

# Microscopia Electrónica



Prof. Carina Ladeira

Abril de 2008



# Microscopia Electrónica

- A Microscopia Electrónica, uma vasta área em Anatomia Patológica, surge com a necessidade de observar cada vez mais com pormenor as estruturas tecidulares, nomeadamente os componentes celulares que não são passíveis de se observar com detalhe ao MO
- Esta área permite a observação da ultra-estruturas de alguns organitos e estruturas com interesse na patologia como é o caso do núcleo, dos lisossomas, das mitocôndrias, entre outras
- Assim, tornou-se um óptimo complemento de diagnóstico, no entanto, a sua principal aplicação continua a ser no campo da investigação científica

# Ultraestrutura de Organitos e Estruturas com interesse em Patologia

- Núcleo
- Mitocôndrias
- Retículo Endoplasmático
- Complexo de Golgi e Grânulos Secretórios
- Lisossomas
- Citoesqueleto
- Membrana plasmática
- Colagénio
- Amilóide



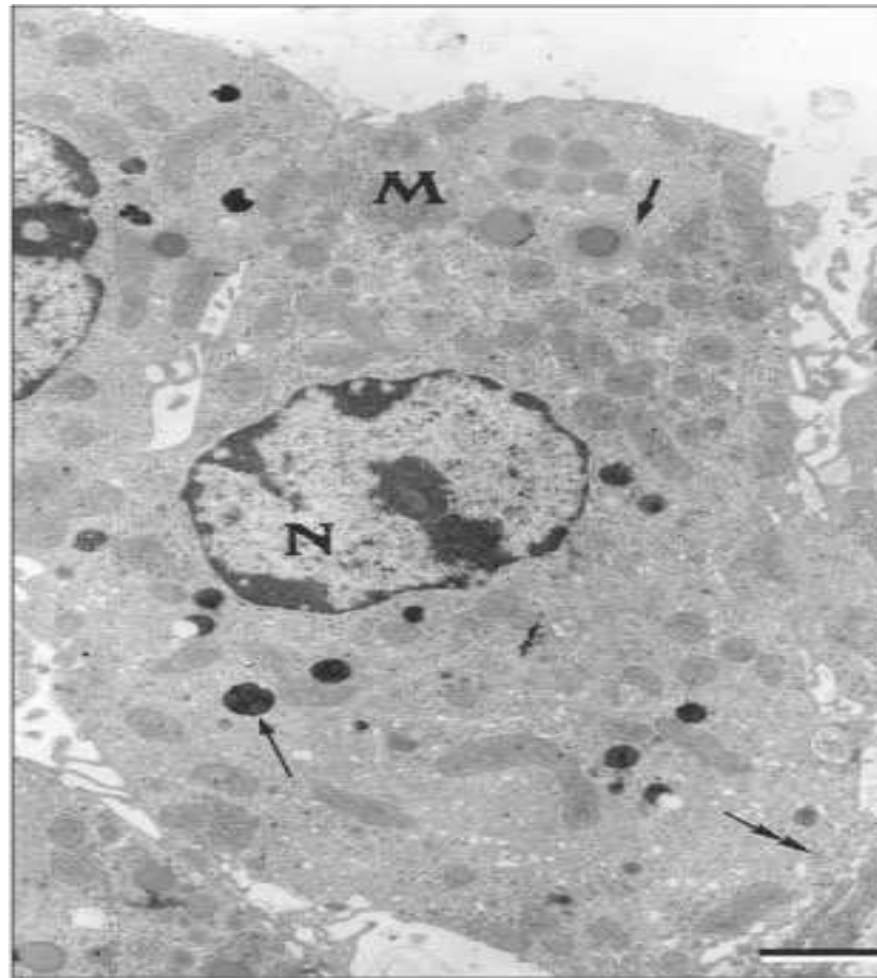
## Núcleo (1)

- Contém o material genético – DNA – associados às proteínas básicas – histonas – para formar a cromatina
- A cromatina condensada ou heterocromatina corresponde a porções inativas do DNA
- Podem ocorrer alterações na cromatina em situações de morte celular
- No caso da apoptose, a cromatina condensa-se em massas compactas
- O nucléolo, que contém RNA e as proteínas ribossômicas, aumenta de volume em células com elevada síntese proteica (ex.: células neoplásicas)

## Núcleo (2)

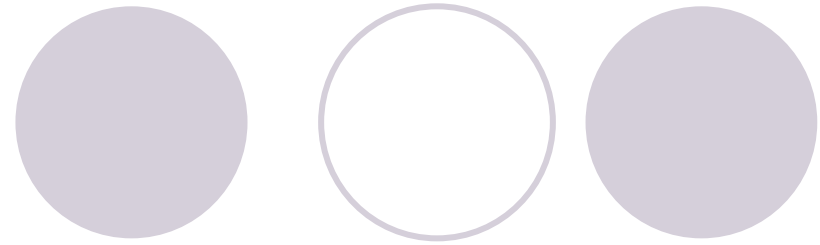
- A membrana nuclear, que separa o núcleo do citoplasma é constituída por 2 folhetos que delimitam um espaço contínuo com o RE, pode apresentar-se muito convulsionada, com proliferações e duplicações, em células neoplásicas
- O núcleo pode também apresentar inclusões, como os corpos nucleares ou inclusões virais

# Núcleo (3)



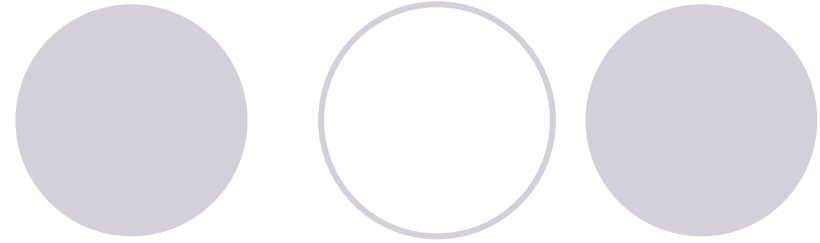
**Fig. 3** — An electron micrograph of a melatonin treated mouse Leydig cell. N = cell nucleus; M = mitochondria; thin arrow = lysosome; thick arrow = smooth endoplasmic reticulum; double arrow = rough endoplasmic reticulum. Bar = 2  $\mu$ m.

# Mitocôndrias (1)



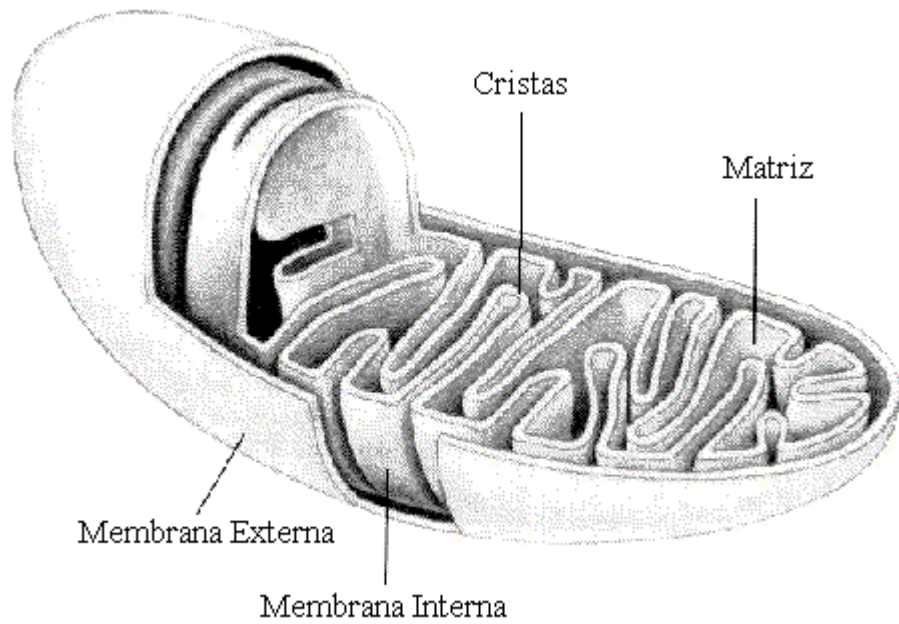
- Distinguem-se 2 membranas: a externa e a interna, que se prolonga sob forma de cristas para o interior do organismo e delimita a matriz
- As mitocôndrias estão sujeitas a alterações conformacionais fisiológicas
- Na fase de oxidação ou na fase de armazenamento de energia, a matriz é mais clara e a câmara externa (espaço intermembranar) diminui de tamanho

