

A aplicação da microscopia electrónica
em biologia

por

David Ferreira

Separata de

A Medicina Contemporânea

N.º 11, Novembro de 1958

A aplicação da microscopia electrónica em biologia

limitações e futuro⁽¹⁾

por

David Ferreira

Assistente do Instituto de Histologia e Embriologia da F. M. L.
Bolsista do Instituto de Alta Cultura

As origens do microscópio são remotas e humildes. Parece ter sido em 1285, que *Salvino d'Armato*, de Florença, descobriu a arte de trabalhar o vidro e de fabricar lentes. Como consequência desta descoberta surgiram os primeiros microscópios simples que eram constituídos por um pequeno cilindro, que tinha numa das extremidades uma lente, e na outra duas lâminas de vidro, onde se colocava o objecto a examinar. Como para as demonstrações era geralmente escolhida a observação de uma pulga, o instrumento foi durante muito tempo conhecido com o nome pouco dignificante de *vitrum pulcarium* (vidro das pulgas).

A observação de objectos pequenos utilizando duas lentes combinadas, foi realizado pela primeira vez por *Zacarias Janssen* em 1590. *Galileu*, a quem também se atribui a descoberta do microscópio composto, utiliza-o em 1609. Nesta época porém, as aberrações das lentes que constituem este aparelho, tornam-no um instrumento cheio de defeitos cuja utilização não encontra cultores. O telescópio, por exemplo, foi recebido com mais entusiasmo e o seu emprego teve repercussões imediatas sobre a ciência da época. Mas a diferença de destino destes dois instrumentos, não se pode explicar unicamente pela má qualidade do microscópio. Compreende-se que no momento histórico em que foi

⁽¹⁾ As fotografias que ilustram este artigo foram feitas no Laboratório de Microscopia Electrónica Calouste Gulbenkian do Instituto de Histologia e Embriologia.

feita a sua descoberta, os homens se preocupassem mais com os segredos do Universo, que com as particularidades do mundo, aparentemente sem significado, revelado pelas trinta ampliações dos microscópios de então.

Apesar das dificuldades os entusiastas do microscópio surgem e com eles nasce a microscopia.

Em 1665, *Robert Hooke* publica «*Micrographia*» com a descrição das suas observações ao microscópio, onde emprega pela primeira vez a palavra célula. Alguns anos mais tarde, contra o parecer de físicos eminentes como *Newton*, que declaravam a aberração cromática um problema sem solução, *Klingensjtjerna* consegue construir pela primeira vez lentes acromáticas.

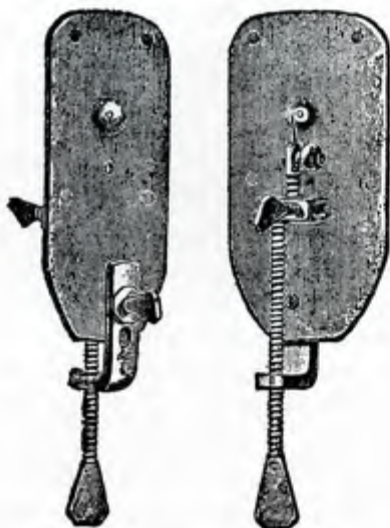


Fig. 1 — Microscópio de Leeuwenhoek

Pode considerar-se a teoria celular de *Schleiden* e *Schwann* (1839), uma consequência da construção de microscópios sem aberração cromática.

De 1875 a 1886, novos melhoramentos são introduzidos na construção do microscópio graças aos trabalhos de *Abbe*. Este físico estabelece as razões por que a partir de uma certa ampliação as imagens perdem a nitidez.

A fórmula de *Abbe*:
$$d = \frac{0,61 \lambda}{N \sin \alpha}$$
 mostra que o poder separador de um sistema óptico, isto é, a mais pequena distância entre dois

pontos em que ainda se podem distinguir um do outro, é directamente proporcional ao comprimento de onda das radiações empregadas, e inversamente proporcional à abertura numérica da objectiva.

Daqui se pôde concluir, que uma vez atingidos os limites para a abertura numérica da objectiva, o poder separador do microscópio, empregando a luz natural, seria de 2.000 Å, o que permitiria ampliações de 1.000 a 1.500 vezes. A partir desse limite, só o emprego de radiações de comprimento de onda mais curto permitiria melhorar o poder separador do microscópio.

Em 1903-1904 surge um microscópio utilizando radiações ultravioletas, cujo comprimento de onda, metade do da luz branca, permite alcançar o poder separador de 1.100 Å, e obter ampliações úteis de aproximadamente 3.000 vezes.

Vinte anos mais tarde *Broglie* estabelece que todas as particulas materiais em movimento, estão associadas a uma onda, cujo comprimento é dado pela fórmula: $\lambda = \frac{h}{m V}$

$\left\{ \begin{array}{l} h - \text{constante de Planck} \\ m - \text{massa da partícula} \\ V - \text{velocidade} \end{array} \right.$

O estudo do movimento dos electrões em campos magnéticos ou electrostáticos, realizado por *Busch* em 1926, conduz este autor a fórmulas semelhantes às da óptica geométrica clássica. Destes trabalhos, surgiu a ideia de se construir um microscópio empregando radiações electrónicas e lentes magnéticas ou electrostáticas. De 1931 a 1932, *Knoll* e *Ruska* constroem o primeiro destes instrumentos.

À construção dos primeiros microscópios seguiram-se as tentativas para a sua aplicação aos estudos biológicos, mas antes que essa aplicação fosse possível, tiveram que resolver-se os problemas técnicos de preparação do material.

De 1939 a 1953, um largo trabalho é empreendido e são lançadas as bases das técnicas citológicas e histológicas da microscopia electrónica. A partir de então um novo instrumento de trabalho foi posto ao serviço da biologia, abrindo à microscopia um mundo novo que vai até à escala molecular.

Comparando a evolução histórica, da microscopia óptica e electrónica, surpreende a diferença de tempo necessária a cada uma destas técnicas, para se tornar um instrumento de interesse para a biologia. Enquanto foram necessários duzentos anos à microscopia óptica para conquistar a sua posição no campo das ciências biológicas, a microscopia electrónica não necessitou mais do que vinte.

