

**Importância do estudo em Microscopia Eletrónica de
Varrimento de amostras incluídas em parafina para fins de
diagnóstico**

Hélia Henriques Ferreira

Dissertação para obtenção do grau de Mestre em

Tecnologias Biomédicas

Orientadores: Prof. Rogério Anacleto Cordeiro Colaço
Prof. António Pedro Alves de Matos

Júri

Presidente: Prof. Patrícia Margarida Piedade Figueiredo

Orientador: Prof. António Pedro Alves de Matos

Vogal: Prof. Ana Paula Valagão Amadeu do Serro

Novembro de 2016

Abstract

The diagnosis performed in Pathological Anatomy is based on the use of light microscopy, through visualization of cellular changes. However, these changes are not always visible using light microscope (LM), either due to its limitations of resolution, either due to the type of contrast that can be obtained by LM.

Scanning (SEM) or transmission (TEM) electron microscopy assume as a microscopy technique complementary to the diagnostic at Pathological Anatomy and the information gathered from different types of microscopy may also hold a more complete diagnosis. This complementary information obtained with different microscopy techniques is called correlative microscopy.

In this study, comparative observations were made between different biological samples in histological sections by LM and SEM. The sample preparation protocol (thickness, drying and conductivity of the section) has been optimized. The best results were obtained with the following protocol: histological sections of 10 μm thickness, dried with T-butanol and increased of the conductivity with metallic coating. The application of this optimized protocol showed that there is a need for a new protocol optimization in some tissues so that can be used the information in diagnosis.

This study shows that the use of the SEM in the correlative microscopy is executable and provides useful additional information to the diagnosis of Pathological Anatomy when compared to LM, however, the preparation of protocols are depending on the type of tissue that is used and it is important that they are always optimized.

Keywords: Correlative Microscopy; Scanning Eletron Microscopy; Diagnosis; Paraffin-embedded samples

Resumo

O diagnóstico realizado na Anatomia Patológica (AP), baseia-se na utilização da microscopia de luz através da visualização das alterações celulares. No entanto, nem todas as alterações são visíveis usando microscópio de luz (ML), quer devido a limitações de resolução, quer devido a questões relacionadas com o tipo de contraste que pode ser obtido, seja o ML de transmissão ou de reflexão. A microscopia eletrónica, de varrimento (MEV) e a de transmissão (MET), assumem-se assim como técnicas de microscopia complementares ao diagnóstico em AP. Com as informações recolhidas dos diferentes tipos de microscopias poderá, assim, realizar-se um diagnóstico mais completo, sendo essa complementaridade designada por microscopia correlativa.

No presente trabalho foram efetuadas observações comparativas entre diversas amostras biológicas em cortes histológicos por ML e MEV, com o objetivo de desenvolver e consolidar protocolos de microscopia correlativa. Assim, o protocolo de preparação das amostras (espessura, secagem e condutividade do corte) foi otimizado. Os melhores resultados foram obtidos com o protocolo de cortes histológicos de 10 μ m de espessura, secos com T-butanol e aumento da condutividade com cobertura metálica.

O presente trabalho mostra que a utilização do MEV complementarmente à ML na prática do diagnóstico é não só exequível, como proporciona maior interesse e fiabilidade a um diagnóstico mais completo em AP. Contudo, evidenciou que é necessário continuar a desenvolver o trabalho de otimização de protocolos de preparação de amostras para ampliar os tipos de imagens disponíveis para interpretação anátomo-patológica, com reflexo na compreensão do significado das estruturas observadas e consequente impacto nos métodos de diagnóstico.

Palavras-Chave: Microscopia Correlativa; Microscópio Eletrónico de Varrimento; Diagnóstico; Amostras em Parafina

Agradecimentos

Eu gostaria de agradecer a todos aqueles que contribuíram para que fosse possível a realização desta dissertação de mestrado.

Ao Professor António P. Alves de Matos e Professor Rogério Colaço pela orientação deste trabalho. Pela pronta disponibilidade, compreensão e partilha de conhecimento que, sem dúvida, contribuíram para que a realização deste trabalho fosse possível.

Ao Professor Raúl Martins pela orientação e partilha de conhecimento na parte eletrónica deste trabalho.

Aos meus pais, pelo seu encorajamento e carinho que me deram ao longo dos anos, e, principalmente, nestes últimos anos, pois sem eles esta dissertação não seria possível.

Gostaria também de agradecer ao Centro de Microscopia Eletrónica e Histopatologia Egas Moniz da Cooperativa de Ensino Superior Egas Moniz, pela disponibilidade de cedência de espaço e de material biológico de arquivo, bem como ao Instituto Ricardo Jorge - Centro de Estudos de Vectores e Doenças Infecciosas Doutor Francisco Cambournac, em especial à Dr.^a Maria João Alves, pela cedência dos materiais biológicos sobre os quais trabalhei.

Por último, gostaria de agradecer a todos os meus amigos e colegas, que sempre me apoiaram e me ajudaram quando precisei: Maria Inês, João, Tomás, Cristiana, Filipe, Frederico, um muito obrigado.

E a todas as pessoas que não mencionei, mas que sabem que fazem parte da minha vida e me guiaram no caminho certo.

Índice

Abstract	iii
Resumo	v
Agradecimentos	vii
Lista de Figuras	xiii
Lista de Tabelas	xvii
Lista de Abreviaturas	xix
1 Introdução	1
1.1 Âmbito e enquadramento do trabalho	1
1.2 Microscopia	2
1.2.1 Microscopia de Luz	4
1.2.1.1 Microscopia de Luz Polarizada	5
1.2.1.2 Microscopia de Campo Escuro	5
1.2.1.3 Microscopia de Contraste de Fase	6
1.2.1.4 Microscopia de Fluorescência	6
1.2.1.5 Microscopia Confocal	6
1.2.2 Microscopia Eletrónica	6
1.2.2.1 Microscopia Eletrónica de Varrimento	7
1.2.2.2 Microscopia Eletrónica de Transmissão	12
1.2.3 Microscopia Correlativa	13
1.3 Caso de estudo: Tecidos de Rato	16
1.3.1 Tecidos estudados	16
1.3.1.1 Pâncreas	16
1.3.1.2 Coração	16
1.3.1.3 Rim	17
1.3.1.4 Pulmão	17
1.3.1.5 Fígado	18
1.3.1.6 Baço	18
1.3.1.7 Músculo esquelético	18
1.3.2 Variáveis em estudo	19
1.3.3 Considerações éticas	19
2 Técnicas e procedimentos experimentais	21
Parte I	22

2.1	Instalação do detetor de eletrões retrodifundidos	22
2.1.1	Circuito elétrico	22
2.1.2	Amplificadores operacionais.....	23
2.1.3	Realimentação	23
2.1.4	Tipos	24
2.1.5	Descrição do sinal.....	25
2.1.5.1	Entrada analógica BE1	26
2.1.5.2	Entrada analógica BE2	28
2.1.5.3	Entrada analógica BE3	29
2.1.5.4	Fichas de controlo	31
2.1.5.5	Tensão de saída	32
Parte II.....	33
2.2	Preparação de amostras	33
2.2.1	Processamento histológico	33
2.2.2	Secagem.....	34
2.2.2.1	Critical Point Drying	34
2.2.2.2	Hexametildisilazano.....	35
2.2.2.3	Tert-butanol	35
2.2.2.4	Protocolos experimentais.....	36
2.2.3	Condutividade	37
2.2.3.1	Metais	37
2.2.3.2	Líquido Iónico.....	38
2.2.3.3	Protocolo experimental	38
2.3	Procedimento experimental.....	39
3	Resultados	41
3.1	Otimização dos protocolos de preparação das amostras	41
3.1.1	Influência da espessura do corte.....	41
3.1.2	Influência da secagem do corte.....	43
3.1.3	Influência da condutividade do corte	46
3.2	Observações após otimização do protocolo de preparação de amostras	48
3.2.1	Coração	48
3.2.2	Rim	50
3.2.3	Pulmão.....	51
3.2.4	Fígado.....	52
3.2.5	Baço.....	53
3.2.6	Músculo Esquelético	54
4	Discussão.....	55

4.1	Otimização do protocolo.....	55
4.1.1	Espessura do corte	55
4.1.2	Secagem do corte	56
4.1.3	Condutividade do corte	58
4.2	Observações após otimização do protocolo de preparação de amostras	59
4.2.1	Coração	59
4.2.2	Rim	59
4.2.3	Pulmão.....	60
4.2.4	Fígado.....	60
4.2.5	Baço.....	60
4.2.6	Músculo Esquelético	60
5	Considerações finais.....	61
5.1	Conclusão	61
5.2	Sugestões para trabalhos futuros	61
6	Bibliografia.....	62
7	Apêndices	69
7.1	Material, Reagentes e Equipamentos de Proteção Individual	69

Lista de Figuras

Figura 1-1 – Exemplar de um microscópio de luz	4
Figura 1-2 - Esquema exemplificativo dos componentes existentes num MEV [86].....	8
Figura 1-3 – Exemplo de um microscópio eletrónico de transmissão [40]	12
Figura 1-4 - Esquema comparativo das diferentes microscopias - microscopia de luz de transmissão, microscopia eletrónica de transmissão e microscopia eletrónica de varrimento [87].....	13
Figura 1-5 - Glomérulo visto por um ML (360X) [87]	15
Figura 1-6 - Glomérulo visto por um MEV - detalhe podócito (6000X) [87]	15
Figura 1-7- Glomérulo visto por um MET - detalhe podócito (5600X) [87]	15
Figura 2-1 - Esquema representativo de ampop [59]	23
Figura 2-2 - Esquema representativo de um ampop inversor [88]	24
Figura 2-3 - Esquema representativo de um ampop não inversor [88]	24
Figura 2-4 -Ampop conversor de tensão em corrente [59]	24
Figura 2-5 - Esquema do circuito elétrico do amplificador do detetor de eletrões retrodifundidos	25
Figura 3-1 – Porção exócrina e endócrina do tecido pancreático (10X, ML).....	41
Figura 3-2 – Tecido cardíaco (10X, ML).....	41
Figura 3-3 – Diferentes estruturas do tecido renal (10X, ML).....	41
Figura 3-4 – Tecido pancreático a 5 μ m.....	42
Figura 3-5 – Tecido pancreático a 10 μ m.....	42
Figura 3-6 - Tecido pancreático a 15 μ m.....	42
Figura 3-7 – Tecido cardíaco a 5 μ m	42
Figura 3-8 – Tecido cardíaco a 10 μ m	42
Figura 3-9 - Tecido cardíaco a 15 μ m	42
Figura 3-10 – Tecido pancreático a 5 μ m – estrutura tubular.....	43
Figura 3-11 – Tecido pancreático a 10 μ m – estrutura tubular.....	43
Figura 3-12 – Tecido pancreático a 15 μ m – estrutura tubular.....	43

Figura 3-13 – Tecido cardíaco a 5µm sem inclinação	43
Figura 3-14 – Tecido cardíaco a 5µm com inclinação	43
Figura 3-15 – Tecido pancreático a 5µm – estrutura vascular	43
Figura 3-16 – Tecido pancreático a 10µm – estrutura vascular	43
Figura 3-17 – Tecido pancreático a 15µm – estrutura vascular	43
Figura 3-18 – Tecido pancreático tratado com HMDS.....	44
Figura 3-19 – Tecido pancreático tratado com T-butanol.....	44
Figura 3-20 – Tecido pancreático tratado com água	44
Figura 3-21 – Tecido cardíaco tratado com HMDS.....	44
Figura 3-22 – Tecido cardíaco tratado com T-butanol	44
Figura 3-23 – Tecido cardíaco tratado com água	44
Figura 3-24 – Tecido pancreático tratado com HMDS – detalhe de estruturas finas	45
Figura 3-25 – Tecido pancreático tratado com T-butanol – detalhe de estruturas finas.....	45
Figura 3-26 – Tecido pancreático tratado com água – detalhe de estruturas finas.....	45
Figura 3-27 – Tecido cardíaco tratado com HMDS – detalhe de estruturas finas.....	45
Figura 3-28 – Tecido cardíaco tratado com T-butanol – detalhe de estruturas finas	45
Figura 3-29 – Tecido cardíaco tratado com água – detalhe de estruturas finas	45
Figura 3-30 – Tecido pancreático tratado com HMDS – estrutura vascular	45
Figura 3-31 – Tecido pancreático tratado com T-butanol – estrutura vascular	45
Figura 3-32 – Tecido pancreático tratado com água – estrutura vascular	45
Figura 3-33 – Tecido renal tratado com HMDS (FESEM).....	45
Figura 3-34 – Tecido renal tratado com T-butanol (FESEM).....	45
Figura 3-35– Tecido renal tratado com HMDS (FESEM).....	46
Figura 3-36 – Tecido renal tratado com T-butanol (FESEM).....	46
Figura 3-37 – Tecido renal tratado com T-butanol (FESEM) – detalhe podócito	46
Figura 3-38 – Tecido pancreático coberto com crómio.....	47
Figura 3-39 – Tecido pancreático coberto com IL	47
Figura 3-40 – Tecido pancreático coberto com crómio e IL	47
Figura 3-41 – Tecido cardíaco coberto com crómio.....	47
Figura 3-42 – Tecido cardíaco coberto com IL	47

Figura 3-43 – Tecido cardíaco coberto com crómio e IL.....	47
Figura 3-44 – Tecido pancreático coberto com crómio – altas ampliações	47
Figura 3-45 – Tecido pancreático coberto com IL – altas ampliações.....	47
Figura 3-46 – Tecido pancreático coberto com crómio e IL – altas ampliações.....	47
Figura 3-47 – Tecido cardíaco coberto com crómio – altas ampliações.....	47
Figura 3-48 – Tecido cardíaco coberto com IL – altas ampliações	47
Figura 3-49 – Tecido cardíaco coberto com crómio e IL – altas ampliações	47
Figura 3-50 – Tecido pancreático coberto com crómio – diferentes intensidades	48
Figura 3-51 – Tecido pancreático coberto com IL – diferentes intensidades	48
Figura 3-52 – Tecido pancreático coberto com crómio e IL – diferentes intensidades.....	48
Figura 3-53 – Tecido cardíaco (10X, ML).....	49
Figura 3-54 – Vaso (20X, ML)	49
Figura 3-55 – Diferentes orientações das fibras (20X, ML)	49
Figura 3-56 - Baixa ampliação (MEV).....	49
Figura 3-57 – Vaso (MEV).....	49
Figura 3-58 - Diferentes orientações das fibras (MEV).....	49
Figura 3-59 - Fibras longitudinais (MEV)	49
Figura 3-60 – Fibras longitudinais, alta ampliação (MEV)	49
Figura 3-61 – Fibras transversais (MEV)	49
Figura 3-62 – Fibras transversais, alta ampliação (MEV).....	49
Figura 3-63 – Porção medular (10X, ML).....	50
Figura 3-64 – Porção cortical (10X, ML)	50
Figura 3-65 – Glomérulo (20X, ML).....	50
Figura 3-66 – Zona cortical (MEV).....	50
Figura 3-67 – Glomérulo (MEV).....	50
Figura 3-68 – Podócito (MEV).....	50
Figura 3-69 – Podócito – detalhe pedicelo (MEV).....	50
Figura 3-70 – Zona medular (MEV)	50
Figura 3-71 – Túbulos (MEV)	50
Figura 3-72 – Túbulos – detalhe interior (MEV)	51

