

Técnicas citológicas e histológicas
da microscopia electrónica

por
David Ferreira

SEPARATA DA REVISTA
A MEDICINA CONTEMPORÂNEA

Ano LXXIV — N.º 3 — 1956, Março

Técnicas citológicas e histológicas da microscopia electrónica

por

David Ferreira

Assistente da Faculdade de Medicina de Lisboa
Bolseiro do Instituto de Alta Cultura

Um dos exemplos mais felizes na história da ciência, da importância do desenvolvimento das técnicas no progresso científico, é sem dúvida a história da microscopia.

Num âmbito mais restrito, o problema que nos ocupa oferece também motivos de meditação sobre o papel importante, mas tantas vezes esquecido, das técnicas na evolução dos nossos conhecimentos.

A história das técnicas é em muitos aspectos a história da própria ciência, e é no brilho das descobertas que originam que muitas vezes a sua contribuição se apaga.

Não queremos também deixar de chamar a atenção para exemplos claros com que deparamos, que representam argumentos reais contra os «exageros» dos defensores «exagerados» da investigação científica dirigida. Se bem que em certos aspectos o planeamento de uma investigação científica possa representar um modo inteligente e eficaz na solução de alguns problemas, não pode, sem grave perigo para o próprio progresso, restringir-se o trabalho dos investigadores unicamente aos limites daquilo que em determinado período é considerado ter interesse prático.

Em microscopia electrónica não existe no estado actual dos nossos conhecimentos, e no campo das suas aplicações à biologia,

nenhum exemplo de uma utilização de tipo prático em que se torne indispensável. Faz ainda parte daqueles métodos que, embora cheios de promessas, têm o seu campo de acção inteiramente ligado à busca do que é desconhecido ou duvidoso. Vive ainda uma era, pela qual também a microscopia óptica passou, em que unicamente nos é possível desenhar com traços muito vagos um futuro promissivo. É também — e este é outro argumento que os «práticos» podem invocar — um método caro. Sem «aplicações» e «caro», dois graves inconvenientes, dois obstáculos sem os quais certamente já teria resolvido muitos problemas com repercussões práticas. Mas como em investigação não são estes os critérios que prevalecem, a microscopia electrónica, com as extraordinárias possibilidades com que hoje se apresenta, tem evoluído graças à «loucura» dos que não procuraram obter um juro imediato.

Depois da bela exposição panorâmica que o Sr. Professor Xavier Morato aqui nos deu, deste «Eldorado» de resultados no campo da citologia e histologia, cabe-nos a vez de mostrar o caminho tantas vezes espinhoso que teve de ser percorrido para se alcançarem. Que me perdoem não ter sabido encontrar uma forma mais amena de o fazer.

As técnicas que permitem a aplicação da microscopia electrónica aos estudos citológicos e histológicos foram criadas e têm evoluído em função, por um lado, das características do microscópio e, por outro, do material a observar, como de resto aconteceu em relação às técnicas para a microscopia óptica.

A necessidade de colocar os espécimes a estudar em câmara onde o vácuo deve ser o mais perfeito possível — pois esta é condição indispensável para que os electrões possam progredir — criou imediatamente uma limitação: este tipo de microscopia unicamente poderia utilizar-se em material morto e fixado.

Por outro lado, a natureza das radiações electrónicas, dotadas de fraco poder penetrador, limitavam-nos o seu emprego a espécimes cuja espessura não podia ultrapassar um certo limite, pois, para uma certa diferença de potencial, todo o objecto biológico de espessura igual ou superior a $0,2 \mu$ é opaco às radiações electrónicas.

São estes os aspectos mais importantes, que traçaram os primeiros passos dos estudos realizados, depois outros problemas tiveram que ser considerados, para os quais mais adiante chamaremos a vossa atenção.

Condicionado portanto a servir, para a observação de material que previamente tinha que ser fixado, e ter uma espessura muito inferior à utilizada para o microscópio óptico, a aplicação do microscópio electrónico ao estudo das células e tecidos originou a criação de técnicas de fixação e de ultramicrotomia que as suas características impunham. E nos progressos que estas técnicas realizaram que se encontra a explicação dos resultados sensacionais obtidos pela microscopia electrónica nos últimos 5 anos.

O problema da fixação

A utilização do microscópio óptico originou em citologia e histologia dois tipos gerais de métodos de exame. Um, em que a observação não é precedida de nenhum artifício de preparação, que é o chamado exame a fresco ou «in vivo», e outro que pressupõe a morte inicial dos elementos a observar, exame «post mortem», em que previamente são sujeitos a vários tratamentos.

O exame «in vivo», de emprego limitado à observação de material transparente, não permitindo senão de forma limitada o emprego de colorações, não podendo constituir elemento de estudo permanente, pois as células ou tecidos, uma vez separados do organismo, começam rapidamente a alterar-se, foi-se a pouco e pouco tornando um método unicamente a utilizar em casos particulares. Pelo contrário, o exame «post mortem» tornou-se com a evolução da técnica um método de emprego quase geral. A sua primeira operação — a fixação — tem por finalidade suspender a vida dos elementos biológicos em estudo, geralmente com o emprego de substâncias químicas, que, sem produzir grandes alterações das estruturas, suspendam os processos autolíticos consecutivos à morte. Este capítulo desenvolveu-se extraordinariamente e com essa finalidade foram estudadas grande número de substâncias, das quais algumas se tornaram de emprego mais frequentes mercê das suas qualidades.

Em microscopia electrónica desde início que se concluiu ser necessário estudar e aplicar uma técnica de fixação que nalguns aspectos tinha que diferir da técnica em uso para a microscopia óptica.

Quais foram as razões que obrigaram a adoptar para o material em estudo no microscópio electrónico uma técnica de fixação especial?

Enquanto que, nas técnicas clássicas, depois da fixação se põem em evidência as estruturas pelo método das colorações, e seguidamente com a montagem se fazem desaparecer os elementos não corados, geralmente os mais alterados pelos fixadores, em microscopia electrónica (como o Prof. Morato fez referência na sua lição) não existe uma técnica de mascaramento que torne invisível os artefactos criados pela fixação. Este facto é agravado pelo emprego em microscopia electrónica de ampliações que podem pôr em evidência alterações mínimas das estruturas. Por estas razões se tornou necessário rever a técnica de fixação, de forma a aperfeiçoá-la e adaptá-la à microscopia electrónica.

Vários fixadores foram estudados, tendo-se concluído que o tetróxido de ósmio, imprópriamente conhecido por ácido ósmico, já considerado pela técnica clássica como um dos melhores fixadores, oferecia condições para ser utilizado.

É assim que, em 1945, *Porter, Claude e Fullam*, num trabalho sobre os melhores fixadores da técnica histológica, afirmam: «As microfotografias electrónicas de células tratadas com outros fixadores, que não o ácido ósmico, fornecem uma excelente ilustração das alterações produzidas pela fixação». A técnica da fixação sofreu novo benefício quando *Palade* demonstrou que a qualidade desta estava não só dependente do fixador usado, mas do pH da solução. Começou a utilizar-se como fixador de eleição em microscopia electrónica o soluto a 1 % de ácido ósmico tamponado com acetato de veronal a pH 7,2, que é hoje vulgarmente conhecido por fixador de *Palade*, e estabeleceu-se que, sempre que o pH do tecido em estudo possa ser medido «in vivo», o pH do fixador deve variar com este.

Não queremos deixar de dizer que a importância do pH dos solutos para fixação já tinha sido anteriormente estudada sob o *contrôle* do microscópio óptico. *Yamaha*, em 1925, e *Zirkle*, em 1928, foram os primeiros a observar que a imagem celular varia com o pH dos solutos fixadores e *Gross* e *Lohans* os primeiros a utilizá-los tamponados a pH 7,2.

Depois dos trabalhos de *Palade* muitos outros estudos apareceram, em que foi investigado não só o mecanismo de acção do tetróxido de ósmio, como a forma ideal de o empregar (tempo, temperatura, etc.). Seria longa a citação de toda essa série de trabalhos, pelo que nos limitamos a fazer referência às fórmulas que são hoje de uso corrente e a algumas das conclusões mais importantes das investigações que levaram à sua introdução.

O primeiro morfologista a chamar a atenção para a importância da concentração osmótica dos solutos fixadores foi *Berthold* (1882), que comparou a fixação de algas marinhas em solutos de fixadores em água destilada e água do mar. Depois deste Autor, que conclui ter interesse o emprego dos fixadores em solução isotónica, muitos outros trabalhos foram publicados em que o critério foi defendido ou em que se reconheceu não ter qualquer interesse.