Esta diferença exprime o aumento da capacidade de realização técnica do homem, e é um índice da importância adquirida pelas ciências biológicas nos últimos cem anos.

Pode imaginar-se facilmente, como seria difícil a um naturalista de 1700, prever a influência que o microscópio óptico viria a exercer nas ciências naturais. Com que coragem é pois possível tentar hoje prever a futura influência da microscopia electrónica? Todas as técnicas têm limitações imediatas, e um futuro próximo cuja importância é grande, pois deles depende a sua evolução e o seu desenvolvimento. Além desse limite, só se pode prever especulando. É das limitações actuais, e do futuro imediato que a sua aplicação permite prever, que aqui nos ocuparemos.



Muito resumidamente um microscópio electrónico é constituído por um sistema produtor de electrões, um conjunto de lentes (condensador, objectiva, lente intermediária e ocular) e um «écran» fluorescente. Os electrões são produzidos por um filamento de tungsténio incandescente. Entre o cátodo com o filamento e o ânodo que fica situado abaixo, estabelece-se uma diferença de potencial e os electrões atraídos atravessam em grande velocidade o ânodo, constituindo um feixe.

O condensador faz convergir este feixe sobre a preparação, que atravessa, e depois de sofrer a acção do sistema de lentes projecta-se no «écran».

Para que os electrões se propaguem livremente ao longo da coluna é necessário que não encontrem na sua trajectória ar. Por isso se torna indispensável fazer o vazio no interior da coluna.

Por outro lado, dado que os electrões, mesmo acelerados por uma diferença de potencial de 100 Kw, têm fraco poder penetrador, é necessário que a preparação seja suficientemente fina para que a atravessem. Destas duas condições, impostas pelas características do aparelho, resulta que as preparações a observar têm que ser secas e extraordinariamente finas. Está pois vedado o exame de preparações «in vivo».

Num artigo sobre a aplicação da microscopia electrónica ao estudo dos microrganismos *Anderson* ao explicar a «filosofia» de uma experiência com o microscópio electrónico tem uma analogia feliz. Imagine-se um homem vindo de Marte, que resolve descobrir o que é o futebol, mas que quando observa os jogadores estes ficam paralisados (fixação). É-lhe possível com esta limitação descobrir quais as regras do jogo?

Pode admitir-se que o marciano tem algumas possibilidades de controlar os acontecimentos. Se por exemplo, puder fazer com que o jogo se inicie às 2 horas poderá descobrir a disposição inicial dos jogadores e que passadas duas horas e meia o campo se encontra deserto. Se tiver um agente semelhante a um enzima que retire todo o ar do campo poderá concluir que a bola é essencial. Se puder provocar em todos os jogadores uma doença, verifica que também são fundamentais. Se dissolver especificamente o seu cabelo, concluirá que o cabelo não

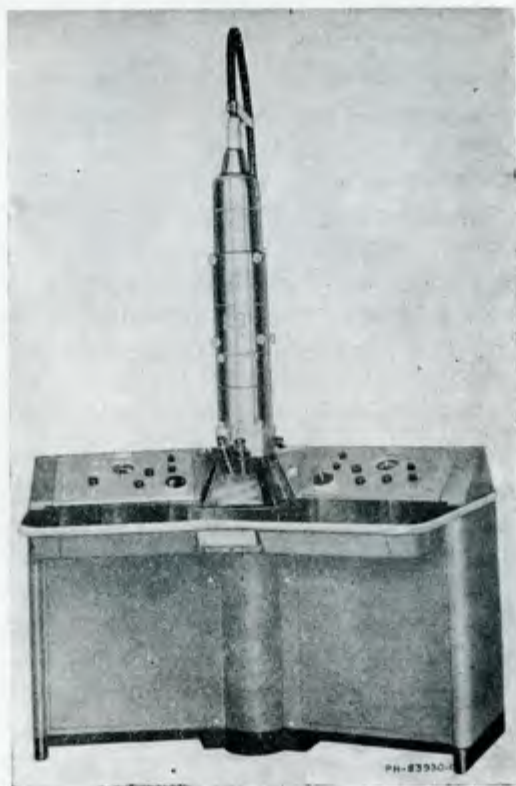


Fig. 2 — Microscópio electrónico RCA-EMU 3 do Laboratório de Microscopia Electrónica Calouste Gulbenkian

tem influência sobre o prosseguimento do jogo, mas se fizer actuar agentes que ataquem as pernas ou os olhos dos jogadores verificará que o jogo não se pode realizar. A moralidade que se pode tirar desta história é que muito embora não se possam fazer com o microscópio electrónico observações «in vivo», há a possibilidade de orientar as experiências de forma a poder tirar conclusões sobre os processos dinâmicos da vida celular.

O material biológico a observar com o microscópio electrónico tem que ser fixado, incluído e cortado. Estas operações têm que executar-se com rigor, pois alterações mínimas das estruturas, podem tomar valor real à escala das ampliações que se empregam.

A descoberta de uma técnica de fixação que pela sua qualidade oferece condições de utilização — ácido ósmico tamponado a pH 7,6 — pode considerar-se uma das principais aquisições das técnicas de aplicação da microscopia electrónica aos estudos biológicos. Porém, apesar das inúmeras tentativas esta técnica é ainda praticamente a única a utilizar-se com bons resultados, e o facto de ser única, constitui um grande inconveniente. Não só não é possível por comparação, controlar os seus artefactos, como os resultados obtidos com certos tecidos são muito inconstantes.

No seu estado actual, a técnica da fixação, constitui sem dúvida, um dos obstáculos, que mais limita o emprego da microscopia electrónica aos estudos biológicos. É de esperar que no futuro estas dificuldades sejam ultrapassadas. Também relacionada com a perfeição exigida da técnica da fixação surge outra limitação. Foi verificado por vários autores, que as alterações provocadas nas ultra-estruturas celulares pela autólise são extremamente rápidas. Desta observação se pode concluir que pelo momento se encontra vedado o estudo ao microscópio electrónico de material de autópsia. Esta limitação priva os anátomo-patologistas de um certo número de observações sem dúvida do maior interesse.

