

Teste de viabilidade de medicamentos de esferoides tumorais 3D usando a formação de imagem automatizada de macro a micro

Introdução

A observação microscópica é uma forma eficaz de avaliar os efeitos medicinais de medicamentos anticâncer em esferoides ou organoides. Porém, o processo de trabalho de formação de imagem pode ser demorado, pois requer um tempo operando o microscópio para encontrar a sua amostra e realizar a formação de imagem.

Desenvolvemos a formação de imagem automatizada de macro a micro, um módulo de formação de imagem inovador que melhora dramaticamente a eficiência deste trabalho. A formação de imagem automatizada de macro a micro pode substituir operações manuais do microscópio com a formação

de imagem e detecção de objetos automatizadas. Nesta nota de aplicação, apresentamos um estudo de caso sobre testes de viabilidade de medicamentos de esferoides tumorais 3D usando a formação de imagem automatizada de macro a micro.

Materiais e métodos: preparação de amostras

As células MCF-7 da linha celular de câncer de mama humano foram semeadas a 2.000 células/poço em uma placa em U de 96 poços (PrimeSurface, Sumitomo Bakelite). No terceiro dia de cultura, os medicamentos anticâncer (Paclitaxel, 5-FU, Cisplatina) foram adicionados a várias concentrações. Após 24 horas de cultura, Hoechst 33342, iodeto de propídio (Propidium Iodide, PI) e Calceína-AM foram adicionados e incubados por uma hora. Os núcleos de todas as células foram tingidos com Hoechst33342, os núcleos das células mortas foram tingidos com PI e as células vivas foram tingidas com Calceína-AM. Em seguida, as células foram observadas usando o módulo do software de macro a micro automatizado no microscópio confocal de escaneamento a laser FV3000.

Como funciona a formação de imagem automatizada de macro a micro?

Com a formação de imagem automatizada de macro a micro, as seguintes operações podem ser realizadas automaticamente, bastando configurar os métodos de observação previamente.

Primeiro, a formação de imagem automatizada de macro a micro adquire uma imagem de visão geral do poço inteiro (incluindo o eixo Z) usando uma lente objetiva de baixa ampliação (objetiva de 1.25X a 4X). Com base na imagem obtida (imagem macro), a posição e a espessura da amostra em cada poço são automaticamente detectadas. Depois, a posição de formação de imagem ideal (XYZ) é calculada e a formação de imagem da amostra é realizada em detalhe usando uma lente objetiva de alta ampliação (imagem micro). Se a amostra for maior do que o campo de visão da lente objetiva usada na formação da imagem micro, o sistema pode automaticamente unir múltiplas imagens (Figura 1).