## Mitocôndrias (2)



- Na fase fosforilativa ou a fase de síntese de ATP, a matriz condensa e a câmara externa aumenta de tamanho
- Verifica-se a formação de edema mitocondrial e de manchas densas de depósitos de cálcio quando ocorrem situações de anóxia, de elevada concentração de cálcio ou de presença de compostos lesivos para as membranas
- Em determinadas patologias podem ser observados cristais no interior deste organito

# Mitocôndrias (3)





# Retículo Endoplasmático (1)

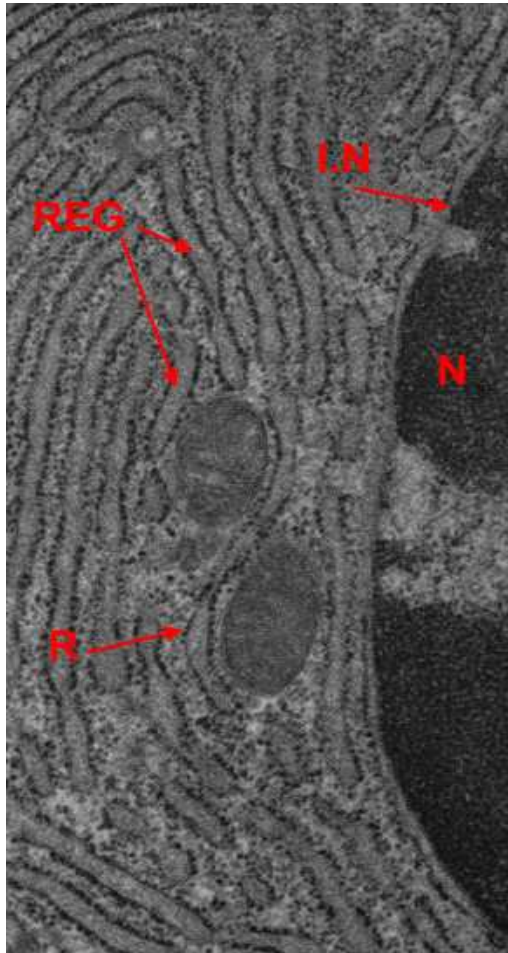
- O RE corresponde a um sistema de cisternas, vesículas e tubos contínuos com a membrana nuclear, divide-se em:
- **RER** - constituído por cisternas recobertas por polirribossomas activos na síntese proteica
- **REL** – formado por uma rede de tubos e de vesículas envolvida no metabolismo do colesterol e em mecanismos de desintoxicação



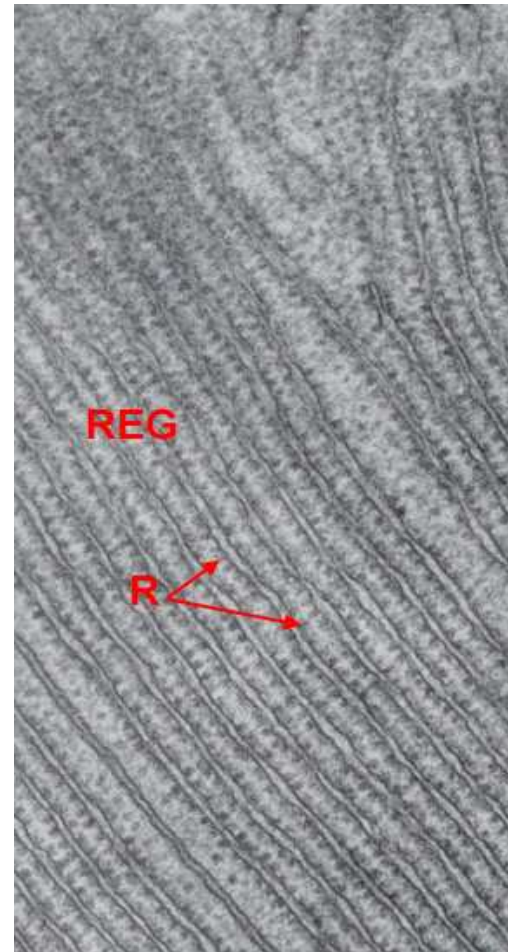
# Retículo Endoplasmático (2)

- Este organito apresenta um aumento de tamanho e um aspecto vesiculoso quando há acumulação de proteínas, por si sintetizadas, ou em casos de edema celular
- O RE pode tomar a forma de estruturas tubuloreticulares, normalmente associadas ao interferão  $\alpha$ , que está presente nas células de Kupffer de doentes com SIDA

# Retículo Endoplasmático (3)



RER



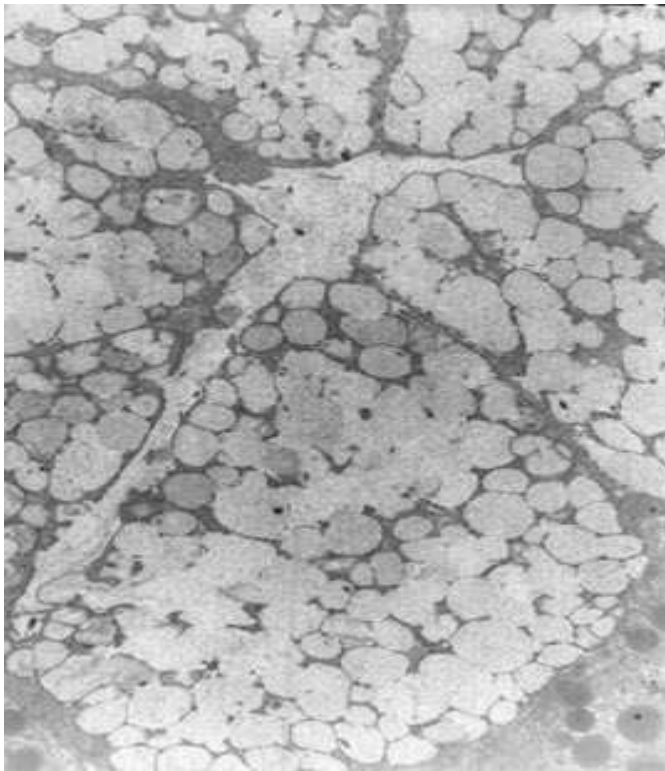
REL

# Complexo de Golgi e Grânulos Secretórios (1)

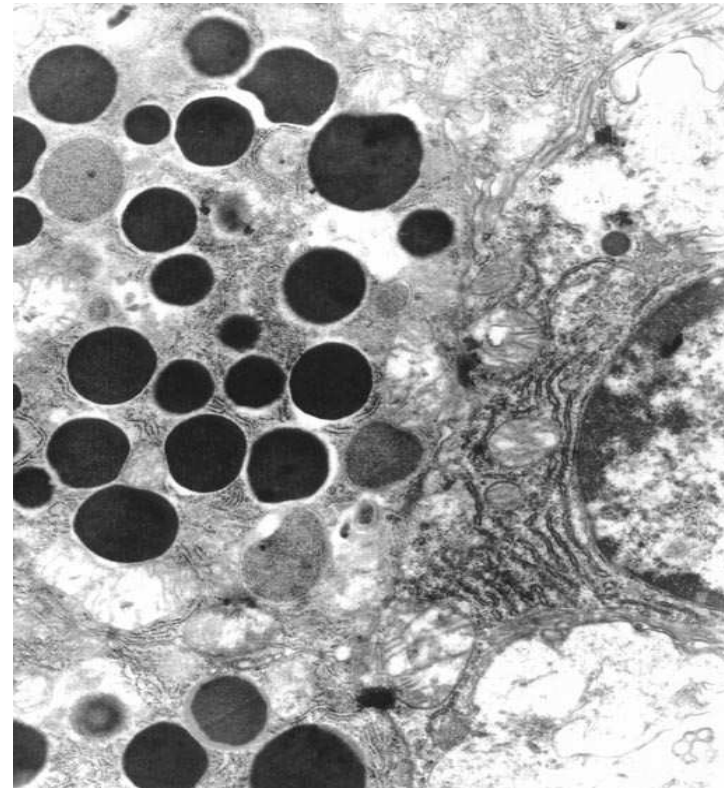


- As proteínas sintetizadas no RER passam pelo aparelho de Golgi, onde são modificadas e armazenadas em grânulos secretórios
- A morfologia destes grânulos é importante na tipificação celular em situações neoplásicas, nomeadamente, em casos de adenoma e de adenocarcinoma