Outro limite, também resultante da técnica actual, é a pequena área do tecido que se pode examinar ao microscópio, em cada observação. Os pedaços de tecido que se fixam têm que ser pequenos, pois o fixador tem fraco poder de penetração. A técnica dos cortes só permite fazer cortes suficientemente finos em superfícies muito pequenas. Os microscópios actualmente construídos só permitem em cada exame a observação de áreas muito reduzidas. Destas três razões resulta que a área que se observa em cada exame é muito pequena. Tanto para a anatomia patológica como para a biologia experimental esta limitação constitui outro sério obstáculo.

A técnica da coloração, que tão útil tem sido em microscopia óptica, não se pode empregar em microscopia electrónica. Está-se assim privado da análise cromática, que tantas vezes, permite tirar conclusões sobre a composição química das estruturas tecidulares.

Ao microscópio electrónico, os elementos ultra-estruturais de uma célula ou tecido, distinguem-se por diferenças de contraste, que resultam da sua diferente combinação com o ácido ósmico. As estruturas

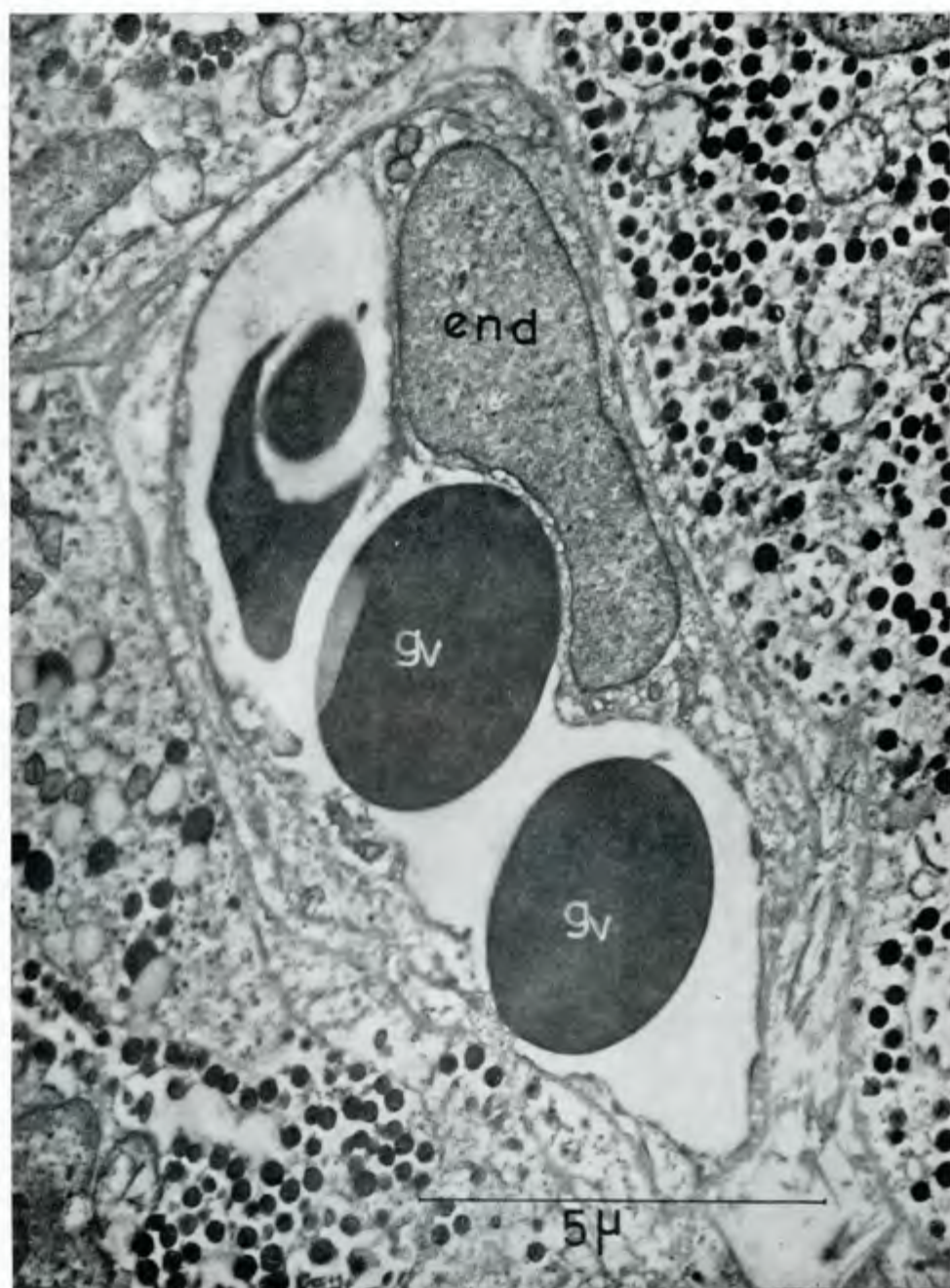


Fig. 3 — Capilar sanguíneo do lobo anterior da hipófise. (Gato). No seu interior globulos vermelhos (gv), à sua volta células acidófilas carregadas de granulações de secreção. End = núcleo da célula endotelial do capilar. $\times 11,000$

que fixam o ósmio em maior quantidade, dispersam maior número de electrões, donde o maior contraste da sua imagem.

Por esta razão, os fixadores que se usam devem possuir átomos de um metal pesado e actuam não só como fixadores como corantes.

Nos últimos anos vários autores têm trabalhado no sentido de separar os problemas da fixação dos da «coloração». Embora utilizem o ácido ósmico como fixador, melhoram as imagens empregando substâncias que por darem maior contraste às estruturas são conhecidas com o nome de «corantes electrónicos».

Entre essas técnicas salientamos uma utilização por *Wohlfarth-Botterman*. Depois da fixação em ácido ósmico, a 2 % isotónico e tamponado, os fragmentos de tecido são lavados com líquido de Tyrode. Os corantes actuam durante a desidratação. Depois de uma permanência em álcool a 70° as peças são transferidas para um soluto a 1 % de ácido fosfotúngstico, depois do que se continua a inclusão.

Esta técnica que já foi ensaiada no Laboratório de Microscopia Electrónica do Instituto de Histologia aumenta o contraste das membranas celulares dando maior beleza às imagens electrónicas.

