

Contraste em Microscopia Eletrónica de Transmissão:

as alternativas emergentes ao acetato de uranilo

Revisão Sistemática

Sara Correia¹, Eva Pipio¹, Raquel Santos¹, Andreia Pinto², Amadeu Borges Ferro¹

1. Escola Superior de Saúde de Lisboa, Instituto Politécnico de Lisboa, Portugal.

2. Leica Microsystems, Heidelberg, Baden-Württemberg, Alemanha

Contraste em Microscopia Eletrónica de Transmissão (MET)

- Estruturas biológicas são compostas por elementos leves (C, N, O e H); ¹⁻²
- Baixa capacidade de dispersão de eletrões; ¹⁻²
- Uso de metais pesados melhora o contraste ao aumentar a densidade eletrónica da amostra. ¹⁻²
- Principais métodos de contraste: ²⁻⁴
 - Coloração *en bloc*
 - Coloração negativa
 - Coloração pós-secção

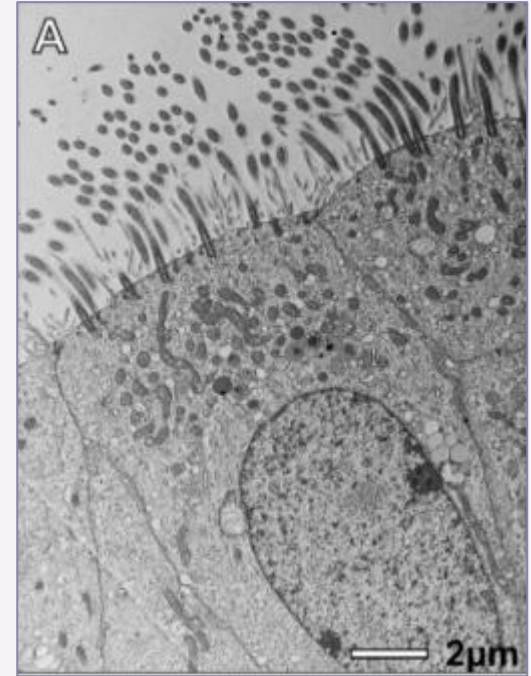


Imagem 1: Epitélio respiratório preparado com AU *en bloc*.

Fonte: Pinto, A.L. Et al. (2021) UA-Zero as a Uranyl Acetate Replacement When Diagnosing Primary Ciliary Dyskinesia by Transmission Electron Microscopy.

Acetato de Urânio (AU) enquanto contraste na MET

- Composto radioativo de urânio, com potencial nefrotóxico, mutagénico, carcinogénico; ⁵
- *Gold Standard*; ⁶
- Elevada densidade eletrónica; ⁶⁻⁷
- Afinidade seletiva por componentes fosfatados e carboxilados; ⁶⁻⁷
- Exige protocolos rigorosos de segurança e descarte. ⁵



Imagem 2: Pictogramas GHS do Acetato de Urânio; Tóxico, Mutagénico/Carcinogénico e Prejudicial para o meio ambiente.

Fonte: Safety Data Sheet - Uranyl Acetate, according to Regulation (EC) No 1907/2006 (REACH) as amended (31st July 2023).

Questão de Investigação

P *Population*

I *Intervention*

C *Comparison*

O *Outcome*

Nos protocolos de MET (P), a substituição do AU por agentes de contraste alternativos (I) permite manter a eficácia na obtenção de imagens morfolologicamente detalhadas (C) e assegurar padrões adequados de segurança (O)?⁸

Objetivo do estudo

Fornecer uma base científica robusta para a seleção de agentes contrastantes mais seguros e igualmente eficazes, contribuindo para a modernização e sustentabilidade das práticas em MET.

Metodologia

- Pesquisa bibliográfica realizada em Outubro de 2025;
- Cinco *search strings* em cada base de dados;
- *Pubmed, Scopus e Science Direct*;
- Excluídos artigos anteriores a 2000, focados noutra tipo de ME e sem comparação direta ou indireta ao AU.