# Complexo de Golgi e Grânulos Secretórios (2)



**Complexo de Golgi**



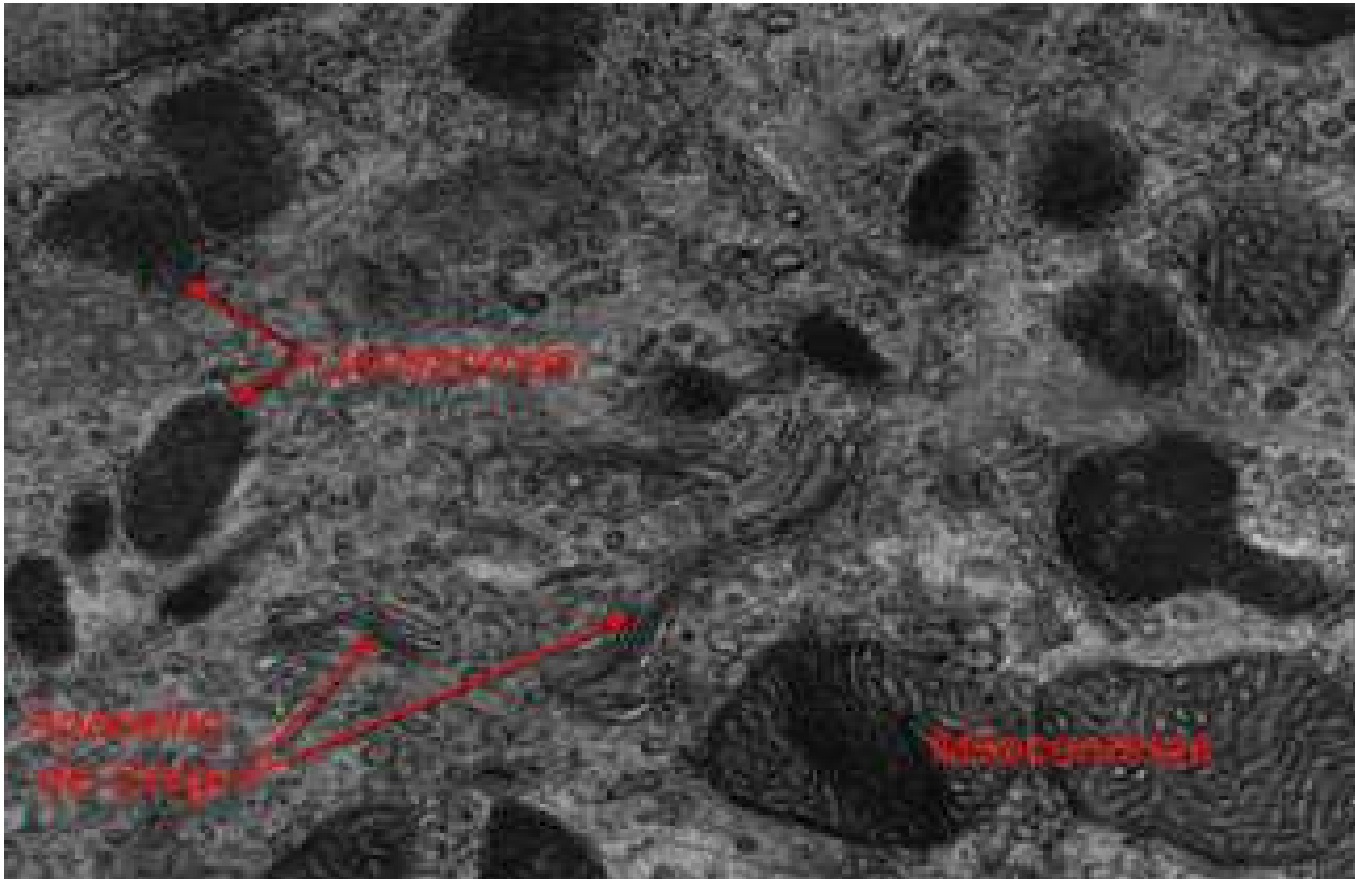
**Grânulos secretórios**

# Lisossomas (1)



- Os lisossomas são constituídos por hidrolases ácidas, que degradam substâncias ingeridas ou porções de citoplasma a eliminar
- São organitos que podem ser classificados em primários, quando ainda não possuem substância em degradação, e secundários, que resultam da fusão dos fagossomas ou vacúolos autofágicos e, por isso, possuem restos de substâncias em degradação
- O estudo do conteúdo dos lisossomas é importante para a identificação de determinadas doenças ou para a detecção de deficiências enzimáticas

# Lisossomas (2)



# Citoesqueleto (1)

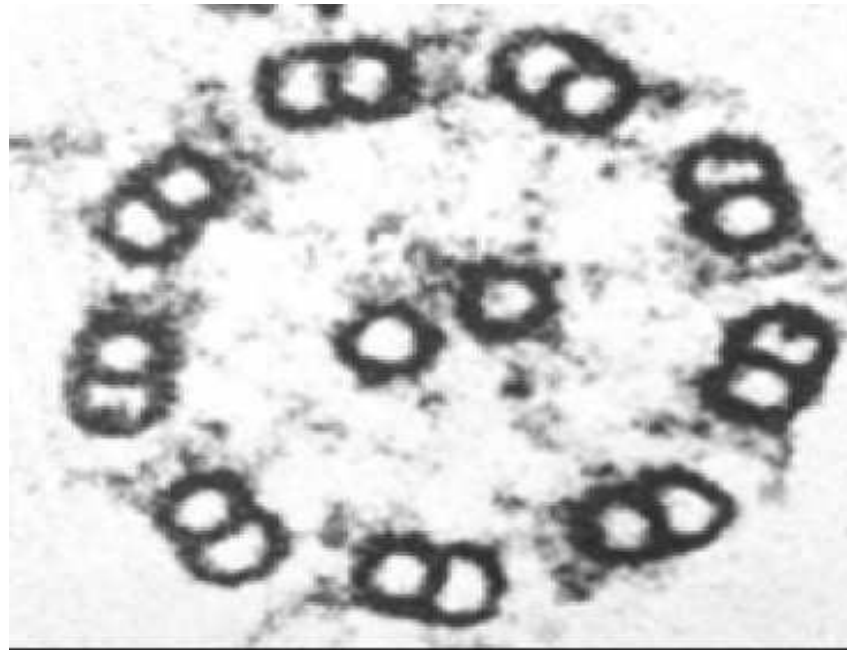
A decorative graphic at the top of the slide consists of six circles arranged in two groups of three. The first group on the left has a solid purple circle, a white circle with a purple outline, and another solid purple circle. The second group on the right has a solid purple circle, a white circle with a purple outline, and another solid purple circle.

- Os microtúbulos estão envolvidos no transporte de organitos celulares, na motilidade dos cílios e na organização do citoesqueleto
- O estudo dos microtúbulos pode levar à detecção de alterações na motilidade de certos organitos, como os cílios, ou à identificação de alterações no transporte intracelular
- Os sarcómeros do músculo estriado e das células musculares lisas apresentam microfilamentos

## Citoesqueleto (2)

- A presença de feixes de microfilamentos organizados é indicativa de diferenciação muscular e pode auxiliar na detecção de tumores
- A diferenciação dos filamentos intermediários em diversos tipos varia conforme as células
- A sua presença e morfologia pode auxiliar no diagnóstico de alguns tumores