A par destas experiências, cujos resultados permitem o emprego de substâncias que melhoram a qualidade dos documentos obtidos, têm sido feitas tentativas no sentido de criar verdadeiras reacções histoquímicas. Compreende-se o interesse destas reacções à escala ultra-estrutural. No dia em que for possível marcar moléculas ou agrupamentos moleculares e observar a sua localização no interior das células ou tecidos, ter-se-há dado um passo fundamental no campo da morfologia e da bioquímica. O desenvolvimento destas técnicas representa pois um dos caminhos mais cheios de promessas no futuro da microscopia electrónica.

Os obstáculos que dificultam a obtenção de reacções deste tipo são muitos, pois só dificilmente se podem fazer coincidir as condições necessárias à histoquímica e à microscopia electrónica.

A microscopia electrónica exige uma fixação impecável, que se deve realizar o mais rapidamente possível a seguir à colheita. Numa reacção histoquímica para a microscopia electrónica, como grande número de enzimas são destruídas pelos actuais processos de fixação, é necessário realizar a reacção histoquímica antes de fazer actuar o fixador. Esta condição diminui as probabilidades de uma boa conservação do espécimen. Por outro lado, o período de incubação da reacção tem que ser curto, pois quanto mais longo for maiores são as probabilidades de destruição das ultra-estruturas celulares. Tem que se realizar a um pH simultaneamente crítico para a reacção, e dentro dos limites com-

patíveis com a conservação das estruturas celulares. Finalmente da reacção, tem que resultar um produto que seja opaco aos electrões e resistente aos tratamentos posteriores, isto é, à fixação, desidratação e inclusão.

Apesar de ser difícil harmonizar uma boa conservação dos elementos ultra-estruturais com as condições técnicas necessárias à realização de uma reacção histoquímica, foram já obtidos alguns resultados positivos. *Barnett* e *Palade* a quem se deve um estudo detalhado das considerações que atrás apontamos criaram um método que permite pôr em evidência ao microscópio electrónico as deidrogenases.

Sabendo-se que o telurito de potássio é reduzido pelos tecidos com formação de um produto estável, insolúvel e com grande poder dispersante dos electrões, *Barnett* e *Palade* conseguiram criar uma técnica quer permite observar ao microscópio electrónico o produto final desta reacção.

Pequenos blocos dos tecidos com cerca de 1 mm³ foram colocados num soluto a 0,1 % de telurito de potássio num tampão de fosfato a pH 7,6. Depois da incubação cerca de 2 h a 37° pcederam à fixação, desidratação, inclusão e cortes segundo a técnica habitual. De todos os tecidos estudados o músculo cardíaco foi aquele em que os resultados foram mais satisfatórios. Depois de cerca de duas horas de incubação num meio estranho e na ausência de oxigénio, e apesar da fixação se realizar muito tempo depois da colheita, a ultra-estrutura das fibras musculares mantém-se quase intacta.

A observação ao microscópio electrónico dos cortes tratados pela técnica de *Barnett* e *Palade* revela a existência de depósitos densos sob a forma de cristais de 100-200 Å de largo por 1.000 Å de comprimento e de finas particulas de 50 a 100 Å. Tanto os cristais como as particulas se encontram quase exclusivamente no interior das mitocondrias.

Por este método pode assim demonstrar-se ao microscópio electrónico o sistema deidrogenase. O produto final da reacção — o telurito reduzido — pode, graças à sua alta densidade, vizualizar-se nos tecidos.

Esta técnica constitui um avanço importante no sentido de uma aplicação conjugada da histoquímica e da microscopia electrónica.

Actualmente vários laboratórios trabalham no sentido de encontrar novas reacções deste tipo podendo constatar-se alguns avanços. Na reunião de 1957, da Sociedade Americana de Histoquímica, foram já apresentadas quatro comunicações tendo por tema a utilização de reacções histoquímicas em microscopia electrónica.