Figura 3-73 – Alvéolos pulmonares (10X, ML).....	51
Figura 3-74 - Brônquios (10X, ML)	51
Figura 3-75 – Cartilagem (20X, ML)	51
Figura 3-76 - Alvéolos pulmonares (MEV)	52
Figura 3-77 – Pneumócitos (MEV)	52
Figura 3-78 – Bronquíolos (MEV).....	52
Figura 3-79 – Bronquíolo – detalhe da parede (MEV).....	52
Figura 3-80 – Tecido cartilágneo (MEV).....	52
Figura 3-81 – Condrócitos (MEV).....	52
Figura 3-82 – Parênquima Hepático (10X, ML).....	52
Figura 3-83 – Hepatócitos (20X, ML).....	52
Figura 3-84 – Vaso (MEV).....	53
Figura 3-85 – Eritrócitos (MEV)	53
Figura 3-86 – Parênquima hepático (MEV).....	53
Figura 3-87 – Centros germinativos (10X, ML)	53
Figura 3-88 – Células (20X, ML).....	53
Figura 3-89 – Parênquima esplénico (MEV)	53
Figura 3-90 – Células (MEV).....	53
Figura 3-91 – Célula na parede do vaso (MEV).....	53
Figura 3-92 – Tecido muscular (10X, ML).....	54
Figura 3-93 – Fibras longitudinais (MEV).....	54
Figura 3-94 – Fibras longitudinais – detalhe (MEV)	54
Figura 3-95 – Fibras transversais (MEV)	54

Lista de Tabelas

Tabela 2-1 – Cronograma de dissertação de mestrado.....	21
Tabela 4-1- Tabela comparativa entre as diversas espessuras em análise.....	56
Tabela 4-2 - Tabela comparativa entre os diversos métodos de secagem em análise	57
Tabela 4-3 - Tabela comparativa entre os diversos métodos de condutividade em análise	58

Lista de Abreviaturas

Ampop	Amplificador Operacional
AP	Anatomia Patológica
CE	Comum Eletrónico
CLEM	Microscopia de Luz e Eletrónica Correlativa
CPD	Critical-Point Drying
FESEM	Microscópio Eletrónico de Varrimento de Emissão de Campo
FNT	Formaldeído Neutro Tamponado
HE	Hematoxilina-Eosina
HMDS	Hexametildisilazano
IL	Líquido Iónico
MC	Microscopia Correlativa
ME	Microscopia Eletrónica
MET	Microscópio Eletrónico de Transmissão
MEV	Microscópio Eletrónico de Varrimento
ML	Microscópio de Luz
NC	Não conectado
TA	Temperatura Ambiente
TRC	Tubo de Raios Catódicos

1 Introdução

1.1 Âmbito e enquadramento do trabalho

Esta dissertação de mestrado tem como tema genérico a avaliação da importância do estudo de material biológico por Microscopia Eletrónica de Varrimento para fins de diagnóstico em Anatomia Patológica.

O diagnóstico elaborado pela Anatomia Patológica (AP) é efetuado, na sua maioria, utilizando microscópios de luz visível (ML). Contudo, nem sempre é possível diagnosticar por ML todos os tipos de alterações celulares que estão presentes nas amostras biológicas. Assim, o diagnóstico em AP pode beneficiar muito com o recurso à microscopia eletrónica (ME), quer de varrimento (MEV) quer de transmissão (MET).

Na microscopia de luz, as amostras são fixadas em formaldeído neutro tamponado (FNT) e depois processadas de modo a serem incluídas em parafina, para que sejam feitos cortes finos. As amostras incluídas em parafina podem, então, ser guardadas para posterior utilização em novas análises.

Na observação por MET, tem que se mudar o meio de inclusão da amostra para se conseguir fazer cortes ultrafinos [1], e para a observação no MEV, a amostra incluída em parafina pode ser fraturada [2], [3].

À utilização de diferentes tipos de microscopias para retirar diferentes informações das mesmas amostras dá-se o nome de Microscopia Correlativa (MC) [4]. Assim, a mesma amostra é visualizada através de diferentes tipos de microscopia para posterior análise da informação obtida. A correlação desta informação permite fazer um estudo mais completo da amostra [5]–[8]. Contudo, a microscopia eletrónica de varrimento é mais utilizada para dar informação a nível da superfície do tecido que estamos a visualizar, sendo menos utilizada para fornecer informação a nível celular ou, até, intracelular, como acontece com a microscopia eletrónica de transmissão [2]. São raras as vezes em que são usadas técnicas de microscopia eletrónica comparativamente com a microscopia de luz, em AP.

Na microscopia correlativa, é importante garantir que se está a observar a mesma zona da amostra pelas diferentes técnicas de microscopia e isso não é de fácil obtenção [9]. Os protocolos que se encontram estabelecidos para a visualização das amostras nos diferentes microscópios utilizam ou (1) amostras diferentes do mesmo tecido, mas com a garantia que contêm a mesma zona de interesse, ou (2) a alteração da amostra utilizada de modo a que seja reprocessada para ser visualizada por outras técnicas de microscopia. A primeira abordagem implica a existência de diversas amostras, todas semelhantes, mas não garantindo que possuam a região de interesse, enquanto que a segunda implica a existência de só uma amostra, contendo, se possível, a região de interesse [10].

O MEV é um microscópio que permite a visualização da superfície das amostras, criando uma aparência de tridimensionalidade. Contudo, não possui uma resolução tão elevada como a do MET [11]. São várias as metodologias utilizadas nos tecidos biológicos para a visualização da sua estrutura interna com o MEV: fratura da amostra, dissociação ou microtomia [12]. No entanto, a microtomia permite o levantamento de informações utilizando o ML antes do MEV pois o MEV permite a visualização da superfície plana e a posição topográfica da amostra em secção [12].

Assim, é esperado que os procedimentos de rotina da histologia para ML possam facilitar a correlação de imagens do ML com as de MEV e MET, pois estas imagens fornecem um detalhe morfológico completo das superfícies internas e externas das amostras biológicas, o que permite melhorar o diagnóstico dado na AP [2], [13], [14].

A questão de partida deste trabalho é: avaliar o valor do MEV, que é um instrumento especializado no estudo das superfícies, na obtenção de informação importante para o diagnóstico.

Para responder a esta questão, foram estabelecidos os seguintes objetivos:

- Estudar com o MEV as amostras incluídas em parafina para a identificação de informação com significado anátomo-patológico evidenciando a importância da utilização do método;
- Elaborar protocolos de preparação de amostras para a sua observação no MEV, aferindo a qualidade da preservação das amostras através da comparação dos diferentes protocolos;
- Estudar um sistema de deteção de sinal do MEV, realizando *reverse-engineering* no detetor de eletrões retrodifundidos para conceber a sua aplicação ao MEV.

Deste modo, neste trabalho começou-se por tratar de colocar em funcionamento um detetor de eletrões retrodifundidos. Assim, procedeu-se à abertura do amplificador para colocar a descoberto o circuito de modo a elaborar um esquema do mesmo para se perceber como o sinal era gerado e como seria possível inseri-lo e controlá-lo no MEV (parte I).

Após isto, deu-se início à parte da dissertação que corresponde à Microscopia Correlativa propriamente dita, tendo sido efetuado um conjunto grande de observações de tecidos de rato (parte II).

1.2 Microscopia

O olho humano tem um limite de resolução de cerca de 0,2mm, ou seja, não tem a capacidade de distinguir dois pontos que distam entre si menos de 0,2mm [15]. Para conseguir ultrapassar esta barreira, o Homem criou equipamentos de ampliação de imagem, nomeadamente lupas, microscópios e telescópios [15], [16]. No presente trabalho focar-nos-emos sobre os microscópios.

A nível histórico, existem várias pessoas que são tidas como inventoras deste tipo de equipamento, como Galileo Galilei, ou Hans Lippershey (detentor da patente do telescópio). Contudo, é transversal o contributo dos fabricantes de óculos Hans e Zacharias Jansen, que no final do século XVI criaram um instrumento formado por um conjunto de duas lentes que permitia observar os objetos em

tamanho aumentado. Este equipamento foi aperfeiçoado no século XVII pelo físico britânico Robert Hooke. Algumas das observações feitas por Hooke foram posteriormente referidas pelo cientista holandês Anton van Leeuwenhoek, que no final do mesmo século já tinha observado células sanguíneas, bactérias e estruturas dentro das células animais utilizando um microscópio de luz visível [16], [17].

Durante o século XVIII, várias invenções tecnológicas e melhoramentos no design dos microscópios fizeram com que ficassem bastante populares em diversas áreas: biologia, zoologia, geologia, entre outras. Contudo, só no início do século XX é que se descobriu algo que revolucionaria a maneira de ver as amostras ao microscópio. Descobriu-se que, usando elétrons acelerados em vácuo, estes se comportariam do mesmo modo que a luz (fotões). E também se descobriu que usando campos elétricos e magnéticos, era possível controlar a trajetória dos elétrons, da mesma maneira que as lentes de vidro controlam a luz [17]. Essa descoberta resultou na invenção do microscópio eletrônico. O primeiro microscópio eletrônico foi, assim, criado em 1931 por Ernst Ruska e Max Knoll na universidade de Berlim [17], [18].

Os microscópios têm que produzir uma imagem ampliada da amostra, para poder visualizar os detalhes pequenos que a amostra possua com o olho humano [16].

Existem várias categorias de classificação dos diferentes tipos de microscopias: de acordo com o princípio físico que utilizam, como interagem com a amostra, como é feita a observação da mesma ou mesmo a sua área de aplicação. Para o efeito deste trabalho, será feita a classificação tendo em conta a formação da imagem da amostra.

Na biologia, a amostra pode ser observada por transmissão de campo largo, ou seja, a amostra é atravessada pelo feixe e a imagem é formada de uma só vez no olho ou num ecrã. Neste tipo de microscopia incluem-se, a título de exemplo, o microscópio de luz composto, o microscópio de fluorescência e o microscópio eletrônico de transmissão (MET); ou então, a amostra pode ser observada através de varrimento do feixe pela amostra, formando a imagem ponto por ponto, onde se incluem o microscópio confocal ou o microscópio eletrônico de varrimento (MEV).

Na microscopia, a imagem obtida da amostra só estará corretamente focada quando a amostra se encontrar no plano apropriado. Se parte da amostra está acima ou abaixo desse plano, então a parte equivalente na imagem não se encontra focada [15].

1.2.1 Microscopia de Luz

Existem diversos tipos de microscópios de luz, dependendo do modo como o feixe de luz atinge a amostra. O microscópio pode ser usado em modo de transmissão, que é o que acontece no microscópio de luz convencional, ou pode ser em modo de reflexão como o microscópio de luz de dissecação, em que a imagem é ampliada pelas lentes usando a reflexão da luz na superfície da amostra [19]. O ML tem um limite de resolução de aproximadamente 200nm, determinado pelo comprimento de onda mínimo da radiação visível, o que é bastante superior aos 0,2mm do olho humano [15], [18], [20].

O ML (Figura 1-1) é composto por [17], [21]–[23]:

- Base ou pé, que serve de apoio às restantes estruturas;
- Mesa ou platina, onde fica a lâmina a ser observada, que possui uma janela por onde passa a luz;
- Tubo ou canhão, que suporta a lente ocular na extremidade superior;
- Revólver, que é a peça giratória que suporta as objetivas;
- Coluna ou braço, que se encontra fixado à base, servindo de apoio a outros elementos;
- Parafuso macrométrico, que permite movimentos de grande amplitude, rápidos, para a deslocação vertical da platina;
- Parafuso micrométrico, que permite movimentos lentos para focagens mais precisas da amostra;
- Fonte de luz;
- Condensador, lente convergente que orienta e espalha de um modo regular a luz sob o campo de visão;
- Diafragma, que regula a intensidade da luz que incide no campo de visão;
- Lentes objetivas, que se encontram na extremidade mais próxima da amostra e que projetam uma imagem da mesma;
- Lentes oculares, que permitem ampliar a imagem dada pelas objetivas.



Figura 1-1 – Exemplar de um microscópio de luz

O ML é um instrumento que usa a luz visível para produzir uma imagem ampliada da amostra que é depois visualizada num sistema de imagem. A amostra é colocada antes do ponto de foco da lente objetiva e a imagem é depois ampliada pela lente ocular, para um plano conveniente para o utilizador [17], [21]–[23].

Existem dois componentes importantes na formação das imagens: a lente objetiva que recolhe a luz difratada pela amostra e que forma uma imagem real, ampliada e invertida perto da ocular e o condensador que foca o feixe de luz numa pequena área da amostra para que só essa área possa ser analisada [21]–[23].

Para a visualização de amostras neste equipamento, estas têm de ser óticamente transparentes, como é uma secção fina de tecido biológico. Usando diferentes colorações é possível revelar certos componentes da célula, pois as colorações (ou seja, conjuntos de químicos que absorvem a luz em diferentes comprimentos de onda) têm afinidade para zonas específicas da amostra [17].

A coloração utilizada rotineiramente na microscopia de luz para o diagnóstico em AP é a Hematoxilina-Eosina (HE), pois é uma coloração topográfica, ou seja, distingue o núcleo do citoplasma das células. Os núcleos ficam corados de roxo pela Hematoxilina e o citoplasma fica corado de rosa devido à Eosina [24].

Existem várias técnicas de microscopia de luz que podem ser utilizadas atualmente, dependendo do tipo de informação que se pretende obter da amostra.

1.2.1.1 Microscopia de Luz Polarizada

Para este tipo de microscopia é necessário que o microscópio seja equipado com um polarizador (primeiro filtro polarizador), que se encontra posicionado no caminho da luz antes que esta atinja a amostra e com um analisador (segundo filtro polarizador) que é colocado entre as objetivas e as oculares [25].

A luz é polarizada no polarizador e atinge a amostra. Se esta possuir porções cristalinas ou com um padrão regular como por exemplo, colagénio, a luz é polarizada por estas porções. Ao atingir o segundo filtro, as áreas que polarizaram a luz encontram-se mais brilhantes, contra um fundo escuro, sendo fáceis de distinguir [25].

