. Proc. R. Soc. Lond. Biol. Sei 55, 443-468 (1894).

CASTANO, P. et al. A comparison between rapid Golgi and Golgi-Cox impregnation methods for 3-D reconstruction of neurons at the confocal scanning laser microscope. **Italian journal of anatomy and embryology= Archivio italiano di anatomia ed embriologia**, v. 100, p. 613-622, 1995.

CAVALHEIRO, E. A.; SANTOS, N. F.; PRIEL, M. R.. The Pilocarpine Model of Epilepsy in Mice. **Epilepsia**, v. 37, n. 10, p.1015-1019, 1996.

CLIFFORD, D. B. et al. The functional anatomy and pathology of lithium-pilocarpine and high-dose pilocarpine seizures. **Neuroscience**, v. 23, n. 3, p. 953-968, 1987.

COX, Willem Hendrik. Imprägnation des centralen Nervensystems mit Quecksilbersalzen. **Archiv für mikroskopische Anatomie**, v. 37, n. 1, p. 16-21, 1891.

GIBB, Robbin; KOLB, Bryan. A method for vibratome sectioning of Golgi-Cox stained whole rat brain. **Journal of neuroscience methods**, v. 79, n. 1, p. 1-4, 1998.

GOLGI, C. Sulla struttura della sostanza grigia dell cervello', Gazz. **Med. Lombarda**, v. 33, p. 224-246, 1873.

HONCHAR, Michael P.; OLNEY, John W.; SHERMAN, William R. Systemic cholinergic agents induce seizures and brain damage in lithium-treated rats. **Science**, v. 220, n. 4594, p. 323-325, 1983.

LI, Anan et al. Micro-optical sectioning tomography to obtain a high-resolution atlas of the mouse brain. **Science**, v. 330, n. 6009, p. 1404-1408, 2010.

LICHTMAN, Jeff W; CONCHELLO, José-angel. Fluorescence microscopy. **Nature Methods**, v. 2, n. 12, p.910-919, dez. 2005.

NARAYANAN, Sareesh Naduvil et al. Appraisal of the effect of brain impregnation duration on neuronal staining and morphology in a modified Golgi–Cox method. **Journal of neuroscience methods**, v. 235, p. 193-207, 2014.

RANJAN, Amit; MALLICK, Birendra N. A modified method for consistent and reliable Golgi–Cox staining in significantly reduced time. **Frontiers in neurology**, v. 1, p. 157, 2010.

SALOMÉ, Murielle et al. A synchrotron radiation microtomography system for the analysis of trabecular bone samples. **Medical Physics**, v. 26, n. 10, p. 2194-2204, 1999.

ZAQOUT, Sami; KAINDL, Angela M. Golgi-cox staining step by step. **Frontiers in neuroanatomy**, v. 10, p. 38, 2016.