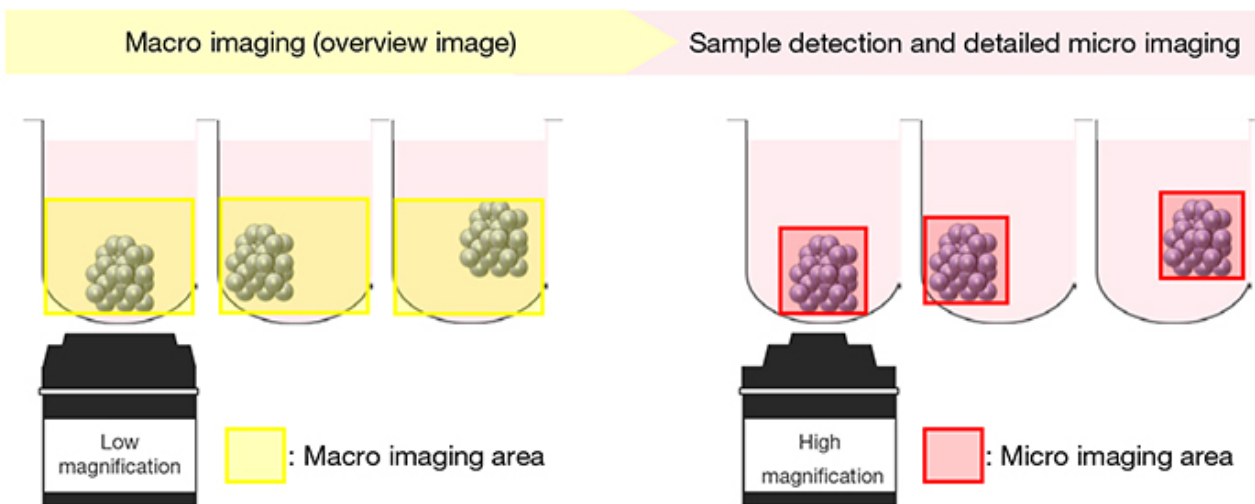
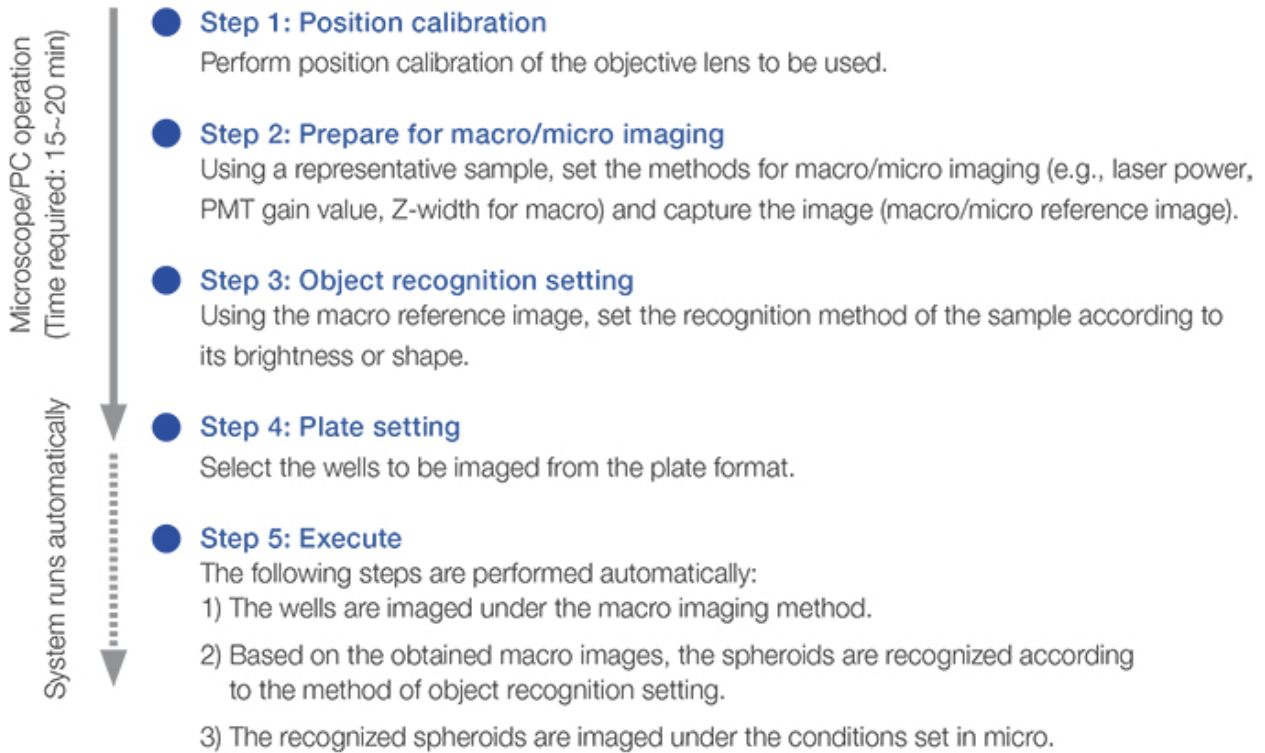


Figura 1. Imagem esquemática de macro a micro

A operação do microscópio leva cerca de 15–20 minutos e somente é necessária no momento da configuração dos métodos de observação iniciais. Após a execução da formação de imagem

automatizada de macro a micro, o usuário pode deixar o microscópio e o computador e realizar outras tarefas enquanto a formação de imagem é concluída. Como resultado, o tempo gasto na operação do microscópio é drasticamente reduzido. Além disso, mesmo que a espessura ou a posição da amostra variem entre os poços, o sistema pode formar imagens com o intervalo Z ideal para cada amostra. Isso acelera o tempo de formação de imagem e reduz a quantidade de dados de imagem.

Etapas da formação de imagem de macro a micro



Resultados da formação de imagem

Esferoides MCF-7 tratados com vários medicamentos anticâncer foram tingidos com Calceína-AM e PI a fim de visualizar a viabilidade. Usando o nosso módulo de formação de imagem automatizada de macro a micro para o microscópio confocal FV3000, conseguimos adquirir rapidamente imagens de alta resolução de 60 poços nas posições apropriadas. A operação do microscópio levou apenas 15 minutos (Figura 2).