Ao contrário de *Palade*, que, além da fórmula de que falamos e é hipotónica, utilizou também solutos tornados isotónicos pelo emprego de líquido de *Tyrode*, *Sjöstrand* defende o emprego em microscopia electrónica de solutos fixadores isotónicos. Em muitos laboratórios é hoje utilizado com o nome de fixador de *Sjöstrand* o soluto a 1 % de ácido ósmico tamponado com acetato de veronal, tornado isotónico pela junção de cloreto de sódio.

Deve-se a *Rhodin* (1945), investigador do laboratório de *Sjöstrand*, o ter esclarecido a importância da temperatura na fixação pelo ácido ósmico. Sabendo-se que algumas das deficiências deste fixador, já apontadas como razão do limite do seu emprego em microscopia óptica, são consequência do seu fraco poder penetrador, e tendo-se verificado que a sua velocidade de penetração aumenta com a temperatura, parecia que o seu emprego a uma temperatura elevada se traduziria por um rendimento óptimo. Acontece, porém, que o aumento de temperatura (acima de 18° C) aumenta igualmente as actividades enzimáticas, e portanto as alterações «post mortem» devidas a este factor. *Rhodin* demonstrou preferível trabalhar com temperaturas de fixação de 0° C, pois as alterações devidas às actividades enzimáticas são mais importantes que aquelas que possam surgir como consequência de uma baixa velocidade de penetração do ácido ósmico a esta temperatura.

Uma outra fórmula cujo emprego tem mostrado certos convenientes é a do fixador de *Dalton*. Este autor, baseando-se no facto de que o bicromato de potássio neutralizado pela potassa cáustica constitui um soluto tampão estável para pH situado entre 5,6-7,6, tem usado com resultados satisfatórios a mistura de um soluto bicromato de potássio (pH 7,2) a 1 %, ácido ósmico a 1 % e soluto de cloreto de sódio a 0,85 %.

As principais vantagens apontadas são a maior estabilidade, o não haver um tempo crítico de fixação (2-24 h), e a redução das alterações produzidas pela polimerização quando se incluem os

materiais com plásticos metacrílicos. As desvantagens são o menor contraste das preparações e a maior dificuldade de obtenção de cortes ultrafinos.

Nas fórmulas a que nos referimos, e que são as mais correntemente empregadas, o ácido ósmico desempenha, como vimos, o papel fundamental, e isso deve-se não só às suas qualidades como fixador, como a outra vantagem, que é mais uma indicação para o seu uso em microscopia electrónica: devido ao efeito dispersante que, pela sua elevada massa atómica, os átomos de ósmio exercem sobre os electrões, o ósmio depositado nos tecidos durante a fixação tem grande importância na formação da imagem electrónica. Ele resolve assim em parte o contraste das imagens, que se tornou um problema desde que é possível fazer cortes ultrafinos.

O seu comportamento neste sentido é semelhante ao dos corantes empregados em histologia clássica e faz parte de um grupo de substâncias que se designam actualmente por corantes electrónicos.

A forma como o fixador é utilizado tem também importância e algumas variantes. Em certos laboratórios, inicialmente foi feita e aconselhada a fixação por perfusão do órgão a estudar com o soluto fixador. Tendo por principal vantagem a redução ao mínimo das alterações produzidas pela autólise, é um método muitas vezes de difícil aplicação e, dado o preço elevado do ácido ósmico, muito dispendioso. Por essas razões, entre outras, se tem divulgado o emprego da fixação por imersão.

Todos os autores são unânimes em que a colheita do material deve ser feita nos primeiros minutos que se seguem à morte do animal, para que não tenha lugar qualquer deformação das estruturas que se traduza por alterações morfológicas.

Os fragmentos devem ser pequenos, de cerca de 1 mm de lado, dada a penetração lenta do ácido ósmico.

Outro processo de fixação, de que também se têm feito tentativas de aplicação, é o método de *Altmann-Gersh* ou do *freezing and drying*, processo muito usado em histoquímica e que consiste essencialmente em congelar um tecido a temperatura muito baixa e seguidamente submetê-lo à dessecação no vácuo. Os resultados, porém, não têm sido satisfatórios. Este processo, que permite a fixação e a desidratação sem intervenção de substâncias químicas, teoricamente parecia ser susceptível de dar excelentes resultados em microscopia electrónica, pois afastava parte dos artefactos surgidos em virtude do emprego de fixadores químicos. Acontece,

porém, que a água das células e tecidos, ao congelar, dá origem à formação de cristais microscópicos que alteram as estruturas ou as deslocam da sua posição normal.

O problema da espessura do espécime

Vejamos agora como desde o início até à actualidade foi resolvido o problema da espessura dos espécimes na aplicação da microscopia electrónica aos estudos biológicos.

Já em microscopia óptica este problema tinha sido anteriormente considerado, pois também a observação ao microscópio óptico do material biológico impõe como primeira condição a sua transparência às radiações luminosas. Como a maior parte desse material é opaca, tornou-se necessária a criação de várias técnicas que o reduzissem a uma espessura que permitisse o seu estudo. Lentamente o objectivo foi atingido, surgindo com essa finalidade vários métodos. De todos, o que deu a solução mais brilhante ao problema foi a criação da técnica das inclusões e o emprego dos micrótomos. Em linhas gerais, a técnica da inclusão consiste em introduzir no seio do material a estudar uma substância inerte em estado líquido, substância essa que por solidificação ulterior dá aos órgãos e tecidos onde se introduziu a consistência suficiente para, por intermédio dos micrótomos, serem reduzidos a delgadas «fatias» transparentes aos raios luminosos.

Os materiais de inclusão cujo emprego mais se generalizou foram a parafina e a celoidina, e, assim, com a inclusão nessas substâncias e o emprego dos micrótomos se obtiveram cortes de 4-5 μ de espessura.

A microtomia ou técnica dos cortes clássica não pôde ser utilizada em microscopia electrónica, pois os cortes obtidos nos mais perfeitos micrótomos tinham ainda uma espessura muito superior à necessária.

Antes que o problema encontrasse solução por este caminho, foram criadas algumas técnicas que o permitiram contornar e que têm ainda hoje a sua aplicação. Porém, a criação da ultramicrotomia reveste uma importância tão grande no desenvolvimento da citologia e histologia electrónicas que se pode fazer a sua divisão em duas etapas:

- 1) Período anterior aos cortes ultrafinos;
- 2) Período dos cortes ultrafinos.

No primeiro período, algumas das técnicas desenvolvidas tinham por finalidade ou a redução da espessura do material a observar ou o emprego de artifícios que permitiam a sua observação indirecta.

1 — Período anterior aos cortes ultrafinos:

A *técnica da moldagem*, de início utilizada com a finalidade de estudar as superfícies de certos objectos, foi realizada a primeira vez por *Mahl* (1940) no estudo das superfícies metálicas.

Baseia-se em imprimir o objecto a estudar sobre uma delgada película de uma substância plástica (colódio, formvar) que funcionará como um molde.

Realiza-se cobrindo a superfície do espécime com uma delgada camada da solução de colódio ou formvar, deixa-se evaporar o solvente e depois desprende-se o filme solidificado, que constitui

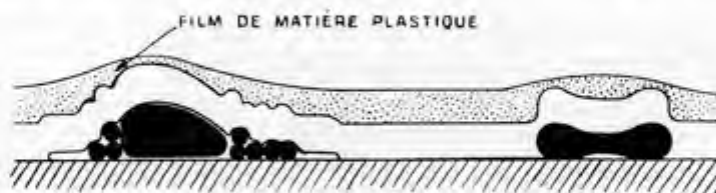


Fig. 1 — Esquema (corte longitudinal) da técnica de impressão aplicada a um esfregaço de sangue (*Bessis*).

um molde negativo de todas as anfractuosidades da superfície. Os moldes que depois de separados do objecto não apresentam o contraste suficiente são submetidos ao processo da metalização, cujos princípios estudaremos mais adiante (*Figs. 1 e 2*).

Servindo-nos deste artifício, foi possível a observação indirecta de certas estruturas. Assim, *Krause* e *Mahl* estudaram, em 1943, células sanguíneas, *Claude*, em 1948, bactérias, *Palay* e *Claude*, em 1949, cromossomas, e *Smith*, *Marckham* e *Wyckoff*, em 1948, os cristais do vírus do tabaco.