# Citoesqueleto (3)



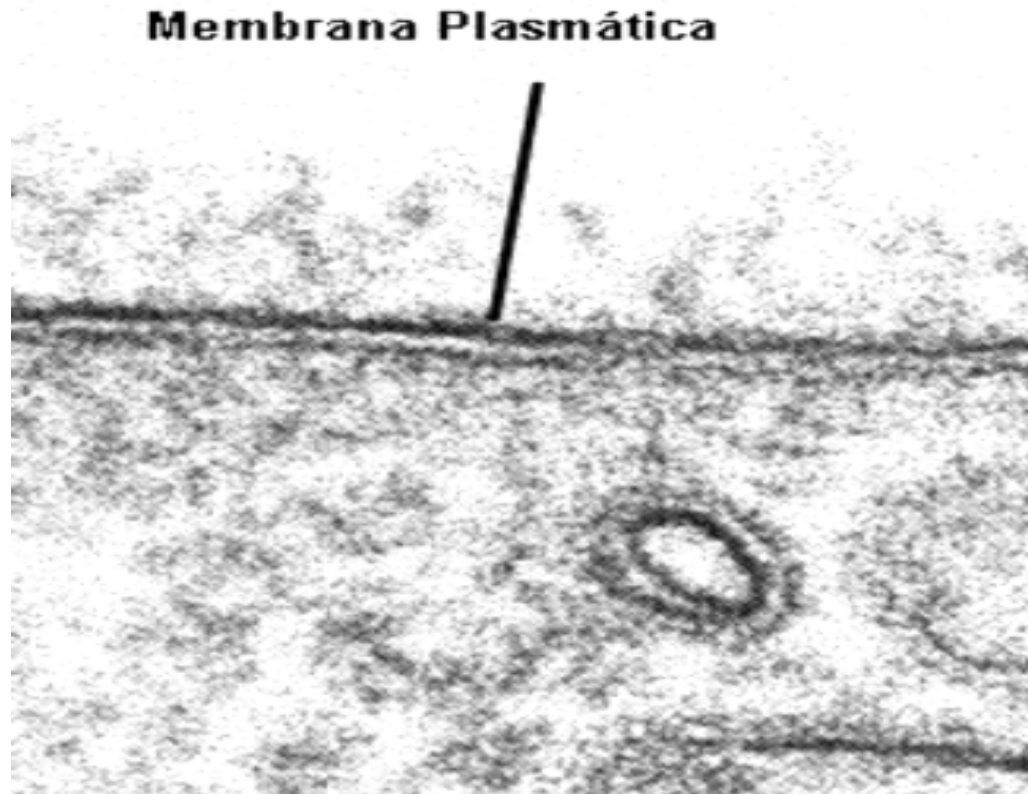
**Patrón microtubular 9 + 2**



# Membrana Plasmática (1)

- Separa o citoplasma do meio exterior
- Constituída por uma dupla camada de fosfolípidos com proteínas intercaladas
- Apresenta um aspecto trilaminar
- Possui diferenciações em microvilosidades e em cílios, os quais auxiliam na identificação celular
- Alterações na membrana traduzem-se em alterações de permeabilidade, que causam alterações na densidade e no volume dos organitos

# Membrana Plasmática (2)

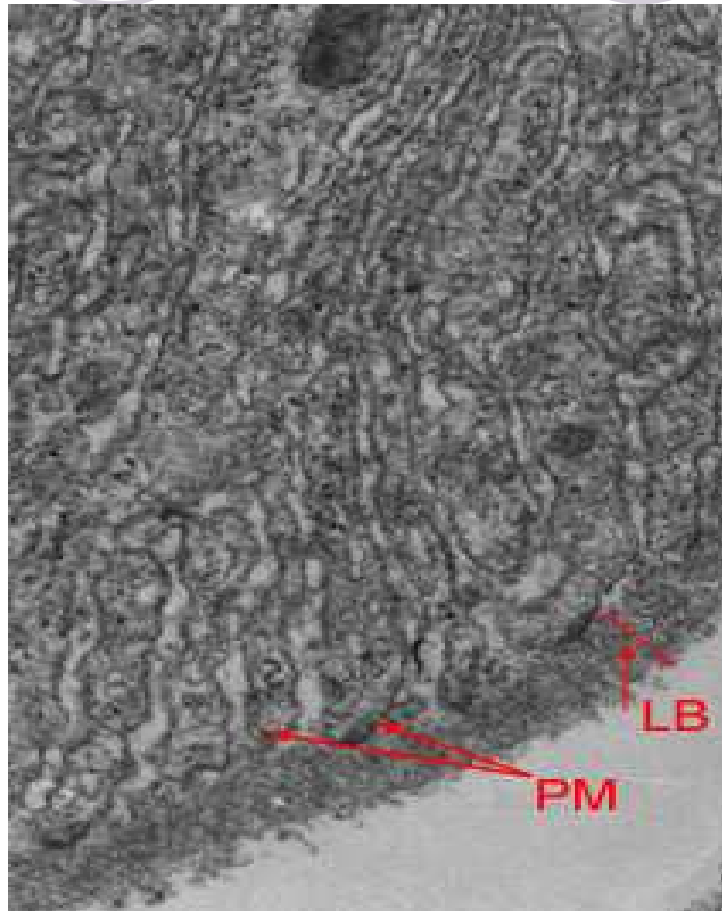


# Colagénio (1)



- O colagénio tipo I resulta da sobreposição parcial de moléculas de tropocolagénio, produzindo fibras com uma estriação transversal
- As moléculas de tropocolagénio, por vezes, polimerizam com uma diferente sobreposição, dando origem ao colagénio de “espaçamento longo” que pode ser observado quer em tecidos normais, quer em tecidos patológicos
- As membranas basais (colagénio tipo IV) polimerizam numa rede tridimensional e podem apresentar-se espessas, estreitas, duplas ou conter depósitos densos, o que corresponde a alterações importantes associadas a doenças do glomérulo renal

# Colagénio (2)



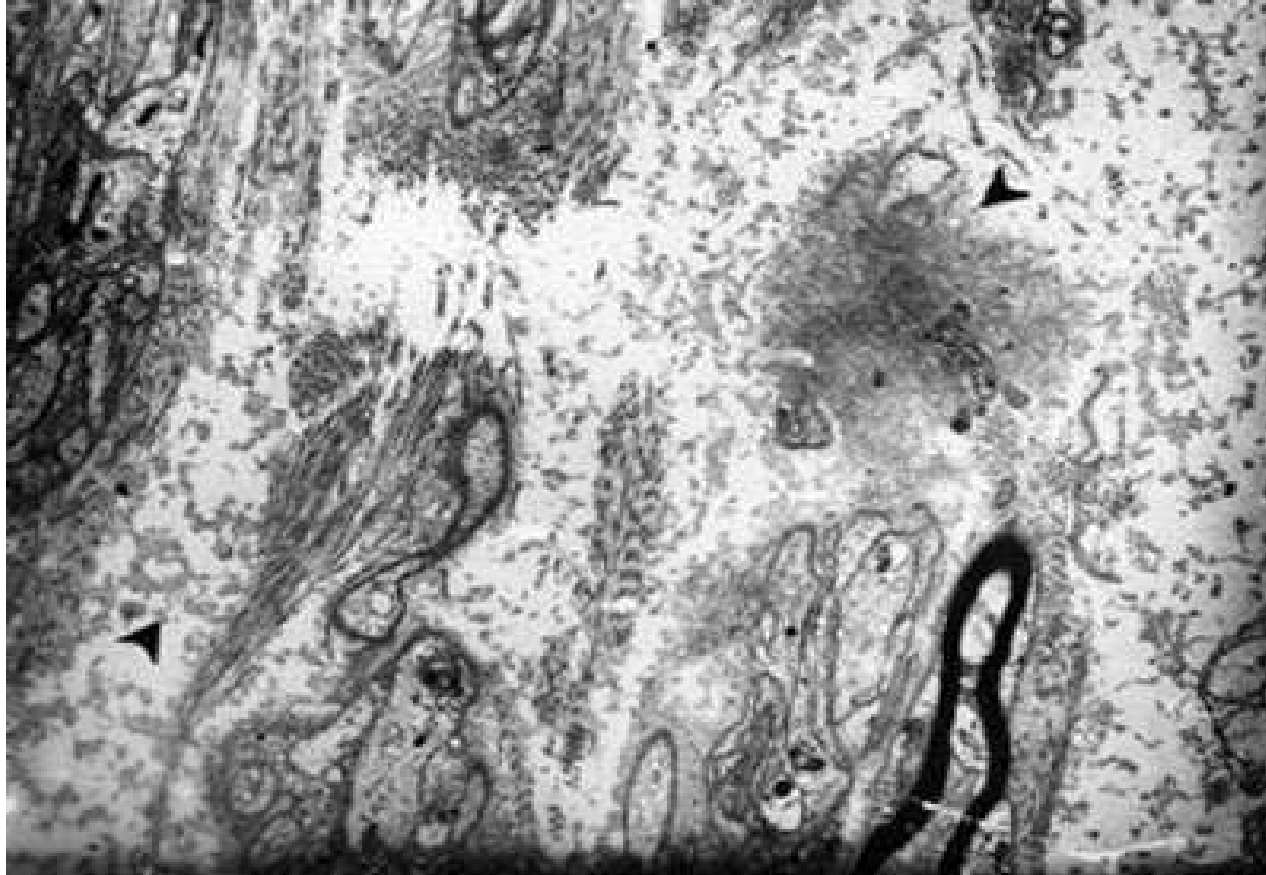
**PM - pregas membranares, LB - membrana**

# Amilóide (1)

A decorative graphic consisting of six circles arranged in two rows. The top row has three circles: a solid purple one on the left, a white one with a purple outline in the middle, and a solid purple one on the right. The bottom row has three circles: a solid purple one on the left, a white one with a purple outline in the middle, and a solid purple one on the right.

