C E N A

BD-004

PRINCÍPIOS BÁSICOS DE ÓPTICA ELECTRÔNICA E TÉCNICAS DE PREPARO DO ESPÉCIMEN PARA MICROSCOPIA ELECTRÔNICA

ELLIOT W. KITAJIMA

30 DE OUTUBRO DE 1 971

BOLETIM DIDÁTICO

CENTRO DE ENERGIA NUCLEAR NA AGRICULTURA
USP-CNEN

ESCOLA SUPERIOR DE AGRICULTURA "LUIZ DE QUEIRÓZ"

PIRACICABA-SP

- BRASIL -

CENA/BD-004

CENA
BIBLIOTECA
N.o 1590

A P R E S E N T A Ç Ã O

Com a instalação do Microscópio Eletrônico no Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA) surgiu a necessidade de se discutir os problemas diretamente ligados a êsse novo campo de pesquisas dentro da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiróz".

Por essa razão foi organizado em janeiro de 1971 um primeiro encontro entre os interessados para uma tomada de consciência sôbre os princípios da Óptica Eletrônica, técnicas de preparo do espécimen, elementos de radioautografia ao nível de microscopia eletrônica e outros assuntos correlatos.

Nêsse encontro sentiu-se a necessidade de se aproveitar as aulas ministradas pelo Dr.E.W.Kitajima - eletrono - -microscopista da Seção de Virologia do Instituto Agronômico de Campinas (IAC) - e publicá-las na forma de um Boletim.

Seria quase desnecessário ressaltar nesta apresentação a importância desta publicação pois todos quantos se dedicam ou vierem a se dedicar à Microscopia Eletrônica em nosso meio irão encontrar nela uma série de considerações de natureza teórica e prática que refletem os conhecimentos de um técnico de primeira linha com mais de uma dezena de anos de vivência nesse campo.

PROF. DARCY MARTINS DA SILVA

Piracicaba, outubro de 1 971

ÍNDICE

página

1. PRINCÍPIOS DE ÓPTICA ELECTRÔNICA 1

1.1. Breve histórico do microscópio electrônico 1
1.2. Poder de resolução..... 2
1.3. Constituição e funcionamento do microscópio electrônico 3
1.4. Vantagens e limitações do microscópio electrônico 6
1.5. Possibilidades de aplicação do microscópio electrônico 6
1.6. Tipos especiais de microscópio electrônico 7

A - Microscópio electrônico de baixa voltagem . 7
B - Microscópio electrônico de alta voltagem .. 7
C - Criomicroscópio electrônico 8
D - Microscópio electrônico de emissão 8
E - Microscópio electrônico analítico (ou de micro-sonda) 8
F - Microscópio electrônico de varredura (Scanning EM) 9

2. TÉCNICAS DE PREPARO DO ESPÉCIMEN PARA MICROSCOPIA ELECTRÔNICA 12

2.1. Princípios gerais de formação da imagem 12
2.2. Preparo da lâmina porta espécimen 12
2.3. Preparo do espécimen 13
2.3.1. Material em suspensão 13
A - Metalização 13
B - Contrastação negativa e positiva ... 14
C - Preparações "leaf dip" 15
2.3.2. Replicagem 15
2.3.3. Técnicas histológicas 16

A - Considerações Gerais 16
B - Fixação 16
C - Inclusão 19
D - Ultramicrotomia 22
E - Contrastação das secções 23

2.3.4. Técnicas Especiais 25

A - Técnicas para investigação de DNA e outras moléculas fibrilares 25
B - Criodecapagem 26
C - Imunomicroscopia electrônica 27
D - Histoquímica enzimática 28
E - Citoquímica 29
F - Autoradiografia 30
G - Ataque iônico 30

2.3.5. Adendo 31
A - Firmas fornecedoras de Drogas e Equipamentos para microscopia electrônica 31
B - Alguns livros sôbre microscopia electrônica, aspectos gerais, teoria, e aplicações principalmente no campo da biologia 31
C - Periódicos 33
D - Firmas fabricantes de Microscópio Electrônico 34
E - Ultramicrótomos 34
F - Equipamento para vácuo - Metalizador 34
G - Chapas Fotográficas 34
H - Métodos para calibração dos aumentos dado pelo aparelho 35
2.3.6. Adendo II 35
A - Uma técnica rotineira para fixação, inclusão e contrastação de secções, em microscopia electrônica..... 35
B - Soluções estoques para fixação 36
C - Citrato de chumbo 37
D - Avaliação da espessura pela côr de interferência das secções 37
E - Formulários 38

PRINCÍPIOS BÁSICOS DE ÓPTICA ELECTRÔNICA E TÉCNICAS DE PREPARO DO ESPÉCIMEN PARA MICROSCOPIA ELECTRÔNICA

E.W.KITAJIMA - Seção de Virologia, Inst.Agron.-Campinas-SP

1.- PRINCIPIOS DE ÓPTICA ELECTRÔNICA

1.1. Breve histórico do microscópio electrônico

Por volta de 1830,bem antes da descoberta do electron, Sir William Hamilton demonstrara já, claramente, a analogia existente entre as leis que governam corpúsculos movendo-se em campos de força e as que regem a trajetória da luz através de meios de diferentes índices de refração.

Abbé em 1873, por outro lado, havia demonstrado que havia um limite teórico para o menor objeto visível em um instrumento de óptica, e que tal limite era diretamente proporcional ao comprimento da onda da luz e inversamente proporcional à abertura numérica das lentes.

Em 1897 dá-se a descoberta do electron por Thompson sendo suas características determinadas por Millikan (massa = =1/1873 do hidrogênio -$9{,}107^{-28}$g; carga = $1{,}603 \times 10^{-19}$ coulomb).

Em 1924, foi demonstrado teórica e pràticamente que comprimentos de onda extremamente curtos estariam associados a um feixe de electrons,respectivamente por De Broglie e Davidson-Germer.

Em 1926, Busch investigou o movimento dos electrons em campos magnéticos e electrostáticos, verificando que essas forças, se produzidas com uma simetria axial, poderiam funcionar como lentes para um feixe de electrons e que o efeito obedecia aos mesmos princípios da óptica fotônica.

Estimulados pelos trabalhos pioneiros de Busch, vários laboratórios europeus iniciaram pesquisas visando construir um supermicroscópio. Em 1932, na Alemanha, Ruska, sob orientação de Knoll, desenvolve na Technische Hochschule de Berlin, uma lente magnética, aproveitando-a em um microscópio electrônico, enquanto Bruche e Johansen descreviam um microscópio electrostático de imersão, de dois estágios para exame de superfície dos catodos emissores. Em 1934, finalmente consegue Ruska produzir um aparelho de poder de resolução superior ao microscópio fotônico. Seus trabalhos foram prosseguidos por Krause e Muller, que volta de 1937 já obtinham aparelhos com poder de resolução da ordem de 25ÔA. Mais ou menos na mesma época, a firma Siemens decide produzir microscópio electrônico em escala comercial. Os trabalhos são conduzidos por von Borries e Ruska, e em 1939 é lançado o primeiro instrumento comercial, já com uma apreciável resolução da ordem de 30-50A. A aplicação dêste aparelho nos diferentes cam

---

Recebido para publicação em 30 de agôsto de 1 971

pos da pesquisa foi desenvolvida na própria Siemens. Helmut Ruska, irmão de Ernst, o construtor do aparelho, fez trabalhos pioneiros sôbre bactérias e vírus, enquanto Volpers, fez pesquisas sôbre fibras e tecidos biológicos.

A firma AEG, também alemã, desenvolveu competitivamente um modêlo electrostático, projetado por von Ardenne e que também foi o introdutor de várias técnicas de preparo do espécimen, muitas das quais ainda nos chega. Marton em Liège construiu independentemente em 1934, um instrumento electromagnético, tendo-o utilizado em suas pesquisas biológicas. Posteriormente foi êle aos EUA auxiliar o desenvolvimento dos aparelhos da RCA. Na Inglaterra, baseado nos trabalhos dos alemães e de Marton, a Metropolitan-Vickers fez seus primeiros protótipos que resultou no modêlo comercial EM-2, em 1944. No continente americano Hillier e Prebus, em 1939, construiram o primeiro microscópio electrônico em Toronto. Mais tarde, êles e mais Zworkin, Ramberg, Vance, fizeram o modêlo B, em 1941, e posteriormente a série EMU. No Japão em 1939, um grupo de trabalho sob a direção de Kasai, baseados nos trabalhos pioneiros dos alemães, mas independentemente dêstes, construiram seus protótipos que serviram de base para os instrumentos produzidos comercialmente hoje.

1.2. Poder de resolução

Qualquer sistema óptico, utilizando um sistema de radiações (luz visível, raio-X, feixe de electrons, etc.) tem um limite natural para o menor detalhe que é possível nêle discernir. Êste limite é referido como poder de resolução, e que pode ser definido como a menor distância entre dois pontos os quais podem ainda ser distinguidos individualmente na imagem.

O poder de resolução (PR) depende:*

a.- da geometria e das dimensões do sistema óptico, i.e., da abertura angular da lente e que representa a relação entre o raio da lente (r) e sua distância focal (f) de tal modo que

$$\operatorname{tg} A = r/f;$$

b.- do comprimento de onda da radiação que incide sôbre o objeto. Objetos menores que o comprimento de onda causam pouca perturbação nessa onda, sendo tanto maior essa perturbação, quanto maior fôr o objeto. Há um nível mínimo nessas perturbações abaixo do qual não se pode percebê-las.

Resumindo temos:

$$PR = k\, L/AN$$

L -comprimento de onda;
AN -n sen A (n = índice de refração);

a constante de proporcionalidade K depende de fatôres visuais

expressos em têrmos de variação em brilho que pode ser detectado. Teòricamente o valor mais justificável é 0,6; sen A no máximo poderá ser 1 enquanto n raramente vai além de 1,5. Assim, nas condições ideais, PR = 0,5 L. Assim, usando radiações na gama visível, teríamos nas melhores das hipóteses, uma resolução da ordem de 2000A.

Assim a única maneira de melhorar a resolução seria reduzindo L. A teoria dualista da radiação permite calcular o comprimento de onda de um feixe de electrons, segundo a equação

$$L = h/mv$$

h - constante de Planch;
m - massa;
v - velocidade.

Como no caso dos electrons, a sua energia cinética é função da voltagem de aceleração, segundo a expressão

$$mv^2/2 = Ve$$

V - voltagem de aceleração;
e - carga do electron,

reunindo ambas expressões teremos

$$L = h(2Vem)^{0,5}$$

Sendo

h, m e e - constantes,

teríamos finalmente $L = 12,3\ V^{-0,5}$ (em Angstroms)

A uma voltagem de aceleração de 90 kV, teríamos

$$L = 0,04A,$$

e poder-se-ia esperar uma resolução teórica de 0,02A.

Desta maneira, a razão fundamental do desenvolvimento do microscópio, electrônico foi a de criar um sistema óptico que pudesse aproveitar radiações de comprimento de onda tão curto, e que teòricamente poderia permitir resoluções da ordem de centésimos de A, e que resultou nos aparelhos modernos, dando na prática, poder da resolução de ca.2A.

1.3. Constituição e funcionamento do microscópio electrônico.

A diferença maior entre o microscópio electrônico e o fotônico reside assim no emprego de diferentes tipos de radiação para iluminar o espécimen, ambos possuindo as mesmas componentes (sistema de iluminação, lentes condensadoras, estágios para o espécimen, lente objetiva e lente projetora).

Contudo essas diferentes partes têm princípios de funcionamento diferentes a saber:

Sistema de iluminação - é o sistema que gera o feixe de electrons e é comumente denominada de canhão electrônico. O feixe electrônico é obtido liberando-se os electrons de seus átomos, acelerando-os através de uma elevada diferença de potencial. Nos microscópios electrônicos de transmissão, comerciais, utiliza-se praticamente só a emissão a quente, obtida pelo aquecimento de um filamento de tungstênio em V. Além do filamento o canhão contém dois cilindros coaxiais, cada qual provido de um pequeno orifício. Um contém o filamento e é chamado cilindro de Wehnelt, ao qual pode-se aplicar um potencial auxiliar negativo para intensificar o feixe. Ao filamento acha-se aplicado um alto potencial negativo (40 a 100 KV nos aparelhos comerciais, até 3 milhões em aparelhos experimentais), funcionando assim como o cátodo. Os electrons emitidos pelo filamento é assim violentamente repelidos pela alta tensão e ao mesmo tempo atraídos pelo outro cilindro, o anodo, comumente à tensão nula. Os electrons atraídos para o anodo ultrapassam-no pelo seu orifício, ganhando impulso suficiente para atravessar o condensador, espécimen, objetiva e projetora e causar fluorescência no ecran ou impressionar a emulsão fotográfica.