A *técnica do estendimento*, que tem sido utilizada na observação de células de cultura de tecidos e do sangue, foi outro dos artifícios que permitiu, pela redução da espessura dos objectos observados, que se tirassem algumas conclusões sobre a ultra-estrutura celular antes do advento do período da ultramicrotomia.

Foi primeiramente empregado por *Porter, Claude e Fullam* (1945) no estudo de células do sarcoma de *Rous*. Consiste em cultivar as células sobre uma película de plástico que lhes serve de

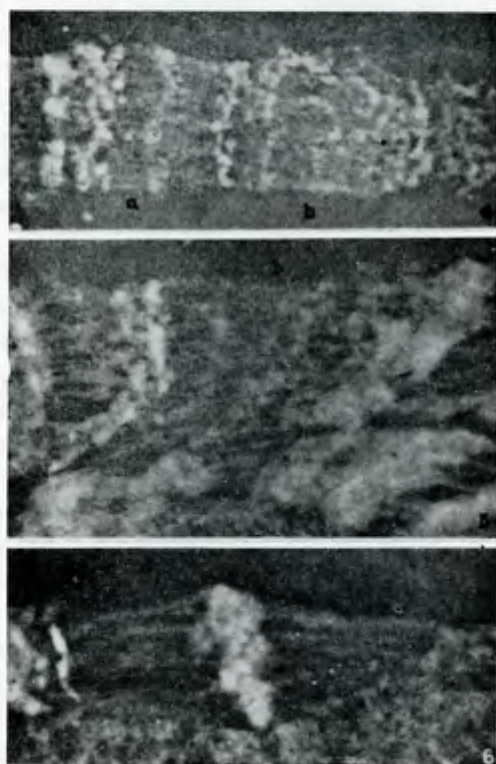


Fig. 2 — Microfotografias electrónicas de cromossomas gigantes de glândulas salivares de *Drosophila melanogaster*. Método da impressão em película de formvar. As impressões das estruturas sobre o filme plástico reproduzem o aspecto original do negativo: as estruturas espessas aparecem em branco ou cinzento-claro, as estruturas delgadas em cinzento-escuro ou em negros. (*Palay e Claude*).

suporte e onde estas se estendem naturalmente. Posteriormente são fixadas e juntamente com a película montadas numa grelha metálica para observação ao microscópio.

Bessis e Bricka (1949) empregaram este processo no estudo das células sanguíneas, depois de demonstrarem que as plaquetas colocadas sobre uma lâmina de vidro se estendem espontaneamente, o mesmo acontecendo aos polinucleares colocados sobre uma lâmina coberta de parlodion, formvar, celofane ou silicone (os polinucleares do sangue de doentes atingidos de leucemia aguda ou crônica não apresentam este fenómeno). Em todos os casos estes Autores observaram que as células começam por emitir longos e finos prolongamentos, que algum tempo depois, por alargamento progressivo a partir da base, se transformam em lâminas que finalmente se fundem, originando a formação de uma membrana que contorna toda a célula.

O estendimento terminado, a célula pode considerar-se dividida em três zonas: uma zona central, na qual se encontra o núcleo; uma zona média, com as granulações e mitocôndrias, e uma zona periférica (hialoplasma) — citoplasma sem inclusões.

A zona média e a zona periférica têm espessura susceptível de observação no microscópio electrónico (*Figs. 3, 4 e 5*).

O problema da limitação da espessura do material a observar foi também rodeado pela aplicação de outros métodos cujo princípio director foi o *isolamento dos constituintes celulares* cujas dimensões permitissem a sua observação. Seguindo este princípio, utilizaram-se a *microdissecção* e a *ultracentrifugação diferencial*. São métodos a aplicar ainda hoje em relação a certos problemas.

Uma outra técnica de grande importância surgida neste primeiro período foi a da *metalização*. Ela está relacionada com um problema, a que já fizemos referência, e com o qual as técnicas citológicas para a microscopia electrónica várias vezes se deparam: o problema do contraste.

Se uma determinada estrutura é formada por quantidade *tão pequena* de matéria, que a diferença entre a dispersão dos electrões no suporte e nessa estrutura é mínima, o objecto não oferece contraste suficiente para a formação de uma imagem.

O processo de metalização, descoberto por *Müller* em 1942 e aplicado dois anos mais tarde à biologia por *Williams e Wychoff*, consiste fundamentalmente em pulverizar obliquamente o objecto a observar com vapores de um metal pesado. Deste bombardeamento realizado no vácuo em câmaras especiais resulta que a superfície do suporte e as porções salientes do material em estudo são



Fig. 3
Fase dendrítica.

*Aspectos ao microscópio
óptico, depois da metali-
zação, de polinucleares
neutrófilos durante as
diferentes fases do esten-
dimento (Segundo Bessis
e Bricka)*



Fig. 4
Fase de transição.



Fig. 5
*Fase final de esten-
dimento.*

cobertas uniformemente de metal, enquanto que as zonas prote-
gidas pelas porções salientes do objecto permanecem sem metali-
zação e se apresentam nas fotografias como zonas de sombra
(Figs. 6, 7 e 8).

É possível, desde que se conheça o ângulo segundo o qual foram projectados os vapores metálicos e o comprimento da «sombra», determinar a altura dos objectos.

Os metais utilizados na técnica da metalização devem formar camadas finas não estruturadas e ter grande poder dispersante sobre os electrões. Utilizaram-se e utilizam-se o ouro, o crómio, a platina, o óxido de urânio, o paládio, a mistura ouro-paládio, etc.

Foi técnica que deu grandes contribuições ao estudo dos vírus e bactérias, mas o seu emprego, limitado ao reconhecimento da superfície, pouco informa sobre a estrutura interna dos objectos observados.

Largamente utilizado em observações hematológicas no microscópio electrónico, as imagens obtidas são aquelas em que todos ainda pensam quando se fala da aplicação da microscopia electrónica a estudos citológicos: as «imagens lunares».

2 — Período dos cortes ultrafinos:

Qualquer destas técnicas — moldagem, estendimento e metalização — tornaram-se porém técnicas de excepção quando a ultramicrotomia, uma vez resolvidos os problemas iniciais, se pôde aplicar largamente.

Von Ardenne, em 1939, encarando o interesse da realização dos cortes ultrafinos para a microscopia electrónica, foi o primeiro criador de uma técnica com essa finalidade.

Utilizando um micrótopo *Leitz-Minot* de porta-bloco rotativo que transportava o bloco com um pequeno ângulo em relação à faca, obtinha, regulando o avanço do micrótopo para $1\ \mu$, cortes em cunha em que uma das extremidades tinha espessura que já permitia a sua observação ao microscópio electrónico.

Porém, os resultados obtidos, tanto por este autor como por *Richards*, *Anderson* e *Hance*, que retomaram os seus estudos em 1952, foram insuficientes.

Em 1943 *O'Brien* e *Mac Kinley*, baseando-se na princípio de que a espessura dos cortes está em relação inversa à velocidade com que o corte é feito, construíram o primeiro micrótopo rotativo ultra-rápido.

Na sua tentativa foram seguidos por *Gessler* e *Fullam*, que em 1946 construíram um outro micrótopo ultra-rápido que já permitia a realização de cortes com uma espessura de $0,1\ \mu$ em material incluído em parafina (*Figs. 9 e 10*).

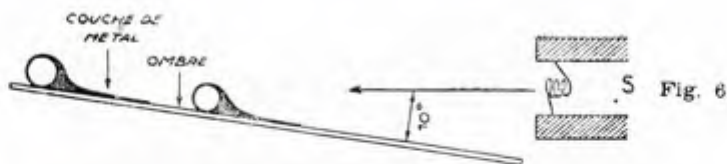


Fig. 6



Fig. 7

Fig. 6 — Esquema do método da metalização — Os vapores dos metais pesados são projectados do filamento S (filamento de tungsténio enrolado em espiral e em cujo interior se encontra o metal) segundo um ângulo de 10° sobre dois objectos esféricos. Os vapores metálicos depositam-se sobre as regiões expostas directamente à radiação (zonas a negro). As regiões da película situadas do lado oposto à origem dos vapores, imediatamente atrás dos objectos e protegidas por estes, não são cobertas de metal, o que faz com que nestas regiões se formem as chamadas «sombas». (Grégoire).

Fig. 7 — Microfotografia electrónica correspondente ao esquema da figura 6.



Fig. 8 — *E. coli*, fase final de divisão. Método da metalização. Ampl. 56.900 \times (Istituto Superiore di Sanità, Rome-Scanga).