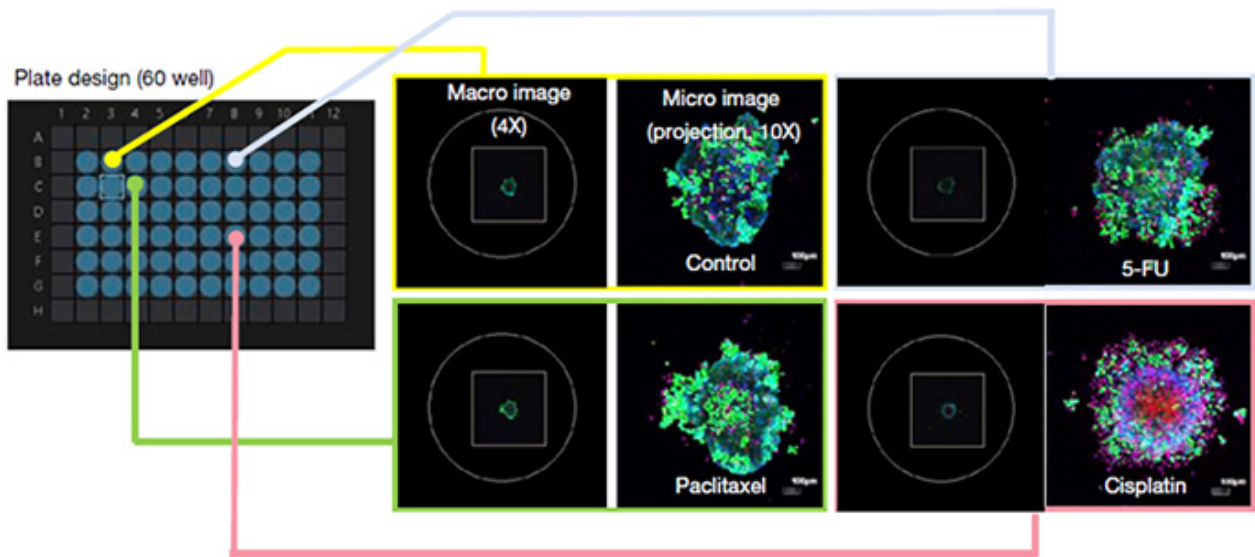


Figura 2. Adaptação do módulo de formação de imagem automatizada de macro a micro para um teste de viabilidade de medicamentos anticâncer

O processo de trabalho de observação convencional requer que você especifique a posição da amostra em cada poço individualmente para obter as condições de formação de imagem apropriadas. Usando o módulo de formação de imagem automatizada de macro a micro, esse trabalho é eliminado. Além disso, o tempo gasto na formação de imagem pode ser usado em outras tarefas, aumentando a eficiência do trabalho.

Resultados das análises

Ao abrir os arquivos das imagens adquiridas pelo módulo de formação de imagem automatizada de macro a micro com o software de análise celular NoviSight™ 3D, é possível analisar imagens multipoços em 3D de uma vez só.

Todos os núcleos são reconhecidos pela intensidade do MCF-7 Hoechst33342. A viabilidade foi avaliada classificando se os núcleos reconhecidos eram células vivas ou mortas de acordo com a intensidade de Calceína-AM e PI. Como resultado, conseguimos avaliar com sucesso a viabilidade de cada medicamento anticâncer a nível unicelular, conforme os relatórios conhecidos (Figura 3 e Figura 4).



Figura 3. Análise do NoviSight para a classificação de células vivas/mortas usando a intensidade da Calceína-AM/PI