Lentes - tôdas as lentes do microscópio electrônico não são constituídas de matérial solido, mas por forças de campo- magnéticas ou electrostáticas. A maioria dos aparelhos comerciais usa lentes electromagnéticas que oferecem vantagens teóricas sôbre as electrostáticas. As lentes electromagnéticas constituem-se de um cilindro ou solenóide, ativada por uma corrente contínua. A convergência da lente é aumentada, limitando o campo magnético a uma faixa estreita, obtida por acessórios denominados peças polares. Quando adequadamente projetadas as lentes electromagnéticas podem ter distância focal da ordem de 1-2mm. Incidentalmente, a distância focal pode ser estimada pela expressão

$$1/f = 0{,}022/V \int_{-\infty}^{+\infty} H_z^2 \, dz$$

f - distância focal
V - voltagem
H_z - intensidade do campo magnético

As lentes electrostáticas usualmente constituem-se de 3 discos dotados de pequena perfuração, estando as 2 externas num mesmo potencial (usualmente 0) e a interna no mesmo potencial de aceleração do electron. Nota-se assim que no microscópio electrônico não há movimento das lentes em relação ao espécimen, pois a focalização é feita variando-se a distância focal da lente, através da variação da corrente que nela circula, e em última análise comporta-se de maneira análoga a focalização pelo olho humano.

O feixe de electrons é assim condensado pelo conden

sador (uniformizando a velocidade, e por conseguinte, o comprimento de onda), passando pelo espécimen, cuja imagem (que seria mais propriamente designado um densitograma electrônico) é ampliada sucessivamente pela lente objetiva e projetora (na maioria dos aparelhos comerciais existe uma lente intermediária entre aquelas duas, dando uma maior flexibilidade nas magnificações produzidas) e projetada sôbre o ecran fluorescente ou a emulsão fotográfica. A variação da magnificação pode ser obtida continuamente variando a distância focal da lente intermediária e projetora. O ecran acha-se coberta de uma substância fluorescente (mistura de ZnS e CdS) que torna-se indispensável para visualização da imagem, desde que o comprimento de onda do feixe electrônico é tão curto que não impressionaria nossa retina. Mencione-se que nos aparelhos modernos, o uso de duas lentes condensadoras, que permite iluminar áreas restritas do espécimen, é comum, e tem a vantagem de diminuir sensivelmente os danos de irradiação electrônica do espécimen.

Todo o sistema - canhão electrônico, lentes, espécimen, ecran, câmara fotográfica, etc., deve ficar sob alto vácuo, para evitar a dispersão dos electrons pelos moléculas do ar e a própria descarga da alta voltagem. Usualmente o vácuo é da ordem de 10^{-4} - 10^{-5} mmHg, conseguidas graças a bombas de difusão. Um sistema de válvulas permite o isolamento das diferentes partes do sistema de vácuo.

Como a velocidade dos electrons e a distância focal das lentes variam com a corrente, estas devem estar altamente estabilizadas e reguladas. Isso é feito por um circuito electrônico auxiliar, relativamente complexo, de cuja perfomance juntamente com os cuidados com que é manufaturado o sistema óptico, depende a qualidade do aparelho.

O limite de resolução do microscópio electrônico é estabelecido pela perfeição do sistema óptico. Embora teòricamente se pudesse resolver centésimos de A pela equação de Abbé, uma série de problemas, dentre as quais a aberração de esfericidade, limita a resolução dos aparelhos em tôrno de 2A.

As lentes electrônicas apresentam defeitos semelhantes às lentes fotônicas, embora as suas causas sejam completamente diferentes. A aberração de esfericidade, a mais importante em microscopia electrônica se caracteriza pelo fato de os feixes periféricos serem mais fortemente curvados que os centrais, e resultam de o campo magnético ou electrostático aumentarem no sentido radial. O resultado é uma imagem borrada. O único meio, no caso das lentes electrônicas (as lentes fotônicas podem ser corrigidas combinando-se lentes com aberrações de sinais opostos), de reduzir essa aberração é procurar utilizar sòmente os feixes centrais, limitando seu diâme-

tro pelo uso de diafragmas. Todavia se os diafragmas forem muito pequenos, surgirão problemas de difração, prejudicando a imagem. Há assim um compromisso ótimo entre estas limitações, e que resulta no máximo poder de resolução. Para lentes electromagnéticas êsse valor é da ordem de 2-3A, enquanto para lentes electrostáticas, que têm uma aberração de esfericidade mais acentuada, é algumas vêzes maior.

As outras aberrações são: cromática, que origina de electrons com diferentes velocidades no feixe e que resultam das flutuações na alta tensão e da dispersão incoerente. Estabilizadores eliminarão a primeira causa, enquanto espécimens mais delgados resolvem a segunda alternativa. O astigmatismo, a aberração que leva à produção de uma imagem linear a partir de um objeto punctual, decorre nas lentes electrônicas de defeitos de fabricação do sistema óptico, que geram campos assimétricos. Ela pode ser fàcilmente sanada pelo uso de fôrças magnéticas auxiliares que corrigem essa assimetria. Finalmente, a distorção é negligível nos microscópios electrônicos e decorre da falta de uniformidade da magnificação no plano imagem.

1.4. Vantagens e limitações do microscópio electrônico

Vantagens:

a. maior poder de resolução
b. maior flexibilidade da operação, devido à variabilidade da distância focal
c. maior profundidade de foco
d. maiores magnificações e numa gama contínua.

Desvantagens:

a. poder de penetração relativamente baixo dos electrons, fato que limita a espessura dos espécimens
b. necessidade de dessecar o espécimen devido ao vácuo.

A soma dêsses fatôres pràticamente impossibilita o exame de material vivo.

1.5. Possibilidades de aplicação do microscópio electrônico

O microscópio electrônico inicialmente utilizado apenas em campos restritos da biologia, metalurgia e cristalografia está cada vez sendo mais empregado em diferentes campos da pesquisa científica tais como física de semi-condutores, meteorologia, geologia, físico-química de polímeros, etc. Contudo, talvez deva ser ressaltado que em citologia e na microbiologia, particularmente em virologia é que o microscópio electrônico teve suas aplicações mais frutíferas.

Referências

Cosslett. 1951. Practical EM. AP.
Burton, Kohl, 1942.The electron microscope. Reinhold.
Wyckoff.1949. Electron Microscopy.Interscience.
Hall.1953.Introduction to EM. McGraw Hill.
Wyckoff.1958.The world of EM. Yale Univ.Press.
Fischer.1964.Applied EM. Indiana Univ.Press.

1.6. Tipos especiais de microscópio electrônico

O microscópio electrônico, cuja constituição foi descrita em 1.2. é o chamado de transmissão, pois analiza-se o feixe de electrons que atravessou o espécimen, usando voltagens de aceleração relativamente alta (40 a 100 KV). Há contudo outros tipos de microscópios electrônicos, que merecem ser comentados.

A - Microscópio electrônico de baixa voltagem

As vantagens de um microscópio electrônico (ME) de baixa voltagem deriva do fato de que a secção dispersora de electrons varia inversamente com a velocidade de aceleração enquanto a resolução varia inversamente com a raiz quadrada da voltagem. Assim o contraste do material biológico não contrastada artificialmente pode ser aumentado de um fator 10 enquanto a resolução se deteriora de um fator 2,diminuindo a voltagem de aceleração a poucos kilovolts. Existem alguns modêlos experimentais ainda em desenvolvimento, que tem permitido obter micrografias de objetos biológicos não contrastados, com feixes acelerados a menos de 10 KV. O problema de sensibilizar a emulsão fotográfica com feixes de baixa velocidade foi solucionado pelo uso de uma lente projetora especial que não sòmente magnifica a imagem mas também acelera os electrons, a um nível de 20 KV. Êste tipo de microscópio talvez permita uma melhor resolução de material biológico num estado muito próximo ao vivo - por exemplo - liofilizado e seccionado sem fixação, inclusão ou contrastação artificial.

Referência

Wilska,1964.J.Roy.Mic.Soc. 83,207

B - Microscópio electrônico de alta voltagem

Uma das desvantagens do ME tem sido o baixo poder de penetração do feixe electrônico, o que limita a espessura dos materiais a serem examinados. Trabalhos pioneiros do grupo de Toulouse e posteriormente dos japoneses, que levaram inclusive à construção de modêlos comerciais,resultaram nos chamados ME de alta tensão que operam a voltagens superiores a 1 milhão de volts. A alta voltagem é obtida por etapas, no chamado sistema de cascata, e naturalmente há uma série de com-

aplicações decorrentes da necessidade de manter estável tal voltagem e de eliminar os riscos da emissão de raio-X. O uso desses ME tem sido maior em metalurgia e cristalografia, mas mesmo em biologia tem demonstrado algumas aplicaçoes. Ao contrário do que se possa pensar, electrons mais velozes causam menos danos ao espécimen do que os mais lentos, pelo fato de ter menos possibilidade de interagir com os átomos do objeto. Com ME de alta tensão pode-se examinar secções até da ordem de 1 μ com resoluções tão boas quanto os ME convencionais. Utilizando-se, além disso, da estereomicroscopia pode-se obter imagens tridiomensionais com facilidade, dispensando o tedioso e complicado processo de secções seriadas. Outra possibilidade que oferece o ME de alta tensão é a de se examinar material ainda vivo, desde que êste seja mantido em uma câmara especial.

Referência

Doupouy,Ferrier,1962. J.Microscopie 1,167
Doupouy,Ferrier.1970. Proc. 7th ICEM 1,129

C - Criomicroscópio electrônico

Um dos problemas sérios em microscopia electrônico é a gradual deposição de um material carbonáceo sôbre o espécimen, durante a observação. Êsse contaminante provém do sistema de vácuo (óleo da bomba de difusão, graxas de vedação), do material em exame, etc., o que em poucos minutos pode reduzir sensívelmente a resolução da imagem. Uma das maneiras de se reduzir êsse problema é usar feixes reduzidos e estágios para o espécimen mantido à temperatura de nitrogênio líquido. Dessa necessidade, F.Moran idealizou um ME que ficasse inteiramente submerso à temperatura de hélio ou nitrogênio líquido usando lentes com enrolamento de ligas de nióbio-zinco ou nióbio-zircônio. A vantagem de tal aparelho seria além de minimizar o problema da contaminação e redução do "ruído" térmico, a de possibilitar o aproveitamento da supercondutividade que surgiria nas lentes, resultando em correntes persistentes e estáveis.

Referência

Fernandez-Moran,1964. J.Roy.Mic.Soc. 83,183

D - Microscópio electrônico de emissão

Nêste tipo de microscópio electrônico o espécimen pode ser a própria fonte emissora dos electrons, cuja imagem projetada em grande aumento no ecran,fornece informações quanto ao arranjo dos átomos na superfície do cristal emissor.

E - Microscópio electrônico analítico (ou de micro-sonda)

Recentemente foi construído um microscópio electrô-

nico que reune num só aparelho a possibilidade de se fazer microscopia convencional de transmissão e também efetuar microanálise de raio-X em áreas selecionadas. Para a microanálise existe uma mini-lente entre o condensador duplo, que produz , quando ativado, um feixe extremamente pequeno, de ca.200mu de diâmetro. O raio-X produzido pelo espécimen sob o bombardeio electrônico é coletado por 2 sistemas de espectrômetro e que pode cobrir comprimento de onda na faixa de 1-10A. Pode-se assim analisar a composição química de áreas selecionadas do espécimen. No caso de material biológico, este não deve ter sofrido nenhum tratamento químico antes do exame, e algumas tentativas feitas tem utilizado criofixação e cricultramicrotomia.