1.2.1.2 Microscopia de Campo Escuro

Para este tipo de microscopia é necessário que o microscópio seja equipado com um condensador especial, que bloqueia a luz que normalmente passa através e em torno da amostra. A imagem é formada pelos raios de luz que foram desviados pela amostra e posteriormente capturados pelas lentes objetivas. A amostra encontra-se, assim, iluminada, fazendo contraste com o fundo escuro [25].

Para se conseguir observar a amostra com este tipo de microscopia, esta deve possuir um índice de refração diferente do meio [25].

1.2.1.3 Microscopia de Contraste de Fase

Para este tipo de microscopia é necessário que o microscópio seja equipado com um sistema de anéis de fase colocados no caminho da luz, nas lentes objetivas e condensador. A luz atravessa as estruturas com diferentes densidades, o que vai levar a que tenham diferentes velocidades, sendo formada da imagem. A interferência entre estes dois caminhos produz imagens cuja densidade das estruturas aparecem mais escuras que o fundo [25].

1.2.1.4 Microscopia de Fluorescência

Para este tipo de microscopia é necessário equipar o microscópio com uma fonte de luz adequada, bem como diversos filtros [25].

A fonte de luz pode provir de lâmpadas de Mercúrio ou de Xénon, pois produzem luz de alta energia e de comprimento de onda curto para excitar os eletrões de certas moléculas da amostra, colocando-os em orbitais mais elevadas. Quando estes eletrões voltam à sua camada de valência, emitem luz de baixa energia e de comprimento de onda longo, normalmente no espectro do visível, formando então a imagem [25].

A existência de filtros permite direcionar e selecionar o tipo de luz que pode excitar a amostra. Existem filtros de excitação, filtros de barreira e espelhos dicromáticos [25].

1.2.1.5 Microscopia Confocal

O microscópio utilizado na microscopia confocal é muito semelhante ao da microscopia de fluorescência.

Um laser emite um feixe de luz que incide no espelho dicróico e, de seguida, na objetiva. Esta converge a luz para um único ponto na amostra. Há medida que a luz atinge a amostra, fótons fluorescentes são emitidos e alguns entram pela lente objetiva. Outros passam pela *pinhole* (abertura) e são captados pelo fotomultiplicador. O fotomultiplicador transforma o sinal luminoso em sinal elétrico que será analisado por um computador.[23]

O microscópio digitaliza assim a amostra sequencialmente, ponto por ponto e reúne os pixéis numa imagem. Deste modo, as seções ópticas da amostra são imagens com grande contraste e resolução nos eixos X, Y e Z [21].

1.2.2 Microscopia Eletrónica

A microscopia eletrónica utiliza outra fonte de radiação que não a luz (fótons). Neste caso utiliza-se um feixe de eletrões que irá interagir com a amostra. No entanto, as amostras para o MEV têm que ser tratadas por forma a estar estáveis em vácuo e devem ser condutoras, e para o MET, além destas duas condições, também têm que ter a espessura adequada. Estas duas condições (estabilidade em vácuo e condutividade) condicionam fortemente os protocolos de preparação de amostras histológicas para microscopia eletrónica. Será este um dos assuntos centrais abordados nesta tese.

Não obstante a complexidade do protocolo de preparação de amostras histológicas para microscopia eletrónica, esta apresenta como vantagens em relação ao ML, uma resolução espacial muito superior, bem com uma profundidade de campo muito maior [19], [20].

1.2.2.1 Microscopia Eletrónica de Varrimento

O MEV é um dos instrumentos mais versáteis disponível para o estudo e análise de características estruturais e topográficas [18], [26], [27]. A apresentação característica da imagem tridimensional da amostra é o resultado da grande profundidade de campo deste equipamento, bem como o efeito sombra-relevo do contraste de eletrões. Uma outra maneira de obter este tipo de informação tridimensional com este nível de resolução é possível através da reconstrução da estrutura a partir de secções seriadas (secções seguidas) observadas em MET [27].

A primeira vez que um MEV foi utilizado na observação de amostras foi entre as décadas de 30 e 40 do século XX. Em 1938, von Ardenne estabeleceu os princípios básicos do MEV, como por exemplo, a formação do feixe e a sua deflexão, a posição dos detetores e como amplificar o sinal do fluxo de eletrões [28]. Depois, Zworykin e a sua equipa nos RCA Research Laboratories construiu um MEV que tinha uma resolução de 50nm [28].

Em 1948 a investigação com o MEV foi novamente retomada na Universidade de Cambridge por Charles Oatley. Oatley, juntamente com os seus estudantes, construíram cinco MEV. O primeiro destes equipamentos demonstrou como o MEV pode revelar a natureza tridimensional das superfícies [29]. Em 1965 foi produzido o primeiro MEV comercial [28].

1.2.2.1.1 Funcionamento

No MEV, um feixe de eletrões altamente focado percorre a superfície das amostras ponto por ponto, linha a linha. Os eletrões secundários ou retrodifundidos pela amostra são detetados por detetores de eletrões, sendo este sinal tratado por forma a criar uma imagem pixel por pixel num ecrã [30], [31].

O MEV possui vários componentes que são essenciais ao seu funcionamento:

O canhão de eletrões, produz e acelera eletrões até à amostra. O canhão pode ter dois tipos de emissão, (1) termoemissão - de tungsténio ou hexaboreto de lantânio - e (2) de emissão de campo. Para que os eletrões se propagem sem que ocorra dispersão é necessário criar vácuo ao longo da coluna [18].

Cada MEV possui um conjunto de lentes, para permitir que o feixe de eletrões seja focado na amostra. Para fazer isso, recorre-se a um campo eletrostático ou eletromagnético [18]. As lentes condensadoras são aquelas que convergem e colimam o feixe de eletrões, controlando a dimensão da sonda. As lentes objetivas são aquelas que dirigem o foco de eletrões para o local a analisar na amostra [18].

Uma escolha apropriada de lentes resulta na redução do diâmetro do feixe de eletrões na amostra e, conseqüentemente, uma melhoria na resolução da imagem, pois são usadas para focar e definir o feixe [18].

Na maioria dos MEV, o sistema de vácuo é composto por uma bomba difusora que tem uma bomba rotativa a apoiá-la e que permite que haja vácuo quer na coluna quer na câmara [32].

O sistema de varrimento permite que seja formada uma imagem da amostra. Para tal, o feixe de eletrões faz o varrimento da amostra horizontalmente em direções perpendiculares (X e Y). O procedimento denomina-se *raster scanning* e faz com que o feixe cubra uma área retangular das amostras. Os *outputs* dos geradores X e Y são aplicados a um equipamento que forma e faz o *display* da imagem, tal como acontece num tubo de raios catódicos (TRC). O feixe de eletrões do TRC apresenta um sincronismo exato com o feixe do MEV, de forma que cada ponto da amostra (dentro da área do *raster scan*) seja equivalente a um ponto no *display* da imagem [17].

A câmara onde é colocada a amostra é um espaço livre, imediatamente abaixo da lente objetiva, onde estão posicionados todos os detetores usados no microscópio - detetores de sinal de eletrões e detetores de raios-X - bem como onde é possível movimentar a amostra e onde é necessário criar o vácuo [18] (Figura 1-2).

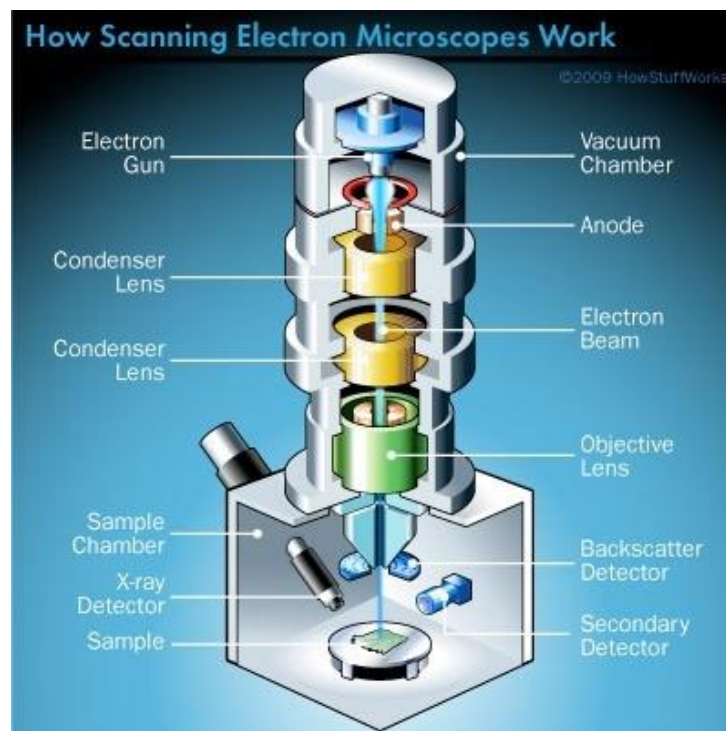


Figura 1-2 - Esquema exemplificativo dos componentes existentes num MEV [86]

1.2.2.1.2 Modos de imagem

A formação da imagem no MEV está dependente da aquisição dos sinais produzidos a partir da interação do feixe de eletrões com a amostra. A existência de detetores dos diversos sinais emitidos é o que permite a visualização das imagens.

A interação do feixe de eletrões com a amostra ocorre dentro de um volume de excitação na superfície da mesma. A profundidade desse volume está dependente da composição sólida da amostra, da energia do feixe incidente e do ângulo incidente.

Existem dois tipos de processos de *scattering*, ou espalhamento: processos elásticos e inelásticos. Os processos elásticos são aqueles em que os eletrões conservam toda a sua energia, resultando na produção de eletrões retrodifundidos quando os eletrões viajam de volta para a superfície da amostra e escapam para o vácuo. Os processos inelásticos são aqueles em que os eletrões perdem energia acabando por excitar a estrutura das amostras. Quando estes eletrões de baixa energia escapam para o vácuo, são chamados de eletrões secundários [18].

Eletrões Secundários

O *scattering* inelástico é responsável pela transferência de energia que pode resultar na emissão de radiação secundária [33]. Os eletrões secundários são definidos na base da sua energia cinética, isto é, são todos os eletrões emitidos, a partir da amostra, com uma energia inferior a 50 eV [34]. Estes são produzidos pelas interações entre os eletrões energéticos do feixe e os eletrões de fraca ligação dos metais utilizados no revestimento da amostra. Se os eletrões tiverem energia suficiente, haverá ionização das camadas de valência dos átomos. Durante este fenómeno existe a ejeção de eletrões que possuem uma determinada energia cinética e que vão atingir o detetor [35].

Em média, os eletrões secundários são gerados a baixa profundidade. A maioria destes entram em repouso após a interação com a amostra. Pelo contrário, aqueles criados próximos à superfície podem escapar para o vácuo, especialmente se no início se deslocavam em direção à superfície [34], [36].

Para detetar os eletrões, eles são primeiramente atraídos para um elétrodo de malha de arame carregado positivamente. Como a maioria dos eletrões passa pela malha, eles são acelerados para o cintilador que também está carregado positivamente. O cintilador converte a energia dos eletrões em fótons, fótons esses que vão até ao fotomultiplicador, que converte a energia dos fótons em eletrões novamente, sendo depois projetados num ecrã. O detetor mais comum de se encontrar num MEV é o Everhart-Thomley [17], [18].

Na prática, há geralmente alguma assimetria devido ao facto de o detetor de eletrões secundários estar localizado para um dos lados da câmara. As características de superfície que são inclinadas em direção ao detetor aparecem especialmente brilhantes porque os eletrões emitidos por estas regiões têm uma maior probabilidade de alcançar o detetor. Este facto pode ser utilizado para distinguir características salientes e depressões na superfície da amostra. Como resultado, a imagem tem uma aparência tridimensional, semelhante ao de uma superfície áspera obliquamente iluminada pela luz, o

que faz com que o contraste topográfico seja relativamente fácil de interpretar [34]. Os elétrons secundários são principalmente usados para o contraste topográfico, ou seja, para a visualização da textura e rugosidade da amostra. A visualização de uma imagem topográfica depende do número de elétrons que atinjam o detetor [18].

Elétrons Retrodifundidos

Os elétrons retrodifundidos são elétrons provenientes do feixe gerado no canhão de elétrons que são projetados de uma amostra por *scattering* elástico, saindo da amostra com energia próxima da energia do feixe primário. Assim, podem ser distinguidos dos elétrons secundários utilizando por base a sua energia cinética [17], [34], [35].

Outra característica dos elétrons retrodifundidos é a relação com o número atômico dos elementos da amostra: o coeficiente de retrodifusão (fração de elétrons do feixe primário que saem da amostra como elétrons retrodifundidos) aumenta para números atômicos elevados, sendo quase linear para números atômicos baixos. Deste modo, o contraste existente nas imagens obtidas através dos elétrons retrodifundidos traduz variações na composição atômica da amostra. As zonas com elementos de maior número atômico surgem mais claras neste tipo de imagem [17], [34], [35].

Existe ainda outra diferença entre os dois tipos de imagens, relativa à profundidade de onde é obtida a informação da imagem. No caso da imagem por elétrons retrodifundidos, o sinal provém de cerca de metade da profundidade de penetração do feixe primário, superior às imagens por elétrons secundários.[34]

O detetor usado para os elétrons retrodifundidos é um pouco diferente do usado para os elétrons secundários, pois está carregado negativamente para evitar que os elétrons secundários sejam atraídos para ele. Apenas os elétrons que viajam num caminho reto da amostra para o detetor é que vão formar a imagem dos elétrons retrodifundidos [18]. Os elétrons podem ser detetados por um cintilador/fotomultiplicador, se este estiver carregado negativamente. Os elétrons são captados se estes colidirem diretamente no colimador [17]. Existem dois tipos de detetor - Robinson e Solid State - e são montados entre a objetiva e a amostra. O modo de funcionamento do primeiro (Robinson) é semelhante ao Evertart-Thomley. O segundo é um detetor semiconductor; se um elétron chegar ao detetor e atravessar a região de transição do semiconductor, a energia que ainda lhe resta é usada para excitar os elétrons de valência da banda condutora, criando a mobilidade de elétrons, e conseqüentemente, a mudança dos locais das lacunas [17].

O sinal obtido pelos elétrons retrodifundidos contém pouca informação sobre a topografia do material, mas fornece informação química devido às diferenças dos números atômicos dos materiais que constituem a superfície da amostra. Também a orientação dos planos cristalinos do material, relativamente ao feixe de elétrons incidente, afeta a penetração do feixe na amostra, através do efeito de difração, que fornece alguma informação relativamente à orientação dos diferentes planos numa amostra policristalina [34].

A imagem dada pelos elétrões retrodifundidos permite, assim, identificar a existência partículas na amostra, bem como a sua composição química relativamente ao que as envolve, e ao mesmo tempo, ter a sua localização na amostra.