- O amilóide corresponde à acumulação exagerada de proteínas no interior das células
- Ultraestruturalmente, corresponde a acumulações de filamentos rectilíneos com cerca de 7 a 10 nm de espessura, normalmente dispostos desordenadamente

# Amilóide (2)



# **Técnica de Microscopia Electrónica de Transmissão**



Prof. Carina Ladeira

Abril de 2008

# Técnica de Microscopia Electrónica

- Fixação
- Processamento
  - Desidratação
  - Transição
  - Impregnação
- Inclusão
- Corte
- Contraste
- Interpretação de imagem

# Registo

- Quando 1 amostra chega ao laboratório de ME tem de ser novamente registada, sendo atribuído um n.º interno
- A maioria das amostras que chegam para ME são biópsias de pele, renais, hepáticas e culturas de células
- As culturas de células são centrifugadas para se obter um sedimento celular no fundo de um tubo *eppendorf* (ex.: urinas)
- Alguns sedimentos de urinas têm de ser descalcificados devido aos cálculos que apresentam (ex.: EDTA)

# Fixação



- **Objectivo:** preservar detalhes a nível macromolecular (proteínas, ácidos nucleicos, lípidos e glícidos) e ultraestrutural, mantendo sempre as relações existentes entre os diferentes constituintes
- Não existe um fixador universal, já que diferentes materiais biológicos exigem diferentes métodos e diferentes meios de preservação
- A aplicação dos fixadores é efectuada de acordo com o material biológico em estudo

A decorative graphic at the top of the slide features the words 'Agentes' and 'Fixadores' in a blue, sans-serif font. 'Agentes' is positioned over a solid purple circle, while 'Fixadores' is positioned over a white circle with a purple outline. To the right of this text are three more circles: a solid purple circle, a white circle with a purple outline, and another solid purple circle.

# Agentes Fixadores

- Glutaraldeído
- Formaldeído
- Tetróxido de ósmio
- Acetato de uranilo

# Glutaraldeído



- Constituído por 2 grupos aldeído (dialdeído) em cada extremidade da sua estrutura molecular
- Estabelece pontes de H entre proteínas, sendo por isso o mais indicado para a fixação destas macromoléculas
- Em ME, o glutaraldeído funciona como fixador primário, já que é através dele que se consegue a estabilização rápida da estrutura celular, bem como das proteínas celulares
- É um fixador muito lento, o que dificulta a fixação total do fragmento
- Para combater esta penetração lenta, pode-se adicionar formol ao glutaraldeído, obtendo-se um fixador mais rápido

A decorative graphic at the top of the slide consists of two rows of circles. The top row has a solid purple circle on the left and an outlined purple circle on the right. The bottom row has a solid purple circle on the left, an outlined purple circle in the middle, and a solid purple circle on the right. The word 'Formaldeído' is written in a blue, sans-serif font, with the first two letters overlapping the solid purple circle in the top row.

# Formaldeído

- Constituído apenas por um grupo aldeído, sendo um fixador menos eficiente para alguns tipos de proteínas
- Não é um bom fixador para ME, pois contém muitas impurezas que dificultam a visualização da ultraestrutura celular
- Na sua forma despolimerizada (estado puro), penetra os tecidos com uma velocidade superior à do glutaraldeído

# Tetróxido de ósmio



- Bom fixador de carácter geral
- Reage com proteínas, lípidos e ácidos nucleicos
- É utilizada devido às suas capacidades de fixação do tecido adiposo
- Utilizado após uma primeira fixação em glutaraldeído, pois possui uma baixa velocidade de penetração e reacção lenta com os tecidos
- Substância altamente tóxica, sendo fundamental a sua manipulação na *hotte*

# Tetróxido de ósmio



- Rapidamente reduzido a dióxido de ósmio sólido, tomando a cor negra em contacto com a matéria orgânica (por este motivo as amostras ficam de cor negra no fim da etapa da fixação)
- A adição de Ferricianeto de potássio ao Tetróxido de ósmio impede a extracção do glicogénio, melhorando a preservação da membrana celular e de outros constituintes celulares

# Acetato de uranilo



- Fixador para todo o tipo de membranas presentes nas células, bem como os ácidos nucleicos, melhorando a preservação destes últimos
- Pode dissolver o glicogénio

# Factores que influenciam a fixação

- pH
- Temperatura
- Osmolaridade

pH



- O pH do fixador deve ser o mais próximo possível do dos tecidos humanos
- Isto consegue-se através da utilização de soluções tampão com pH entre 7,2 e 7,4; apesar de ser possível obter bons resultados com pH entre 6 e 8
- As soluções tampão mais utilizadas em ME são:
- Tampão Cacodilato
- Tampão Fosfato
- Tampão S-Colina
- Tampão Acetato-Ácido acético

# Tampões (1)

A decorative graphic at the top of the slide consists of two rows of circles. The first row has a solid purple circle on the left and an outlined purple circle on the right. The second row has a solid purple circle on the left, an outlined purple circle in the middle, and a solid purple circle on the right.

## **Tampão Cacodilato**

- É um dos tampões mais utilizados em ME
- Contém arsénico e previne o crescimento bacteriano e fúngico
- Possui boas qualidades fixadoras, permitindo uma boa preservação da ultra-estrutura
- Tratando-se de um produto tóxico deve ser manipulado com luvas e deve evitar-se a reacção com ácidos, que leva à libertação de gás tóxico

# Tampões (2)

A decorative graphic at the top of the slide consists of two groups of three circles. The first group on the left has a solid purple circle on the left, a white circle with a purple outline in the middle, and a solid purple circle on the right. The second group on the right has a solid purple circle on the left, a white circle with a purple outline in the middle, and a solid purple circle on the right.

## **Tampão Fosfato**

- Permite uma preservação equivalente à obtida com o tampão Cacodilato
- Vantagem: não é tóxico
- Desvantagem: em alguns casos potencia a formação de precipitados finos nos tecidos

## **Tampão S- Colidina**

- Extrai grande parte da matriz extracelular, obtendo-se fixações de menor qualidade comparativamente com os tampões fosfato e cacodilato
- Útil para peças de grandes dimensões devido à extracção facilita a penetração do fixador no tecido

A decorative graphic at the top of the slide consists of two groups of three circles. The first group on the left has a solid purple circle on the left, a white circle with a purple outline in the middle containing the text 'Tampões (3)', and a solid purple circle on the right. The second group on the right has a solid purple circle on the left, a white circle with a purple outline in the middle, and a solid purple circle on the right.

# Tampões (3)

## **Tampão Ácido acético**

- Tem como principal função a preparar os tecidos para receber o Acetato de uranilo, que possui um pH 5
- Este tampão (com pH 5) faz, então, a transição do tampão cacodilato (pH 7.2) para o Acetato de uranilo (pH 5)
- Este tampão não pode ser usado como ponto de paragem (ao contrário do tampão cacodilato), porque este pH vai interferir com as membranas se a sua exposição for demasiada

A decorative graphic at the top of the slide consists of two rows of circles. The top row has three circles: a solid purple one on the left, a white one with a purple outline in the middle, and a solid purple one on the right. The bottom row has three solid purple circles. The word 'Temperatura' is written in a purple serif font, with the 'T' and 'a' overlapping the first circle of the top row.

# Temperatura

- O controlo da temperatura durante o processo de fixação é importante visto que temperaturas baixas podem destruir as membranas perinucleares ou danificar os microtúbulos
- Temperaturas elevadas provocam desnaturação de proteínas, impossibilitando o seu estudo
- A fixação é realizada a TA

# Osmolaridade

A decorative graphic consisting of two rows of circles. The top row has a solid purple circle on the left and an outlined purple circle on the right. The bottom row has a solid purple circle on the left, an outlined purple circle in the middle, and a solid purple circle on the right.