Referência

Chandler,Chou,1970.Proc. 7th ICEM 1,493
Hõhling et al.1967.Naturwis. 54,142

F - Microscópio electrônico de varredura (Scanning EM)

A microscopia electrônica de varredura é um método de ME que permite resolução melhor que os microscópios fotônicos (ca. 100A) ao se examinar superfície de um espécimen. Essencialmente compõe-se o MEV de uma coluna com o canhão electrônico na parte inferior. O feixe de electrons é acelerado para cima com um potencial da ordem de 20 KV. Duas lentes magnéticas reduzem o feixe para algumas centenas de A na superfície do espécimen. A resolução do aparelho é dado pelo diâmetro final dêste feixe. A superfície do espécimen é varrida pelo feixe por um sistema defletor. O sistema defletor acha-se conectado aos tubos de raios catódicos usados para visualização da imagem. A magnificação é obtida reduzindo a corrente do defletor e mantendo a mesma corrente nos tubos de raios catódicos e pode-se conseguir aumentos até de 100.000x. Várias centenas de linhas devem ser "varridas" para cada imagem que pode ser de um segundo para a visualização ou cerca de 5 minutos para fotografia. O detector de electrons coleta electrons secundários emitidos pelo espécimen sob o bombardeio, acelerando-o cerca de 10 KV e lançando-os contra um cintilador de plástico. A luz produzida é amplificada num fotomultiplicador. Êste sinal modula o brilho no tubo de raios catódicos e a imagem final representa a variação dos electrons coletados da superfície do espécimen. O contraste se deve às variações topográficas. Embora possa ser considerada como uma lupa sofisticada, sua grande virtude reside na profundidade de foco das imagens obtidas, impossíveis de serem conseguidas pela microscopia fotônica e oferece a possibilidade de se estudar superfícies sem necessidade de replicagem.

Por outro lado, recentemente, no Departamento de Física da Universidade de Chicago, a equipe de Crewe construiu

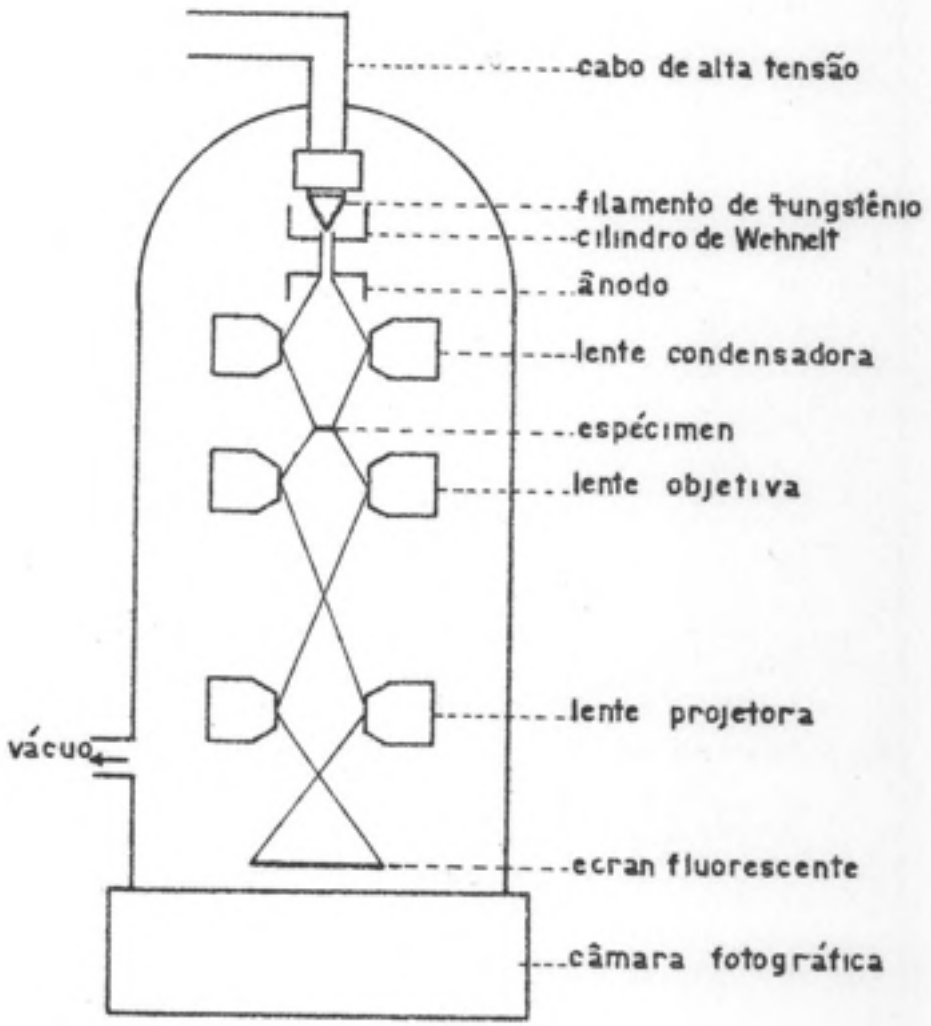
um MEV mais complexo que atualmente tem uma resolução da ordem de 5A e permite visualizar átomos individuais de certos elementos mais pesados. O aparelho consegue tal performance detectando 3 tipos de electrons que emerge do espécimen bombardeado - os dispersos elàsticamente, os dispersos inelàsticamente e os não dispersos. O sistema integra essas 3 informações e produz a imagem.

Referências

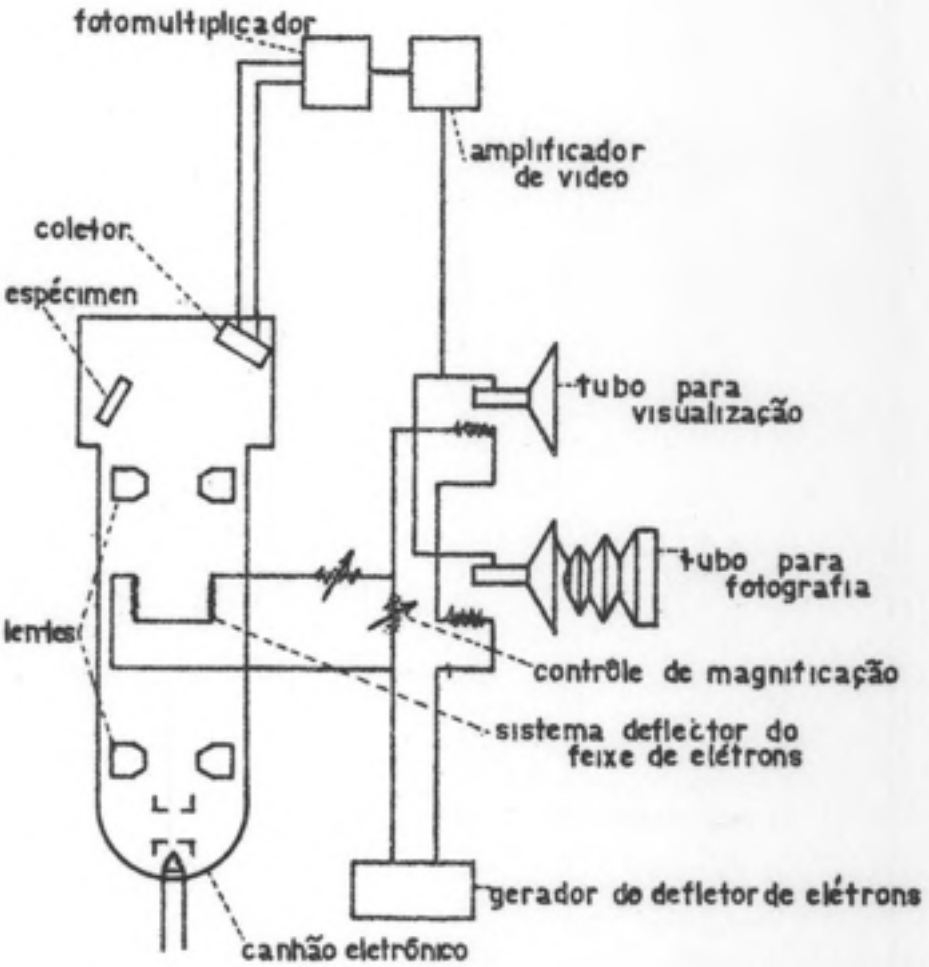
Smith,Oatley,1955. Brit.J.Appl.Phys, 6,391
Nixon.1964. J.Roy.Mic.Soc. 83,213
Crewe,1970. 7th ICEM 1,467,485

CENA
1590

MICROSCÓPIO ELETRÔNICO DE TRANSMISSÃO



MICROSCÓPIO ELETRÔNICO DE VARREDURA



2.- TÉCNICAS DE PREPARO DO ESPÉCIMEN PARA MICROSCOPIA ELECTRÔNICA

2.1. Princípios gerais de formação da imagem

Na microscopia fotônica o contraste na imagem é obtida principalmente pela diferença na absorção seletiva das radiações de determinados comprimentos de onda, pelas diferentes partes do espécimen. Na ME a imagem final é um densitograma electrônico do objeto. Em outras palavras, o contraste é formado pelos electrons dispersos pelas diferentes porções do objeto, que deixam assim de atingir o ecran final ou a emulsão fotográfica. A dispersão dos electrons será tanto maior, quanto menor for a velocidade do feixe ou maior a concentração ou as dimensões dos átomos que constituem dada região do espécimen. Os electrons dispersos são eliminados do feixe pelos diafragmas.

Os materiais biológicos usualmente têm baixo contraste ao ME porque compõe-se de átomos de baixo número atômico. Assim ao exame direto, sem tratamento algum, macromoléculas biológicas, por exemplo, revelam poucos detalhes além de um contorno pouco nítido. Há assim necessidade de se empregar certos artefatos para melhorar a visibilidade desses objetos e ao mesmo tempo obter mais informações sôbre sua morfologia interna e externa, sem todavia comprometer sua integridade.

Nas linhas que se seguem serão apresentadas as técnicas de preparo de espécimens, especialmente biológicos, mais comumente empregados em ME de transmissão.

2.2. Preparo da lâmina porta espécimen

Evidentemente, dada a baixa penetração dos electrons, não se pode utilizar lâminas de vidro para suportar o espécimen. Qualquer que seja seu substituto, deve ter êle duas características essenciais:

a. ser literalmente transparente ao feixe de electrons;
b. ser suficientemente resistente para suportar o espécimen.

Os materiais mais comumente usados para tal fim são películas de plástico, como colódio (nitrocelulose) ou formvar (polivinil formol) ou películas obtidas pela evaporação de materiais como carbono, sílica, berilio em certos substratos (vidro, mica, glicerina), à vácuo.

As películas de colódio podem ser obtidas gotejando uma solução de colódio a 1-2% em acetato de amila, sobre a água, ou mergulhando uma lâmina de vidro numa solução 0,3-0,5 % e destacando a camada que fica sôbre o vidro, após evaporar-se o solvente. Películas assim obtidas têm ca. 200A. Películas de Formvar, são obtidas da segunda maneira, usando clorofórmio, dioxana ou di-cloro-etileno como solvente.

Como as películas assim obtidas são demasiadamente frágeis, devem ser montadas sôbre pequenos retículos (3mm de diâmetro) de malhas bastante pequenas - de 100 a 400 mesh (malhas/polegada).

É frequente a prática de reforçar a película de plástico com uma delgada deposição de carbono.

Referência

Kay,1961. Techniques for EM.CC.Thomas
Pease,1964. Histological techniques for EM. 2nd.Ed.AP.

2.3. Preparo do espécimen

2.3.1. Material em suspensão

No caso mais simples, quando se trata de material de densidade electrônica relativamente alta, como certos minerais pode-se examiná-los diretamente sem nenhum preparo especial. Uma gota da suspensão, numa concentração adequada e examinando o remanescente ao microscópio electrônico. A suspensão deve ser feita em um solvente que não deixe resíduos ao evaporar, caso contrário êstes irão interferir no exame.

Contudo, material biológico, como regra geral, tem baixa densidade electrônica, produzindo ao ME imagens pouco nítidas, havendo necessidade de se melhorar o contraste para se ter informações mais precisas. Isto pode ser obtido pela metalização ou contrastação negativa.