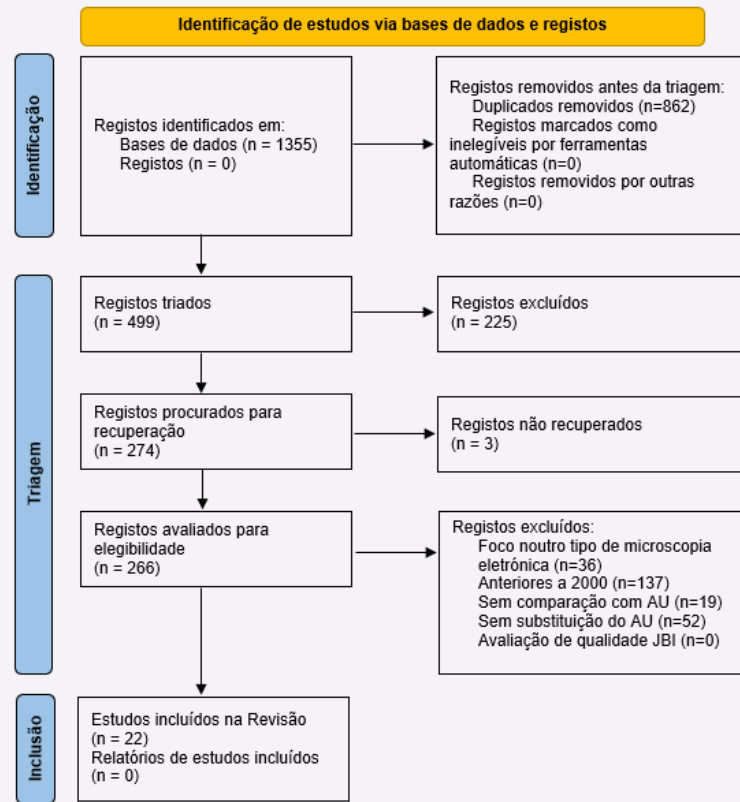


Figura 1: Fluxograma PRISMA 2020 para novas revisões sistemáticas que incluíram pesquisas em Bases de Dados e Registos apenas.

Resultados

Grupo 1

Substitutos Comerciais ¹⁰⁻¹³

Reagentes "prontos a usar", desenvolvidos para mimetizar o AU.

Grupo 3

Extratos Naturais ²⁰⁻²⁵

Compostos orgânicos utilizados em conjunto com metais (como o citrato de chumbo).

Grupo 2

Lantanídeos ¹⁴⁻¹⁹

Elementos metálicos de transição com densidade eletrónica semelhante ao Urânio.

Grupo 4

Metais Pesados e outros compostos ²⁶⁻³¹

Agentes de alta densidade eletrónica para alvos moleculares seletivos.

Resultados

	Nº de artigos	Reagentes	Amostras	Protocolos	Resultados
Grupo 1 10-13	4	UA-Zero, Uranyl-Acetate Replacement, UranylLess, STAIN 77, Nano-W e NanoVan.	Amostras biológicas de diversas origens e Nanoplásticos.	<i>En bloc</i> (1) C. Negativa (1) Pós-secção (4)	Desempenho equiparável e, em alguns casos, superior ao AU.
Grupo 2 14-19	6	Sais puros e misturas não comerciais de Samário, Gadolínio, Neodímio e Ytterbium.	Amostras biológicas de origens animal e vegetal.	<i>En bloc</i> (2) C. Negativa (2) Pós-secção (3)	Desempenho comparável ao AU; Superior na coloração <i>En bloc</i> .

Resultados

	N° de artigos	Reagentes	Amostras	Protocolos	Resultados
Grupo 3 20-25	6	Extrato de Chá Oolong, Ácido Tânico.	Amostras biológicas de origens animal, vegetal e protozoária.	<i>En bloc</i> (2) Pós-secção (5)	Desempenho superior ao AU em fibras de colagénio, mas inferior para as restantes estruturas.
Grupo 4 26-31	6	Compostos derivados de Tungsténio, Platina, Háfnio e Ruténio.	Amostras biológicas de origem animal, fúngica e viral.	C. Negativa (1) Pós-secção (5)	Desempenho, de modo geral, inferior ao AU; Destaque positivo para polissacarídeos.

Grupo 1: Substitutos Comerciais

- Oferecem soluções *ready-to-use* que mimetizam a afinidade do AU por membranas, facilitando a transição imediata em laboratórios de rotina.
- As fórmulas comerciais oferecem uma manipulação segura eliminando riscos de toxicidade aguda e radioatividade, que reduz drasticamente os custos e a complexidade do descarte.

Grupo 2: Lantanídeos

- Apresentam um desempenho ultraestrutural comparável ao AU, garantindo nitidez em colorações *en bloc*.
- A eficácia é altamente dependente de um controlo rigoroso do pH para evitar a formação de precipitados, uma variável que exige maior perícia técnica do que o uso de AU.

Discussão

Grupo 3: Extratos Naturais

- Abordagem "*Green Microscopy*", onde compostos orgânicos oferecem uma alternativa de baixíssimo custo e impacto ambiental nulo, sem os riscos de toxicidade aquática do urânio.
- Embora eficazes, requerem frequentemente dupla coloração com Citrato de Chumbo para atingir o contraste necessário em estruturas complexas.
- A natureza biológica dos extratos pode introduzir variabilidade e a literatura carece de protocolos padronizados de concentração para estes agentes.