- Deve estar próxima da do meio extracelular, embora os fixadores hipertônicos produzam bons resultados
- Quando existe necessidade de acertar a osmolalidade do fixador adiciona-se sucrose ou iões de cálcio
- Em situações específicas, acrescenta-se o meio em que as células vivem como, p.e., água do mar para o plâncton ou o próprio meio de cultura das células

# Síntese do procedimento (1)

- A fixação com o **Glutaraldeído** a 3% em tampão cacodilato 0.1M
- Deve ser feita no frigorífico à temperatura de 4°C e durante 2 a 10 horas
- O método de fixação usado é o de imersão que consiste em mergulhar a peça no fixador
- Após decorrido o tempo de fixação do glutaraldeído, procede-se à primeira lavagem com **tampão Cacodilato** 0.1M a pH 7.2
- Esta efectua-se três vezes, com um intervalo de 5 minutos. Se necessário, os fragmentos podem permanecer nesta solução durante uma semana (ponto de paragem)

## Síntese do procedimento (2)

- Coloca-se a solução de **Tetróxido de ósmio** 1% em cacodilato 0.1M, pH 7.3, durante 2H
- São feitas novas lavagens com **tampão Cacodilato** 0.1M, 3x, cada uma com a duração de 10'; seguidas de lavagens em **tampão Acetato-Ácido acético** 0.1M, pH 5, 3x, 10'cada
- Como último agente fixador, usa-se o **Acetato de uranilo** 0.1M, pH 5 em tampão acetato, durante 1H
- De seguida e com a finalidade de retirar o excesso da solução na qual os fragmentos estavam mergulhados – acetato de uranilo – faz-se uma nova lavagem em **tampão Acetato-Ácido acético** 0.1M, pH 5: três repetições da lavagem, durante 10' cada

# Processamento

A decorative graphic at the top of the slide consists of two groups of three circles. The left group has a solid purple circle on the left, a white circle with a purple outline in the middle, and a solid purple circle on the right. The right group has a solid purple circle on the left, a white circle with a purple outline in the middle, and a solid purple circle on the right.

As etapas que se seguem são:

- **Desidratação**
- **Transição**
- **Impregnação**
  
- São etapas sequenciais obrigatórias, em que um erro condicionará a qualidade do material para análise

# Desidratação

A decorative graphic at the top of the slide consists of two rows of circles. The top row has a solid purple circle on the left and a white circle with a purple outline on the right. The bottom row has a solid purple circle on the left, a white circle with a purple outline in the middle, and a solid purple circle on the right.

- **Objectivo:** eliminar toda a água da amostra, uma vez que os meios de inclusão são imiscíveis em água
- Regra geral, o etanol e a acetona são os solventes que melhor funcionam como desidratantes na ME
- A sua utilização deve estar associada aos filtros moleculares do tipo 3A ou sulfato de cobre anidro, já que estes solventes são higroscópios, nomeadamente a acetona, o que os leva a absorver a humidade da atmosfera, aumentando a probabilidade de desidratação deficiente



# Desidratação

- Em determinadas situações é necessário ter em atenção o desidratante que se vai utilizar, já que pode dissolver determinadas substâncias, como os lípidos
- Para reduzir a extracção de lípidos, procede-se à fixação pelo Tetróxido de ósmio e pelo Acetato de uranilo
- A utilização de Acetona nestas situações é mais eficaz do que a utilização de etanol
- É ainda possível a desidratação noutros solventes ou mesmo resinas hidrossolúveis que tem como vantagem minimizar a extracção de determinados componentes

# Transição (1)



- A reacção dos desidratantes, principalmente os alcoóis, com as resinas Epoxi, que são a substância de impregnação/inclusão, é muito lenta e com as resinas poliéster não há reacção
- Assim, é necessário utilizar uma substância intermediária que acelere a reacção no 1º caso e que permita a utilização de resinas poliéster no 2º
- Os meios de transição servem para desocupar os espaços preenchidos pelas substâncias desidratantes, para dar lugar às resinas de inclusão

## Transição (2)

A decorative graphic consisting of six circles arranged in a horizontal line. The first circle is solid purple and contains the text 'Transição (2)'. The second circle is white with a purple outline. The third circle is solid purple. The fourth circle is white with a purple outline. The fifth circle is solid purple. The sixth circle is solid purple.

- Os meios de transição têm propriedades semelhantes às dos diafanizadores utilizados em MOC
- O epoxi-propano ou óxido de propileno é a substância mais utilizada para este efeito, já que as resinas são muito solúveis neste, facilitando a impregnação

# Impregnação

A decorative graphic at the top of the slide consists of six circles arranged in two groups of three. The first group on the left has a solid purple circle on the left, a white circle with a purple outline in the middle, and a solid purple circle on the right. The second group on the right has a solid purple circle on the left, a white circle with a purple outline in the middle, and a solid purple circle on the right.

- **Objectivo:** penetrar o monómero da resina no material, de forma uniforme, para que se possa proceder à polimerização que formará o bloco duro (inclusão)
- Como as resinas Epoxi são muito viscosas, a infiltração deve ser prolongada (de 1 dia para o outro ou durante à noite) para garantir que houve uma boa impregnação dos tecidos
- Quanto mais viscosa for a resina + difícil é obter bons resultados, sendo necessário aumentar o tempo de impregnação dos tecidos

# Inclusão (1)

A decorative graphic at the top of the slide consists of a row of five circles. The first circle is solid purple and contains the text 'Inclusão (1)'. The second circle is white with a purple outline. The third circle is solid purple. The fourth circle is white with a purple outline. The fifth circle is solid purple.

- **Objectivo:** obtenção de um bloco sólido, onde a amostra está incorporada, de fácil manuseamento, de dureza homogénea e com uma plasticidade e uma elasticidade adequadas à execução de cortes suficientemente finos (pretende-se uma espessura inferior a 100 nm) para visualização ao ME

## Inclusão (2)



- As resinas do tipo Epoxi são as mais utilizadas como meio de inclusão na ME
- São resinas hidrofóbicas que se apresentam sob a forma de um líquido viscoso, que se transforma num polímero sólido de grande dureza através do aquecimento ou da irradiação pelos raios UV
- A velocidade desta reacção aumenta na presença de um catalisador
- É importante ter em conta que quanto + viscosa for a resina, + difícil será a obtenção de bons resultados e, portanto, é necessário aumentar os tempos de impregnação



## Inclusão (3)

- O monómero da resina Epoxi tem na sua constituição os seguintes componentes:
- Resina (araldite, epon ou equivalentes)
- Anidrido (DDSA, MNA, etc.)
- Catalisador (DMP-30, BDMA)
- Aditivos (DBP, DER 736, etc.)
- A polimerização consiste na formação de um polímero tridimensional pela reacção dos grupos epóxido com o anidrido

# Inclusão (4)

A decorative graphic at the top of the slide consists of a row of five circles. The first circle on the left is solid purple. The second circle is white with a purple outline. The third circle is solid purple. The fourth circle is white with a purple outline. The fifth circle is solid purple.

- A razão entre estes 2 componentes determina, em grande parte, as propriedades do corte e, portanto a estrutura do polímero
- A dureza do bloco é, então influenciada pela:
- Natureza da combinação anidrido-resina (o MNA providencia blocos + duros que o DDSA com Epon)
- Quantidade de catalisador (excesso torna os blocos quebradiços)
- Presença de plastificadores (DBP torna os blocos + macios)



## Inclusão (5)

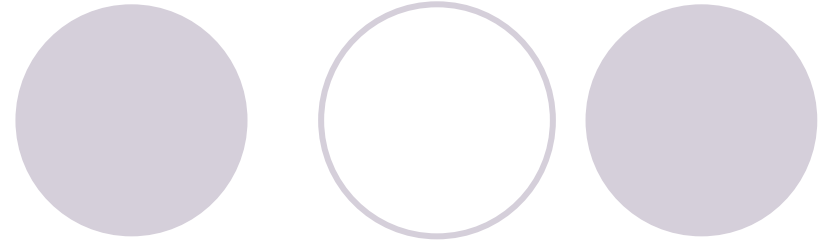
- As resinas epoxi são adequadas para estudos ultraestruturais morfológicos, daí existir uma gama de formulações, destacando-se:
- **Epon de Luft** – dureza regulada pela proporção dos anidridos DDSA e MNA
- **Mistura Epon-Araldite de Molenhauer** – dureza regulada pela adição do plastificador DBP

A decorative graphic at the top of the slide consists of two groups of three circles. The first group on the left has a solid purple circle on the left, a white circle with a purple outline in the middle, and a solid purple circle on the right. The second group on the right has a solid purple circle on the left, a white circle with a purple outline in the middle, and a solid purple circle on the right.