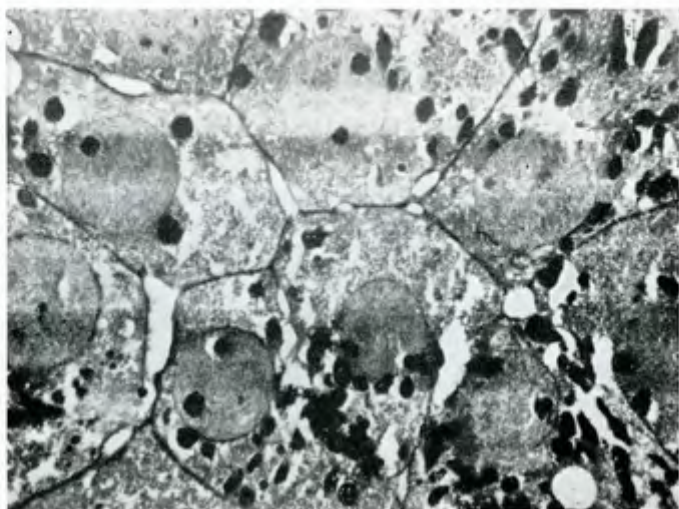


Fig. 9 — Microfotografia electrónica de corte de fígado de *Cobaia*. Fixação em tetróxido de ósmio. Inclusão em parafina. Ampliação 4500 \times (Gessler e Fullam).

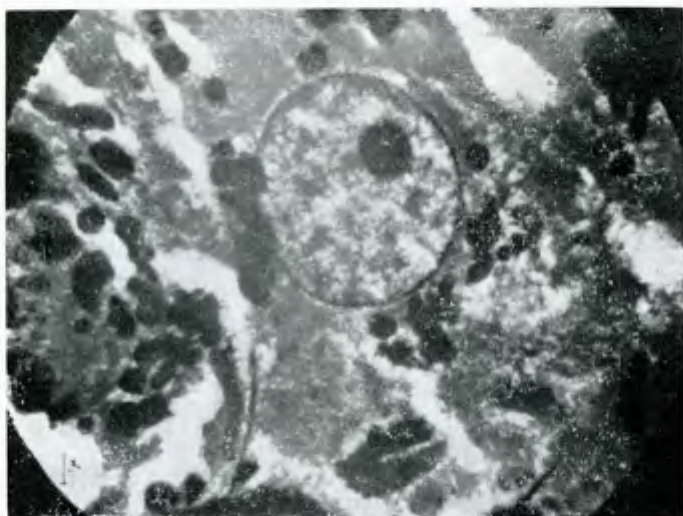


Fig. 10 — Microfotografia electrónica de corte de fígado de *Cobaia*. Fixação em tetróxido de ósmio. Inclusão em parafina. Ampliação 7000 \times (Gessler e Fullam).

Porém, a irregularidade dos cortes, o deslocamento mecânico das estruturas celulares produzidas pela faca e outros artefactos criados pela fixação e inclusão defeituosas não permitiram que estes métodos se desenvolvessem.

Uma das razões deste fracasso estava ligada ao problema da inclusão. A parafina não dava ao bloco a consistência necessária para permitir a obtenção de cortes ultrafinos, nem nos cortes tinha firmeza suficiente para servir de suporte às estruturas.

No sentido de resolver este problema, começam a surgir nesta época trabalhos com a finalidade de modificar os métodos de inclusão.

São assim ensaiadas as parafinas duras e a mistura de parafinas e ceras, cujo ponto de fusão vizinho de 70° torna o seu emprego prejudicial à conservação das estruturas. Por outro lado, a necessidade da sua extracção consecutiva, por intermédio de solventes, origina novos artefactos sobre a forma de distorções. Entre as várias tentativas feitas para eliminar este factor, conta-se a da inclusão em cânfora e naftaleno, que, com um ponto de fusão semelhante ao da parafina e dando às peças a consistência suficiente para serem cortadas, se podiam, uma vez feitos os cortes, volatilizar.

O *éster wax*, mistura de ceras muito duras, de ponto de fusão de 48° e consistência superior à parafina, foi utilizado com êxito, mas os resultados brilhantes foram alcançados depois da introdução dos plásticos metacrílicos por *Newmann, Borysko e Sverdlow*, em 1949. Segundo a técnica original destes Autores, os tecidos fixados e desidratados eram introduzidos numa mistura de metacrilatos de butilo e metilo, sob a forma líquida de monómeros, provocando-se seguidamente a sua polimerização e solidificação no seio dos tecidos na estufa a uma temperatura entre os 40° e 50° C. A polimerização pode também obter-se juntando catalizadores de polimerização, como o peróxido 2-4 dicloro-benzeno. Segundo esta técnica, os tecidos fixados e desidratados recebem banhos de uma mistura de metacrilatos de butilo e metilo e, seguidamente a um banho de metacrilato a que se juntou o catalizador de polimerização, são colocados na estufa. Esta técnica, a que foram introduzidas pequenas modificações, constitui actualmente o método de inclusão mais vulgarmente utilizado. Uma das vantagens que apresenta deve-se ao facto de não ser necessária a sua extracção para examinar os cortes, como acontece aos cortes de blocos incluídos em parafina.

A par com o aperfeiçoamento da técnica das inclusões, os estudos sobre a realização de um micrótomo, especialmente destinado aos cortes ultrafinos, fez também notáveis progressos.

Depois das tentativas de *Von Ardenne*, *O'Brien* e *Mac Kinley*, alguns investigadores tentaram por modificação do sistema de avanço adaptar os micrótomos da histologia clássica à microscopia electrónica.

Em 1948, *Pease* e *Baker* conseguem, por modificação do sistema de avanço de um micrótomo *Spencer 820*, obter cortes com $0,2 \mu$ em blocos incluídos em celoidina-parafina.

Bertschneider, em 1949, adapta um micrótomo *Rocking-Cambridge* de velho modelo, com o qual consegue obter cortes com espessura de $0,6 \mu$.

Outros autores, por modificações do avanço mecânico dos micrótomos clássicos, obtêm igualmente cortes de espessura de $0,1 \mu$.

Em 1949 surge, porém, uma inovação no sistema de avanço. *Newmann*, *Borysko* e *Sverdlov* substituem um micrótomo *Spencer* do tipo clássico de avanço mecânico por um dispositivo de avanço térmico. O bloco era colocado na extremidade de uma haste metálica, cuja dilatação, provocada pelo aquecimento (por intermédio de uma resistência eléctrica ou de uma lâmpada), originava um avanço contínuo, que, coordenado com o ritmo das passagens do bloco pela faca, permitia obterem-se cortes com a espessura necessária.

Vários autores conseguiram assim, com modelos de micrótomos de tipo clássico, obter cortes com a espessura suficiente para observação no microscópio electrónico; porém, o grande êxito neste capítulo da técnica deve-se a *Porter* e *Blum* e depois a *Sjöstrand*, que criaram os primeiros ultramicrótomos a serem comercializados.

Esquemáticamente, um micrótomo é constituído por um porta-bloco com um sistema de avanço e uma faca. O sistema de avanço faz com que o suporte do bloco se desloque de tal forma, que depois de cada corte o bloco se apresenta ao fio da faca com uma certa espessura.

A forma como estes dois elementos essenciais se relacionam nos micrótomos clássicos é diferente. Assim, existem micrótomos em que no momento do corte a faca se desloca, permanecendo o bloco fixo, como acontece no micrótomo de *Ranvier* e no micrótomo de corredeira, e outros em que a faca permanece fixa, sendo o bloco a deslocar-se, como sucede nos micrótomos do tipo *Minot*. Neste micrótomo, o deslocamento do bloco é accionado por um volante,

que, por intermédio de uma biela, faz com que a sua rotação completa corresponda ao movimento de descida e subida da peça que suporta o bloco. Um outro dispositivo faz com que, ao subir, o suporte do bloco faça rodar uma roda dentada, que em conexão com um parafuso micrométrico avança o bloco, segundo uma medida regulável pela nossa vontade.