A - Metalização

É uma técnica que foi introduzida, em ME por Müller e Williams, Wyckoff por volta de 1946. Consiste o método em depositar a vácuo, uma delgada camada de um metal pesado (Cr, Pt, por exemplo) sob um certo ângulo, sôbre o espécimen. Quando o metal, colocado numa cesta de tungstênio, é aquecido até sua temperatura de volatilização, o material evaporado caminha em linha reta aderindo à superfície que eventualmente encontra. Como a deposição é feita sob um certo ângulo, fica sempre uma área atrás do espécimen, protegida de deposição. Findo o processo, temos uma situação tal que a película suportando o espécimen recebeu uma deposição uniforme do metal, tornando-se medianamente densa ao feixe; o espécimen aparece bem mais denso pois à sua densidade natural somou-se a do metal depositado e se destaca vivamente de uma área transparente, contígua, justamente àquela que não recebeu deposição. Obtem-se assim uma imagem, em negativo, similar à uma paisagem vista do alto num entardecer ou amanhecer, aparecendo "sombras" do objeto (e por isso o processo chama-se também sombreamento). Além disso, conhecendo-se o ângulo de deposição do metal (quer diretamente, quer através de uma referência) pode-se por

simples cálculo trigonométrico, conhecer-se a altura do espécimen. Também pela geometria da sombra e usando artifícios como o sombreamento duplo, pode-se conhecer melhor a geometria do objeto estudado.

Pode-se estimar a quantia de metal necessário, ou a espessura da deposição pela formula:

$$M = 16 \pi R^2 D E/3 (\text{sen } A) 10^8$$

onde

M - massa do metal (g);
E - espessura do depósito em A;
A - ângulo de metalização;
R - distância da fonte ao espécimen (cm);
D - densidade do metal.

Para finalidades gerais, o paládio é indicado pois não se combina com o tungstenio durante a evaporação mas não se presta a trabalhos de alta resolução, devido à sua tendência de granular. Germânio, platina, liga de platina-carbono, são recomendáveis para essa finalidade.

Uma das principais desvantagens da metalização é sua baixa resolução devido à granulação, não indo além de 30-50A, agravado ainda pelas distorções que ocorrem durante o processo. Além disso, detalhes internos, òbviamente, não são visíveis.

Referência

Kay,1961. Techniques for EM.C.C.Thomas

B - Contrastação negativa e positiva

Êste método foi desenvolvido primàriamente para aplicação em virologia, para se estudar detalhes da arquitetura viral, por Brenner e Horne em 1959, embora os princípios gerais houvessem sido já indicados por Hall em 1955. O princípio do método é a de se embeber o espécimen num meio mais denso que êle próprio, de modo que o objeto se destaque por um contraste negativo. Há uma variedade de substâncias que tem sido utilizadas para essa finalidade, como o ácido fosfotungstico, ácido fosfomolíbdico, acetato de lantânio, acetato de uranila, molibdato de amônio, etc.. O primeiro deles é o que mais tem sido utilizado, em solução neutralizada com KOH N numa concentração de 1-2%. A suspensão de vírus, numa concentração adequada é misturada com a do corante e a mistura, transferida para a telinha, coberta com plástico, reforçado com carbono. Elimina-se o excesso de líquido e examina-se diretamente. As imagens obtidas têm excelente resolução, da ordem de 10A ou melhor. Além disso o corante pode penetrar em certas cavidades ou canalículos do espécimen e tais detalhes

podem ser nitidamente visualizada. Traços de albumina, adicionados à solução corante podem auxiliar, funcionando como espalhante adesivo. O uranil formato recentemente introduzido parece ser o que melhores resoluções tem dado.

Em certos casos em que se verifica uma afinidade de determinados corantes com certas substâncias que formam o espécimen, pode-se utilizar um método conhecido como coloração positiva. É o caso do acetato de uranila que tem demonstrado afinidade com material nucleico. Tratando-se assim partículas de vírus durante 1-2 horas com êste sal, pode-se evidenciar melhor a região onde se acha o ácido nucleico.

Referência

Brenner,Horne,1959. BBA 34,103
Hall,1955. JBBC 1,1
Horne,1964. J.Roy.Mic.Soc. 83,169
Horne,1967. Methods in Virology 3,521
Finch,Holmes,1967. Methods in Virology 3,351
Huxley,Zubay,1961. JBBC 11,273

C - Preparações "leaf dip"

É uma técnica relativamente simples utilizada para detecção de vírus de planta em preparações obtidas da planta infetada sem tratamento algum. O método introduzido por Johnson em 1951 em que se coletava o exsudato (artificial ou natural) do sistema vascular das plantas afetadas o qual era examinado após serem metalizados. Brandes em 1957 sugeriu simplesmente a imersão de um pequeno pedaço de fôlha em água destilada e examinar a suspensão resultante. Ambos métodos funcionaram bem para vírus alongados, cujas partículas podiam ser distinguidas em meio aos detritos celulares. Contudo não serviam para vírus isométricos. Kitajima e Hitchborn, Hills sugeriram em 1965 a combinação do método de "leaf dip" com contrastação negativa com excelentes resultados, permitindo a detecção de numerosos vírus isométricos, além dos alongados.

Referência

Johnson,1951. Phytopath. 41,78
Brandes,1964. Mitt.Biol.Bund.Land-und Fortwirt., Berlin-Dahlem, 110.
Kitajima,1965. J.Electronm. 14.119
Hitchborn,Hills,1965. Virology 27,528

2.3.2 - Replicagem

As réplicas consistem em filmes delgados de material transparente aos electrons, correspondendo exatamente à topografia da superfície do espécimen em estudo. Inicialmente as réplicas eram feitas de plástico mas o trabalho ficou bas-

tante facilitado pela introdução da deposição de carbono por Bradley em 1954.

As réplicas podem ser obtidas em 1,2 ou até 3 etapas de replicagem. Pode-se por exemplo depositar carbono sôbre a superfície em questão, remover a película com auxílio de plástico que é depois dissolvido. Pode-se também tirar um molde inicial em plástico e depois o contra-molde em carbono que é examinado. Normalmente, a película a ser examinada é metalizada para realçar as irregularidades.

Referência

Kay,1961. Techniques for EM.C.C.Thomas

2.3.3. Técnicas histológicas

A - Considerações Gerais

Uma das aplicações bastante profícuas da ME tem sido a citologia. Muitos dos conceitos hoje aceitos sôbre estrutura e função da célula fundamentam-se em histologia EM.

As técnicas de histologia ao nível do ME não diferem basicamente daquelas empregadas em microscopia fotônica, constituindo-se na fixação, inclusão, seccionamento, coloração e exame. As diferenças obviamente decorrem das próprias limitações e vantagens do ME. As secções deve ser extremamente delgadas, ordinariamente ao redor de 50-100 mu. Por outro lado as estruturas devem estar muito bem preservadas para mostrarem seus detalhes e devem ter contraste suficiente para serem identificados. O meio de inclusão deve resistir à dessecação e ao bombardeio electrônico.

O desenvolvimento da histologia o ME deveu-se fundamentalmente a 4 melhoramentos introduzidos quase que simultâneamente, mas por pesquisadores independentes, e que foram: o desenvolvimento de um ultramicrótomo que desse pequenos avanços por Porter e Blum; a introdução de resinas acrílicas como meio de inclusão por Newman et al; o uso de navalhas de vidro, por Latta e Hartman; e o estabelecimento dos princípios básicos de fixação com OsO_4 por Palade. Todos êsses fatos se deram ao redor de 1950.

B - Fixação

A fixação, num sentido mais lato, inclui a morte da célula e a estabilização de suas componentes de tal modo que o mínimo de deslocação, movimento e eliminação de substâncias solúveis ocorra durante os processos subsequentes de desidratação e inclusão. Para ME a fim de assegurar a penetração rápida do fixador deve-se usar pedaços pequenos de tecido.

O OsO_4 tem sido considerado desde muito tempo como

um fixador excelente para preservação de detalhes citológicos. As primeiras tentativas de utilizá-lo em ME tiveram resultados erráticos, mas com o uso de solução tamponada, em veronal-acetato, em pH ligeiramente alcalino, por Palade, em 1952, obteve-se fixações mais consistentes. O OsO_4 além de funcionar como fixador, atua como contrastante, impregnando bem lipídeos, liproproteinas e certas proteínas. Algumas variantes, como adição de sais ou açúcares foram propostas ao fixador de Palade. Dalton utilizou com sucesso um fixador crômio-ósmico Luft, em 1956 fez uma inovação quando usou $KMnO_4$ como fixador, com excelentes resultados para estruturas membranosas, embora comumente lixivie nucleoproteínas, mas Warmke, mostrou posteriormente que fixação bem curta em $KMnO_4$ pode preservar bem as nucleoproteínas.

Aldeídos, também bastante conhecidos em histologia convencional, foram tentados várias vêzes, particularmente a formalina, mas tecidos fixados nessa droga e incluídas em resinas acrílicas, usualmente se decompunham sob o feixe electrônico não sendo assim intensamente utilizada no início da histologia ao ME. Por volta de 1960, todavia, foram êles redescobertos e verificaram que promoviam excelentes preservação, principalmente se combinado com uma post-osmicação. Além disso, a introdução de aldeídos como fixadores intensificaram os trabalhos de histoquímica enzimática e citoquímica pois preservavam tais reagentes, as propriedades enzimáticas e químicas das diferentes componentes celulares, usualmente destruídas pela fixação com OsO_4.

A formalina inicialmente utilizada com intensidade foi posteriormente substituída pelo aldeído glutárico $COH - (CH_2)_3 - COH$ e acroleína, $CH_2 = CH - COH$. Naturalmente a tonicidade e o pH do tampão veículo deve estar controlado..

A respeito do tampão, por muito tempo, devido aos trabalhos iniciais de Palade, utilizou-se o veronal- acetato, cuja tonicidade alguns sugeriram corrigir com adição de sais e/ou açúcares. Mais tarde verificaram que outros tampões eram tão ou mais eficientes que o veronal-acetato e assim os tampões fosfato, S - colidina, tris, cacodilato, etc., passaram a ser utilizados. Em certos casos, como fixação com $KMnO_4$ o tamponamento do fixador parece não ser crítico.

Quanto ao tempo de fixação há algumas divergências. Há grupos que defendem fixações relativamente curtas para evitar lixiviação de material solúvel, enquanto outros consideram que isso seria um cuidado desnecessário. Assim os extremos vão de ca.1 hora até 18-24 horas.

Aparentemente, o cuidado mais importante no fixador

é a sua tonicidade que deve ser a mais isotônica possível com o tecido em estudo. Atualmente é praxe calcular a molaridade usando esmometros, obtendo-se assim resultados mais consistentes.

Não é muito fácil enumerar-se os critérios para se avaliar uma boa fixação, pois há uma variação quantitativa e qualitativa quanto ao aspecto que as diferentes células apresentam. Todavia, algumas generalizações podem ser feitas: o núcleo deve aparecer uniforme e finamente granular; mitocôndrios não devem estar inchados e suas cristas devem estar conspícuas; o substrato do citoplasma deve estar finamente precipitado; a largura e a disposição das cisternas do retículo endoplasmático devem ser razoàvelmente uniformes; as citomembranas devem ser contínuas; o sistema lamelar dos plastídeos devem aparecer regularmente arranjadas.

Além da fixação química, há alguns pesquisadores que investigam a utilização da fixação física, pelo uso de temperaturas extremamente baixas (criofixação). Os crio-ultramicrótomos permitem seccionar tais materiais sem inclusão ou alternativamente, pode-se incluir esse material criofixado num meio adequado pelo processo de "freeze substitution", através da qual a água do tecido é substituída gradativamente por uma substância inerte quimicamente, como glicerina e etileno glicol, antes de passar para o meio de inclusão.

Referências

OsO_4 - Palade,1952. J.Expt.Med. 95,285
- Thamisian,1964. JUR 10,182 (Palade + NaCl)
Kellenberger,1958. JBBC 4,671 (p/ bactérias)
Zetterqvist,1956 (Palade + sais)
Caulfield,1957. JBBC 3,827 (Palade + sacarose)
Afzelius,1959. JBBC 5,269 (O_sO_4 40%)
Bennet,Luft.1959.JBBC 6,113 (tampão S-colidina)
Dalton,1955. Anat.Rec. 121,291 (cromio-OsO_4)
McAlear,1962. Ann.Histoch.supl.2,261 ($KMnO_4$-OsO_4)
Millonig,1964. From molec.to cell-Symp.Em,347 (OsO_4-NaPBS)

$KMnO_4$ - Luft,1956, JBBC 2,279
Whaley et al. 1959. JBBC 5,501
Mollenhauer,Zabrun.1960. JBBC 9,761
Warmke,Christie. 1967. Virology 32,534

Formol - Holt,Hicks,1961. JBBC 11,31
Luft,1959.Anat.Rec. 133,305
Swift,1965. Am.Nat. 99,201.