Espectroscopia de dispersão de energia

A espectroscopia de dispersão de energia de radiação-X é uma técnica microanalítica qualitativa e quantitativa que consegue fornecer informação da composição química de elementos com números atômicos superiores a três. Os elétrões do feixe primário penetram na amostra e interagem com os átomos de que esta é feita, resultando em dois tipos de radiação-X: *bremstrahlung* de radiação-X e radiação-X característica [37].

Quando um elétron da camada interna é deslocado pela colisão com o elétron do feixe, um elétron da camada mais exterior vai decair para a camada interna que perdeu o elétron para repor o equilíbrio de cargas nas orbitais do átomo, levando a um evento de ionização. Assim, através da emissão de um fóton de raio-X, o átomo ionizado volta ao seu estado base. Adicionado aos picos de radiação-X característica, um fundo contínuo é gerado através da desaceleração de elétrões de elevada energia - *bremstrahlung* de radiação-X [18]. Esta radiação-X é detetada por um detetor que vai mostrar o sinal na forma de um espectrograma de intensidade *versus* energia da radiação-X. A energia adquirida da radiação-X característica permite que os elementos que constituem a amostra sejam identificados e as suas concentrações quantificadas graças aos picos existentes no espectrograma [37]. A resolução espacial depende do tamanho do volume de interação com a amostra, que é controlado pela tensão de aceleração e a média de números atômicos dos elementos existentes na amostra [37].

1.2.2.1.3 Tipos

Dependendo do tipo de amostras que se podem ver, existem vários tipos de MEV. Assim, é possível distinguir três tipos de MEV:

- O MEV convencional é aquele em que é utilizado na obtenção de imagens de rotina, usando vários tipos de detetores. É necessário utilizar uma amostra seca e condutora, sendo muitas vezes necessário prepará-la para que apresente estas qualidades. A amostra deve ser capaz de suportar elevado vácuo, pois este é necessário para que o feixe de elétrões não disperse [38];
- O MEV de emissão de campo (FESEM, do inglês Field Emission Scanning Electron Microscope) é semelhante ao MEV convencional, tendo uma fonte de elétrões diferente. É usado com o canhão de elétrões de emissão de campo. Como contrapartida, este tipo de MEV necessita de condições de maior vácuo que as utilizadas no MEV convencional [39];
- O MEV ambiental, também chamado de MEV de baixo vácuo, após terem sido focados pela lente objetiva, os elétrões do feixe encontram apenas moléculas gasosas durante os últimos milímetros da sua jornada. O gás que se encontra na zona da amostra, é, normalmente, vapor de água, o que permite a utilização de amostras que não foram secas para a sua visualização no microscópio [17].

1.2.2.2 Microscopia Eletrónica de Transmissão

Neste trabalho, devido a questões de tempo, acabou por não se efetuar observações por MET. Contudo, justifica-se uma breve descrição do mesmo, uma vez que este tipo de microscopia permite complementaridade nas observações de amostras biológicas entre ML e MEV.

O modo de funcionamento do MET é muito semelhante ao do microscópio de luz convencional, tendo como grande diferença o facto de a fonte de radiação serem eletrões e não luz (fotões) [15].

Nas décadas de 1950 e 1960 foram comercializados os primeiros microscópios eletrónicos de transmissão. As diversas lentes - condensador, objetiva e projetora - atuavam no feixe de eletrões e produziam a imagem ampliada da amostra que transmitia parte do feixe [19].



Figura 1-3 – Exemplo de um microscópio eletrónico de transmissão [40]

O MET (Figura 1-3) tem diversos componentes que serão descritos de seguida [40]:

- Canhão de eletrões – é onde se gera o feixe de eletrões, sendo normalmente colocado no topo da coluna. Os tipos de canhões são semelhantes entre o MET e o MEV;
- Coluna – é onde se encontra o canhão de eletrões, as diversas lentes eletromagnéticas e o porta-amostras e é onde é formado o vácuo;
- Lentes eletromagnéticas – é o que direciona o feixe de eletrões;
- Detetores – o detetor mais utilizado no MET é o sistema de espectroscopia de dispersão de energia de radiação-X, que também se pode encontrar no MEV;
- Porta-amostras – onde são colocadas as grelhas para a visualização das amostras em vácuo. O porta-amostras possui um ou dois poços numa das extremidades onde é colocada a grelha que tem a amostra;
- Painel de controlo – que controla os campos gerados pelas lentes para focar a amostra, bem como todas as outras características necessárias para uma boa qualidade de imagem;

- Câmara de visualização – encontra-se no fundo da coluna com uma janela e com um par de binoculares ajustáveis. A imagem da amostra é projetada no ecrã fluorescente existente na câmara.

As amostras, para serem vistas por este microscópio, têm que ser finas o suficiente para que o feixe de eletrões as atravesse, sendo a sua espessura da ordem dos 50 a 90nm. Podem ser montadas em grelhas de cobre e cobertas com carbono [19].

1.2.3 Microscopia Correlativa

A Microscopia Correlativa (MC) (Figura 1-4) é uma metodologia que junta as diversas capacidades dos sistemas de microscopia anteriormente descritos para observar uma mesma amostra. Com a combinação de toda a informação obtida, é feito um estudo de maior abrangência da amostra [4]–[6]. Isto porque diferentes tipos de microscópios dão diferentes informações, logo, é possível realizar um estudo muito mais completo da amostra do que se só se utilizar um tipo de microscópio [5].

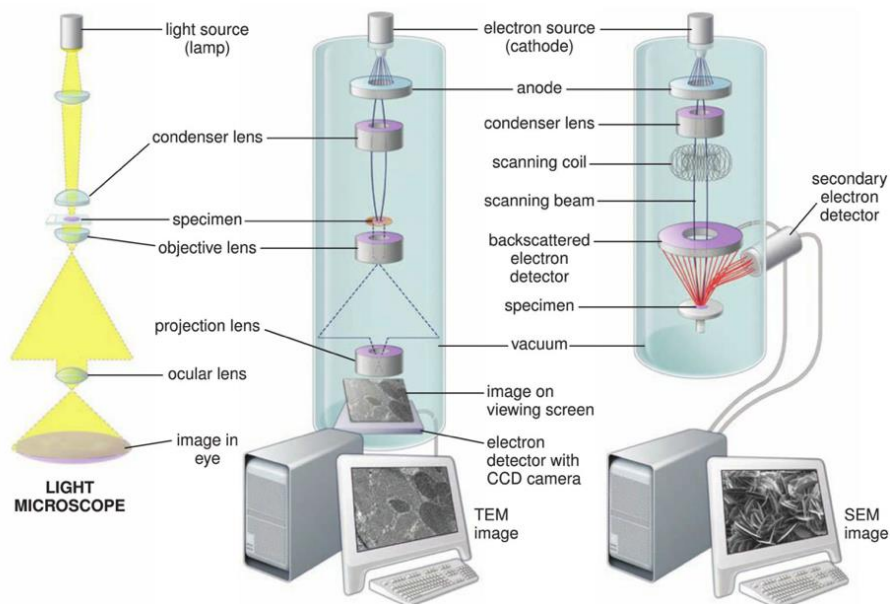


Figura 1-4 - Esquema comparativo das diferentes microscopias - microscopia de luz de transmissão, microscopia eletrônica de transmissão e microscopia eletrônica de varrimento [87]

A MC tem como características [41]:

1. A identificação da região de interesse;
2. A colocação do alvo numa região mais ampla;
3. A identificação de diversas informações a partir das diferentes técnicas;
4. A procura de uma melhor resolução utilizando a ME, que fornece detalhe ultraestrutural.

Esta metodologia tem bastante importância na área das ciências biomédicas, pois é possível fazer uma compilação correlativa da informação estrutural a nível tecidual, celular e até molecular [4], [42].

Quando se fala de MC, qualquer combinação entre dois ou mais dos sistemas de imagem que utilizem luz, elétrons, raios-X ou mesmo ressonância magnética são possíveis [41], [42]. Contudo, o que é mais comum se encontrar na bibliografia é a combinação entre a microscopia de luz visível e a microscopia eletrônica - microscopia de luz e eletrônica correlativa (CLEM do inglês *correlative light and electronic microscopy*). A combinação destes dois métodos permite a visualização da célula para encontrar um evento raro num tecido e identificar o local para posterior visualização em alta resolução com a microscopia eletrônica [6], [8], [42]–[46]. Isto porque a microscopia eletrônica tem como grandes limitações o campo de visão restrito e de não ser possível ver organismos vivos [5], [8], [42].

A utilização da CLEM em amostras biológicas foi feita, pela primeira vez, ainda na década de 1970, quando se correlacionou tecidos onde tinha sido feita imunohistoquímica para microscopia de luz e depois foram vistos em microscopia eletrônica [47].

A utilização da CLEM com instrumentos separados tem diversos obstáculos que precisam de ser superados: o reconhecimento e a localização da região de interesse nos dois tipos de microscopia e observação da amostra nos dois microscópios [48]. Assim, a maneira mais fácil de correlacionar é usando a informação obtida após a aplicação de protocolos diferentes a amostras similares, e não a mesma amostra, ou seja, amostras paralelas que não foram preparadas de forma idêntica [8], [10].

Há quem defenda que só quando se utiliza a mesma amostra é que se deve utilizar o termo de microscopia correlativa, pois só assim é possível estudar a mesma estrutura existente na mesma região da mesma amostra [9].

Recentemente, têm sido criados diversos equipamentos na tentativa de que a mesma amostra possa ser observada nos dois tipos de microscópios [49]. No entanto, a ideia não é nova, pois já em 1982 um instrumento foi construído para facilitar o diagnóstico, só que não chegou a ser comercializado [42].

Para a realização de alguns diagnósticos, atualmente, recorre-se à MC entre a microscopia de luz e a microscopia eletrônica (de transmissão) de amostras que podem ou não ser exatamente a mesma [9]. Quando a amostra é exatamente a mesma, o que se costuma fazer é retirar a área de interesse do bloco de parafina, reincluí-lo em resina e depois, analisar secções semi-finas de amostra em resina para novamente analisar a área ao ML, para localizar a região de interesse e realizar, então, as secções ultrafinas para a microscopia eletrônica [41].

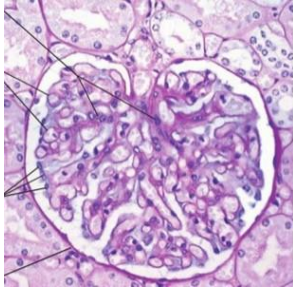


Figura 1-5 - Glomérulo visto por um ML (360X) [87]

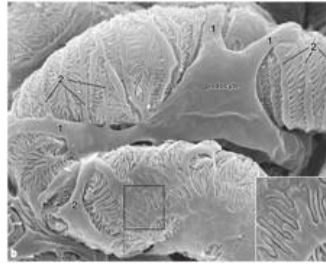


Figura 1-6 - Glomérulo visto por um MEV - detalhe podócito (6000X) [87]

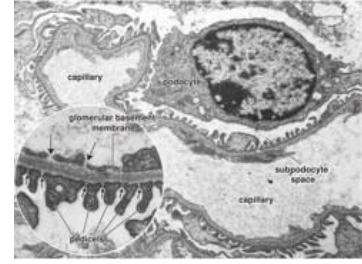


Figura 1-7- Glomérulo visto por um MET - detalhe podócito (5600X) [87]

Quando se fala em microscopia correlativa em diagnóstico, fala-se da possibilidade de utilizar a microscopia de luz e eletrônica. O que acontece é que se utiliza a microscopia de luz de transmissão e a microscopia eletrônica de transmissão, pois é o mais tradicional - realização de secções das amostras para ver ao microscópio. No entanto, existem diferenças na resolução e na área de observação da amostra quer para o ML quer para o MET [50]. Para ultrapassar essas diferenças, pode-se utilizar o MEV, pois possui uma gama de resolução que varia quase desde a resolução do ML até a do MET, além de que apresenta um tipo de imagem diferente daquele que é obtido pela microscopia de transmissão, porque dá informação sobre a topografia da amostra, bem como de material estranho presente, mesmo quando se possa estar a falar de cortes histológicos [12], [27] (Figura 1-5, Figura 1-6 e Figura 1-7).

Para se estabelecer um critério válido para diagnóstico com MEV, é necessário que as observações neste microscópio sejam bem documentadas com estudos na microscopia de transmissão da mesma amostra, pois só assim é possível melhorar a precisão do mesmo [14], [51].

1.3 Caso de estudo: Tecidos de Rato

Neste trabalho foram utilizados os tecidos incluídos em parafina existentes no arquivo do laboratório no Centro de Microscopia Eletrónica e Histopatologia Egas Moniz da Cooperativa de Ensino Superior Egas Moniz. Nas amostras foram executados cortes seriados: um corte para a visualização no ML e os restantes para o estudo das características do tecido em MEV. Por cada característica, realizou-se um corte para ML, para comparação das estruturas existentes nos diversos cortes.

Para maior controlo de todas as fases pelo qual o tecido passa na rotina histológica, foram cedidos pelo Instituto Ricardo Jorge – Centro de Estudos de Vectores e Doenças Infecciosas Doutor Francisco Cambournac alguns tecidos de rato. Estes tecidos foram fixados em FNT, sofrendo um processamento para que ficassem incluídos em parafina. Após a sua inclusão em parafina, foram cortados para as duas microscopias utilizadas: ML e MEV.

1.3.1 Tecidos estudados

1.3.1.1 *Pâncreas*

O pâncreas é uma glândula tanto endócrina como exócrina [52].

O pâncreas é revestido por uma cápsula de tecido conjuntivo e é dividido em lóbulos, que são acumulações densas de glândulas exócrinas, que muitas vezes envolvem os ilhéus [53].

A porção exócrina do pâncreas é formada a partir de conjuntos de glândulas tubuloacinares que estão agregados em lóbulos. São compostos por grandes células epiteliais secretoras piramidais que rodeiam e definem um lúmen, agrupados em ácinos. A orientação luminal pode não ser reconhecida devido à natureza bidimensional dos cortes histológicos. Na superfície luminal as células estão ligadas entre si e na superfície basal são suportados por uma lâmina basal [52], [53]. As células acinares podem ser binucleadas, com complexos de Golgi e retículo endoplasmático proeminentes e o citoplasma apresenta grandes quantidades de grânulos eosinófilos segregados [52], [53].

A parte endócrina é composta por grupos de células endócrinas com a sua rede capilar - ilhéus de Langerhans - que se encontram incorporados no meio do tecido acinar. Os ilhéus de Langerhans são compostos por várias combinações de dois tipos de células endócrinas: as células alfa que segregam glucagon e ocupam a periferia do ilhéu e as células beta que segregam insulina, são mais numerosas e preenchem o centro do ilhéu [52], [53].