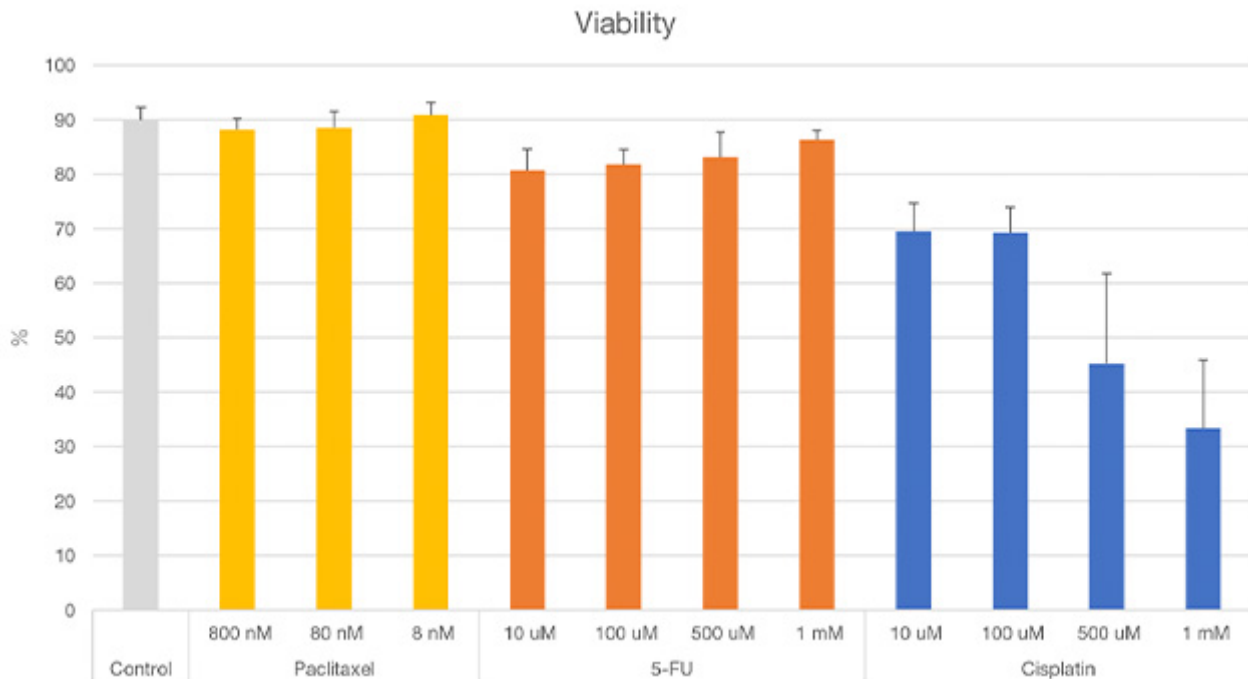


Figura 4. Resultados da viabilidade de esferoides usando a análise do NoviSight

Conclusão

Usando o módulo de formação de imagem automatizada de macro a micro, conseguimos formar imagens de 60 poços da microplaca nas posições de imagem apropriadas após cerca de 15 minutos operando o microscópio e o computador.

Estimamos que a formação de imagem manual de cada poço individualmente exigiria mais de seis horas de operação intermitente do microscópio e do computador, incluindo o tempo de formação de imagem. Com o módulo de formação de imagem automatizada, você somente precisa passar cerca de 15 minutos operando o microscópio e o computador e tem a flexibilidade de realizar outras tarefas enquanto a formação de imagem é concluída.

Além disso, ao combinar a formação de imagem automatizada de macro a micro e o software NoviSight, foi possível analisar imagens multipoços em lotes. Essa configuração proporciona um processo de trabalho simplificado, da aquisição de imagem à análise de amostras de esferoides multipoços.

Mayu Ogawa

Pesquisador, Pesquisa e Desenvolvimento – Olympus Corporation

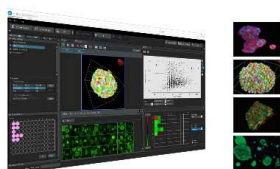


Microscópio de escaneamento a laser confocal

FV3000

- Disponível para configurações de escâner híbrido galvanômetro/ressonante (FV3000RS) ou apenas galvanômetro (FV3000)
- Detecção TruSpectral extremamente precisa e eficiente em todos os canais
- Otimizado para imagem de célula viva com alta sensibilidade e baixa fototoxicidade
- Inverted and upright frame options to suit a variety of applications and sample types

Saiba mais ► <https://www.olympus-lifescience.com/laser-scanning/fv3000/>



Software de análise celular 3D

NoviSight

O software de análise celular NoviSight 3D fornece dados estatísticos sobre esferoides e objetos 3D em experimentos com base em microplacas. Use-o para quantificar a atividade celular em 3D, capturar facilmente eventos celulares raros, obter contagens de células precisas e melhorar a sensibilidade da detecção. O software NoviSight funciona com uma variedade de técnicas de formação de imagem, incluindo a formação de imagem confocal de rastreamento de pontos, formação de imagem de dois fótons, formação de imagem confocal de disco giratório e formação de imagem de células vivas de super-resolução.

- Reconhecimento de imagem 3D rápido de estruturas inteiras a características subcelulares
- Análise estatística precisa
- Equipado com uma variedade de ensaios padrão prontos para usar ou crie o seu próprio facilmente

Saiba mais ► <https://www.olympus-lifescience.com/software/novisight>