Cromio-Fortalina -
Low,Freeman.1956. JBBC 2,269

Criofixação -
SjÖstrand,Haker,1958. JUR 1,239
Muller,1957, JUR 1,109

Freeze substitution -
Fernandez-Moran.1959.Science 129,1225
Bullivant.1960. JBBC 8,639
Rebhun.1961. JBBC 9,785
Pease,1966. JUR 14,356
Zalokar,1966. JUR 15,469

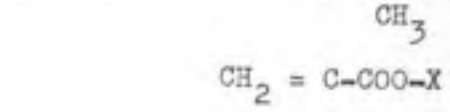
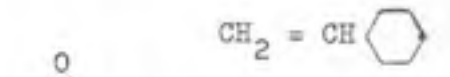
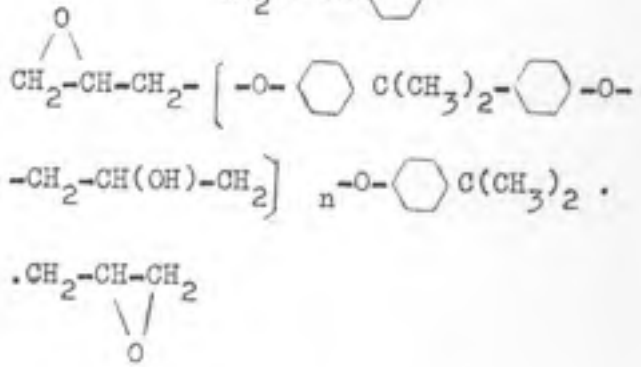
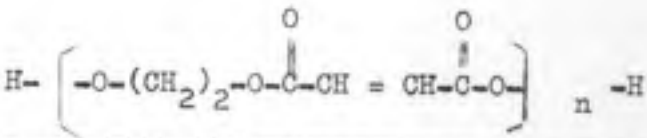
C - Inclusão

O material fixado antes de ser incluído num meio apropriado deve ser desidratado pois em geral as resinas utilizadas para tal fim não são miscíveis em água. Usualmente a desidratação é feita em etanol ou acetona. No caso das resinas epóxicas ou poliester que não são solúveis em álcool o material se desidratado em álcool, passa num banho de óxido de propileno antes de seguir para a resina. Quando se utiliza resinas hidrossolúveis a desidratação é feita no próprio meio de inclusão. Outras substâncias inertes, como o polietileno glicol tem sido utilizado como agente desidratante.

Para inclusão, a parafina e depois uma mistura de parafina e celoidina, foram empregados nas tentativas iniciais, o que se revelaram inadequadas para ME. Em 1949, Newman et al., introduziram pela primeira vez as resinas acrílicas como meio de inclusão com resultados consistentes, uso êste que se extendeu até recentemente. A dureza dos blocos de metacrilato podia ser controlada pela mistura apropriada de butil (duro), metil (mole) e etil (médio) metacrilato. As resinas acrílicas usualmente se decompõe sob o feixe electrônico, o que sob certas circunstâncias chega a ser até vantajoso, pois aumenta o contraste da imagem. Todavia, quando se desejava alta resolução êste fato tornava-se prejudicial,pois as forças de tensão superficial, durante a sublimação do metacrilato, deformavam delicadas estruturas. Além do mais a principal desvantagem do metacrilato era sua taxa de contração relativamente elevada (20-30%) durante a polimerização que distorcia detalhes ou chegavam mesmo a explodir as células. Algumas medidas como pré-polimerização da resina ou adição de certas substâncias como nitrato de uranila à mistura, foram recomendadas para reduzirem os danos de contração.A adição de outras resinas como o estireno ou divinil benzeno foram também tentados, com resultados não muito animadores.

A procura de outro meio de inclusão assim se intensificou e por volta de 1960 já se tinham outras resinas que

pertenciam ao chamado grupo de poliester e resinas epóxicas. Assim surgiram, dentre as resinas epóxicas e Araldita, Epon 312, Maraglass, Epok 533, DER, etc.. Por outro lado, entre resinas poliester tínhamos o Vestopal, Rigolac, Selectron, Rhodester.

Resina	Fórmula
Metacrilato	
Estireno	
Epóxicas	
Poliester	

Há autores que sugeriram também misturas de Araldite e Epon.

Tanto a Araldita e Epon, provàvelmente as resinas mais utilizadas atualmente têm um certo inconveniente de ser algo viscoso (efeito que pode ser reduzido aquecendo-as pouco antes do uso) criando alguns problemas de penetração. Spurr em 1969 sugeriu uma mistura de ERL-4206, DER-736 como uma solução para o problema, pois o meio apresentava baixa viscosidade e excelentes propriedades de corte. Por outro lado, Coulter formulou um esquema rápido para inclusão, usando Araldite ou Epon.

Conscientes do problema de extração de material celular pelo uso de solventes, alguns pesquisadores procuraram resinas hidrosolúveis. Inicialmente a gelatina foi utilizada. Mais tarde, conseguiu-se extrair do metial metacrilato uma resina hidrosolúvel - o glicol metacrilato. Posteriormen-

te o glicol metacrilato foi utilizado em combinação com metil e butil metacrilato, tendo sido desde então utilizada em técnicas de citoquímica. Posteriormente outra resina dessa família, o hidroxipropil metacrilato também foi introduzido para os trabalhos de citoquímica. Outras resinas hidrosolúveis são n-vinilpirolidone, aquon (uma fração hidrosóluvel obtida do Epon) e o Durcupan.

As resinas epóxicas e de poliester produzem blocos de excelentes qualidades para ultramicrotomia, sem contração. As secções produzidas resistem bem ao bombardeio electrônico e os detalhes estruturais das células são preservados para os trabalhos de alta resolução. Contudo as secções têm baixo contraste razão pela qual devem ser contrastadas com sais de uranila e de chumbo, antes de seu exame ao ME. As secções tendem a comprimir-se ligeiramente durante o seccionamento mas elas podem ser distendidas com vapores de xilol, cloroformio, ou pelo calor.

Referências

Metacrilato -
Newman et al.1949.J.Res.Nat.Bur.Stand. 43,183
Farquhar,1956. Lab.Investig. 5,317
Borysko,1956. JBBC 2, suppl,3
Ward,1959. J.Appl.Phys.30,2039
Shipkey,Dalton,1959. Proc.EMSA. J.Appl.Phys 30
Kushida.J.Electronm. 10,16 e 194.1961.
Baker,Luke,1963. Quant.J.Micro.Soc. 104,101

Vestopal- Kellenberger,1958. JBBC 4,671

Araldita- Maaloe,Birch-Anderson.1956.Symp.Soc.Gen.Microb.6261
Glauert,Glauert.1958. JBBC 4,191

Durcupan- Staubli,1963. JCB 16,197

Epon - Luft,1961. JBBC 9,409
Finck,1960. JBBC 7,27
Craig et al.1962. JBBC 12,190
Coulter,1967. JUR 20,346

Maraglass-Freeman,Spurlock.1962. JCB 13,438
Kattine,Freeman.1963. JCB 17,203
Erlandson,1964. JCB 22,704

Glicol metacrilato -
Fabergé,Lewis.1962. JCB 15,579
Bernhard,Leduc,1962.5th ICEM 2,L:4
Wichterle et al. 1960.Nature 186,494
Rosenberg et al. 1960.JUR 2,200

Selectron-Low,Clevarger, 1962. JCB 12,615

ERL-4206- Spurr,1969. JUR 26,31

DER - Kushida.1967. J.Electroonm. 16,278
Lockwood,1964. Anat.Rec. 150,129

Aquon - Gibbons,1959. Nature 184,375

Hidroxipropil metac. -
Leduc,Holt,1965. JCB 26,137

Rigolac - Kushida,1960. J.Electronm. 9,113

Gelatina-F.Moran,Finean.1957. JBBC 3,725
Gilev,1958.JUR 1,349

Epon/Arald. -
Luft,Woods,1960
Mollenhauer.1964. Stain Tecnol. 39,111

Epok 533- Kushida,1963. J.Electronm. 12,167

N. vinilpirolidone -
Faberg´e,Lewis,1962. JCB 15,579

Rodester- Aragndon,Enjalbrecht,1964.

Vinil polyampholyte -
McLeser,Singer,1964. JBBC 20,518

D - Ultramicrotomia (Seccionamento)

Devido ao baixo poder de penetração dos electrons as secções histológicas, como outros materiais para ME devem ser extremamente delgadas, devendo no máximo ter 1 a 2 décimos de micron (exceto nos casos em que se utiliza ME de alta tensão). Na década de 1940/50 não havia um micrótomo adequado para os trabalhos de histologia e algumas tentativas usando micrótomos convencionais ou adaptadas não deram resultados promissores. Por volta de 1950 finalmente surgiram os primeiros microtomos que produziam pequenos avanços, quer por meios mecânicos, quer por avanço térmico. Êsses micrótomos também tinham como característica o fato de o bloco apos o seccionamento retornava à posição de corte sem passar pela navalha.Outro fato que levou ao rápido desenvolvimento da ultramicrotomia foi a introdução da navalha de vidro por Latta e Hartman que sobrevive até os dias de hoje, mas paulatinamente substituida pela navalha de diamante, outra grande inovação feita por Fernandez-Moran, que além de ter uma durabilidade muito maior, permite cortar objetos duros.

A confecção de navalhas de vidro é relativamente simples. Utiliza-se um vidro de boa qualidade - cristal - de 5-6 mm de espessura. Usualmente divide-se sucessivamente uma placa de vidro até que se tenha quadrados de ca.3cm x 3cm que é finalmente cortado em diagonal, obtendo-se uma peça triangular. Uma das arestas, da espessura,do vidro, de ângulo próximo a 45 é utilizada como navalha, onde o fio útil representa

cerca de 2-3mm e dependendo da dureza do bloco e da habilidade do operador pode-se conseguir cerca de 100 secções de cada navalha, no máximo.

Já existem aparelhos comerciais que fabricam as navalhas com boa reprodutibilidade. Atrás do fio da navalha monta-se uma barquinha de material variado (metal, fita plástica, etc.) que é vedada com parafina. A barquinha deve ser cheia de água até o nível do fio, de modo que as secções assim que são feitas, flutuem no líquido, e de onde são transferidas para as telinhas porta-objeto.

A montagem da navalha no microtomo deve ser feita de tal modo que o lado da navalha forma um ângulo de 5-6° com a tangente do arco que descreve a ponta do bloco, no ponto em que está passa pelo fio.

Para o seccionamento, o bloco deve ser desbastado de tal modo que a parte a ser seccionada tenha ca.1mmx1mm, usualmente com perfil trapezoidal, para se obter uma fita das secções. A espessura das secções pode ser regulada no instrumento e ela pode ser avaliada pela cor de interferência que produz ao flutuar no líquido da barquinha. Usualmente aproveita-se de secções que tenham côr de interferência de dourado, prateado e cinza. Cortes mais espessos adjacentes às ultrafinas podem ser obtidos no mesmo microtomo e podem ser examinadas ao microscópio fotônico, como contrôle.

Referencias

Sjöstrand,1953.Experientia 9,114(microtomo de expansão termica)
Porter,Blum,1953.Anat.Rec. 117,685 (ultramicrotomo)
F.Moran.1956. JBBC 2 (suppl.),57 (navalha de diamante).
Latta,Hartman.1950.Proc.Soc.Expt.Biol.Med. 74,436.