1.3.1.2 *Coração*

O coração é um órgão muscular oco que se encontra rodeado por um tecido fibroelástico - pericárdio. A parede do coração é constituída por três camadas distintas: endocárdio, miocárdio e epicárdio. O endocárdio é a camada interior que reveste as câmaras e que cobre as válvulas. O miocárdio é a camada intermédia constituída por músculo cardíaco. O epicárdio é camada externa composta por mesotélio e tecido conjuntivo, que cobre a superfície do coração como o pericárdio visceral. A cavidade do pericárdio, preenchida com fluído, separa o pericárdio do epicárdio [52].

A maior parte do miocárdio é composto pela grande área eosinófila do citoplasma dos cardiomiócitos. O núcleo dos cardiomiócitos é grande, retangular e contém cromatina granular e pode conter um ou dois nucléolos. Entre cardiomiócitos está um interstício delicado com fibroblastos e capilares revestidos com células endoteliais. Os fibroblastos e as células endoteliais são semelhantes entre si quando visualizadas em ML, têm um citoplasma escasso e um pequeno núcleo ovalóide densamente basófilo [53].

O epicárdio e o endocárdio são muito finos, por vezes, da espessura de uma camada de células [53].

O sistema de condução do impulso do coração é composto por fibras musculares cardíacas especializadas que são estimuladas por nervos do sistema nervoso autónomo. Este sistema possui o nódulo sinusal, o nódulo auriculo-ventricular e as fibras de Purkinje [52].

1.3.1.3 Rim

O rim é um órgão em forma de feijão e coberto por uma cápsula de tecido conjuntivo. Do lado côncavo menor encontra-se o hilo e é de onde saem os vasos renais, os nervos e o uréter [52], [53].

O rim é dividido em duas regiões: o córtex, que contém maioritariamente os glomérulos e alguns túbulos, e a medula, composta por vasos sanguíneos e túbulos coletores [52].

A unidade funcional deste órgão é o nefrónio, que é constituído pelo glomérulo e túbulos urinários associados - túbulo proximal, ansa de Henle descendente e ascendente, segmento reto, mácula densa e túbulo distal. O glomérulo, composto por um tufo de capilares rodeados por cápsula de Bowman, é fornecido por uma arteríola aferente e drenado por uma arteríola eferente. No rato, um dimorfismo sexual é observado no tipo de epitélio da cápsula de Bowman: epitélio cubóide para a maioria dos glomérulos no macho, epitélio pavimentoso na fêmea [52], [53].

Histologicamente, a rede vascular glomerular é apoiada por células mioepiteliais incorporando a matriz extracelular. A superfície luminal de capilares é revestida por endotélio fenestrado, ao passo que a superfície urinária é coberta por células epiteliais viscerais (podócitos), com prolongamentos característicos – pedicelos [53].

1.3.1.4 Pulmão

Os pulmões fazem parte do sistema respiratório. É onde se fazem as trocas gasosas [52]. Os pulmões, no rato, são divididos em quatro lóbulos do lado direito e um do lado esquerdo [53].

Nos pulmões estão presentes os bronquíolos revestidos por epitélio ciliado e não ciliado. Os bronquíolos ramificam-se para formar os ductos alveolares, seguidos pelos sacos alveolares e por fim, os alvéolos. Antes dos bronquíolos existem os brônquios e a traqueia. A traqueia possui um epitélio colunar ciliado e é suportada por vários anéis em forma de C de cartilagem hialina. A cartilagem hialina é caracterizada por ter um aspeto esbranquiçado e lustroso no estado vivo e é composta por células - os condrócitos - que estão em lacunas [52].

Os alvéolos são estruturas de paredes finas revestidas por células epiteliais e suportadas pelos septos (tecido intersticial). As células alveolares, ou pneumócitos, podem ser de dois tipos: tipo I e tipo II [52]. Os pneumócitos tipo I estão diretamente envolvidos na troca gasosa, ao passo que os pneumócitos tipo II produzem surfactante e funcionam como células de reserva para o epitélio alveolar [53]. As células tipo II podem ser reconhecidas pela sua localização característica na junção dos septos bem como pela sua forma cuboide e citoplasma vacuolizado [52].

Dentro dos espaços alveolares estão os macrófagos alveolares, que limpam as partículas transportadas pelo ar e servem como a primeira linha de defesa contra microrganismos que atingem as superfícies epiteliais da zona respiratória [53].

1.3.1.5 Fígado

O fígado é dividido em quatro lóbulos contendo a veia hepática central, da qual células hepáticas saem, separadas por sinusoides, para a periferia [53]. As fronteiras externas dos lóbulos são mal delimitadas pelas tríades (artéria hepática, veia porta e ducto biliar). As fibras reticulares, originárias da cápsula fibrosa que cobrem o fígado, penetram o órgão dando apoio ao parênquima [52], [53].

As células hepáticas ou hepatócitos são grandes células poligonais com um núcleo central proeminente e citoplasma eosinófilo. Ocasionalmente podem ser vistos dois núcleos e um ou mais nucléolos [52], [53].

Os ramos interlobulares da artéria e porta hepática fornecem o sangue aferentes às sinusoides hepáticas. As sinusoides por sua vez, drenam para as veias centrais do lóbulo, que são ramos da veia hepática. As sinusoides são revestidas por endotélio e células reticuloendoteliais especializadas, e ainda possuem as células de Kupffer, que funcionam como fagócitos [52].

Entre os hepatócitos adjacentes, no lado oposto da sinusoide, estão os canalículos biliares. Estes estendem-se desde a veia central para fora, para a periferia do lóbulo, onde se abrem em ductos biliares revestidos por epitélio cúbico. Esses ductos biliares carregam bÍlis até à vesícula biliar [52].

1.3.1.6 Baço

O baço é um órgão muito vascular e é revestido por uma cápsula de tecido conjuntivo. É composto por polpa branca e polpa vermelha [52], [53].

A polpa branca é composta por tecido linfóide e forma nódulos característicos (corpúsculos de Malpighi). Ocasionalmente, os centros germinativos são identificáveis, pois encontram-se cercados por uma massa esférica de linfócitos, bem como uma arteríola ocupa o centro do nódulo [52], [53].

A polpa vermelha consiste principalmente em células estimuladoras da eritropoiese, linfócitos, granulócitos, células plasmáticas, mastócitos e megacariócitos [52], [53].

1.3.1.7 Músculo esquelético

Músculos estriados (voluntários ou esqueléticos) são capazes de contração poderosa ou a manutenção do tónus. O tecido conjuntivo também acompanha este tipo de músculo, bem como os

vasos sanguíneos e os nervos. Os núcleos das células são alongados e ovais e aparecem no lado de fora do feixe de fibras do músculo, quando em corte longitudinal [52].

Quando visto em secção longitudinal das estrias, a partir das quais este tipo de músculo tem o nome, são altamente visíveis as bandas claras e bandas escuras verticais que alternam entre si [52].

Todas as fibras musculares esqueléticas têm uma fibra nervosa associada [52].

1.3.2 Variáveis em estudo

Neste trabalho, as variáveis independentes (as que são manipuladas) são os diversos métodos aplicados à amostra: diferentes espessuras, diferentes métodos de secagem e diferentes métodos de condução. A variável dependente (a que sofre o efeito da variável independente) é a qualidade da preservação do tecido da amostra após submetido aos diferentes métodos, sendo avaliada qualitativamente [54].

1.3.3 Considerações éticas

Neste trabalho, de acordo com os procedimentos éticos e legais descritos no Código de Nuremberg:

- A investigação foi necessária e realizada com o intuito de trazer benefícios para a sociedade;
- A investigação foi conduzida de modo a evitar todo o sofrimento e danos desnecessários.

2 Técnicas e procedimentos experimentais

Os procedimentos experimentais deste trabalho iniciaram-se com a realização de um cronograma com o objetivo de definir detalhadamente as atividades a serem executadas, que se apresenta na tabela seguinte (Tabela 2-1). A primeira atividade realizada foi a instalação de um detetor de eletrões retrodifundidos. A segunda parte do trabalho consistiu na preparação de um conjunto de amostras e sua observação por microscopia correlativa.

Tabela 2-1 – Cronograma de dissertação de mestrado

<i>Etapas do estudo</i>	<i>Set.</i>	<i>Out.</i>	<i>Nov.</i>	<i>Dez.</i>	<i>Jan.</i>	<i>Fev.</i>	<i>Março</i>	<i>Abril</i>	<i>Mai</i>	<i>Junho</i>
<i>Planeamento</i>	X									
<i>Revisão da Literatura</i>	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
<i>Reverse-Engineering</i>		X	X	X						
<i>Adaptação de protocolos</i>					X	X	X			
<i>Aplicação do protocolo otimizado</i>									X	X
<i>Recolha de dados</i>						X	X	X	X	X
<i>Interpretação dos dados</i>										X
<i>Discussão dos dados e conclusão</i>										X

Parte I

2.1 Instalação do detetor de eletrões retrodifundidos

A primeira tarefa realizada no presente trabalho consistia na instalação de um detetor de eletrões retrodifundidos, pois permitia a obtenção de informação relativamente à composição química relativa das amostras. Para tal foi necessária a realização do *reverse-engineering* no detetor de eletrões retrodifundidos para conceber a sua adaptação ao MEV. O trabalho iniciou-se pela procura das *datasheets* dos diversos componentes para compreender por onde o sinal elétrico passa no circuito. Foi identificada a saída do sinal e seguiu-se o caminho da corrente no sentido inverso. Foi necessário identificar os diversos valores das resistências e dos condensadores e perceber quais são os que intervêm ativamente nos ganhos do circuito. A partir daí, foi importante elaborar pequenos esquemas dos diversos componentes e de como se interligam entre si e identificar, então, os sinais de entrada. Foi criado um esquema e descrito o sinal do detetor de eletrões retrodifundidos.

2.1.1 Circuito elétrico

Para se fazer o estudo de circuitos elétricos, é necessário ter algumas definições presentes [55].

A intensidade de corrente elétrica, ou mais comumente dita como corrente, é o número de cargas elétricas (eletrões) que por segundo, atravessam uma secção reta do circuito. Já a tensão, ou diferença de potencial entre dois pontos, é o trabalho que é necessário fazer para mover uma carga de um ponto a um potencial elétrico mais baixo para um ponto a potencial mais elevado [55].

Analisando agora os circuitos, quando estes possuem uma bifurcação pela qual a corrente passa, designa-se por nó, qualquer componente presente no ramo é atravessado pela mesma corrente. Malha é conjunto de ramos e nós existentes no circuito pelos quais passa a corrente elétrica [55].

Quando a tensão presente no circuito varia ao longo de um determinado tempo de um modo particular, dá-se pelo nome de sinal, que pode ser ou não periódico, e tem em conta três características: a sua frequência, a sua amplitude e a sua fase. Mas quando sinais ocorrem ocasionalmente, sem algumas características bem definidas, como a frequência ou a amplitude, denominam-se por ruído [55].

Para alterar o sinal produzido, pode-se recorrer a componentes, como por exemplo resistências ou condensadores, de modo a conseguir o sinal pretendido [55].

Uma resistência é um componente que se opõem à passagem da corrente elétrica, quando existe uma diferença de potencial aplicada nela [55].

O componente que tenha dois condutores separados por um dielétrico dá-se pelo nome de condensador [55].

Os circuitos podem ser analógicos ou digitais. Os analógicos são aqueles cujo o estado de saída corresponde ao estado de entrada. E como exemplo, temos os circuitos amplificadores, ou seja, os amplificadores operacionais [56].

2.1.2 Amplificadores operacionais

O amplificador operacional, ou abreviadamente, ampop, é um elemento ativo fundamental no desenho e funcionamento de circuitos analógicos [57].

Os primeiros ampops eram circuitos de válvulas que foram criados para serem utilizados nos computadores, para executar operações matemáticas em aplicações [57], [58]. Contudo, com o avanço da tecnologia, os ampops tornaram-se componentes com funcionamento altamente confiável e previsível, miniaturizado e termicamente estabilizado, não possuindo quase nenhuma semelhança com os ampops iniciais [57], [58].

Um ampop é então, um dispositivo amplificador de ganho elevado, que funciona através de uma malha de realimentação, podendo ser associado em andares de amplificação. É representado por um triângulo em que está assinalado as duas entradas diferenciais (entrada inversora - negativa - e não inversora - positiva) e a saída (Figura 2-1) [55], [57], [59].

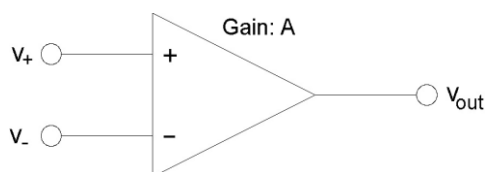


Figura 2-1 - Esquema representativo de ampop [59]

2.1.3 Realimentação

A realimentação de um circuito consiste num processo pelo qual se aplica uma parte do sinal de saída na entrada para se conseguir controlar a resposta do circuito [55]. A realimentação pode ser aplicada em diferentes tipos de mecanismos, estando também presente nos sistemas biológicos. Pode ser positiva ou negativa, sendo esta última a mais utilizada nos sistemas, isto porque a realimentação negativa tende a diminuir o sinal de saída quando este é aplicado na entrada, já quando é positiva, o sinal de saída controlado tende a aumentar [55].

Para que o ampop funcione, a realimentação deve ser aplicada na entrada inversora. Isto faz com que a tensão aplicada nas entradas seja igual, existindo assim um curto-circuito na entrada do ampop, ou seja, a diferença de potencial entre os dois pontos é nula [57].

Com a utilização do sistema de realimentação é possível controlar e reduzir o ganho do amplificador, tornando-o independente da frequência e da amplitude do sinal de entrada [55], [57]. E assim, a partir dos restantes componentes existentes na malha, é viável determinar o valor do ganho [55].

O ampop tem sido utilizado para multiplicar o sinal por uma constante. Dependendo da construção do amplificador, depende a maneira de calcular o ganho: para o ampop inversor, a constante de

multiplicação é o ganho $-R2/R1$ e para um ampop não inversor, a constante de multiplicação é o ganho $1+R2/R1$ [60] (Figura 2-2 e Figura 2-3).

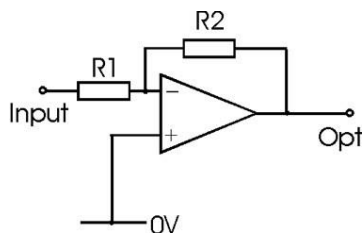


Figura 2-2 - Esquema representativo de um ampop inversor [88]

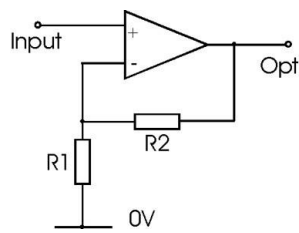


Figura 2-3 - Esquema representativo de um ampop não inversor [88]

Para obter um determinado ganho, basta usar resistências com os valores que permitam obter o valor final. No entanto, valores muito elevados ou muito baixos não são aconselháveis, isto porque quando se utilizam resistências de valores elevados, a corrente que circula é muito próxima da que entra no ampop, fazendo com que as aproximações não sejam válidas; e quando se utilizam resistências de valores baixos, a corrente que circula é muito elevada, podendo ultrapassar o limite máximo que o ampop pode fornecer [55].