O ultramicrotomo de *Porter-Blum* (Fig. 12) é um microtomo de faca fixa, de avanço mecânico, em que os movimentos do bloco são também comandados por um volante. Mas, enquanto nos micro-

MICROTOMO

CLÁSSICO
(Faca fixa)



DISPOSITIVO
DE
BLUM

MICROTOMO
DE
SJÖSTRAND



MICROTOMO
PORTER-BLUM

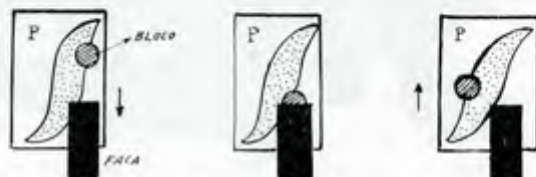


Fig. 11

tomos de tipo clássico, de faca fixa, o bloco passa pelo gume da faca duas vezes, uma no momento do corte e outra ao retomar a sua posição inicial, neste microtomo foi introduzido o sistema da passagem simples, cujas vantagens foram anteriormente demonstradas por *Blum* num protótipo em que o espécime era fixo na margem de um disco, que rodava segundo um eixo perpendicular ao gume da faca (Fig. 11).

Este sistema evita que a face do bloco, no momento de retorno, retire a precedente secção, tendência que se acentua nos sistemas de avanço contínuo, evitando igualmente a compressão do bloco pela faca.

Além disso, como actualmente é de uso corrente o emprego de metacrilato como material de inclusão, e como este, depois de ser cortado, se dilata, se o bloco passasse diante do gume da faca no movimento de retorno este certamente seria alterado.

No micrótomos de *Porter-Blum* o «single-pass» foi aproveitado, mas por intermédio de um outro dispositivo. O bloco encontra-se num suporte (já adaptado para os blocos de metacrilato) situado na parte anterior de uma barra metálica que atravessa uma peça com o formato indicado na fig. 11 com a letra *P* e na fig. 12 com *3*.

Ao descer, a barra metálica segue encostada à vertente direita dessa peça, passando o bloco diante do gume da faca e efectuando-se

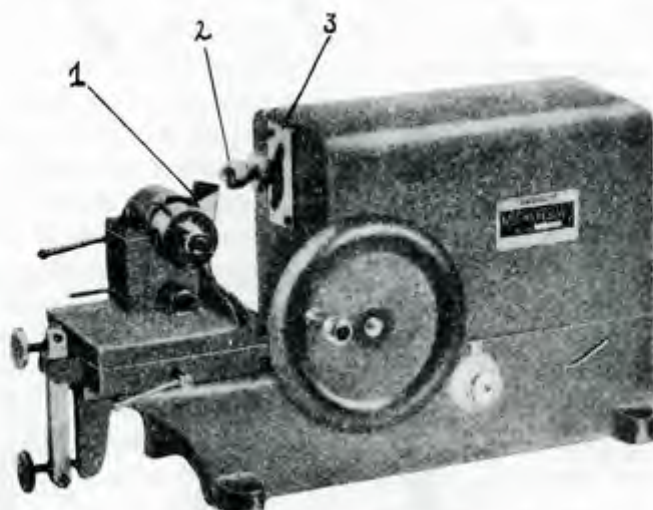


Fig. 12 — Ultramicrótomos de *Porter-Blum*: 1 — Faca e depósito para receber os cortes; 2 — Porta-bloco e bloco.

o corte; no movimento de subida segue encostada ao lado oposto, o que faz com que o bloco passe nesse movimento ao lado do gume da faca.

O avanço neste micrótomos é mecânico e comandado por um volante (Fig. 12) como nos micrótomos de tipo *Minot*, e faz-se uso de facas de vidro, cujo emprego foi introduzido por *Latta e Hartmann* em 1950.

No micrótomos de *Sjöstrand* (Fig. 13) o suporte está colocado excêntricamente num disco metálico, que roda accionado por um motor (segundo o dispositivo de *Blum* anteriormente referido).

O bloco está situado na extremidade de uma barra de aço, cuja parte posterior é aquecida por uma resistência eléctrica. Assim, a expansão desta barra faz com que o avanço do bloco seja linear durante um período de 15 minutos, em avanços menores de 200 Å. Para uma velocidade do disco de 60 rotações por minuto, corresponde um número de cortes suficientes por período.

Primitivamente, este micrótomo utilizava unicamente como facas lâminas de barbear afiadas momentos antes e que se colocavam ligeiramente encurvadas.

Ambos os ultramicrótomos a que nos referimos são do tipo de faca fixa e em ambos, com dispositivos diferentes, se aproveitam

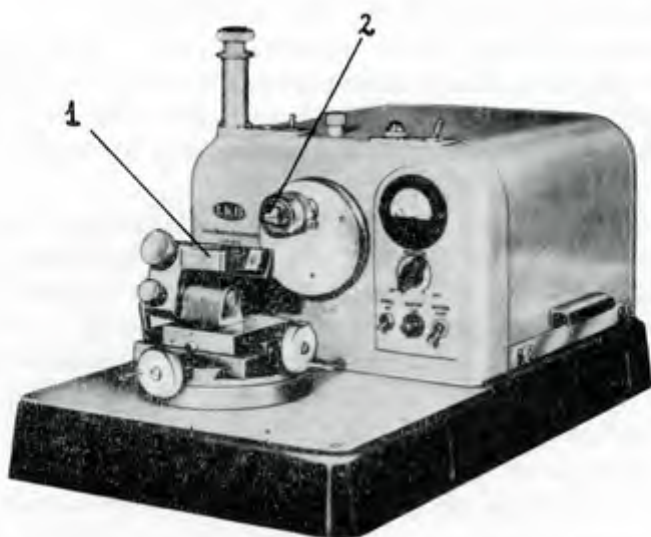


Fig. 13 — Ultramicrótomo de Sjöstrand: 1 — Faca e depósito para receber os cortes; 2 — Porta-bloco e bloco.

as vantagens do «single-pass». O avanço é mecânico no micrótomo de *Porter-Blum* e térmico no de *Sjöstrand*.

No que diz respeito às facas, actualmente são as de vidro as mais frequentemente utilizadas. Assim, o micrótomo de *Sjöstrand*, em que primitivamente unicamente se empregavam lâminas metálicas, possui já um dispositivo que permite a sua utilização.

Estas facas oferecem sobre as de aço várias vantagens, são económicas e de fabrico rápido, portanto facilmente substituíveis. Os seus gumes são a maior parte das vezes excelentes e quando

possuem defeitos que originem qualquer artefacto nos cortes podem ser rapidamente substituídas.

Fabricam-se, no momento em que se vão utilizar, a partir de barras de vidro de 8 mm de espessura e 4 cm de largo. As qualidades do vidro são muito importantes e, como se empregam vidros de vidraça ordinária, é aconselhável experimentar vidros de origem diferente antes de escolher um fornecedor. O vidro «macio» dá cortes menos estriados. Para se fazerem as facas, coloca-se a barra numa calha condutora escavada numa prancha de madeira e, depois de humedecida a sua superfície com petróleo, risca-se com uma roleta de aço segundo um ângulo de 45°. Utiliza-se como gume a zona onde foi feita a secção. Cada faca terá, pois, um comprimento correspondente à espessura das barras utilizadas.

Fernandez Moran (1953) utilizou com muito bons resultados facas de diamante, mas a necessidade de empregar na sua preparação técnicas especiais de polimento não permitiu que esta outra solução fosse até hoje difundida, muito embora os resultados pareçam ter sido bons.

A forma como se recolhem os cortes é também importante. De início eram, como na histologia clássica, recolhidos a seco e depois colocados com a ajuda de um pincel sobre a grelha suporte. Em 1948 *Claude* introduziu um método que permite a recolha dos cortes em água destilada. A faca adapta-se um pequeno receptáculo cheio de água destilada, no qual os cortes são recebidos sobre a superfície líquida.

Em ambos os ultramicrotomos referidos os cortes são ou podem ser recolhidos em suportes que se adaptam à faca.

Por exemplo, para o microtomo de *Porter* procede-se da seguinte forma: uma vez feita a faca, adapta-se-lhe o pequeno recipiente de latão como está indicado na figura 14. O recipiente é preso à faca com parafina e, uma vez esta solidificada, enche-se com acetona a 10 %.

Quando se monta a faca no microtomo, depois de se lhe dar a inclinação desejada, a quantidade de líquido do recipiente deve ser tal que se comporte como reflector de uma luz que se monta sobre o microtomo, devendo também formar um menisco convexo a partir do gume da faca. Quando a superfície do bloco, que previamente à talhada em pirâmide, passa diante do gume da faca, o corte é feito e desliza imediatamente na superfície do líquido (*Fig. 14*).

Este sistema não só permite uma eficaz extensão dos cortes, pela acetona a 10 % contida no recipiente, como permite a recolha fácil dos cortes e a identificação dos que servem para observação no microscópio.

Para observar servem de suporte aos cortes umas pequenas grelhas de cobre cobertas por uma película de uma substância que, por razões já anteriormente referidas, deve ser transparente às radiações electrónicas.