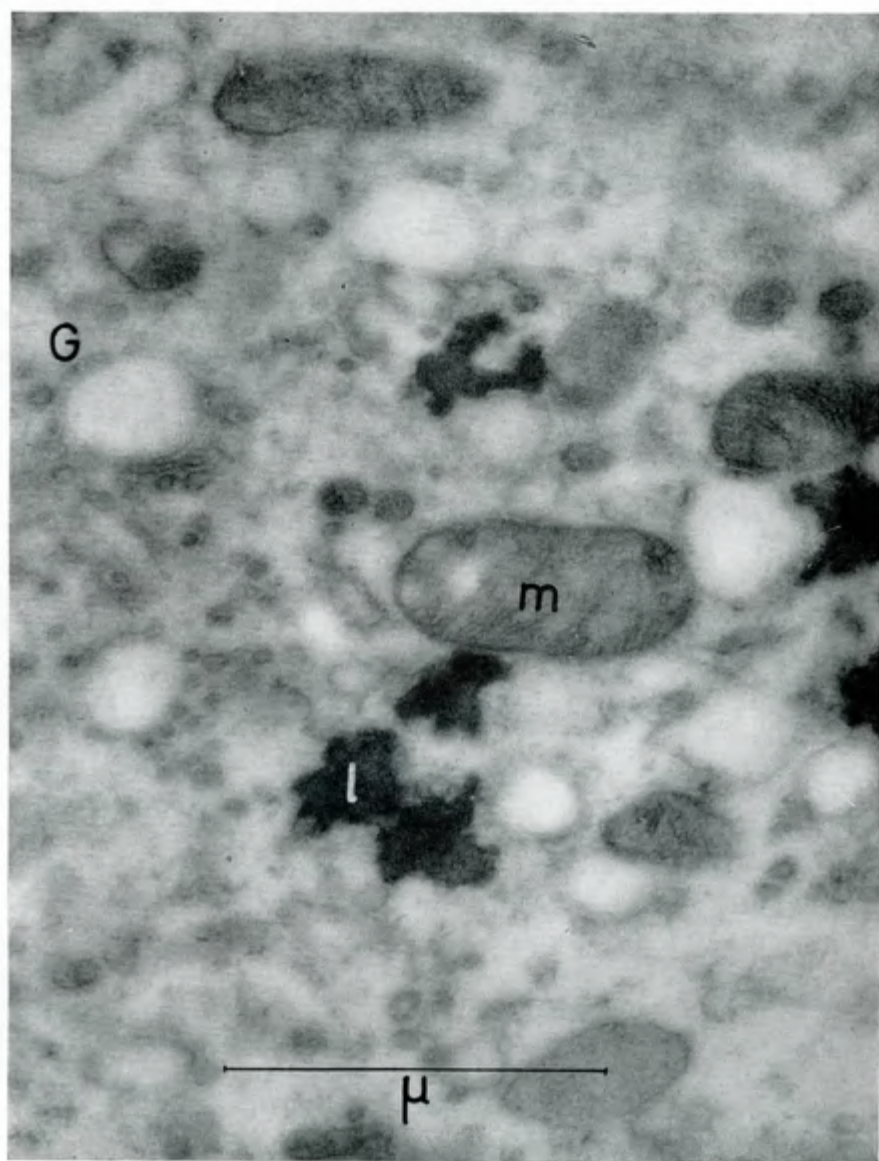


Fig. 4 — Aspecto parcial de uma célula epitelial dos plexos coróideus de embrião de Pinto.
G = aparelho de Golgi — *m* = mitocôndrias — *l* = lípidos — $\times 50.720$

Outro método cuja aplicação combinada com a microscopia electrónica parece susceptível de abrir novos horizontes aos estudos morfológicos e bioquímicos é o da ultracentrifugação diferencial.

A *Claude*, pioneiro simultaneamente da ultracentrifugação e da microscopia electrónica, se deve o mérito de ter despertado por uma série de notáveis trabalhos o interesse por esta técnica.

Na ultracentrifugação os tecidos depois de triturados num homogenizador são submetidos na ultracentrifuga a velocidades de rotação progressivamente crescentes. Os constituintes celulares separam-se e sedimentam por ordem do seu volume e densidade. A partir de um tecido normal obtém-se pois: uma fracção nuclear, uma fracção mitocondrial — grãos de secreção e finalmente a uma velocidade maior — cerca de 130.000 r/m — a fracção dos microsomas. Se se interromper a sedimentação, é pois possível isolar por este método os diferentes constituintes celulares e proceder ao seu estudo separadamente. Pode por exemplo analisar-se a sua composição química. Foi assim que *Claude* ao tentar isolar o vírus do sarcoma de Rous tendo isolado, tanto nos tecidos tumorais, como nos testemunhas, uma fracção constituída por partículas de 70m μ (microsomas) pôde concluir da sua extraordinária riqueza em ácido ribonucleico.

Graças aos progressos, tanto da microscopia electrónica como das técnicas de separação das diferentes fracções, é hoje possível proceder simultaneamente ao estudo morfológico e bioquímico das fracções isoladas por ultracentrifugação. A importância desta técnica é aumentada pela possibilidade de se poderem submeter os constituintes celulares, isolados por ultracentrifugação, a determinadas reacções (acção de certos enzimas) e estudar posteriormente as suas modificações morfológicas.

Vários resultados interessantes foram já obtidos com a associação destas duas técnicas. *Palade* e *Siekewitz* publicaram dois interessantes artigos sobre os microsomas do fígado e do pâncreas, em que integram os resultados da análise bioquímica da fracção microsomial, com a observação ao microscópio electrónico de amostras desta fracção, e ainda com os resultados obtidos pelo estudo da ultra-estrutura de células intactas. Em linhas gerais procederam da seguinte forma: depois de colherem do órgão um pequeno fragmento para observação ao microscópio electrónico, homogeneizaram-no e isolaram por ultracentrifugação a fracção microsomial. Desta fracção colheram uma amostra que foi fixada, incluída e cortada para observação ao microscópio electrónico e fizeram o estudo bioquímico (analítico e quantitativo) na parte restante. Do exame ao microscópio electrónico da amostra da fracção microsomial puderam concluir que é essencialmente constituída por dois elementos:

um membranoso e outro granular. Da análise química concluíram depois de separarem com desoxicolato a porção membranosa da granular, que o ácido ribonucleico se encontra associado com os granulos enquanto que as proteínas, fosfolípidos, hemocromagénico e DPNH — citocromio — e — reductase estão ligados ao componente membranoso.

Integrando os resultados da observação das células e da fracção microsomial ao microscópio electrónico, com a análise bioquímica, estabelecem que a fracção microsomial resulta da fragmentação do retículo endoplásmico e que é nos granulos que está localizado o ácido ribonucleico.

Estes resultados embora ainda sujeitos a discussão são do maior interesse.

A associação ultracentrifugação-microscopia electrónica tem já sido utilizada com bons resultados no estudo de outros problemas. Citam-se por exemplo os interessantes trabalhos de *Novikoff* e de *Siekewitz* e *Watson* no estudo do condrioma.

A associação dos estudos bioquímicos e morfológicos que a microscopia electrónica põe hoje ao nosso alcance, pode em certos casos ser facilitada por uma disposição particular das estruturas que se observam.

Serve de exemplo neste caso o estudo do ciclo do ferro no organismo, problema sobre o qual foram publicados por *Bessis e Breton Gorius* na Europa e por *Richter* na América alguns trabalhos interessantes.

Sendo a molécula da ferritina muito rica em ferro, a dispersão sofrida pelos electrões ao seu nível, torna possível a sua observação ao microscópio electrónico sem qualquer preparação especial. Por outro lado o ferro tem nesta molécula uma disposição característica que permite facilmente a sua identificação.

Bessis e colaboradores observaram em cortes de medula óssea que a fagocitose dos glóbulos vermelhos pelas células reticulares era seguida pelo aparecimento no seu citoplasma de granulações de 50 Å fortemente contrastadas.

Estas granulações observadas com fortes ampliações têm o aspecto característico da molécula da ferritina que foi estudada ao microscópio electrónico em 1954 por *Farrant*.