O ampop amplifica a diferença entre os dois sinais de entrada, sendo isso o ganho de tensão em malha aberta. O ganho, quando é visto a nível de amplitude, varia numa faixa de 10^4 até 10^7 [58].

2.1.4 Tipos

As montagens dos ampops com os outros componentes eletrónicos podem dar origem a diversos tipos de amplificadores.

O circuito de ampop pode ser alterado para produzir uma fonte de corrente e quando tal acontece, assume-se que o ampop tem uma carga de resistência desconhecida (resistência de carga) e esta tem outra resistência em série [59].

O ampop conversor de tensão em corrente aceita como entrada uma tensão e tem como saída uma corrente de um certo valor. O ampop força as suas entradas a serem iguais, fazendo com que a tensão de entrada seja igual nas duas. A corrente que passa na resistência carga e resistência R são, conseqüentemente, iguais a V/R (Figura 2-4) [60].

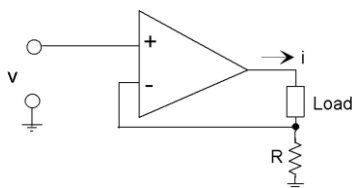


Figura 2-4 - Ampop conversor de tensão em corrente [59]

2.1.5 Descrição do sinal

Na Figura 2-5 mostra-se o esquema elétrico do amplificador do detector de retrodifundidos a ser instalado no MEV existente no laboratório. O esquema foi construído e descrito no âmbito do presente trabalho utilizando uma abordagem de *reverse-engineering*.

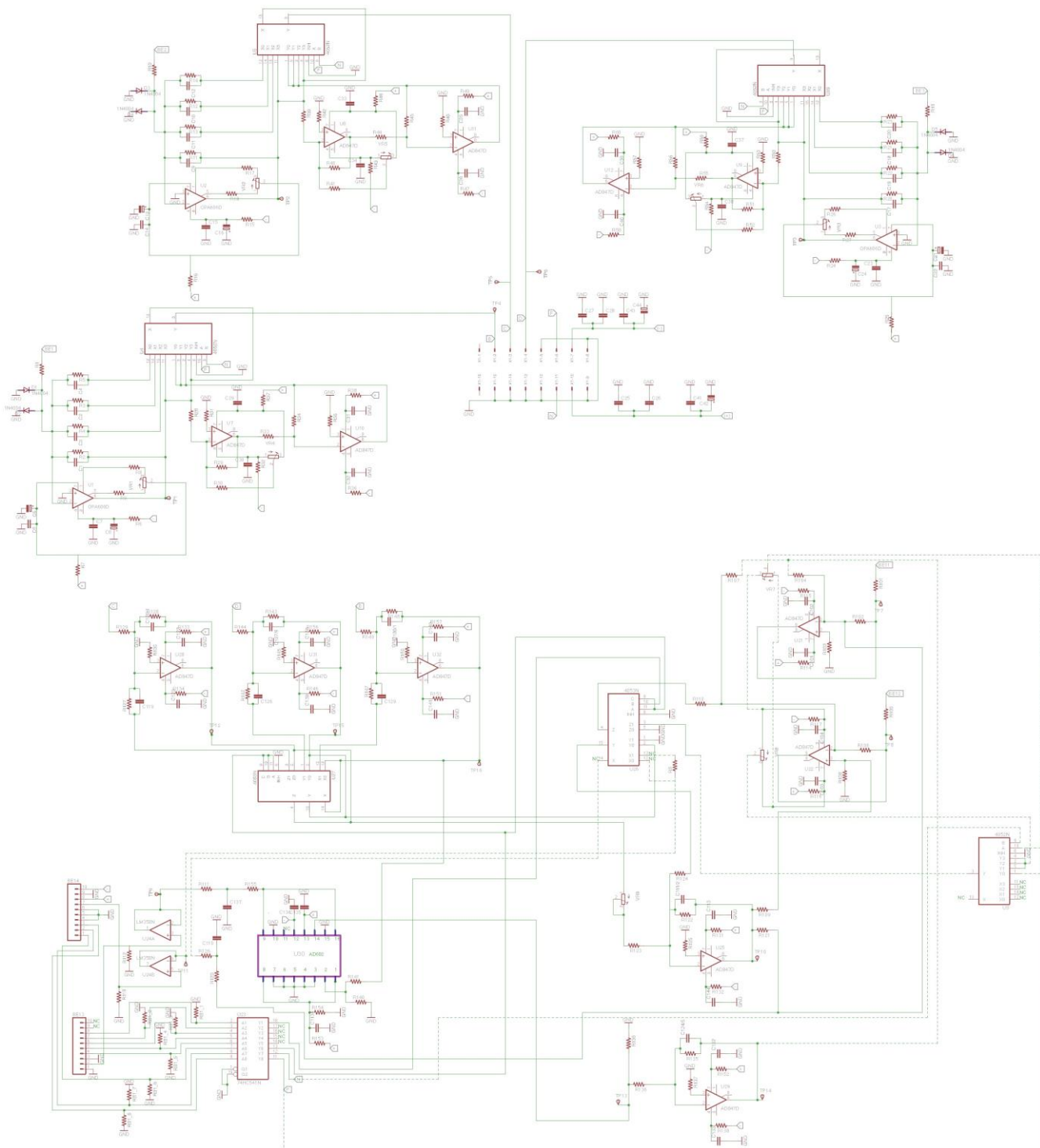


Figura 2-5 - Esquema do circuito elétrico do amplificador do detector de eletrões retrodifundidos

Após a identificação de entrada e como o sinal circula no circuito, é possível descrevê-lo para conseguir perceber como é manipulado eletricamente. Existem três andares de entrada que serão analisados separadamente.

2.1.5.1 *Entrada analógica BE1*

Segue-se um andar de proteção constituído pela resistência R1 (200 Ω) e díodos D1 e D2. Estes díodos estão ligados ao Comum Eletrónico (CE) porque a entrada do ampop está a esse potencial e o ampop está numa configuração de transadmitância - conversão corrente-tensão.

O ganho do primeiro ampop é estabelecido pela malha de realimentação de U1 (OPA606) que é escolhida dependendo das entradas binárias do multiplexer U4 (MC74HC4052N):

- BA = 00, realimentação feita por (C1//R2)/(C4//R5), Ganho \approx -21000;
- BA = 01, realimentação feita por (C1//R2)/(C2//R3), Ganho \approx -21000;
- BA = 10, realimentação feita por (C1//R2)/(C3//R4), Ganho \approx -21000;
- BA = 11, realimentação feita por (C1//R2), Ganho \approx -150000;
- A - pino 3 da ficha BE14 (cinzento, DH-11);
- B - pino 2 da ficha BE14 (branco, DH-11).

As combinações da palavra binária estão relacionadas com as frequências de corte de cada conjunto, que fazem variar as frequências de varrimento por parte do feixe de eletrões. Assim:

- BA = 00, $f_c \approx$ 250kHz;
- BA = 01, $f_c \approx$ 170kHz;
- BA = 10, $f_c \approx$ 110kHz;
- BA = 11, $f_c \approx$ 4,7kHz.

A saída do primeiro amplificador é depois seguida por dois amplificadores, U7 e U10 (AD847).

O ganho de U7 é controlado pelas resistências R29 (519 Ω) e R28 (519 Ω), Ganho = -R29/R28 = -1.

O U7 tem um circuito de compensação da componente DC efetuado pelo potenciômetro VR4 que pode somar uma corrente via R30 (432k Ω) que é +, - ou 0.

O ganho de U10 é controlado pelas resistências R34 (2150 Ω) e R33 (301 Ω), Ganho=-R34/R33=-7,14

A saída dos três andares é feita pelo segundo canal do multiplexer analógico U4 (MC74HC4052N) com a seguinte configuração:

- BA = 00, saída = U1 x U10 x U7 \approx 147000;
- BA = 01, saída = U1 x U10 x U7 \approx 147000;
- BA = 10, saída = U1 x U10 x U7 \approx 147000;
- BA = 00, saída = U1 x U10 x U7 \approx 147000;
- BA = 11, saída = U1 \approx 150000;
- A – pino 3 da ficha BE14 (cinzento, DH-11);

- B – pino 2 da ficha Be14 (branco, DH-11).

Depois do multiplexer U4, o sinal segue para uma ficha de interligação que liga uma das placas à outra (pino 2 da ficha AXL2169).

O andar de amplificação seguinte U32 (AD847), é um filtro passa-baixo cuja função de transferência é definida de acordo com a palavra digital binária do multiplexer U27, canal x (MC74HC4053N):

- A = B = C = 0, realimentação feita por (C130//R148), Ganho $\approx 29, 40$;
- A = B = C = 1, realimentação feita por (C130 // R148)/(C129//R147), Ganho $\approx 0,604$;
- A = B = C – pino 1 da ficha BE14 (preto, DH-11).

A saída deste andar de amplificação segue para outro amplificador, U30 (AD602), sendo antes multiplicado pelo factor constante de $R140/(R140+R141) = (1000/(1000+825)) = 0,5479$.

Este amplificador U30 tem uma particularidade de ter o ganho controlado por tensão, tensão essa que vem pelo pino 2 da ficha BE13 (vermelho, DH-14, varia entre 0V e 1,3V) e passa por um filtro passa-baixo definido pelo U24A, R111 (7500k Ω), R155 (510 Ω) e C137 (1 μ F). Este amplificador também tem a particularidade de ter uma resistência interna, que varia de acordo com a tensão que nele entra. O ganho para este amplificador é calculado tendo em conta a tensão que entra nele. Assim:

- Tensão é mínima (0V), o ganho é de 0,29;
- Tensão 0,65V, o ganho de 3,2;
- Tensão é máxima (1,3V), o ganho é 34, 67.

A seguir ao U28 vem mais um amplificador, o U29 (AD847), com possível configuração de filtro passa-baixo, cujo ganho é definido por $(R135//C124)/R136 \approx -1$.

A saída deste ampop, U29, vai haver um divisor de tensão, que vai fazer com que o sinal siga dois caminhos distintos:

1. Entre no amplificador U21 (AD847), sendo o seu ganho controlado pelas resistências R104 (750 Ω) e R102 (475 Ω), Ganho = $-R102/R104 = -0,63(3)$. A este sinal vai ser adicionado outro, originário no pino 7 da ficha BE14. Esse sinal passa pelo U24B, entrando no canal x do multiplexer U26, sendo a função de transferência definida de acordo com a palavra digital binária:
 - A = 0, o sinal segue para o seguinte andar de amplificação U21, passando por R126 (7,5k Ω), R120 (182 Ω) e C110 (1 μ F);
 - A = 1, o sinal segue para o seguinte andar de amplificação U21, passando por Rs (13 Ω), R126 (7,5k Ω), R120 (182 Ω) e C110 (1 μ F). A saída deste ampop vai para a ficha BE11, via R101 (7,5k Ω).
2. Entre no amplificador U22 (AD847), pela via de R107 (475 Ω). A tensão DC é controlada através dos potenciômetros VR7 e VR8, dependendo da palavra binária existente no multiplexer Us (MC74HC4052N):

- BA = 00, é controlado por VR7;
- BA = 01 = 10 = 11, é controlado por VR8.

Esta opção só está presente quando no canal z de U26, a palavra binária C está a 1. O sinal entra no U22, com a configuração de filtro passa-baixo, cujo o ganho é definido por $-R106/(R107//R110) = -2,11$. A saída deste ampop vai para a ficha BE12, via R105 (7,5k Ω).

2.1.5.2 Entrada analógica BE2

Segue-se um andar de proteção constituído pela resistência R10 (200 Ω) e díodos D3 e D4. Estes díodos estão ligados ao CE porque a entrada do ampop está esse potencial e o ampop está numa configuração de transadmitância – conversão corrente-tensão.

O ganho do primeiro ampop é estabelecido pela malha de realimentação de U2 (OPA606) que é escolhida dependendo das entradas binárias do multiplexer U5 (MC77HC4052N):

- BA = 00, realimentação feita por (C9//R11)/(C12//R14), ganho ≈ -21000 ;
- BA = 01, realimentação feita por (C9//R11)/(C10//R12), ganho ≈ -21000 ;
- BA = 10, realimentação feita por (C9//R11)/(C11//R13), ganho ≈ -21000 ;
- BA = 11, realimentação feita por (C9//R11), ganho ≈ -150000 ;
- A – pino 3 da ficha BE14;
- B – pino 2 da ficha BE14.

As combinações da palavra binária estão relacionadas com as frequências de corte de cada conjunto, que fazem variar as frequências de varrimento por parte do feixe de eletrões. Assim:

- BA = 00, $f_c \approx 250\text{kHz}$;
- BA = 01, $f_c \approx 170\text{kHz}$;
- BA = 10, $f_c \approx 110\text{kHz}$;
- BA = 11, $f_c \approx 4,7\text{kHz}$.

A saída do primeiro amplificador é depois seguida por dois amplificadores, U8 e U11 (AD847). O ganho de U8 é controlado pelas resistências R39 (519 Ω) e R40 (519 Ω), Ganho = $-R40/R39 = -1$.

O U8 tem um circuito de compensação da componente DC efetuado pelo potenciômetro VR5 que pode somar uma corrente via R41 (432k Ω) que é +, - ou 0.

O ganho de U10 é controlado pelas resistências R45 (2150 Ω) e R44 (301 Ω) Ganho = $-R45/R44 = -7,1429$.

A saída dos três andares é feita pelo segundo canal do multiplexer analógico U5 (MC74HC4052N) com a seguinte configuração:

- BA = 00, saída = U2 x U11 x U8 ≈ 147000 ;
- BA = 01, saída = U2 x U11 x U8 ≈ 147000 ;
- BA = 10, saída = U2 x U11 x U8 ≈ 147000 ;

- BA = 00, saída = $U_2 \times U_{11} \times U_8 \approx 147000$;
- BA = 11, saída = $U_2 \approx 150000$;
- A – pino 3 da ficha BE14;
- B – pino 2 da ficha Be14.

Depois do multiplexer U5, o sinal segue para uma ficha de interligação que liga uma das placas à outra (pino 3 da ficha AXL2169).