E - Contrastação das secções (coloração)

O uso de resinas epóxicas e de poliester tiveram como consequência o desenvolvimento de técnicas de contrastação das secções para melhorar sua visualização. Watson foi um dos pioneiros que se preocuparam com o problema, tendo testado diversas substâncias tendo o sido responsável pelo uso de sais de uranila e de chumbo, prática essa que ainda persiste hoje, com ligeiras modificações. Êsses corantes são de ordem geral intensificando o contraste geral da célula, embora o acetato de uranila tenha efeitos mais pronunciados sôbre material nucleico. A prática rotineira atualmente é a contrastação dupla, primeiramente com acetato de uranila em solução aquosa e depois com sais de chumbo, comumente o citrato de chumbo, preparado conforme preconizado por Reynolds.

O acetato de uranila é normalmente usado solução aquosa, saturada (ca.3%), mas pode também ser usada dissolvida

em metanol. Também sais mais complexos de uranila, como o acetato de magnésio e uranila tem sido empregado.

Quanto aos sais de chumbo, além do citrato, outros subacetato, acetato, óxido de chumbo alcalinizado, hidróxido de chumbo, amonio-acetato de chumbo, tem sido sugeridos.

Além dos compostos de uranila e chumbo, outros como ácido fosfotungstico, $KMnO_4$, sais de vanádio, cromil cloride podem ser usados.

A contrastação do material pode ainda ser feita antes do seccionamento, durante a desidratação, Sais de uranila (nitrato, acetato), ácido fosfotungstico, acetato de chumbo, $KMnO_4$, tem sido utilizados.

Referencias

Acetato de uranila -
Watson,1958. JBBC 4,727
Stempack,Ward,1964.JCB 22,697

Acetato de uranila e magnésio -
Frasca,Parks,1965. JCB 25,157

Compostos de chumbo

Hidróxido de chumbo em solução alcalina -
Millonig,1961. JBBC 11,736
Feldman,1962. JCB 15,592
Watson,1958. JBBC 4,475
Dalton,Zeigel,1960. JBBC 8,409
Karnovsky,1961. JBBC 11,729
Lever,1960. Nature 186,810

Citrato de chumbo -
Reynolds,1963. JCB 17,208
Venables,Coggeshall,1965. JCB 25,407

Ácido fosfotungstico
Hall et al.1945. J.Appl.Phys. 21,68

$KMnO_4$ - Lawn,1960. JCB 8,161
Sutton,1968. JUR 21,424

Sais de vanádio -
Callaham,Horner,1964. JCB 20,350

Cromil cloride -
Bullivant,Hotchin.1960. ECR 21,211

Compostos de prata -
Marx,Mülbert.1965. J.Microscopie 4,799
Churg et al. 1958. JBBC 4,841
Marinozzi,1961. JBBC 9,121
Martino,Zamboni,1967. JUR 19,273

Compostos de índio -
Watson,Aldrige,1961. JBBC 11,257

Lantânio- Doggenweiler,Frenk.1965. PNAS 53,425
Revel,Karnovsky,1967. JCB 33,C-7

Contrastação durante desidratação

Ácido fosfotungstico
Jakus,1956. JBBC 2,243
Huxley,1957, JBBC 3,631

$KMnO_4$ - Persons,1961. JBBC 11,492

Acetato de uranila -
Hills,Plaskitt,1968. JUR 25,323

Acetato de chumbo -
Kushida,1966. J.Electronm. 15,90

2.3.4. Técnicas Especiais

A - Técnicas para investigação de DNA e outras moléculas fibrilares.

I - Método de Beer "Streaking"

Diversos autores têm dedicado especial atenção ao estudo das macromoléculas fibrilares, particularmente ao DNA, pelas suas implicações genéticas. O método de Beer, consiste simplesmente em colocar a solução contendo o DNA numa depressão, e uma telinha coberta de película é passada sôbre a superfície do líquido num movimento linear. Exames ao ME mostram as fibras de DNA aderidas à película, dispostas linearmente na direção em que o movimento foi efetuado. Usualmente metaliza-se a preparação perpendicularmente a tal direção para realçar as fibras, ou alternativamente pode-se corar positivamente o DNA com acetato de urânila. A equipe de Beer também investiga a possibilidade de marcar seletivamente os nucleótides do DNA, numa tentativa de se determinar sua sequência. Estudos preliminares mostraram que o DNA reage com OsO_4 em pH neutro, sendo a timidina degradada preferencialmente. Por outro lado $AuCl_4$ ataca lentamente timidina e uracil enquanto o citosina e adenina são atacadas mais ràpidamente.O ácido 2-amino-p-benzenosulfônico diazotizado pode também marcar seletivamente os resíduos de guanina.

Referências

Beer,1964. J.Roy.Mic.Soc. 83,153
Beer,1961, JMB 3,263

II-Método da película monomolecular de proteína (Kleinschimidt)

A técnica consiste em formar uma película monomole-

cular de proteína à qual o DNA ou outras moléculas fibrilares venham se adsorver. Para isto, o material em estudo, purificado, é misturada com uma solução de proteína-citocromo C, por exemplo, em concentração e molaridades apropriadas. Esta mistura é espalhada na superfície líquida, comumente uma solução diluida de acetato de amônia, ca.0,1M, fazendo-a deslizar lentamente por uma rampa. A proteína ao tocar no líquido se espalha em sua superfície, formando uma película monomolecular aonde se adsorve o DNA. A película é a seguir comprimida até se ter uma tensão superficial da ordem de 0,1 dine/cm (equivalente a 0,8-1m2/mg). A película é transferida para uma telinha coberta de Formvar-carbono, desidratada em etanol e isopentano e seca ao ar. Antes do exame é metalizada com platina num ângulo de 6-10°, numa mesa rotatória. A técnica tem sido bastante empregada para se determinar o comprimento do DNA ou RNA de diversos vírus e estruturas celulares.

Referências

Kleinschmidt, Zahn, 1959. Z.Naturforschg. 14,770
Kleinschmidt et al. 1962. BBA 61,875
Kleinschmidt et al. 1963. JMB 10,282

B - Criodecapagem (Freeze etching)

Nêste processo o espécimen é estabilizado e inativado fisicamente através do congelamento rápido à temperaturas extremamente baixas (ca. -100°C). Utilizando navalhas refrigeradas, o espécimen congelado e incluído em gêlo é cortado ou mais propriamente fraturado, expondo-se assim a parte interna do material em estudo. A superfície exposta é, a seguir, ligeiramente sublimada à vácuo, metalizada e replicada, em carbono.

O método foi originàriamente proposto por Steere em 1957, estudar cristais de vírus e posteriormente desenvolvido na Suiça por Moor, o que permitiu sua aplicação em citologia.

O ponto crítico dêsse método é o congelamento rápido das células vivas o que deve ser feito com rapidez suficiente para evitar formação de cristais de gêlo, prejudiciais à preservação do material. Tem-se empregado hélio líquido ou Freon 12 pois o nitrogênio líquido não parece ser recomendável devido ao efeito Ledenfrost (formação de bôlsa gasosa entre o material e o congelante, prejudicando as trocas de calor). O uso de glicerina como substância anti-congelante também ajuda a preservar as estruturas.

Um melhoramento recentemente introduzido ao método foi o de ser possível agora obter réplica das duas superfícies expostas pela fratura. Tem-se assim a imagem positiva e negativa da mesma superfície, o que naturalmente virá reduzir os erros de interpretação devido a artefatos.

As vantagens oferecidas pela criodecapagem são - exame de detalhes internos de material criofixado e portanto o mais próximo ao natural; a possibilidade de se visualizar a superfície de certas estruturas celulares, impossíveis de serem analizadas pelas técnicas de seccionamento. As desvantagens são as mesmas das preparações metalizadas, i.e. - limitações na resolução devido à granulação.

Referências

Steere,1957. JBBC 3,45
Moor,1964. Z.Naturforschg. 62,546
Moor,Muhlethaler.1963. JCB 17,609
Steere,1970.Proc. 7th ICEM 1,451

C - Imunomicroscopia electrônica

Recentemente foi desenvolvida uma técnica para microscopia electrônica que permite a detecção de antígenos específicos nos tecidos, a semelhança do método de anticorpo fluorescente na microscopia fotônica. O método consiste em conjugar ao anticorpo do antígeno em questão um marcador que possa depois ser identificado fàcilmente ao ME. As tentativas iniciais foram feitas com ferritina, uma proteína com ca. 100A de diâmetro, peso molecular de 750,000, contendo um núcleo formado de 4 grupos de átomos de ferro, de ca. 55A de diâmetro, que pelas suas dimensões pode fàcilmente ser visualizada ao ME. A ferritina é obtida com facilidade de baço de cavalo.

A conjugação da ferritina com anticorpo pode ser feita com m-xilileno, diisocianato ou tolueno diisocianato,em 2 etapas (i.e. primeiro a conjugação da droga com a ferritina e depois a conjugação do composto formado com o anticorpo) ou pp-difluoro-m-m'-dinitro difenilsulfona, numa só etapa. Em geral a conjugação reduz sensivelmente o título do anticorpo e uma avaliação da eficiência da conjugação deve ser feita por eletroforese.

Se, o que se pretende marcar é extracelular ou acha-se na superfície da célula, faz-se a reação do anticorpo marcado com o antígeno em condições e tempo adequado; lava-se o excesso de anticorpo e examina-se ao ME.

Quando se quer verificar a localização de antígenos no interior da célula há problemas. A mera exposição de secções (mesmo com fixação em aldeido e inclusão em resinas hidrosolúveis, que preservam a atividade antigênica) ao anticorpo marcado resulta em marcação errática. Assim, a marcação deve ser feita antes da inclusão. Todavia, como a ferritina é relativamente grande, é incapaz de atravessar o plasmalema e assim há necessidade de se abrir a célula, quer por um ciclo de congelamento-descongelamento, quer pelo seccionamento

em criostato. O uso da ferritina conquanto possa fornecer informações importantes, ainda deixam muito a desejar pois o rompimento da célula sempre prejudica sua preservação e nos dá incertezas quanto à situação original do antígeno.

Algumas variantes tem sido propostas para solucionar o problema. Uma delas foi a marcação do anticorpo com Iôdo radioativo I127 que seria posteriormente indicado por autoradiografia, com resultados promissores, mas o método mais interessante parece ser a conjugação do anticorpo com a peroxidase. A peroxidase é uma proteína de pêso molecular bem menor, de ca. 40,000 e portanto mais fácil de ser introduzido na célula e sua conjugação com o anticorpo é feita de maneira simples, em presença de glutaraldeído. A detecção de peroxidase é feita pela reação de Graham-Karnovsky, com diaminobenzidina.

A reação direta do anticorpo marcado com o antígeno é chamado de imunomicroscopia direta, havendo possibilidade de se fazer imunomicroscopia indireta. Aqui prepara-se anticorpo para um dado antígeno, a partir de rato. Em separado prepara-se antigamaglobulina de rato, a partir de carneiro, e êste é marcado com peroxidase. Pode-se preparar uma grande quantidade dessa antigamaglobulina de rato marcado e deixar em estoque. Após a reação inicial da célula com seu anticorpo, obtido de rato, faz-se nova reação com a antigamaglobulina de rato marcado, cuja presença é detectado pela reação com diaminobenzidina. A vantagem do método é quando se tem anticorpo em pequena quantidade e a possibilidade de ter em estoque antigamaglobulina em quantidade, pronta para o uso.

Referências

Singer,Schick,1961. JBBC 9,519
Rifkind et al.1960. Nature 187,1094
Morgan et al.1962. CSHSQB 27,57
Graham,Karnovsky,1966. JHC 14,291
Miller,1970. 7th ICEM 1,537
Kuhlman,1970. 7th ICEM 1,535

D - Histoquímica enzimática

Tentativas de se aplicar técnicas de histoquímica enzimática ao nível do ME foram feitas desde o início da citologia ME. As tentativas iniciais usando formalina e inclusão em metacrilato embora dessem alguns resultados pecavam pela péssima preservação das células.

Um melhoramento notável na histoquímica enzimática foi obtido quando Sabatini et al. em 1963 investigaram as propriedades fixadoras de diversos aldeídos, correlacionando a retenção da atividade enzimática e a preservação das estruturas celulares.Seus resultados mostraram que os melhores a-

gentes pré-fixadoras foram os dialdeídos: glutaraldeido e hidroxiadipaldeido.