Segundo *Bessis e Breton-Gorius* depois da fagocitose dos glóbulos vermelhos as células reticulares, repletas de granulações ferruginosas são rodeadas por eritroblastos jovens. As granulações de ferritina são então transferidas das células reticulares para os eritroblastos por um mecanismo que recorda a pinocitose. Posteriormente as granulações ferru-

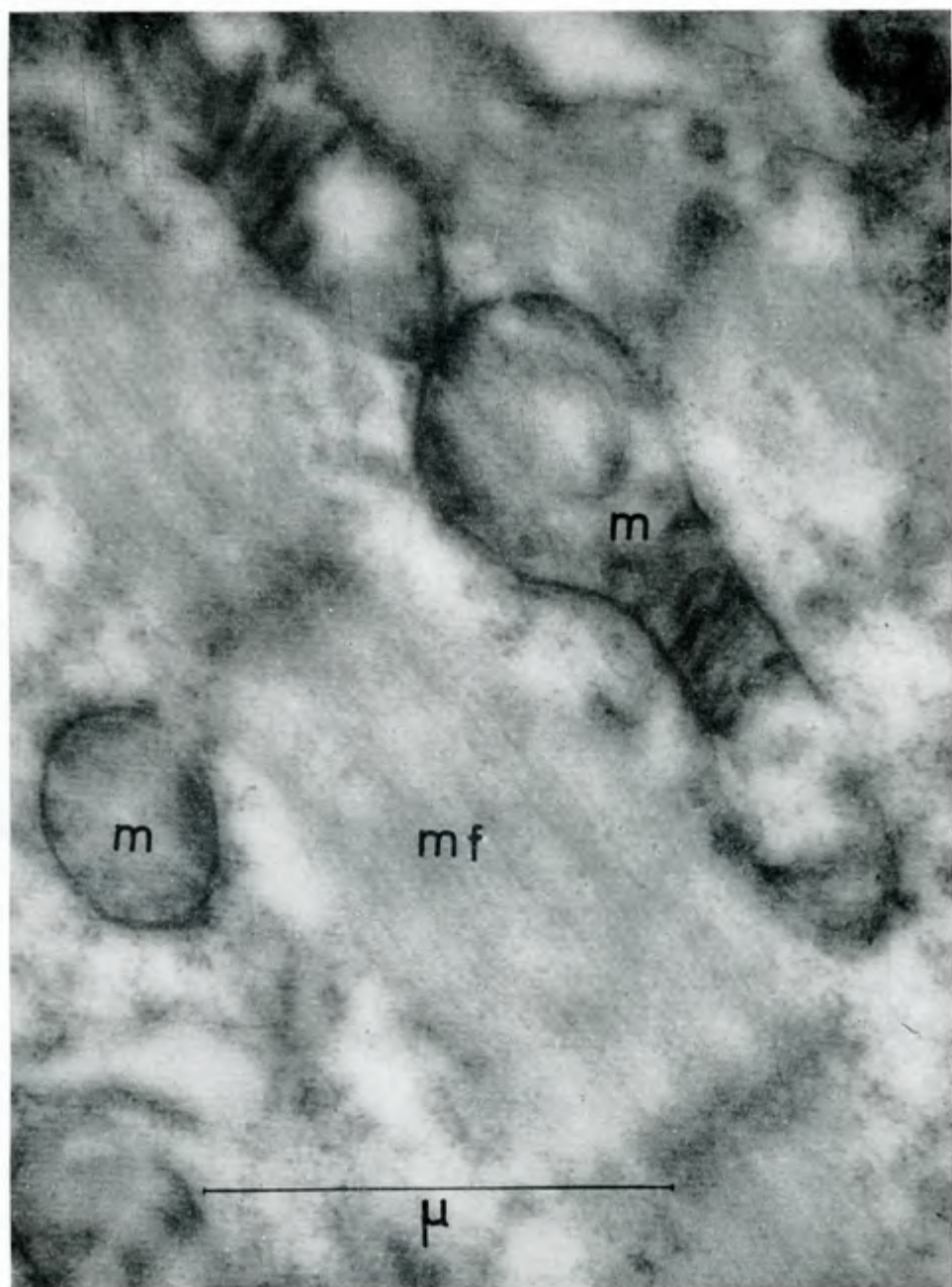


Fig. 5 — Aspecto parcial de uma célula muscular cardíaca de embrião de Rato.
m = mitrocondrias — mf = miofibrilha com miofilamentos — x 63.600

gínosas acumulam-se no interior das mitocôndrias, onde se transformam em grânulos mais finos. Seguidamente as mitocôndrias rebentam dispersando-se pelo citoplasma o material nelas contido que provavelmente vai tomar parte na formação da hemoglobina.

Estas observações, além de esclarecerem certos aspectos da hemossiderose, abrem um caminho sem dúvida muito proveitoso no estudo da fisiopatologia do sangue.

Sendo impossível analisar de forma exaustiva todas as possibilidades da microscopia electrónica na sua aplicação à Biologia, escolhemos na literatura estes exemplos em que se esboçam os indícios de uma das contribuições fundamentais do seu futuro: a integração dos conhecimentos morfológicos e bioquímicos.

Um outro problema em que também lhe está reservado no futuro um papel fundamental, é o do estudo dos vírus. Pela sua importância tanto sob o ponto de vista biológico, como patológico, não podemos deixar de lhe fazer algumas referências.

* Os estudos do vírus do mosaico do tabaco realizados em 1939 por *Kausche* e colaboradores e em 1941 por *Stanley* e *Anderson*, contam-se entre as primeiras observações de material biológico feitas com o microscópio electrónico. A aplicação deste instrumento ao estudo dos vírus é portanto anterior à sua utilização nos estudos citológicos. Por que razão ao falar do futuro da sua aplicação se escolhe este exemplo para realçar a sua importância?

Os vírus pelas suas dimensões e pela sua organização estão situados entre o mundo das moléculas e o mundo das células. Estão como diz *Morand* nos confins da vida. As suas dimensões determinadas pelos métodos da filtração e ultracentrifugação coloca-os na sua maioria fora do alcance do microscópio óptico. O seu estudo morfológico pode pois realizar-se unicamente por intermédio da microscopia electrónica. Mas o que dá hoje uma importância especial à microscopia electrónica e lhe confere um lugar importante no futuro da virologia, deve-se aos progressos realizados na técnica de preparação das células e tecidos. Graças a esses melhoramentos é agora possível estudar os vírus não como partículas isoladas mas nas suas relações com as células e tecidos. Isto é, pode seguir-se morfológicamente a biologia de um vírus.