O andar de amplificação seguinte U28 (AD847), é um filtro passa-baixo cuja função de transferência é definida de acordo com a palavra digital binária do multiplexer U27, canal z (MC74HC4053N):

- A = B = C = 0, realimentação feita por (C120//R128), Ganho $\approx 29, 40$;
- A = B = C = 1, realimentação feita por (C120 // R128)/(C119//R127), Ganho $\approx 0,604$;
- A = B = C – pino 1 da ficha BE14.

A saída do multiplexer U27 passa pelo potenciômetro VR9 e pela resistência R123 (750Ω) antes de entrar no ampop U25 (AD847), somando-se ao sinal que vem do canal y do U26 (que em última análise, é o sinal originário da outra entrada analógica). Neste ampop, com possível configuração de filtro passa-baixo, o ganho tem em conta a soma de várias tensões.

À saída do ampop U25, o sinal segue dois caminhos distintos:

1. O sinal segue pela R109 (475Ω), avançando para a entrada positiva do U22 (AD847). Aqui, a entrada negativa tem o sinal proveniente do canal z de U26 realimentado, que pela via R110 ($150k\Omega$) se junta com o sinal que passa pela R107 (475Ω), sendo o seu ganho definido por $(-R106/(R107//R110)) = -2,11$. Por último, o sinal segue para a ficha BE12, via R105 ($7,5k\Omega$)
2. O sinal junta-se a outro proveniente do pino 7 da ficha BE14. Este passa pelo U24B, entrando no multiplexer U26, canal x, sendo a função de transferência definida de acordo com a palavra digital binária:
 - A = 0, o sinal segue para o seguinte andar de amplificação U21, passando por R126 ($7,5k\Omega$), R120 (182Ω) e C110 ($1\mu F$).
 - A = 1, o sinal segue para o seguinte andar de amplificação U21, passando por Rs (13Ω), R126 ($7,5k\Omega$), R120 (182Ω) e C110 ($1\mu F$)

O sinal proveniente de U25 soma-se ao sinal do andar de amplificação U21. O ganho de U21 é controlado pelas resistências R121 (750Ω) e R102 (475Ω), Ganho = $-R102/R121 = -0,6(3)$. Por último, a saída deste ampop vai para a ficha BE11, via R101 ($7,5k\Omega$)

2.1.5.3 Entrada analógica BE3

Segue-se um andar de proteção constituído pela resistência R19 (200Ω) e díodos D5 e D6. Estes díodos estão ligados ao CE porque a entrada do ampop está a esse potencial e o ampop está numa configuração de transadmitância – conversão corrente-tensão.

O ganho do primeiro ampop é estabelecido pela malha de realimentação de U3 (OPA606) que é escolhida dependendo das entradas binárias do multiplexer U6 (MC74HC4052N):

- BA = 00, realimentação feita por (C17//R20)/(C20//R23), ganho ≈ -21000 ;
- BA = 01, realimentação feita por (C17//R20)/(C18//R21), ganho ≈ -21000 ;
- BA = 10, realimentação feita por (C17//R20)/(C19//R22), ganho ≈ -21000 ;
- BA = 11, realimentação feita por (C17//R20), ganho ≈ -150000 ;
- A – pino 3 da ficha BE14;
- B – pino 2 da ficha BE14.

As combinações da palavra binária estão relacionadas com as frequências de corte de cada conjunto, que fazem variar as frequências de varrimento por parte do feixe eletrões. Assim:

- BA = 00, $f_c \approx 250\text{kHz}$;
- BA = 01, $f_c \approx 170\text{kHz}$;
- BA = 10, $f_c \approx 110\text{kHz}$;
- BA = 11, $f_c \approx 4,7\text{kHz}$.

A saída do primeiro amplificador é depois seguida por dois amplificadores, U9 e U12(AD847). O ganho de U9 é controlado pelas resistências R50 (519 Ω) e R51 (519 Ω), Ganho = $-R51/R50 = -1$.

O U9 tem um circuito de compensação da componente DC efetuado pelo potenciômetro VR6 que pode somar uma corrente via R52 (432k Ω) que é +, - ou 0.

O ganho de U12 é controlado pelas resistências R56 (2150 Ω) e R55 (301 Ω), Ganho = $-R56/R55 = -7,1429$. A saída dos três andares é feita pelo segundo canal do multiplexer analógico U6 (MC74HC4052N) com a seguinte configuração:

- BA = 00, saída = U3 x U12 x U9 ≈ 147000 ;
- BA = 01, saída = U3 x U12 x U9 ≈ 147000 ;
- BA = 10, saída = U3 x U12 x U9 ≈ 147000 ;
- BA = 00, saída = U3 x U12 x U9 ≈ 147000 ;
- BA = 11, saída = U3 ≈ 150000 ;
- A – pino 3 da ficha BE14;
- B – pino 2 da ficha Be14.

Depois do multiplexer U6, o sinal segue para uma ficha de interligação que liga uma das placas à outra (pino 4 da ficha AXL2169). O andar de amplificação seguinte U31 (AD847), é um filtro passa-baixo cuja função de transferência é definida de acordo com a palavra digital binária do multiplexer U27, canal y (MC74HC4053N):

- A = B = C = 0, realimentação feita por (C127//R143), Ganho $\approx 29,40$;
- A = B = C = 1, realimentação feita por (C127 // R143)/(C126//R142), Ganho $\approx 0,604$;
- A = B = C – pino 1 da ficha BE14.

A saída do U27 segue para outro multiplexer, U26 (MC74HC4053N), cuja a função de transferência é definida de acordo com a palavra digital binária:

- CBA (C=A) = 000, o sinal segue para o próximo andar de amplificação;
- CBA (C=A) = 101, o sinal segue para o próximo andar de amplificação;
- CBA (C=A) = 010, o sinal não segue para o próximo andar de amplificação;
- CBA (C=A) = 010, o sinal não segue para o próximo andar de amplificação;
- A – pino 1 da ficha BE14;
- B – pino 8 da ficha BE13.

O sinal segue para o amplificador U25 (AD847) com possível configuração de filtro passa-baixo, cujo ganho é definido consoante a palavra binária B do U26:

- B = 0, entrada do sinal proveniente de U26, canal y, no ampop U25 pela via R124 (1k Ω), somando-se com o sinal proveniente de U27, canal z, pela via VR9 e R123 (750 Ω);
- B = 1, entrada do sinal proveniente de U27, canal z, no ampop U25 pela via VR9 e R123 (750 Ω), ganho = $(R122//C112)/R123 \approx 1,33$.

O sinal que sai deste ampop (U25) tem destinos diferentes:

1. O sinal segue pela R109 (475 Ω) avançando para a entrada positiva do U22 (AD847). Neste ampop, a entrada negativa tem o sinal proveniente do canal z de U26 realimentado, que pela via R110 (150k Ω) se junta com o sinal que passa pela R107 (475 Ω) proveniente do U29, sendo o seu ganho definido por $-R106/(R107//R110) = -2,11$. Por último, o sinal segue para a ficha BE12, via R105 (7,5 k Ω).
2. O sinal junta-se a outro proveniente da ficha BE14 (pino 7). O sinal proveniente de BE14 passa pelo U24B, entrando no multiplexer U26, canal x, sendo a função de transferência definida de acordo com a palavra digital binária:
 - A = 0, o sinal segue para o seguinte andar de amplificação U21, passando por R126 (7,5k Ω), R120 (182 Ω) e C110 (1 μ F).
 - A = 1, o sinal segue para o seguinte andar de amplificação U21, passando por Rs (13k Ω), R126 (7,5k Ω), R120 (182 Ω) e C110 (1 μ F)

O sinal proveniente de U25 soma-se ao sinal do andar de amplificação U21. O ganho de U21 é controlado pelas resistências R121 (750 Ω) e R102 (475 Ω), Ganho = $-R102/R121 = -0,6(3)$. Por último, a saída deste ampop vai para a ficha BE11, via R101 (7,5 k Ω).

2.1.5.4 Fichas de controlo

As fichas de controlo têm a seguinte disposição:

- Ficha de controlo BE14 (DH11):
 1. Controlo Geral;
 2. Palavra binária B;
 3. Palavra binária A;

4. CE;
 5. CE;
 6. CE;
 7. Controlo do ganho por Tensão;
 8. Alimentação do sistema - parte positiva (+5V);
 9. CE;
 10. Alimentação do sistema - parte negativa (-5V).
- Ficha de controlo BE13 (DH14):
 1. CE;
 2. Controlo do ganho por Tensão;
 3. CE;
 4. Ligado à resistência RB1;
 5. Ligado à resistência RB1;
 6. Ligado à resistência RB1;
 7. Ligado à resistência RB1;
 8. Ligado à resistência RB1;
 9. NC;
 10. NC.

2.1.5.5 Tensão de saída

A tensão na saída BE11 (DH6) pode ser calculada tendo em conta o ganho de U29 (- R102/R104 = - 0,6(3)) multiplicado pela a tensão à saída de U29 somando com o ganho de U25 (- R102/R121 = - 0,6(3)) multiplicado pela a tensão à saída de U25 (ganho de U27 (29,4) multiplicado com a tensão da segunda e terceiro entrada analógica após a primeira placa) (Equação 1):

$$Tensão\ BE11 = 0 - 0,6(3) \times Tensão\ U29 - 0,6(3) \times Tensão\ U25 = -0,6(3) \times (Tensão\ U29 + Tensão\ U25) \quad (1)$$

A tensão na saída BE12 (DH5) pode ser calculada tendo em conta vários parâmetros (Equação 2):

- A tensão que entra na parte positiva de U22 [R108/(R109+108) = 1/1,5] multiplicado com a tensão à saída de U25;
- A tensão que entra na parte negativa de U22 [R106/R107 = 2] multiplicado pela subtração da tensão positiva de U22 com a tensão de saída de U29;
- A tensão que entra na parte negativa de U22 [R106/R110= 7x10⁻³] multiplicado pela subtração da tensão positiva de U22 com a tensão DC.

$$\begin{aligned} Tensão\ de\ BE12 &= Tensão\ U25 \times \left(\frac{1}{1,5}\right) - 2 \times \left[Tensão\ U25 \times \left(\frac{1}{1,5}\right) - Tensão\ U29 \right] - 7 \times 10^{-3} \times \left[Tensão\ U25 \times \left(\frac{1}{1,5}\right) - Tensão\ DC \right] \quad (2) \\ &= Tensão\ U25(1 + 2) \times \frac{1}{1,5} - 2 \times Tensão\ U29 + 5 \times 10^{-3}(Tensão\ U25) - 7 \times 10^{-3}(Tensão\ DC) \\ &= 2 \times (Tensão\ U25 - Tensão\ U29) + 5 \times 10^{-3}(Tensão\ U25) - 7 \times 10^{-3}(Tensão\ DC) \end{aligned}$$

Parte II

A segunda parte do presente trabalho consistia na preparação de amostras biológicas, otimização de protocolos e observação por microscopia correlativa.

2.2 Preparação de amostras

A grande profundidade de campo do MEV torna possível a observação de amostra de uma forma tridimensional [11]. Este tipo de informação acaba por ser bastante valiosa no exame das amostras de origem biológica, que são muito diferentes a nível morfológico [27], [61]. A existência de diversos tipos de MEV influencia o método utilizado para a preparação das amostras, não só devido às características do equipamento, mas também da amostra [61].

A maioria das amostras de origem biológica estão num ambiente aquoso, são sensíveis à radiação e à temperatura, têm baixa emissividade e são pouco condutoras. Assim, há que ter em atenção a estabilização das amostras para as ver no MEV, bem como melhorar o seu contraste e a sua condutividade, mas tendo sempre presente a manutenção, ao máximo, da estrutura do seu estado *in vivo* [27].

Os procedimentos de rotina para a preparação das amostras envolvem uma fixação química do material, a sua desidratação ou secagem e a montagem num suporte metálico, com a amostra revestida por uma camada condutora [11], [62], [63]. A parte da fixação é considerada um passo crítico, pois é com este passo que a atividade celular pára e ocorre a preservação das amostras e das suas estruturas como no seu estado *in vivo* [48], [64].

Para observar as amostras biológicas foram desenvolvidas metodologias para ver a superfície das amostras. Contudo, também foram desenvolvidas metodologias para que se consiga a visualização do interior das amostras: a criofatura, a dissociação, a microtomia ou uma combinação destes [11], [12], [26].

Recorrendo à microtomia da amostra, é possível a correlação com os outros tipos de microscopia, bem como a observação tridimensional da organização interna da célula [2], [12]. Com este método também é possível ter uma melhor orientação da amostra, bem como da posição das estruturas em estudo [12].

2.2.1 Processamento histológico

O material biológico proveniente de autópsias ou de biopsias pode fornecer informação bastante útil através da análise num MEV. Assim, para obter não só a orientação da amostra, mas também para a correlação entre ML e MEV foram desenvolvidos vários métodos que permitem a visualização das amostras a partir de blocos de parafina, preservando a maioria do tecido para outros cortes, se tal for necessário [12], [26], [65], [66].

Nos laboratórios de AP, as amostras são rotineiramente fixadas em FNT, para parar os processos de autólise nas células e são incluídas em parafina para que sejam mais facilmente cortadas em secções de espessura reduzida ($3\mu\text{m}$). É depois, quando se encontram incluídas em parafina - blocos de parafina - que as amostras são arquivadas, após realizadas as secções.

A existência de material em blocos de parafina facilita a correlação entre as diversas microscopias, pois é possível retirar as amostras da parafina e reprocessá-las para a microscopia eletrónica [2], [66].

O facto de se verificar que usando material preparado para a microscopia de luz pode ser utilizado para ME e com boa preservação tecidual permite obter muita informação útil para o diagnóstico por observação em ME de material incluído em parafina [2], [64].

Sabe-se que a profundidade de campo, uma característica-chave do MEV, está intimamente relacionada com a espessura do corte [65]. Relativamente à espessura do corte, a bibliografia não é muito variável. Os diversos artigos analisados mencionam que as espessuras de $5\mu\text{m}$ ou $10\mu\text{m}$ são as melhores, para a obtenção de imagens tridimensionais [2], [66]. Como com a utilização do MEV se quer ver a superfície das amostras, o uso da microtomia vai alterar a superfície das amostras, pois ocorre o seu corte da amostra com uma faca, suavizando assim a superfície [67].

A parafina deve ser removida da amostra para expor a superfície da mesma. Para tal, pode-se recorrer às técnicas já utilizadas para a microscopia de luz, ou seja, utilizando solventes orgânicos.

O xileno é o solvente orgânico utilizado para a remoção da parafina, sendo também miscível em álcool, podendo ser possível recolocar a amostra num ambiente aquoso [2].

2.2.2 Secagem

Para que o feixe de eletrões possa chegar à amostra sem qualquer tipo de desvio, os microscópios eletrónicos precisam de trabalhar em vácuo [31], [48]. E para tal, as amostras têm que ser estáveis em vácuo e são preparadas no seu estado sólido [31]. Ou seja, a água presente nas amostras biológicas tem de ser removida e substituída por um meio não volátil em vácuo. Contudo, a remoção da água leva à redistribuição dos componentes na célula e à precipitação de outros na membrana ou no citoesqueleto, o que pode levar a uma má interpretação da amostra [27], [48], [68].