## Inclusão (6)

- **LR-White** – resina monomérica de carácter hidrofílico que confere extrema facilidade em se misturar com a água
- **Resinas Spurr** – são meios de impregnação de baixa viscosidade, baixo contraste e relativamente instáveis sob o feixe de electrões; a baixa viscosidade torna-a num bom meio de impregnação para paredes celulares, membranas, tecidos duros e lípidos

# Inclusão (7)



- Existem vários tipos de moldes de inclusão:
- Moldes de borracha
- Moldes de plástico

## Inclusão (8)



- O primeiro passo é colocar um pouco de resina, com uma seringa, sobre o molde de forma a cobrir o fundo
- Seguidamente, é necessário colocar o número de registo do fragmento, para estes posteriormente poderem ser identificados
- A melhor maneira de identificar o bloco é colocar um pequeno rectângulo de papel, com o número de registo impresso, no centro do molde, voltado para cima

# Inclusão (9)



- O próximo passo é colocar os fragmentos
- Tanto a identificação do bloco como o correcto posicionamento dos fragmentos são auxiliados por um palito de madeira
- Não existe uma orientação específica, sendo que os fragmentos filiformes são colocados com o seu maior eixo paralelo ao maior eixo do molde
- Uma excepção é a inclusão de pele e mucosas: estas devem ser incluídas para que cada corte que é feito contenha a derme e epiderme ou o epitélio e o tecido conjuntivo, respectivamente



## Inclusão (10)

- Como os fragmentos depois de fixados com tetróxido de ósmio adquirem a cor preta, não sendo possível distinguir a derme da epiderme, a **técnica de migar** adquire uma importância extrema
- É necessário que cada técnico adquira uma forma de migar que lhe permita reconhecer facilmente a localização das referidas estruturas
- **Migar** - que consiste na realização de cortes longitudinais e transversais sobre uma superfície especial, com o auxílio de um bisturi ou lâmina de barbear, reduzindo o material a pequenos fragmentos

# Inclusão (11)

- Seguidamente é preenchido o bloco de forma convexa, isto é, com excesso de resina, pois a resina ao polimerizar retrai, evitando, assim, a retracção da superfície do bloco
- Por último, os moldes de inclusão são colocados na estufa, a uma temperatura que ronda os 58°C, durante 2 a 3 dias para se dar a polimerização da resina
- 
- Se se tratar de um caso urgente, é possível fazer uma polimerização rápida em cerca de 24 horas, aumentando a temperatura até 100° C, embora este procedimento possa danificar a amostra

## Corte (1)

- Em ME, o corte das amostras é considerado o procedimento mais difícil de ser efectuado, requerendo muita prática por parte do Técnico de AP que o efectua
- A produção de cortes muito finos foi possível devido à construção de instrumentos específicos para o efeito – ultramicrótomo –, à utilização de resinas apropriadas para a inclusão e à utilização de facas de vidro ou de diamante

## Corte (2)

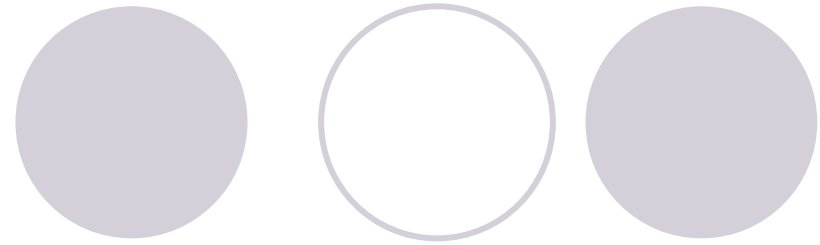


- A observação de cortes histológicos ao ME exige que estes sejam extremamente delgados, para permitir a penetração dos electrões na matéria
- O ultramicrotomo permite a obtenção de cortes com uma espessura que pode variar desde algumas micras a 0,01 micras para os mais finos
- O ultramicrotomo deve permanecer num local onde não se produzam vibrações, onde exista temperatura constante e não se formem correntes de ar. Por estes motivos, aconselha-se que estejam colocados sobre uma mesa anti-vibratória

# Corte – Facas (1)

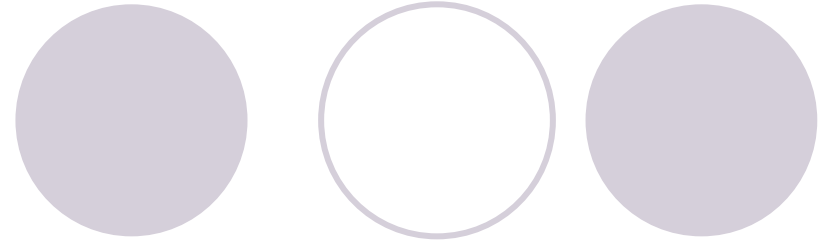
- As facas de vidro são fragmentos de vidro quebrado segundo um método preciso, produzindo um gume muito afiado
- Nos últimos anos as facas de vidro têm vindo a ser substituídas num número crescente de laboratórios por facas de diamante, cujo gume pode durar anos e que cortam melhor que as facas de vidro
- No entanto o elevado custo de uma faca de diamante justifica ainda em muitos casos o uso das facas de vidro tradicionais
- As facas de vidro têm como principais inconvenientes a sua fácil deterioração e o facto de só servirem para um número limitado de cortes.

## Corte – Facas (2)



- O vidro que se utiliza é diferente do comum, pois a sua cristalização é feita em condições especiais de temperatura
- É comercializado sob a forma de barras de 40 a 50 cm de comprimento, por 4 a 5 cm de largura e 0.4 a 0.5 cm de altura
- O fabrico das facas é feito num instrumento próprio designado de *Knifemaker*, que corta a barra de vidro em paralelepípedos, para serem posteriormente seccionados na diagonal de modo a obter prismas de vidro dotados de um gume com ângulo de corte de  $45^\circ$
- Os cortes no vidro são feitos por um diamante

## Corte – Facas (3)



- As facas de diamante são obtidas por polimento, podendo ser re-polidas quando existe perda na qualidade dos cortes
- Permitem fazer cortes de qualidade superior aos obtidos com as facas de vidro e a realização de cortes seriados (“ténias”)
- Têm preço elevado
- Deve ser limpo com medula de sabugueiro, plástico esponjoso, detergente ou ultra-sons

# Técnica de Corte



- Para a execução dos cortes com este tipo de facas é necessário existir uma zona de recolha destes, para tal desenvolveram-se os chamados “barquinhos”
- Estes são um pequeno reservatório, junto do gume da faca, com um líquido adequado que visa receber os cortes
- Para a sua preparação foi usada fita adesiva prateada
- Um cuidado primordial é não tocar com os dedos na parte da fita que vai ficar em contacto com o líquido, pois a gordura dos dedos acaba por contaminar o líquido e, finalmente, os cortes

# Técnica de Corte – 1º Trapézio

- A superfície de corte deve ser preparada talhando os blocos: isto consiste na remoção do excesso de resina em volta do fragmento e de forma a dar ao futuro corte a forma de trapézio
- Esta é a forma geométrica, normalmente, usada, pelo facto de, possui todos os lados de tamanho diferente, o que ajuda na descrição do local pretendido para observação e sobre o qual, mais à frente, se talhará o 2º trapézio, para execução dos ultra finos

# Técnica de Corte – 1º Trapézio

- A face de corte com forma trapezoidal, deve ficar orientada com o lado maior junto do gume da faca e posicionado de modo a ficar-lhe paralela
- Este interesse pela regularidade da face inferior é facilmente compreendido, pois é este que contacta, primeiramente, com a faca, facilitando o corte
- Se a face superior não for regular pode haver dificuldade em se separarem os cortes, que serão arrastados por cima do gume para a parte de trás da faca
- Estas condições são também importantes quando se pretende obter cortes seriados, devendo as duas bases do trapézio (superior e inferior) estarem paralelas ao gume para que a “ténia” fique direita

# Técnica de Corte – 1º Trapézio

- Para tal, o bloco é colocado num suporte sob a lupa do ultramicrotomo, bem fixo por parafusos e talhado com o auxílio de uma lâmina de barbear
- Começa-se por remover o excesso de resina aos lados e à superfície do fragmento e ao mesmo tempo tenta-se dar a forma de trapézio
- O desbaste pode ser realizado de forma grosseira em torno do fragmento (desbaste vertical), mas de forma mais cuidada quando se faz o desbaste horizontal de modo a atingir o fragmento

# Cortes semi-finos (1)



- Para proceder ao corte é colocado o bloco no devido local, assim como é montada a faca, no respectivo suporte, de tal modo que fique bem presa pelos diversos parafusos
- Deve-se orientar o bloco de modo a que este fique paralelo ao gume e o mais próximo possível deste
- Execução dos cortes semi-finos
- Enche-se o barquinho de água com a ajuda de uma seringa e observando-se pelas oculares, coloca-se ou retira-se água de modo a obter-se uma superfície espelhada, ou seja, aspecto prateado que toma por reflexão da luz fluorescente