• • •

Quando em 1949, *Langeron* escreveu no seu *Précis de Microscopie* que «les appareils électroniques ne sont pas des microscopes mais des agrandisseurs» cometeu o erro de esquecer que a qualidade essencial de um microscópio é o seu poder separador.

Os instrumentos que actualmente se podem adquirir permitem já observar partículas de cerca de 15 \AA de diâmetro. Isto significa estarem hoje ao alcance das investigações morfológicas estruturas de dimensões inferiores às de uma molécula proteica. Comparando os limites da microscopia óptica e electrónica facilmente se compreende como é vasto o campo aberto às investigações morfológicas, atendendo mesmo aos obstáculos impostos pela técnica actual.

A interpretação das novas imagens vai obrigar a um largo trabalho de identificação e recenseamento que se vai ainda prolongar alguns anos. Mas para além dos trabalhos em que a microscopia electrónica constitui uma continuação directa da morfologia clássica obtêm-se as perspectivas de uma morfologia molecular. Como diz Bessis ao nível de um \AA , a morfologia, a bioquímica e a fisiologia encontram-se. O futuro desta técnica é pois cheio de promessas. A sua utilização vai sem dúvida marcar de forma profunda os nossos conhecimentos sobre a matéria viva, mas um dia virá em que outra técnica mais potente, rompendo os obstáculos estabelecidos pelos seus limites, permitirá ver ainda mais longe. Como os homens as técnicas têm uma vida: nascem, vivem e morrem.

BIBLIOGRAFIA

- Anderson, T. F., *Phys. Tech. in Biol. Res.*, 3, 178, 1956.
Barnett, R. J., Palade G. E., *J. Biophysic. Biochem. Cytol.*, 3, 589, 1957.
Barnett, R. J., Palade G. E., *J. Histochem. and Cytochem.*, 6, 1, 1958.
Bessis, M. C., Breton-Gorius, J., *Sem. Hop. Path. Biol.*, 33, 2173, 1957.
Bessis, M. C., Breton-Gorius, J., *Sem. Hop. Path. Biol.*, 33, 411, 1957.
Bessis, M. C., Breton-Gorius, J., *J. Biophysic. Biochem. Cytol.*, 3, 503, 1957.
Claude, A., *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 9, 263, 1945.
Claude, A., *Harvey Lectures*, 48, 121, 1947-48.
Cosslett, V. E., *Endeavour*, 12, 153, 1956.
Farrant, J. L., *Biochim. et Biophysica Acta*, 13, 569, 1954.
Van Heurck, H., «Le microscope» 4ed. E. Ramlot, Bruxelas 1891.
Kausche, G. A., Pfankuch, E. Ruska, H., *Naturwissenschaften*, 27, 292, 1932.
Langeron, M., «Précis de microscopie» 7th ed., Masson & C., Paris 1949.
Morand, P., «Aux Confins de la vie», Masson & C., Paris 1955.
Novikoff, A. B., *Symp. of the Soc. Exp. Biol.*, 10, 92, 1957.
Palade, G. E., Siekevitz, P., *J. Biophysic. Biochem. Cytol.*, 2, 671, 1956.
Palade, G. E., Siekevitz, P., *J. Biophysic. Biochem. Cytol.*, 2, 171, 1956.



Fig. 6 — Cílios de uma célula epitelial dos plexos coróideus de embrião de Pinto. — $\times 63.400$

- Richter, G. W., J. Exp. Med., 106, 203, 1957.
- Richter, G. W., J. Biophysic. Biochem. Cytol., 4, 55, 1958.
- Siekevitz, P., Watson, M. L., J. Biophysic. Biochem. Cytol., 2, 653, 1956.
- Siekevitz, P., Palade, G. E., J. Biophysic. Biochem. Cytol., 2, 203, 1958.
- Singer, C., Endeavour, 12, 197, 1953.
- Singer, C., Endeavour, 14, 12, 1955.
- Stanley, W. M., Anderson, T. F., J. Biol. Chem., 139, 325, 1941.
- Thomson, G., Endeavour, 2, 125, 1943.
- Watson, M. L., Siekevitz, P., J. Biophysic. Biochem. Cytol., 2, 639, 1956.
- Williams, R. C., Adv. in Virus Res., 2, 184, 1954.
- Wohlfarth-Botterman, K. E., Proc. Stockholm Conf. Electron Microscopy, 1956, p. 124, Almqvist & Wiksell, Stockholm 1957.