Para trabalhos de histoquímica enzimática, após a pré-fixação no aldeído, o tecido é incubado em condições adequadas para a reação, na solução contendo o substrato da enzima em estudo e uma substância que reaja com o produto da ação da enzima, formando um precipitado denso ao feixe de electrons, no local onde se der a reação (ex.: sais de chumbo, cálcio, etc.). Numerosas enzimas como fosfatases ácida e alcalina, esterases de ácido carboxílico, dehidrogenase succinica, oxidase de citocromo, glucose-6-fosfatase, etc., puderam ser assim localizadas em diversos tecidos.

Referencias

Barnett,1964. J.Roy.Mic.Soc. 83,143
Sabatini et al.1963. JCB 17,14
Karnovsky,1964. JCB 23,217 (colinesterase)
Novikoff et al.1962. JCB 14,451
Wetzel et al.1965. JCB 25,593 (fosfatase)
Sedar,Brunde,1965. JCB 24,285
Lee,1970. JCB 45,644 (Transaminase de oxalacetico glutâmico)
Novikoff,1970. Proc. 7th ICEM 1,656

E - Citoquímica

Pode-se atualmente determinar a composição química de determinadas estruturas celulares ao nível do ME graças às técnicas de citoquímica, quer baseadas na impregnação específica, quer através da digestão específica, e tem sido particularmente desenvolvidas para ácidos nucleícos, mas tem sido também empregados com sucesso para proteínas e polisacárides.

Para ácido nucléico pode-se mencionar 2 técnicas distintas:

a.- fixação do tecido em formalina e digestão do ácido nucleico pela enzima seguida de extração pelo tricloroacético seguida de inclusão;

b.- fixação em aldeido (formalina, acroleina-formalina) e inclusão em meio hidrosolúvel, seccionamento e tratamento das secções com as enzimas adequadas.

Para tecidos fixados e incluidos em Epon, como habitualmente se faz, há ainda possibilidade de se fazer citoquímica, segundo a técnica de Monneron, que é a de oxidar as secções com H_2O_2 ou ácido periódico fazendo-se a seguir digestão com enzimas proteolíticas ou amilases. Não funciona bem contudo para ácidos nucléicos. Uma outra que merece ser citada é a técnica de revelar polisacárides usualmente na superfície celular pelo uso de Vermelho de Rutênio.

Peters descreveu um método bastante específico para DNA, através de uma reação modificada da prata-metenamina em produtos da hidrolise com HCl, enquanto Gautier, Scheyer preconizam uma reação similar a de Feulgen ao nível do ME.

Uma outra técnica interessante e bastante simples é a proposta por Bernhard, em que tecido fixado em aldeido e incluido em Epon é seccionado, e as secções inicialmente coradas com acetato de uranila e depois "descoradas" com tampão citrato ouEDTA. Há um descoramento do DNA, por razões não compreendidas.

Referências

Swift,1965. J.Roy.Mic.Soc.83,161; Am.Nat. 99,201
Bernhard,Tournier. CSHSQB 27,67.1962
Bernhard,1969. JUR 28,250 (EDTA)
Luft,1964. JCB 23,54a (verm. rutênio)
Peters,Giese.1970. Proc. 7th ICEM 1,557 (DNA)
Gautier,Schreyer. Proc. 7th ICEM 1,559,1970 (Feulgen type/ME)
Monneron,1966. J.Microsc. 5,697 (Epon/H_2O_2)
Marinozzi,1961. JBBC 9,121 (polisac.)

F - Autoradiografia

Êsse método citoquímico consiste em detectar pela precipitação da prata da emulsão fotográfica, cobrindo a secção, a localização intracelular do material aonde o precursor radiativo fornecido foi incorporado. Evidentemente os problemas ao nível do ME é introduzir suficiente material radiativo numa secção delgada e de obter uma camada monocristalina de brometo de prata, cujos cristais devem ser bastante pequenos. Hoje a técnica já se acha bastante desenvolvida e a resolução é da ordem de 0,1µ, correspondente às dimensões dos cristais do AgBr.

Referências

Caro,1964. J.Roy.Mic.Soc. 83,127
Granboulan,1967. Meth. Virology 3,617

G - Ataque iônico

Consiste esta técnica em bombardear a secção preparada como de rotina, com um feixe de ions, formado pela descarga elétrica numa atmosfera rarefeita. As telinhas são montadas sôbre lâmina de mica apoiado no eletrodo negativo e aplica-se no sistema tensão da ordem de 1000V (100mA) durante 45-60''. Segue-se metalização. Verifica-se que determinadas estruturas são corroidas pelo ataque enquanto outras não. Muitas vêzes material aparentemente uniforme é atacado de maneira desigual, evidenciando diferenças na sua estrutura.

Referências

Silveira,Arruda,1969. Ciência e Cultura 21,484
Fabergé,1966. J.Appl.Phys. 37,3920

2.3.5. Adendo

A - Firmas fornecedoras de Drogas e Equipamentos para microscopia electrônica

Ernest Fullam Inc.
P.O.Box 444
Schnectady,N.Y. 12301,USA

Ladd Res. Inc.
P.O.Box 901
Burlington,Vermont 05401,USA

Polaron Equipment Ltd.
4 Shakespeare Read
Finchley,London N3, England

Graticules
57-60 Holborn Viaduct
London EC 1, England

AEON Laboratories
Beech Hill
Ridgemead Road
Englefield Green
Egham,Surrey

Okenshoji Co. Ltd.
5-6 Chome, Ginza cho-ku
Tokyo, Japan

Polysciences
Paul Valley
Warrington, Pa. 18976, USA

B - Alguns livros sôbre microscopia electrônica, aspectos gerais, teoria, e aplicações principalmente no campo da biologia

PEASE, 1964. Histological techniques for electron microscopy, AP

KAY,1961. Techniques for electron microscopy. C.C. Thomas

COSSLETT,1951. Practical electron microscopy. AP.

HALL,1953.Introduction to electron microscopy.McGraw Will

Ivan Sorvall Inc.- Thin sectionigg and associated techniques for electron microscopy.

The microscope in living biology. Número especial de J.Roy. Microscopical Society, vol. 83, parte 1 e 2, 1964.

KUNTZ, 1964. Electron microscope anatomy, AP.

FISCHER,1964. Applied electron microscopy. Indiana Univ. Press.

REINER,1959. Elektronemikroskopische Untersuchung Präparationsmethod. Springer-Verlag.

WYCKOFF,1958. The world of electron microscope.Yale Univ.Press.

PALAY,1958. Frontiers in cytology. Yale Univ. Press

HARRIS,1962. The interpretation of the ultrastructure, AP.

RHODIN,1963. An atlas of ultrastructure.Saunders

MERCER,BRIBECK.1961. Electron microscopy: a handbook for biologists. Blackwell.

SIEGEL,1964. Modern developments in electron microscopy. AP

ZWORKIN et al.1945. Electron optics and the electron microscope. John Wyley & sons.

CAUSEY,1962. Electron microscopy, a text for biologists. Williams & Wilkins

MAGNAN,1961. Traité de microscopie electronique. Herman

SANTANDER,1969. Tecnicas de microscopia electrônica em biologia. Aguilar

BARER,COSSLETT.1969. Advances in optical & Electron Microscopy, vols. 1-3. AP

GLANERT,1971. Practical methods in electron microscopy. North Holland

WISCHNITZER,1962. Introduction to electron microscopy. Pergamon Press

HAINE,1962. The electron microscope. Interscience

OSTER, POLLISTER,1956. Physical techniques in biological researchs. vol. 3. AP

MELLORS,1959. Analytical cytology. AP

Proceedings dos Congressos Internacional de Microscopia Electrônica.

7ª	- Grenoble. Soc.Fr. de Mic. Elect.	1970
6ª	- Kyoto,Maruzen	1966
5ª	- Philadelphia,AP	1962
4ª	- Berlin,Springer-Verlag	1958
3ª	- London,London Royal Mic. Soc.	1954
1ª	- Paris	1950

Proc. European Regional Conference on Electron Microscopy:

1ª	- Stocolmo	1957
2ª	- Delft	1960

GABOR,1948. The electron microscope. Chemical Publ.

PORTER,BONNEVILLE,1964. An introduction to the fine structure of cells and tissues. Lea & Farber.

BOYD,JOHNSON,LEVERS,1959. Symposium on ultrastructure of cells. Williams & Wilkins.

FAWCETT,1966. The cell, an atlas of fine structure

SMITH,1968. Insect cells. Oliver & Boyd

BRACHET,MIRSKY,1959-64. The Cell vols. 1-6. AP

LIMA DE FARIA,1969. Handbook of molecular cytology. North Holland.

BOURNE,196 . Cytology and cell physiology. AP

BURTON & KOHL,1942. Electron microscope. Reinhold

NCI Monographs (Eds.Vincent & Miller). Nucleolus, its structure and function.

SJOSTRAND,F. 1967. Electron Microscopy of cells & tissnes. vol. 1 - Instrumentation and techniques. AP

MARAMOROSCH,KOPROWSKI. Methods in Virology vol. 1-4 AP - 1967

C - Periódicos

Planta

Journal Cell Biology (anteriormente era J.Biophysical and Biochemical Cytology).
Journal of Ultrastructure Research
Journal de Microscopie
Journal of Electron Microscopy
Experimental Cell Research
Micron

D - Firmas fabricantes de Microscópio Electrônico

Alemanha
Siemens & Halske
Carl Zeiss

Holanda
Phillips

Japão
Hitachi
Japan Electron Optics Laboratory
Akashi
Shimadzu

Inglaterra
AEI Scientific Apparatus

Checoslováquia
Tesla Brno

França
Sopelen

E - Ultramicrótomos

U.S.A.
Sorvall - Porter Blum MT-1, MT-2

Alemanha
Reichert
Leitz

Súécia
LKB

F - Equipamento para vácuo - Metalizador

U.S.A.
Varian

Inglaterra
Edwards

Liechtenstein
Balzers

Alemanha
Siemens

Japão
Jeol

G - Chapas fotográficas

E.U.A.
Eastman Kodak (Electron Image Plates)

Belgica
Gevaert (Scientia)

H - Métodos para calibração dos aumentos dado pelo aparelho.

1. Leitura das correntes das lentes
2. Medição do deslocamento do espécimen
3. Utilização de objetos padrões
   a. Réplica de grades de difração (2.160linhas/mm)
   b. Diatomáceas
   c. Esferas de poliestireno
   d. Partículas de vírus
   e. Cristais: ftalocianina de cobre
      catalase (Wrigley 1968,JUR 24,453), 172 ± 4Å

2.3.6. Adendo II

A - Uma técnica rotineira para fixação, inclusão e contrastação de secções, em microscopia electrônica.

1. Fixar pequenos pedaços do tecido (o tecido deve ser fixado imediatamente após sua remoção e se possível, fazer a fragmentação no próprio fixador).

   Fixador - aldeído glutárico 3% em tampão fosfato 0,05M pH 7,2 , (a osmolaridade final do fixador deve ser aproximadamente igual à do tecido; e se necessário fazer as correções de tonicidade do fixador).

   Fixação - 1-2 horas a 4°C

2. Lavar pelo menos 3x o tecido fixado no tampão (0,15-0,2M,pH7).
   Cada lavagem 15-20 minutos. Se por razões diversas for necessário interromper o trabalho de fixação, pode-se após a fixação em aldeído glutárico, manter o tecido no tampão por vários dias. Em nenhuma das próximas etapas é conveniente interromper, até chegar-se à resina de inclusão , pura.

3. Pós-fixação em OsO_4, a 1% em tampão fosfato 0,1M durante 1-2 horas,4°C.

4. Desidratação - O tecido fixado em OsO_4 pode ser rapidamente lavado em tampão (esta etapa pode

ser dispensada) e a seguir passado numa série de concentração crescente de acetona ou etanol (30%, 50%, 70%, 100%). As trocas podem ser feitas ràpidamente, ficando o tecido em cada etapa 2-5 minutos. A lavagem na solução pura pode ser repetida 3x. Para inclusão em Epon, se a desidratação fôr feita em etanol, deve-se transferir o tecido para óxido de propileno, passando primeiramente numa mistura etanol-óx. propileno (1:1).