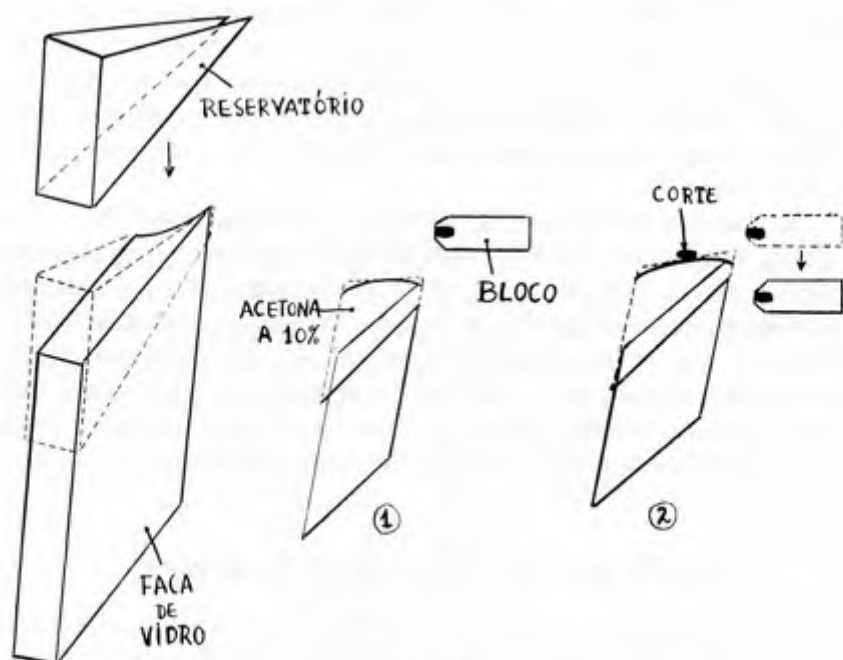


Fig. 14

Dos vários materiais até hoje estudados com esta finalidade, são as películas de materiais plásticos, como o *collodion*, *parlodion* e *formvar*, as usadas com mais êxito. A grelha de cobre em que assenta a película, além de servir de suporte à película de plástico, desempenha também a função de condutor do calor desenvolvido ao nível da preparação, quando já em observação no microscópio.

A maneira de preparar as grelhas-suporte (*treillis*) varia de laboratório para laboratório. Um dos métodos consiste em mergulhar uma lâmina de vidro cuidadosamente limpa num soluto de *formvar*.

Seguidamente deixa-se secar em posição vertical (bem defendida de qualquer poeira) esta película de plástico, cuja espessura deve ser de cerca de 100 Å. Uma vez seca, introduz-se um dos bordos da lâmina numa tina com água e com a ajuda dum objecto cortante separa-se cuidadosamente a película da lâmina, de forma a obter-se uma película de *formvar* sobrenadante. É sobre esta película que seguidamente se colocam as grelhas metálicas que lhe servirão de suporte.

As grelhas, já cobertas com a película de *formvar*, são retiradas da tina com um papel de filtro e, juntamente com este, deixam-se secar na estufa dentro de uma caixa de *Petri*.

Uma vez secas, faz-se com a ajuda do microscópio de contraste de fase a triagem, sendo eliminadas todas as que possuírem qualquer partícula estranha que possa vir prejudicar a observação e o microscópio.

A maneira de recolher os cortes do recipiente adaptado à faca é muito simples. Segura-se cuidadosamente com uma pinça a grelha coberta com a película de *formvar* e mergulha-se no recipiente. Seguidamente coloca-se sob os cortes e levanta-se cuidadosamente. Os cortes que se encontravam à superfície são assim recolhidos pela grelha. Depois deve retirar-se o líquido que porventura permaneça sobre a grelha, para o que basta tocar com esta num papel de filtro. Uma vez completamente seca, pode observar-se no microscópio.

Marcha geral da técnica dos cortes ultrafinos

Tendo passado em revista a evolução das técnicas citológicas e histológicas aplicadas à microscopia electrónica e expostas as principais inovações em que assenta a ultramicrotomia, vejamos em linhas gerais o esquema da marcha geral dum objecto biológico em que se pretendem fazer cortes ultrafinos.

Uma vez feita a colheita do tecido que se deseja examinar, deve imediatamente ser imerso no soluto de ácido ósmico. Aí, com a ajuda de lâminas de aço muito afiadas, secciona-se em pequenos fragmentos cúbicos de 1 mm de lado, que seguidamente são introduzidos nos frascos com o fixador, onde permanecem geralmente 30-60'. Terminada a fixação, procede-se à lavagem do excesso de fixador. Esta lavagem, feita com água destilada ou líquido de Tyrode, é geralmente curta (10 banhos de 3 minutos). Inicia-se depois a desidratação, que se faz dando banhos sucessivos de álcool

a 70°, 80°, 90° e absoluto, ou três banhos sucessivos de álcool a 95°, seguidos de três banhos de álcool absoluto, de 10 minutos de duração cada. Pode usar-se com economia de tempo e bom rendimento o aparelho de desidratação contínua de Bernhard, que essencialmente é constituído como está esquematizado na figura 15.

O pequeno reservatório *B*, onde se colocam os fragmentos dos tecidos já fixados contidos em pequenos crivos, é cheio de água

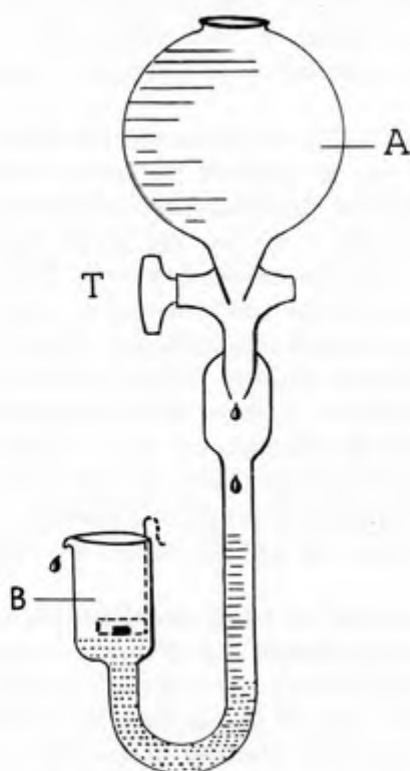


Fig. 15 — *Aparelho de Bernhard*

destilada. O depósito *A* enche-se de álcool absoluto. Seguidamente abre-se a torneira *T*, do que resulta que o álcool colocado no depósito *A* se vai misturando progressivamente com a água do reservatório *B*. Assim, neste reservatório vamos tendo progressivamente álcoois de concentração crescente. Uma vez esvaziado o depósito *A*, o depósito *B* encontra-se cheio de álcool aproximadamente a 95°. A desidratação completa das peças faz-se dando, já fora do apa-

relho, dois banhos de álcool bidestilado de 10 minutos cada. Terminada a desidratação, inicia-se a inclusão (o modo de a fazer difere em pequenos pormenores de laboratório para laboratório, sobretudo no tempo de duração dos banhos. Os tempos que aqui indicamos são os actualmente usados no Laboratório de Microscopia Electrónica do Instituto de Investigações sobre o Cancro de Villejuif).

Do último banho de álcool absoluto as peças passam para um banho de metacrilato-álcool, cuja duração vai de 10 a 30 minutos. Seguidamente dois banhos de metacrilato puro de 10-30 minutos cada e, finalmente, um banho de metacrilato catalizador de 10 a 60 minutos.

A seguir a este banho as peças são colocadas em cápsulas de gelatina (como as que se utilizam em certos medicamentos, como a aureomicina) repletas de metacrilato-catalizador, que se fecham e se colocam na estufa a 45° por um prazo de 12 a 36 horas (a cápsula funciona como um molde de bloco). Feita a polimerização do metacrilato, que adquire assim a dureza que torna possível os cortes, dissolve-se a cápsula de gelatina (para o que basta mergulhar o bloco em água durante alguns minutos). Ainda antes de se montar no micrótomo, o bloco deve ser talhado em tronco de cone no lado em que se encontra a peça, de forma que a superfície que vai ser cortada não seja muito grande, pois se assim for as possibilidades de estriação dos cortes aumentam (para apreciar a evolução das técnicas, ver as figuras 16, 17, 18 e 19).