## Cortes semi-finos (2)

- Após os cortes se encontrarem a flutuar na água do barquinho, estes são apanhados com um palito e colocados sobre uma gota de água previamente posta numa lâmina
- Já com vários cortes, a lâmina é colocada na placa quente para evaporar a água e levar a adesão dos cortes à lâmina
- Simultaneamente ocorre a extensão dos cortes. No caso dos cortes apresentarem muitas rugas, pode-se colocar a lâmina na estufa para uma adesão mais lenta o que permite uma extensão mais eficaz
- Saliente-se que a presença de rugas nestes cortes não são significativas, desde que permitam a localização da área a estudar



# Coloração de semi-finos

- As colorações de semi-finos devem ser rápidas, simples, reproduzíveis e aplicáveis a todos os meios de inclusão, pois em ME o meio de inclusão não é removido ao contrário do que acontece com os blocos de parafina
- Assim, tendo a lâmina sobre a placa quente, colocam-se umas gotas da solução de azul de toluidina sobre os cortes
- Aguarda-se cerca de 30'' passando-se de seguida a lâmina por água corrente
- São colocados, novamente, na placa quente afim de secar. A lâmina é, então, observada ao MOC pelo médico que selecciona a área do trapézio que mais lhe interessa estudar pormenorizadamente

# Técnica de Corte – 2º Trapézio

- Coloca-se, novamente, o bloco no porta-blocos e observa-se pelo sistema de oculares o trapézio antes efectuado
- Através da comparação da lâmina obtida anteriormente, onde se encontra marcada a zona escolhida, e do 1º trapézio, reconhece-se facilmente a zona pretendida e demarca-se os limites do 2º trapézio com a lâmina de barbear
- Desbasta-se, então, o bloco com a lâmina de barbear paralela a este até à demarcação do trapézio, com cerca de 1mm de profundidade
- Esta profundidade confere uma segurança ao técnico no caso de este errar na realização do 2º trapézio

# Cortes Ultra-Finos (1)



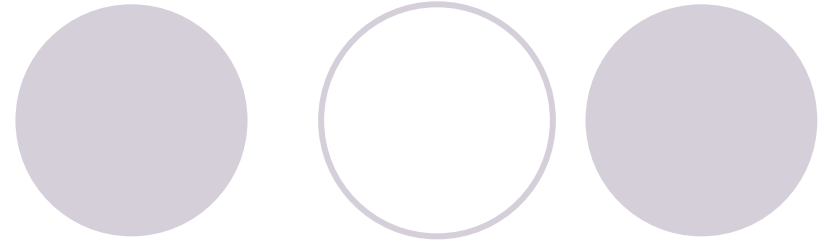
- Colocado tanto o bloco como a faca de diamante, no local correcto, e após cuidado desbaste, fazem-se os cortes ultra-finos (20 a 90nm)
- Os cortes à medida que são feitos e observados pelas oculares, vão-se separando com a ajuda de uma pestana (colocada na ponta de uma pequena vareta) para uma zona da água sem sujidade

## Cortes Ultra-Finos (2)



- À medida que se vão fazendo os cortes, a sua espessura pode ser regulada por um botão giratória
- Na ME é possível apreciar a espessura dos cortes através de um sistema bastante preciso que se baseia no chamado fenómeno de interferência das ondas luminosas reflectidas pelo corte e a superfície do líquido flutuante
- Isto origina a observação de uma gama de cores variadas, que definem a sua espessura

# Tabela de Peachey



Cor de Interferência	Espessura do corte (nm)
Cinzentos	Abaixo de 60
Prateado	60-90
Dourado/Creme	90-150
Púrpura	150-190
Azul	190-240
Verde	240-280
Amarelo	280-320

# Cortes Ultra-Finos (3)



- Os cortes seleccionados são, geralmente, os de creme ou prateados, que são, posteriormente, recolhidos por grelhas perfuradas – discos metálicos com 3,05mm – que oferecem suporte às secções
- Estas grelhas podem apresentar-se com diferentes “malhas”, ou seja, número de orifícios por unidade de superfície
- A região dos cortes de malha que contacta as barras metálicas da rede não se pode observar, pelo que uma grelha de malha baixa (grandes orifícios) permite a observação de maior área dos cortes, mas exige ser previamente recoberta com um fino filme de suporte

## Cortes Ultra-Finos (4)



- Para recolha dos cortes e com o auxílio de uma pinça, agarra-se a grelha, mergulha-se esta pela solução de formvar 0.25% e colocando-se a grelha sobre papel de filtro afim de absorver o excesso de líquido
- Depois de seca, pega-se novamente na grelha com a parte brilhante para cima e apanham-se os cortes (com a parte baça) através de um processo de aderência, em que colocando a grelha sobre o corte este lhe adere



## Cortes Ultra-Finos (5)

- A grelha é outra vez seca sobre o papel de filtro, com a face fosca voltada para cima, e é colocada numa cápsula de gelatina, devidamente identificada
- As grelhas nunca devem ser tocadas com as mãos ou estar em contacto com a pele, para não existir contaminação com gordura
- O frasco que contém este líquido deve estar o mínimo de tempo possível aberto, para evitar evaporação do dicloroetano, aumentando a concentração do formvar

# Contraste (1)

A decorative graphic at the top of the slide consists of six circles. The first circle on the left is solid purple. The second circle is white with a purple outline. The third circle is solid purple. The fourth circle is white with a purple outline. The fifth circle is solid purple. The sixth circle is white with a purple outline.

- Muitas vezes, e erradamente, esta fase é designada por "coloração", termo transposto das técnicas de MO, no entanto, como não há cor na imagem do ME, deve evitar-se essa terminologia
- Esta consiste na deposição de metais pesados nos cortes, conferindo visibilidade ultra-estrutural aos cortes ultra-finos
- O contraste das imagens é devido a colisões elásticas dos electrões com os átomos da amostra

## Contraste (2)

- Os electrões são desviados da sua trajectória e removidos do sistema óptico por diafragmas, gerando zonas do feixe deficitárias em electrões
- As áreas do fragmento de maior densidade observam-se com uma cor mais escura (cinza escuro), enquanto as zonas de menor densidade apresentam uma tom mais claro (cinza claro)
- A deposição de átomos pesados nos tecidos inicia-se aquando da fixação com o Tetróxido de ósmio e o Acetato de uranilo
- Mas não sendo este contraste suficiente, tratam-se os cortes, nesta fase, com Acetato de uranilo e Citrato de chumbo

A decorative graphic consisting of six circles arranged in a horizontal line. The first circle is solid purple, the second is a white outline, the third is solid purple, the fourth is a white outline, and the fifth and sixth are solid purple.

## Acetato de uranilo

- Correntemente usado como contrastante para cortes ultra-finos
- O efeito do uranilo deve-se à sua elevada afinidade para grupos carboxilo e fosfato, sobretudo a baixo pH, o que explica o seu efeito sobre ácidos nucleicos e fosfolípidos das biomembranas

# Citrato de chumbo



- Este é o composto de chumbo mais utilizado como contrastante
- Produz bons resultados, com tempos de actuação relativamente curtos
- Os contrastantes com chumbo são mais eficazes a pH alcalino, possivelmente devido à ionização que ocorre em moléculas de vários constituintes celulares, que ficam em condições de se ligarem ao  $Pb^{2+}$
- Os contrastantes com pH alteram-se por contacto com o ar, devido à formação de carbonato de chumbo, por acção de  $CO_2$  atmosférico
- Por este facto é corrente a prática desta operação de contrastação com estes produtos em placas de petri tapadas



# Outras Técnicas de ME

- Podem-se aplicar as técnicas de ME em amostras fixadas em formaldeído e processadas em parafina
- É marcada na lâmina a área desejada e sobreposta a lâmina no bloco de parafina
- Corta-se a referida área com um bisturi
- Remove-se a parafina no xilol
- Hidrata-se e lava-se em tampão cacodilato de sódio a 0,1M
- Realiza-se o processamento de ME a partir do Tetróxido de ósmio

A decorative header consisting of five circles in a horizontal row. From left to right: a solid light purple circle, an empty white circle with a light purple outline, the word "RESUMO" in bold blue uppercase letters, another empty white circle with a light purple outline, and a solid light purple circle.

# RESUMO

- Microscopia Electrónica
- Ultraestrutura de organitos e estruturas com interesse em Patologia
- Técnica de Microscopia Electrónica
- Outras técnicas em Microscopia Electrónica