5. Inclusão - da acetona 100% ou óxido de propileno o tecido é transferido para uma mistura 1:1 de Epon-acetona (ou ox.prop.) onde é mantido por 1-2 horas, sob agitação (se possível)
6. A seguir o material é passado para o Epon puro, onde pode ficar de 12 horas até alguns dias, no refrigerador.
7. Finalmente o material pode ser passado para uma mistura fresca do Epon e êste é polimerizado a 60°, durante 2-3 dias.
8. As secções obtidas dos blocos podem ser contrastadas com acetato de uranila (sol. aq. 3%) durante 1-2 horas e lavadas com água destilada. A seguir, contrastadas com citrato de chumbo (Reynolds), durante 1 minuto, lavadas com jato de água destilada e examinadas.

B - Soluções estoques para fixação

Aldeido glutárico - 10%
Tampão fosfato 0,2M, pH 7,2
Sols.estoques Na_2HPO_4 0,2M e KH_2PO_4 0,2M

Ex. 53,6g Na_2HPO_4 7HOH/litro
27,2g KH_2PO_4/litro

ml de Na_2H	ml de KH_2	pH
8	42	6,02
16	34	6,41
30	20	6,91
33	17	7,0
36	14	7,1
39	11	7,24
40	10	7,3
42	8	7,42

OsO_4 a 4% (1grama/25cc)

Ald. glutárico 10%..... 3cc
Tampão Fosf., 0,2M, pH 7,2 ..... 2,5cc
Água destilada 4,5cc

10,0cc

Ald. glut. 3%, tampão fosf. 0,05 M, pH 7,2

OsO_4 4%..... 1cc
Tampão fosf. 0,2M, pH 7,2 ..... 3cc

4cc

OsO_4 1%, tampão fosf. 0,15M, pH 7,2.

C - Citrato de chumbo

(Reynolds.E.S.1963.JCB - 17,208)

Dissolver 1,33g de $Pb(NO_3)_2$ e 1,76g de $Na_3(C_6H_5O_7).2H_2O$ (citrato de sódio) em 30cc de água destilada. Agitar durante 30 minutos. Adicionar 8cc de NaOH N, gota a gota, sob agitação. A solução de leitosa passa a transparente. Completar o volume para 50cc com água destilada. Deixar em repouso durante 1 noite. Centrifugar ou filtrar para remover qualquer precipitado. Convém se possível, antes de usar centrifugar a solução.

Forme uma superfície parafinada, por exemplo, colocando parafina derretida até a metade, numa placa de Petri e deixando-a solidificar. Sôbre esta superfície coloque uma gota do citrato de chumbo e faça a telinha flutuar sôbre essa gota, com o lado da secção tocando o corante. Convém deixar algumas pérolas de NaOH próxima a gota para absorver CO_2 do ambiente. Cubra a placa durante a coloração que deve durar cerca de 1 minuto. A seguir lava a telinha quer sob repetidos jatos de água destilada ou mergulhando várias vêzes (25-30 vêzes em vazilhas) em água destilada.

D - Avaliação da espessura pela côr de interferência das secções

Côr de interferência	Espessura da secção (A)
Cinza	600
Prateada	600-900
Dourada	900-1500
Púrpura	1500-1900
Azul	1900-2400
Verde	2400-2800
Amarela	2800-3200

E - Formulário

1. Fixador Palade (Palade,G.E.1952.J.Exptl.Med. 95,285)

Solução estoque A
Veronal sódico (barbital).....14,7g
Acetato de sódio..... 9,7g
Água destilada 500cc

Solução estoque B
OsO_4 (cristais)..... 2,4g
Água destilada..... 100cc

Fixador
Solução A ..... 5 cc
Solução B 12,5cc
HCl, 0,1N ..... 5 cc
Água destilada..... 2,5cc

Correção do pH final, para 7,4 , feita com HCl 0,1N

2. Fixador de Caulfield - OsO_4/sacarose (Ca field, 1957, JBBC 3,827)

Solução estoque A do fixador de Palade...1 parte
0,1N HCl ..... 1 parte
Água destilada..... 2partes
Solução estoque B do fixador de Palade.. 4partes
Sacarose.-tecido vegetal.....0,15 g/cc do fixador
-tecido animal ..... 0,045 g/cc do fixador.

3. Fixador $KMnO_4$ de Luft (Luft,J.1956.JJBC,2,799)

Solução estoque A de Palade..... 1 parte
$KMnO_4$ 1,2% ..... 1 parte

pH ajustado a 7,4 - 7,6

Pode-se usar $KMnO_4$ a concentrações maiores e sem o tampão.

4. Fixador com $KMnO_4$/OsO_4 (Moore,R.T.McAlear,J. 1961. Phytopath.Z. 42,297)-p/ fungos.

a. fixar 5 minutos em $KMnO_4$ 2%, não tamponado
b. lavar
c. Post-fixar em OsO_4 2%, tamponado (Palade,fosfato, etc.) 5h/4°C.

5. Fixador cromio-ósmico (Dalton,A.J.1955. Anat. Record 121,281).

Tampão estoque
$K_2Cr_2O_7$ 4%, com pH corrigido para 7,2 com KOH

Solução salina estoque
NaCl 3,4%

OsO_4 estoque
OsO_4 2-4%

Fixador
Tampão..... 1 parte
Salina.....1 parte
OsO_4..... 2 partes

6. Fixador salino de Zetterqvist (Zetterqvist,1956)

Estoque A - de Paladd
Estoque B (salina)

NaCl	40g
KCl	2g
$CaCl_2$	1g
H_2O	500cc

Fixador -
Solução A ..... 10 cc
Salina 3,4cc
OsO_4 ..... 0,5g
Água para completar. 50 cc

pH final 7,2 - 7,4, tonicidade 0,34M

7. Fixador OsO_4 em tampão fosfato de sódio (Millonig G,1964).

A - Para tecido parenquimatoso

2,26%	$NaH_2PO_4.H_2O$	40,8cc	pH 7,6
2,52%	NaOH	9,2	ca.0,13M
OsO_4		0,5	g

8. Glutaraldeido em tampão cacodilato

Tampão - 2,76g ácido cacodílico/70cc H_2O
Correção de pH com NaOH N, para 7,4-7,6 (ca.18cc)

Completar o volume para 100cc
Fixador -
Tampão cacodilato ..... 10 cc
Aldeido glutárico 25% ..... 5 cc
0,1M $CaCl_2$ 0,4cc
H_2O para completar ..... 20 cc

Post fixar com OsO_4 em tampão fosfato de sódio de Millonig (vide 7,B).

9. Fixação com Formalina/Glutaraldeido, Karnovsky, M. 1965. JCB 27,137A).

a. 2g de paraformaldeido (trioximetileno) dissolver em 25cc de H_2O. Aquecer até pouco antes da ebulição.
b. adicionar 1-3 gotas de NaOH até clarear a solução.
c. resfriar
d. adicionar 5cc de glutaraldeido 50%
e. completar volume para 50 cc com tampão 0,2M (fosfato, cacodilato) (pH 7,4-7,6).
f. Fixação
   1. fixar 20-30' as peças maiores. Cortá-las em peças menores e fixar mais 2-5 horas.
   2. Lavar 3-12 horas em tampão 0,1M
   3. Post-fixar em OsO_4 1-2% durante 2 horas.

10. Fixador Formalina/Acroleina (Bernhard,pers.comm)

Acroleina 10% ..... 1 parte
Formalina 10% ..... 1 partea
Tampão fosfato 0,2M pH 7,2 ..... 1 parte
H_2O ..... 1 parte

Fixar durante 1-2 horas. Lavar 1-3 horas no tampão (0,2M). Post fixar com OsO_4 em tampão fosfato 0,15M, durante 1 hora.

MATERIAL PARA INCLUSÃO	SOLVENTE P/ DESIDRATADO	PROCESSAMENTO			OBSERVAÇÕES Ref. Gerais: Pease p. 66; Kay.p.175: Servalla
		S O L U Ç Ã O	tempo	temp.	
GLICOL METACRILATO 1/3 n-Vinil pyrolidine 1/3 Etileno glicol metacrilato 1% benzoil peróxide (acelerador)	etanol ou água (é solúvel em H_2O	resina (3 trocas)	5'	amb.	1. Ref. (a) Fabergé, Lewis.1962 JCB , 15.579; (b) Bernhard, Leduc. 1962. V - ICEM 2:14. Não usar capsulas de gelatina (c) Não fixar materialcom OsO_4
		resina e acelerador	5'	amb.	
		resina e acelerador	3d.	37°C	
		resina e acelerador (remover dos tubos)	24h	60°C	
SELECTRON 5/10 selectron 5003 4/10 N-butil metacrilato 1/10 selectron 5214 0,5-2% tert-butil hidro peroxide (acelerador		resina, acetona (1:1)	60'	amb.	1. Ref. (a) Clevenger, Low. Pittsburgh Plate Glass Co. Brochure; (b) Low, Clevenger 1962. JCB 12:615 2. Secções podem ser tratadas com calor (2h a 200°F) ou solventes para eliminar metacrilato.
	acetona	resina, sem acel.	60'	amb.	
		resina e acelerador	12-48h	60°C	

DDSA - anidrido dodecenil succínico

MNA - anidrido metil nádico

EMP - dimetil amino etilphenol

(continuação)

MATERIAL PARA INCLUSÃO	SOLVENTE P/ DESIDRATADO	PROCESSAMENTO			OBSERVAÇÕES
		SOLUÇÃO	tempo	temp.	Ref. Gerais: Pease, p. 66; Kay. p.175 Servalla
EPON 1/3 sol.A (Epon 812-62cc; DDSA -1000c) 2/3 sol.B(Epon 812-100cc; MNA -89cc) 1,5-2% DMP (acelerador)	acetona ou álcool e óxido de propileno	resina - solvente(1:1)	1h uma noite	amb.	1. Ref.Luft. 1961. JBBC 9,409; Craig,Frajola,Creider,1962 JBBC 12:190 2. Secções podem ser utilizadas sem película suporte. 3. B sòmente muito duro; A sòmente, mole. 4. Pode-se extrair do Epon, - uma resina solúvel em água, Aquom com ± 30% de rendimento. Gibbons: 1959; Nature 184:375
		Resina	uma noite	amb.	
		Resina	2-4 dias	60°C	
MARAGLASS 3/5 maraglass 655 2/5 cardolite 513 ou 7/10 maraglass 2/10 cardolite 1/10 dibutilftalato 2% Benzildimetilamina (acelerador).	acetona ou álcool e óxido de propileno.	Resina - solvente (1:)	30'	amb.	1. Ref.: (a) Freeman, Spurlock 1962. JCB 13:437; (b) Freeman,Spurlock. V-ICEM,2:11; (c) Kattine,Freeman. 1963. JCB 17:203. 2. Dibutilftalato aumenta a propensão para enrugar,mas últimas referências encomenda a proporção 7:2:1
		Resina	8-12h	10°C	
		Resina	24-28h	60°C	

(continuação)

MATERIAL PARA INCLUSÃO	SOLVENTE P/ DESIDRATADO	PROCESSAMENTO			OBSERVAÇÕES
		SOLUÇÃO	tempo	temp.	Ref. Gerais: Pease, p.66; Kay. p. 175 Servalla
ARALDITA 1/2 resina 6005 1/2 Endurecedor DDSA 1-2% N-Benzil--Dimetial-amina (acelerador)	acetona ou etanol e óxido de propileno	1/2 resina 1/2 solv.	30'	amb.	1. Ref.: Glauert, Glauert, 1958. JBBC 4:191 2. Lotes de resinas inconsistentes; às vêzes duras, às vêzes moles. 3. Pode-se adicionar o plastificante dibutil-ftalato na seguinte proporção: Araldita 6005-40cc; DDSA-40cc e DBF-15cc
		Resina	uma noite	amb.	
		Resina	uma noite	60C	
DURCUPAN-ARALDITA Durcupan Araldita I (DDSA e resina) Araldita II (DDSA, resina e acelerador)		1/2 durcupan : 1/2 H_2O	30'	amb.	1. Ref. Staubli. 1963. JCB 16:197 2. Corta melhor que Durcupan puro
		7/10 " 2/10 "	30'	amb.	
		9/10 " 1/10 "	30'	amb.	
		durcupan	60'	amb.	
		7/10 durcupan 3/10 araldita I	60'	amb.	
		3/10 durcupan 3/10 araldita I	3h	amb.	
		araldita I	60'	amb.	
		araldita II	60'	amb.	
		araldita II	uma noite	60C	