Depois de uma fase inicial de grande entusiasmo, baseada nas possibilidades de amplificação que oferecia, a microscopia electrónica, em virtude dos limites que a técnica da sua aplicação originava, tombou numa fase em que as imagens obtidas eram olhadas com cepticismo e a que se atribuía unicamente carácter especulativo. Hoje, exactamente graças aos pioneiros, que, resistindo à pobreza dos primeiros resultados, souberam adaptar as técnicas de preparação do material ao instrumento, pode-se afirmar que a microscopia electrónica constitui uma das técnicas mais brilhantes até hoje postas ao serviço dos citologistas e histologistas.

Foi o desenvolvimento da ultramicrotomia que terminou com o cepticismo que originaram «as imagens de células que mais pareciam imagens lunares» e actualmente esta técnica tem já o crédito merecido pelas suas possibilidades, pois em todo o Mundo se montam e equipam novos laboratórios.

TÉCNICAS CITOLÓGICAS E HISTOLÓGICAS

O estado actual do seu desenvolvimento permite também encarar o futuro com optimismo e prever as suas próximas contribuições como das mais importantes no estudo dos «infinitamente pequenos».

Tudo faz prever para a microscopia electrónica o papel de elo de ligação entre a química celular e a morfologia. Onde hoje se

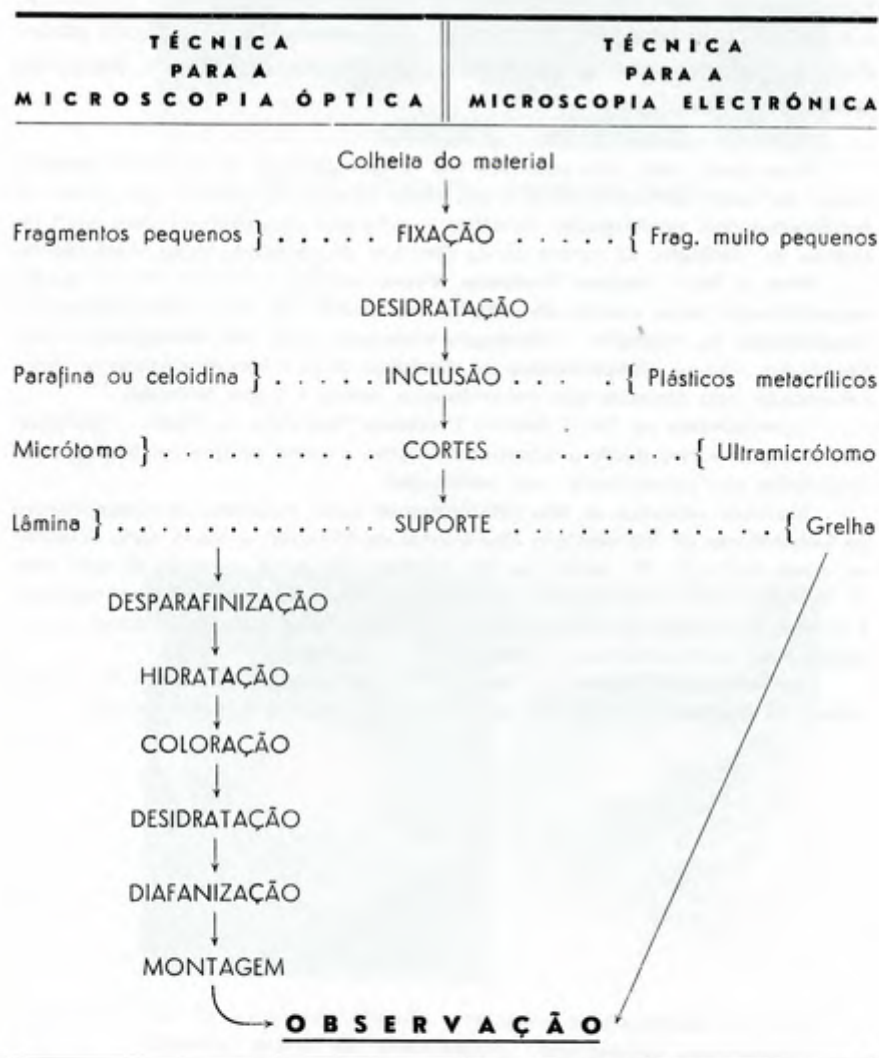


Fig. 16 — Esquema comparativo da marcha geral das técnicas histológicas para a microscopia óptica e electrónica

descreve uma formação cujo sentido nos escapa no complexo do conjunto, talvez amanhã se possa assinalar, graças ao desenvolvimento das técnicas que se esboçam, a posição duma molécula cujo sentido tenha para nós significado.

Embora, pois, para a sua aplicação se tenham ainda que encarar muitos problemas não resolvidos, embora a manutenção dum laboratório deste tipo seja difícil e a aparelhagem para o seu equipamento cara, os progressos que o seu emprego tem permitido e o futuro que promete justificam plenamente os sacrifícios materiais e pessoais que a fundação dum laboratório desta natureza possa originar.

É-me dada hoje, pela primeira vez, a oportunidade de exprimir publicamente os meus agradecimentos a um certo número de pessoas que, pelo seu entusiasmo pela investigação científica e pela sua alta compreensão dos problemas da citologia, se tornaram os directos responsáveis desta conferência.

Para o Ex.^{mo} Senhor Professor Xavier Morato, a quem devo a minha especialização neste campo de estudo, testemunho da sua compreensão das necessidades da citologia e histologia modernas e da sua inteligência como orientador, vão os cumprimentos do discípulo, cuja responsabilidade se sente aumentada pela amizade que naturalmente dedica a quem trabalha.

Agradecemos ao Ex.^{mo} Senhor Professor Celestino da Costa o interesse com que patrocinou desde o primeiro momento o nosso estágio em França e as facilidades que obteve para a sua realização.

Ingratos seríamos se não lembrássemos neste momento os companheiros do Laboratório de Microscopia Electrónica de Villejuif, a quem tudo devemos na nossa iniciação. Na pessoa do Dr. *William Bernhard*, exemplo de uma vida de sacrifício pela investigação, cuja vontade e inteligência têm impulsionado a equipa que dirige, saudamos todos os investigadores desse laboratório, recordando com muita saudade os dias que aí trabalhamos.

Ao Instituto Francês em Portugal e ao Instituto de Alta Cultura agradecemos as facilidades materiais que tornaram possível o nosso estágio.

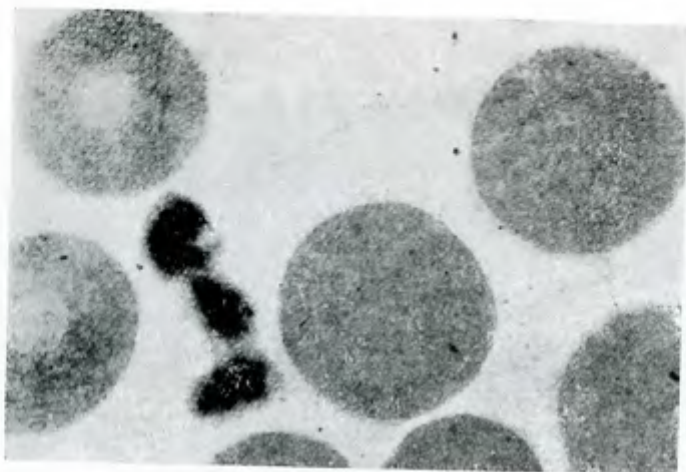


Fig. 17 — *Plaquetas (microscópio óptico).*

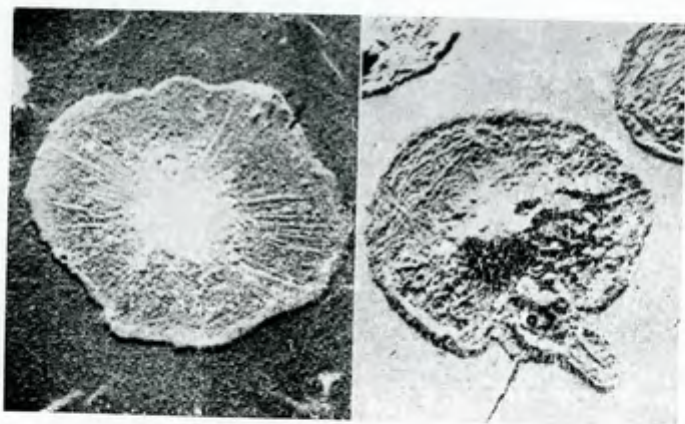


Fig. 18 — *Imagem directa e imagem da impressão de uma plaqueta, depois de metalização. (Microscópio electrónico) (Segundo Bessis).*