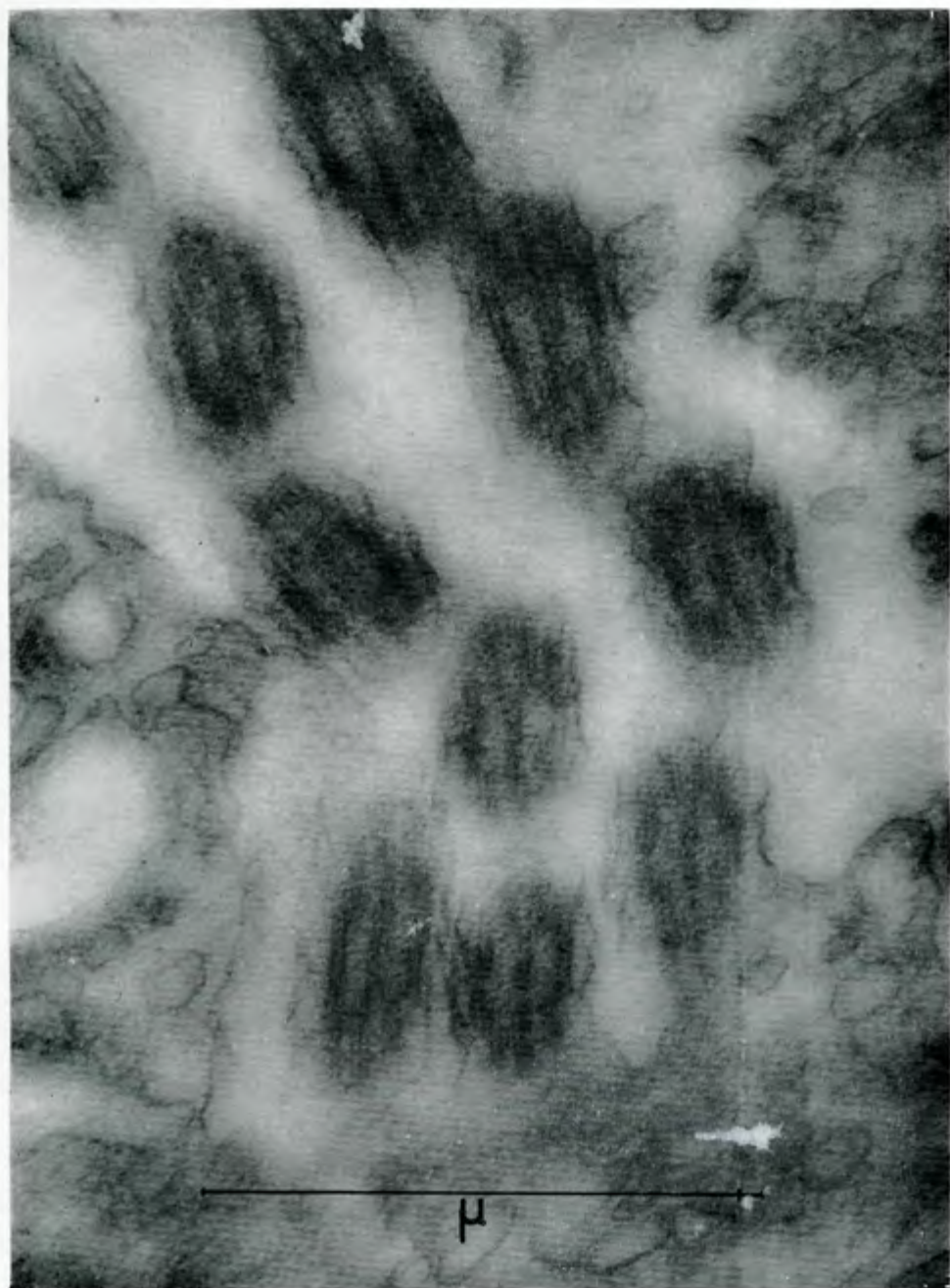


Fig. 7—Cílios de uma célula epital dos plexos coróideus de embrião de Pinto.— $\times 76.000$

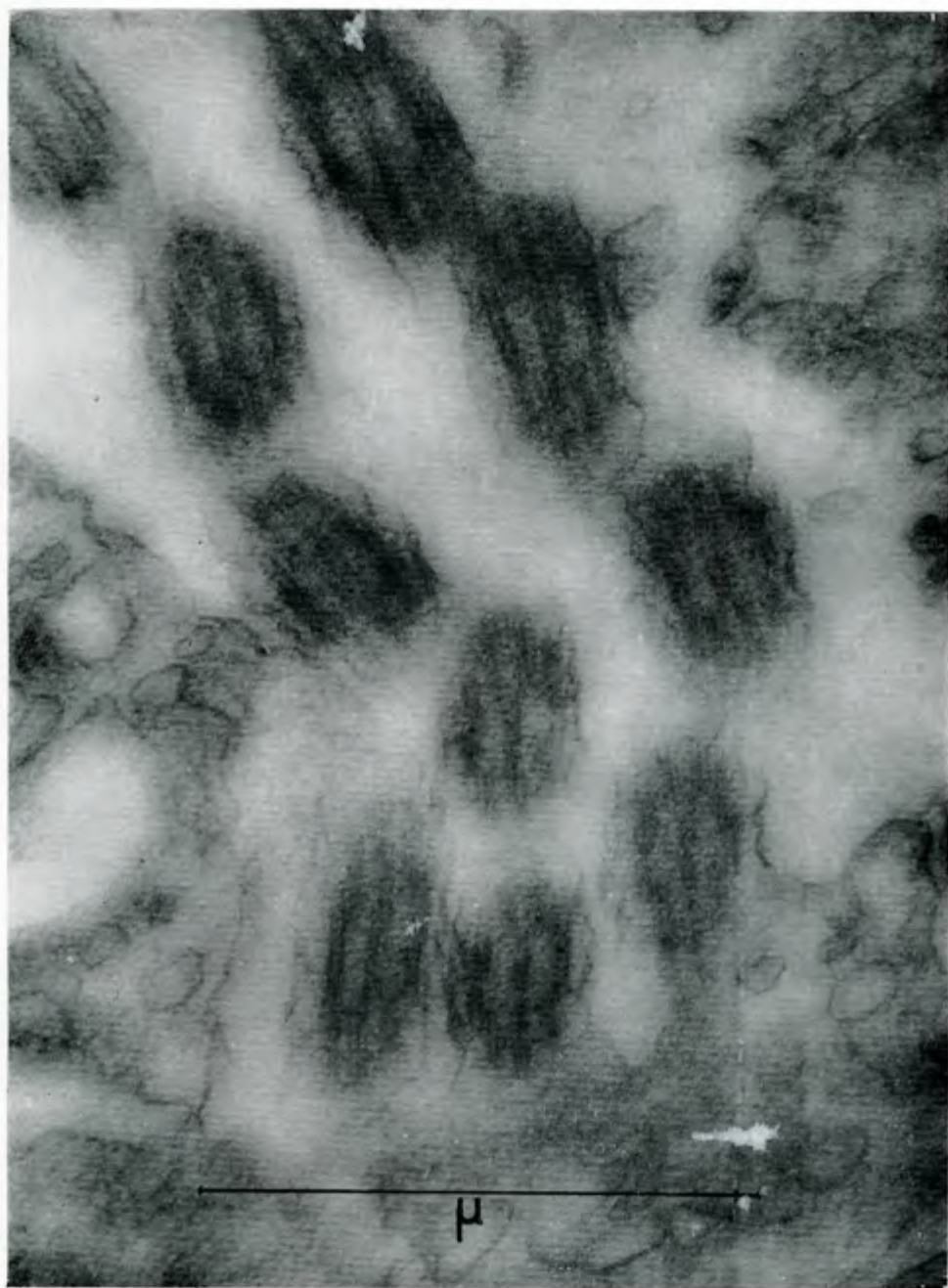


Fig. 7 — Células de uma célula epital dos plexos coróideus de embrião de Pinto. — $\times 76.000$