Grupo 4: Metais Pesados e outros compostos

- Superam o AU na definição de polissacarídeos e glicogénio, tornando-os ferramentas de eleição para patologias específicas onde a afinidade química do AU é insuficiente para o diagnóstico.
- É o grupo que mais carece de dados quantitativos na literatura.

Conclusão

- A substituição do AU é possível, sendo que as alternativas contrastantes que mais se destacaram foram os lantanídeos e os derivados comerciais.
- No entanto, é necessária a padronização das técnicas e o uso de indicadores objetivos, de modo a combater as limitações e assegurar a reprodutibilidade e confiabilidade dos resultados.

Referências Bibliográficas

1. Tizro P, Choi C, Khanlou N. Sample preparation for transmission electron microscopy. In: Yong W, editor. *Biobanking*. Methods in Molecular Biology, vol. 1897. New York, NY: Humana Press; 2019. p. 417–424. doi:10.1007/978-1-4939-8935-5_33.
2. Dumančić E, Vojta L, Fulgosi H. Beginners guide to sample preparation techniques for transmission electron microscopy. *Periodicum Biologorum*. 2023;125(1–2):123–131. doi:10.18054/pb.v125i1-2.25293.
3. Ellis EA. Poststaining grids for transmission electron microscopy: conventional and alternative protocols. *Methods in Molecular Biology*. 2007;369:97–106. doi:10.1007/978-1-59745-294-6_6.
4. Elsevier. Negative staining [Internet]. ScienceDirect Topics; [cited 2026 Feb 25]. Available from: <https://www.sciencedirect.com/topics/biochemistry-genetics-and-molecular-biology/negative-staining>
5. Keith S, Faroon O, Roney N, Scinicariello F, Wilbur S, Ingerman L, et al. *Toxicological profile for uranium* [Internet]. Atlanta (GA): Agency for Toxic Substances and Disease Registry (US); 2013 [cited 2026 Feb 25]. Available from: <https://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp150.pdf>
6. Watson ML. Staining of tissue sections for electron microscopy with heavy metals. *J Biophys Biochem Cytol*. 1958;4(4):475–478. doi:10.1083/jcb.4.4.475.
7. Reynolds ES. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *J Cell Biol*. 1963;17(1):208–212. doi:10.1083/jcb.17.1.208.
8. Methley AM, Campbell S, Chew-Graham C, McNally R, Cheraghi-Sohi S. PICO, PICOS and SPIDER: a comparison study of specificity and sensitivity in three search tools for qualitative systematic reviews. *BMC Health Serv Res*. 2014;14:579. doi:10.1186/s12913-014-0579-0.
9. Page MJ, McKenzie JE, Bossuyt PM, Boutron I, Hoffmann TC, Mulrow CD, et al. A declaração PRISMA 2020: diretriz atualizada para relatar revisões sistemáticas [The PRISMA 2020 statement: an updated guideline for reporting systematic reviews]. *Rev Panam Salud Publica*. 2022;46:e112. doi:10.26633/RPSP.2022.112.
10. Seifert P. Modified Hiraoka TEM grid staining apparatus and technique using 3D printed materials and gadolinium triacetate tetrahydrate, a non-radioactive uranyl acetate substitute. *J Histotechnol*. 2017;40(4):130–135. doi:10.1080/01478885.2017.1361117.
11. Pinto AL, Rai RK, Shoemark A, Hogg C, Burgoyne T. UA-Zero as a Uranyl Acetate Replacement When Diagnosing Primary Ciliary Dyskinesia by Transmission Electron Microscopy. *Diagnostics (Basel)*. 2021;11(6):1063. doi:10.3390/diagnostics11061063.