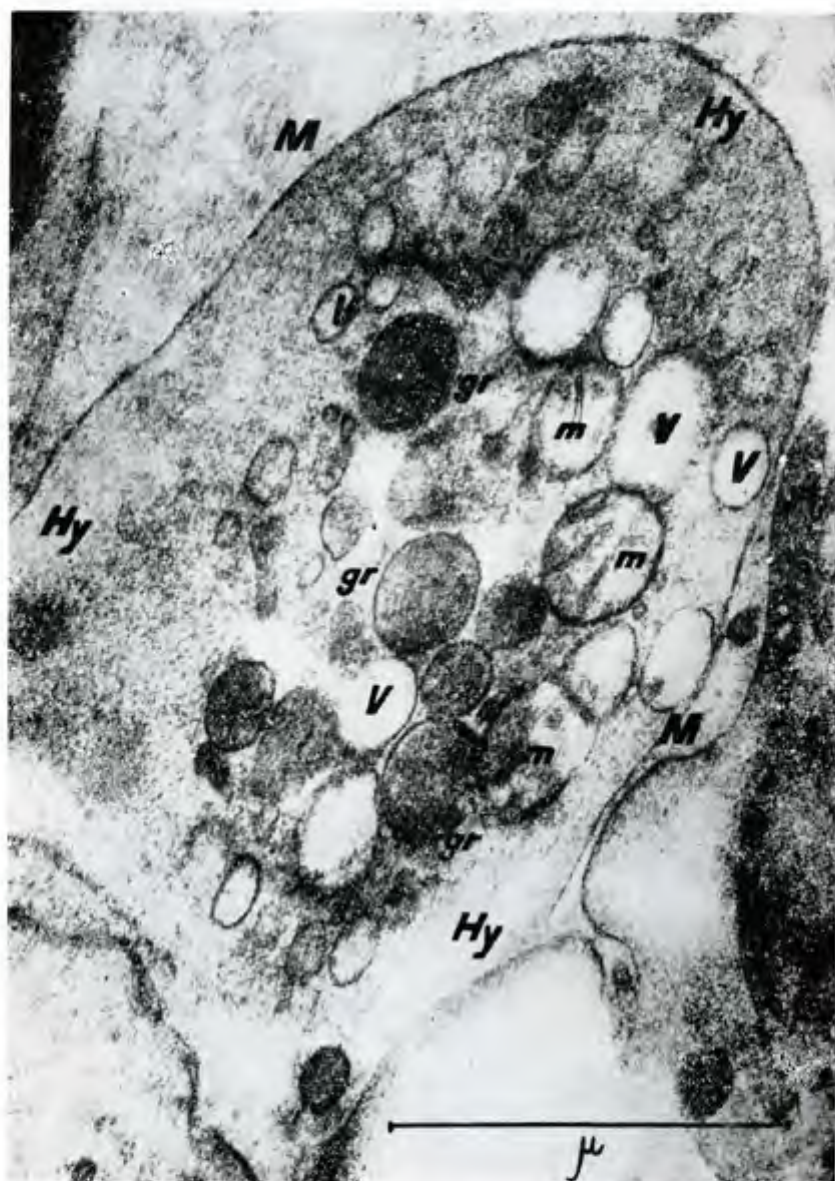


Fig. 19 — Plaqueta de sangue humano normal: M — Membrana celular; Hy — Hialômero; Gr — Granulações do cromômero; m — mitocôndrias; V — Vacúolos; ps — pseudópodo duma plaqueta vizinha. Ampl. 80.000 × (Bernard e Leplus).

Bibliografia

- 1) *Bahr, G. F.* — «Osmium tetroxide and ruthenium tetroxide and their reactions with biologically important substances». *Exp. Cell. Res.* 7 (457) 1954.
- 2) ——— «Continued studies about the fixation with osmium tetroxide». *Exp. Cell. Res.* 9 (277) 1955.
- 3) *Barry, J.* — «Le Microscope Electronique et ses conditions d'application à l'étude cytologique». *Bull. de la Soc. Sc. de Nancy, Set.* 1955.
- 4) *Bernhard, W.* — «Appareil de Deshydratation continue». *Exp. Cell. Res.* 8 (248), 1955.
- 5) ——— «Problèmes de la cytologie électronique de haute résolution». *Bull. de Mic. App.*, 5,1/2 (12), 1955.
- 6) *Bernhard, W.*, e *R. Lepus* — «La methode des coupes ultrafines et son application à l'étude de l'ultrastructure des cellules sanguines». *Journ. Suisse de Med.*, 85, 38/39 (897), 1955.
- 7) *Bessis, M.*, e *M. Bricka* — «Nouvelles études sur les cellules sanguines au Microscope Electronique avec une étude particulière de leur ultrastructure». *Arch. d'Anat. Micr. et de Morph. Exp.*, 38-3 (190), 1949.
- 8) *Bessis, M.* — «Traité de Cytologie Sanguine». *Masson, Paris*, 1954.
- 9) *Claude, A.*, *Porter, K. R.*, e *E. G. Pickels* — «Electron Microscope Study of chicken tumor cells». *Cancer Research*, 7 (421), 1947.
- 10) *Dalton, A. J.* — «Electron microscopy of tissue sections». *Int. Rev. Citol.*, 2 (403), 1953.
— «A chome-osmium fixative for Electron Microscopy». *Anat. Rec.*, 121-2 (281), 1955.
- 11) *Danon, D.* — «Etude comparative des techniques histologiques pour le Microscope Electronique par la méthode des coups minces». *Tese da Fac. de Med. de Genebra* (1952).
- 12) *Fernandez-Moran, H.* — «A diamond knife for ultrathin sectioning». *Exp. Cell. Res.*, 5-1 (255), 1953.
- 13) *Gessler, A. E.*, e *E. F. Fullam* — «Sectioning fo the electron microscope accomplished by the high speed microtome». *Am. Journ. Anat.*, 78-2 (245), 1946.
- 14) *Grégoire, Ch.* — «Microscope Electronique et Recherche Biologique». *Masson & C. Ed.*, Paris, 1950.
- 15) *Haguenau, F.*, e *W. Bernhard* — «Le problème de l'ultrastructure du cytoplasme et des artéfacts de fixation». *Exp. Cell. Res.*, 3-4 (629), 1952.
- 16) *O'Brien, H. C., Jr.*, e *G. M. Mc Kinley* — «New microtome and sectioning for electron microscopy». *Science*, vol. 98 (455), 1943.
- 17) *Low, Frank N.* — «The electron microscopy of sectioned lung tissue after varied duration of fixation in buffered osmium tetroxide». *Anat. Rec.*, 120-4 (827), 1954.
- 18) *Latta, H.*, e *J. F. Hartmann* — «Use of a glass edge in thin sectioning for Electron Microscopy». *Proc. of Soc. for Exp. Biol. Med.*, 74 (436), 1950.
- 19) *Palade, G. E.* — «A study of fixation for Electron Microscopy». *Journ. Exp. Med.*, 95-3 (285), 1952.

MICROSCOPIA ELECTRÓNICA

- 20) *Palay, S. L., e A. Claude* — «An Electron microscope study of salivary gland chromosomes by the Replica Method». Journ. Exp. Med., 89 (431-438), 1949.
- 21) *Polícard, A., Bessis, M., e Bricka, M.* — «La fixation des cellules isolées observée au contraste de phase et au Microscope Electronique». Bull. Mic. App., 2-3/4 (1952).
- 22) *Polícard, A., e M. Bessis* — «Histologie classique et microscope électronique». Bull. Mic. App., 3 11/12 (149), 1953.
- 23) *Porter, K. R., e J. Blum* — «A study in microtomy for Electron Microscopy». Anat. Rec., 117-4 (685), 1953.
- 24) *Porter, K. R., e F. Kallman* — «The proprieties and effects of osmium tetroxide as a tissue fixative with special reference to its use for Electron Microscopy». Exp. Cell. Res., 4-1 (127), 1951.
- 25) *Rhodin, J.* — «Correlation of ultrastructural organization and function in normal and experimental changed proximal convoluted tubule cells of the mouse kidney». Karolinska Instituted, Stockholm (1954).
- 26) *Sjöstrand, F. S.* — «A new microtome for ultrathin sectioning for high resolution Electron Microscopy». Experientia, 9-3 (114), 1953.
- 27) *Watson, M. L.* — «A new microtome for thin sectioning for Electron Microscopy». Biochim. et Biophys. Acta 10 (1-4), 1953.