Referências Bibliográficas

12. Lacavalla MA, Cisterna B. Uranyl-Free Staining as a Suitable Contrasting Technique for Nuclear Structures at Transmission Electron Microscopy. *Methods Mol Biol.* 2023;2566:225–231. doi:10.1007/978-1-0716-2675-7_18.
13. Kissling VM, Eitner S, Bottone D, Cereghetti G, Wick P. Systematic Comparison of Commercial Uranyl-Alternative Stains for Negative- and Positive-Staining Transmission Electron Microscopy of Organic Specimens. *Adv Healthc Mater.* 2025;14(16):e2404870. doi:10.1002/adhm.202404870.
14. Nakakoshi M, Nishioka H, Katayama E. New versatile staining reagents for biological transmission electron microscopy that substitute for uranylacetate. *J Electron Microscop (Tokyo).* 2011;60(6):401–407. doi:10.1093/jmicro/dfv084.
15. Hosogi N, Nishioka H, Nakakoshi M. Evaluation of lanthanide salts as alternative stains to uranyl acetate. *Microscopy (Oxf).* 2015;64(6):429–435. doi:10.1093/jmicro/dfv054.
16. Moscardini A, Di Pietro S, Signore G, Parlanti P, Santi M, Gemmi M, et al. Uranium-free X solution: a new generation contrast agent for biological samples ultrastructure. *Sci Rep.* 2020;10(1):11540. doi:10.1038/s41598-020-68405-4.
17. Kuipers J, Giepmans BNG. Neodymium as an alternative contrast for uranium in electron microscopy. *Histochem Cell Biol.* 2020;153(4):271–277. doi:10.1007/s00418-020-01846-0.
18. Ishii N, Odahara T. Investigation of the Efficacy of Lanthanoid Heavy Metal Acetates as Electron Staining Reagents for Biomembrane Vesicles. *Microsc Microanal.* 2023;29(6):2080–2089. doi:10.1093/micmic/ozad107.
19. Ishii N. Evaluation of Maltose-based Mixtures With Lanthanoid Acetates as Electron Staining Reagents for Transmission Electron Microscopy of Extracellular Vesicles and Liposomes. *Microsc Microanal.* 2025;31(2):ozaf026. doi:10.1093/mam/ozaf026.
20. Sato S, Adachi A, Sasaki Y, Ghazizadeh M. Oolong tea extract as a substitute for uranyl acetate in staining of ultrathin sections. *J Microsc.* 2008;229(Pt 1):17–20. doi:10.1111/j.1365-2818.2007.01881.x
21. Miller AA, Simakova AV. Application of method of OTE staining of ultrathin sections based on example of microsporidia (Protozoa: Microsporidia). *Cell Tissue Biol.* 2010;4:109–115. doi:10.1134/S1990519X10010128.

Referências Bibliográficas

22. Ellis EA. Staining sectioned biological specimens for transmission electron microscopy: conventional and en bloc stains. *Methods Mol Biol.*2014;1117:57–72. doi:10.1007/978-1-62703-776-1_4.
23. Carpentier A, Abreu S, Trichet M, Satiat-Jeunemaitre B. Microwaves and tea: new tools to process plant tissue for transmission electron microscopy. *J Microsc.* 2012;247(1):94–105. doi:10.1111/j.1365-2818.2012.03626.x.
24. He X, Liu B. Oolong tea extract as a substitute for uranyl acetate in staining of ultrathin sections based on examples of animal tissues for transmission electron microscopy. *J Microsc.* 2017;267(1):27–33. doi:10.1111/jmi.12544.
25. He X, Guo F, Liu B. Oolong tea and LR-White resin: a new method of plant sample preparation for transmission electron microscopy. *J Microsc.*2018;270(2):244–251. doi:10.1111/jmi.12678.
26. Inaga S, Katsumoto T, Tanaka K, Kameie T, Nakane H, Naguro T. Platinum blue as an alternative to uranyl acetate for staining in transmission electron microscopy. *Arch Histol Cytol.* 2007;70(1):43–49. doi:10.1679/aohc.70.43.
27. Krautgartner WD, Vitkov L. Visualization of neutrophil extracellular traps in TEM. *Micron.* 2008;39(4):367–372. doi:10.1016/j.micron.2007.03.007.
28. Harland DP, Vernon JA, Walls RJ, Woods JL. Transmission electron microscopy staining methods for the cortex of human hair: a modified osmium method and comparison with other stains. *J Microsc.* 2011;243(2):184–196. doi:10.1111/j.1365-2818.2011.03493.x.
29. Pradeep Ram AS, Nagata T, Tomaru Y, Nagasaki K. Tungstate compounds as an alternative to uranyl acetate for enumerating viral-infected prokaryote cells in aquatic systems. *Aquat Microb Ecol.* 2007;47(2):209–212. doi:10.3354/ame047209.
30. Ikeda K, Inoue K, Kanematsu S, Horiuchi Y, Park P. Enhanced effects of nonisotopic hafnium chloride in methanol as a substitute for uranyl acetate in TEM contrast of ultrastructure of fungal and plant cells. *Microsc Res Tech.* 2011;74(9):825–830. doi:10.1002/jemt.20964.
31. Sahiro K, Kawato Y, Koike K, et al. Preyssler-type phosphotungstate is a new family of negative-staining reagents for the TEM observation of viruses. *Sci Rep.* 2022;12:7554. doi:10.1038/s41598-022-11405-3.

Contraste em Microscopia Eletrónica de Transmissão:

as alternativas emergentes ao acetato de uranilo

Revisão Sistemática

Sara Correia¹, Eva Pipio¹, Raquel Santos¹, Andreia Pinto², Amadeu Borges Ferro¹

1. Escola Superior de Saúde de Lisboa, Instituto Politécnico de Lisboa, Portugal.

2. Leica Microsystems, Heidelberg, Baden-Württemberg, Alemanha