Quando se realiza a secagem ao ar da água presente nas amostras, nota-se que certas estruturas colapsam devido à alta tensão superficial que a água tem ($72,8\text{ mN/m}$) [69], [70].

Assim, outras técnicas que não a simples secagem ao ar têm sido desenvolvidas para a desidratação da amostra, tendo como objetivo final a mínima distorção do material celular e a máxima preservação estrutural [62], [70].

2.2.2.1 *Critical Point Drying*

O *Critical-Point Drying* (CPD) é um dos métodos mais utilizados para a preparação das amostras biológicas para MEV [71]. Foi introduzido por Anderson em 1951 e consiste em impregnar a amostra

com dióxido de carbono líquido a uma temperatura de 31°C e pressão de 74 bar, num equipamento próprio para o efeito [71]–[73].

O uso deste método diminui a possibilidade de ocorrer uma distorção na morfologia da célula, bem como minimiza a produção de artefactos devido à tensão superficial quase nula a que a amostra é sujeita durante a desidratação [72].

As vantagens deste método (CPD) são a sua fácil aplicação, a reprodutibilidade dos resultados bem como a preservação dos finos detalhes da superfície da amostra, contudo, apresenta desvantagens, como o elevado investimento inicial no equipamento e a diminuição do tamanho das amostras biológicas (retração) [71].

2.2.2.2 Hexametildisilazano

Para substituir o CPD, devidos às suas desvantagens, outros métodos de secagem são descritos. Um desses métodos utiliza solventes que infiltram e evaporam do tecido rapidamente [4], [69], [74].

Este tipo de solventes são utilizados nas amostras biológicas com bons resultados, pois preservam o tecido e têm algumas vantagens, como a característica baixa tensão superficial, de serem miscíveis em álcool e acetona, de não ser necessário qualquer tipo de equipamento específico para a sua utilização (ao contrário do CPD) e o seu baixo custo e tempo dispensado. Um destes solventes é o Hexametildisilazano (HMDS) [4], [74].

Em 1983, quando o HMDS foi utilizado pela primeira vez, não se tinha a certeza como é que o solvente agia nos tecidos. Pensava-se que formava éteres com alguns dos compostos reativos do tecido e fazia também ligações cruzadas com as proteínas presentes [75]. Foi-se descobrindo que os éteres reagem com átomos de hidrogénio reativos como os que se encontram nos açúcares, aminoácidos ou mesmo álcoois (a maioria proveniente da desidratação da amostra) [69], [74], [75]. Assim, a amostra seca com HMDS apresenta robustez e detalhe superficial [69], [75].

Sabe-se que, nas células, as zonas citoplasmáticas não são afetadas e a zona nuclear é de fácil distorção quando a desidratação se faz com álcoois. É por isso que o HMDS é utilizado, porque tem menos tensão perinuclear e menos danos a nível nuclear durante a secagem da amostra [4].

Para usar o HMDS, é necessário ter alguns cuidados a nível da segurança do utilizador, sendo importante evitar o contacto com a pele e ainda usar uma câmara de fluxo laminar ou *hotte*, para não inspirar os vapores, uma vez que o solvente é reativo com compostos presentes no tecido biológico [75].

2.2.2.3 Tert-butanol

Um dos métodos que se pode utilizar para a secagem das amostras biológicas pode ser a liofilização ou seja, *freeze-drying*. A amostra é tratada com um solvente líquido, que depois é congelado, para depois ser sublimado [61]. Este procedimento evita a existência de uma interface líquido-ar, que é a causa da tensão superficial. Ao sublimar o solvente, é eliminada a tensão superficial, não ocorrendo o colapso das estruturas mais frágeis [76].

Um dos solventes que se usa neste tipo de método é o Tert-butanol. O Tert-butanol, 2-metil-2-propanol, também chamado de T-butanol, apresenta propriedades físicas que o qualificam como um bom solvente para este método: é miscível em água, tem um baixo ponto de ebulição (82,4°C) e um alto ponto de fusão (25,6°C) [76], [77]. Mas também tem outras características, como ser relativamente barato, ser utilizado em técnicas para o ML e não ser preciso nenhum aparelho especial para fazer este método.

As amostras são desidratadas e depois impregnadas com o T-butanol. De seguida, são congeladas, ficando o T-butanol no seu estado sólido. Após este processo, as amostras são colocadas em vácuo, que sublima o solvente congelado, passando do seu estado sólido para o estado gasoso [61], [76].

Um dos problemas deste solvente é que contamina o óleo presente nas bombas rotativas usadas para fazer o vácuo. Contudo, isto é facilmente contornável, pois quando o T-butanol entra em contacto com o óleo, o produto resultante é de fácil remoção [77].

A utilização de T-butanol em vez de água permite que não haja a existência de artefactos como células danificadas pelos cristais de água [77], além de que causa menos retração dos tecidos quando comparado com os outros agentes desidratantes utilizados [78].

Este método passou a ser muito popular no Japão quando uma equipa de investigadores o utilizou pela primeira vez em 1988 com ótimos resultados. No entanto, durante anos, o Japão foi o único país com bibliografia referente a este método. Atualmente, isso já não se verifica, mas, não deixa de intrigar os investigadores que agora usam este método [76], [78].

2.2.2.4 Protocolos experimentais

2.2.2.4.1 Protocolo de secagem por HMDS

- Realização de cortes histológicos do bloco de parafina à espessura pretendida (10µm);
- Adesão na estufa (65°C);
- Desparafinação do corte durante 20 min em xileno;
- Passagem por etanol a 100%;
- Passagem por HMDS de modo a garantir a total remoção do etanol a 100%;
- Secagem do HMDS ao ar;
- Metalização da lâmina com crómio;
- Colocação da lâmina num suporte;
- Visualização ao MEV.

2.2.2.4.2 Protocolo de secagem por T-butanol

- Realização de cortes histológicos do bloco de parafina à espessura pretendida (10µm);
- Adesão na estufa (65°C);
- Desparafinação do corte durante 20 min em xileno;
- Desidratação do corte em etanol a 100% durante 3 min;

- Incubação do corte em concentrações crescentes de T-butanol em etanol a 100% (1:3, 2:2, 3:1), à TA, durante 10 min cada;
- Incubação do corte em T-butanol a 100%:
 - 1ª incubação - 30 min;
 - 2ª incubação – 60 min;
 - 3ª incubação – 60 min;
- Incubação do corte em T-butanol a 100% a 4°C durante 15 a 20 min (até solidificar);
- Sublimação de T-butanol numa câmara de vácuo e mais 30 min após sublimação total;
- Metalização da lâmina com crómio;
- Colocação da lâmina num suporte;
- Visualização ao MEV.

2.2.2.4.3 *Protocolo de secagem a partir de água*

- Realização de cortes histológicos do bloco de parafina à espessura pretendida (10µm);
- Adesão na estufa (65°C);
- Desparafinação do corte durante 20 min em xileno;
- Passagens por decrescentes concentrações de etanol (100%, 96% e 70%), seguida de passagem por água destilada
- Secagem ao ar;
- Metalização da lâmina com crómio;
- Colocação da lâmina num suporte;
- Visualização ao MEV.

2.2.3 Condutividade

As amostras que não sejam condutoras e que vão ser visualizadas no MEV apresentam numerosos artefactos, desde a acumulação do excesso de carga que provoca o aparecimento de linhas resultantes das descargas iminentes (linhas horizontais na imagem) [48], [79], [80].

Para evitar estes artefactos, as superfícies a observar necessitam de ser recobertas de uma camada condutora, ligada à terra (massa do microscópio) [19], [48]. No MEV, tal consegue-se cobrindo a amostra com uma fina camada de metal ou carbono, ligando à massa com uma ponte condutora [11], [27], [48], [79], [81], [82]. Este procedimento aumenta a resolução do ME [11], [48].

2.2.3.1 *Metais*

Os metais usados para recobrir a amostra têm uma boa condutividade elétrica. Quando estão sob bombardeamento de eletrões, emitem um grande número de eletrões secundários, que depois são facilmente detetáveis pelo detetor [83].

2.2.3.2 Líquido Iónico

O líquido iónico (IL do inglês ionic liquid) é um sal que está no estado líquido à temperatura ambiente. Este tipo de sal está a ser utilizado, na investigação, para visualizar amostras biológicas no MEV, pois as amostras assim tratadas não precisam de ser desidratadas, não sofrendo, então, qualquer tipo de alteração ao seu estado *in vivo*, além de que ficam estáveis num ambiente de vácuo [82], [84].

O facto de ser possível visualizar amostras no MEV com IL deve-se ao facto de este possuir condutividade iónica, mas não condutividade eléctrica, não havendo os problemas de efeitos de carga na amostra [84], pois é o IL que é carregado pela irradiação do feixe de electrões na câmara de vácuo [82].

As imagens obtidas com este procedimento exibem um contraste escuro [82], quando comparadas com o contraste de imagens obtidas com cobertura metálica.

2.2.3.3 Protocolo experimental

2.2.3.3.1 Protocolo sem secagem e cobertura com IL

- Realização de cortes histológicos do bloco de parafina à espessura pretendida (10µm);
- Adesão na estufa (65°C);
- Desparafinação do corte durante 20 min em xileno;
- Passagens por decrescentes concentrações de etanol (100%, 96% e 70%), seguida de passagem por água destilada;
- Remoção do excesso de água seguida de incubação do líquido iónico (concentração de 1:10 em água destilada), na *hotte* e deixar secar;
- Colocação da lâmina num suporte;
- Visualização no MEV.

2.2.3.3.2 Protocolo de secagem com HMDS e cobertura com IL

- Realização de cortes histológicos do bloco de parafina à espessura pretendida (10µm);
- Adesão na estufa (65°C);
- Desparafinação do corte durante 20 min em xileno;
- Passagens por decrescentes concentrações de etanol (100%, 96% e 70%), seguida de passagem por água destilada;
- Remoção do excesso de água seguida de incubação do líquido iónico (concentração de 1:10 em água destilada), na *hotte* e deixar secar (15 min);
- Passagens por crescentes concentrações de etanol (70%, 96%), até etanol a 100%;
- Passagem por HMDS de modo a garantir a total remoção do etanol e deixar secar (15 min);
- Metalização da lâmina com crómio;
- Colocação da lâmina num suporte;
- Visualização no MEV.

2.2.3.3.3 *Protocolo de secagem com HMDS e cobertura metálico*

Protocolo idêntico ao descrito em 2.2.2.4.1 – Protocolo de secagem com HMDS

2.2.3.3.4 *Protocolo de secagem com HMDS e cobertura com IL e metálico*

- Realização de cortes histológicos do bloco de parafina à espessura pretendida (10 μ m);
- Adesão na estufa (65°C);
- Desparafinação do corte durante 20 min em xileno;
- Passagens por decrescentes concentrações de etanol (100%, 96% e 70%), seguida de passagem por água destilada;
- Remoção do excesso de água seguida de incubação do líquido iônico (concentração de 1:10 em água destilada), na *hotte* e deixar secar (15 min);
- Passagens por crescentes concentrações de etanol (70%, 96%), até etanol a 100%;
- Passagem por HMDS de modo a garantir a total remoção do etanol e deixar secar (15 min);
- Metalização da lâmina com crómio;
- Colocação da lâmina num suporte;
- Visualização no MEV.

2.3 Procedimento experimental

A parte experimental deste trabalho está relacionada com a otimização do protocolo para a visualização de cortes em lâminas no MEV. Para tal, obtiveram-se treze cortes por cada amostra em estudo (um bloco com tecido pancreático, um bloco com tecido cardíaco e outro bloco com tecido renal, todos de rato) a partir de um micrótomo de Minot, tendo sido colocado um corte por lâmina. Após o corte, as lâminas foram colocadas na estufa para que o corte aderisse às mesmas.

Para a otimização do protocolo, focou-se em três características-chave para a boa visualização da amostra biológica em MEV: espessura, secagem e condutividade do corte. Para a análise da espessura, foram utilizados quatro dos treze cortes. Um deles seguiu o procedimento utilizado no laboratório para a microscopia de luz – espessura de 3 μ m e coloração HE – e os restantes cortes, que tinham espessuras diferentes - 5 μ m, 10 μ m e 15 μ m – seguiram o procedimento utilizado no laboratório para a visualização de amostras biológicas no MEV. Para a análise da secagem, foram utilizados quatro dos treze cortes. Um deles seguiu o procedimento utilizado no laboratório para a microscopia de luz – espessura de 3 μ m e coloração HE – e nos restantes, com espessura de corte de 10 μ m, testou-se os diferentes procedimentos de secagem: secagem utilizando solventes com baixa tensão superficial (HMDS), secagem utilizando o processo de liofilização com o T-butanol e a secagem da amostra embebida em água. Para a análise da condutividade do corte, foram utilizados cinco dos treze cortes. Um dos cortes seguiu os procedimentos utilizados no laboratório para a microscopia de luz – espessura de 3 μ m e coloração HE – e nos restantes quatro cortes, com espessura de corte de 10 μ m, testou-se os diferentes protocolos de condutividade da amostra: cobertura da amostra com IL sem secagem, cobertura da amostra com IL e secagem por HMDS,

cobrimento da amostra com crómio com secagem por HMDS e cobrimento da amostra com crómio e IL com secagem por HMDS.

De seguida foi a aplicação do protocolo otimizado em seis tecidos diferentes de rato – coração, rim, fígado, pulmão, baço e músculo esquelético. Para tal, por cada tecido obteve-se dois cortes: um para microscopia de luz – espessura de 3 μ m e coloração com HE – e um para MEV – o protocolo otimizado (idêntico ao protocolo 2.2.2.4.2 – protocolo de secagem por T-butanol).

3 Resultados

Devido à escassa bibliografia relativamente a este tipo de amostras (cortes histológicos para serem vistos num MEV), foi necessária a elaboração e otimização de um protocolo de preparação de amostras. Fez-se a elaboração de protocolos tendo por base três características da amostra:

- Espessura;
- Secagem;
- Condutividade do corte.

Para tal recorreu-se a três tipos de tecido de rato que se encontravam em arquivo no laboratório: Pâncreas, Coração e Rim.

Todas as observações por MEV foram sempre acompanhados de observações por ML de lâminas com cortes de $3\mu\text{m}$ de espessura e corados com a coloração de HE (Figura 3-1, Figura 3-2 e Figura 3-3). A realização destes cortes teve como objetivo a identificação das diversas estruturas presentes nos cortes (uma vez tratarem-se de cortes sequenciais), em cada característica analisada.

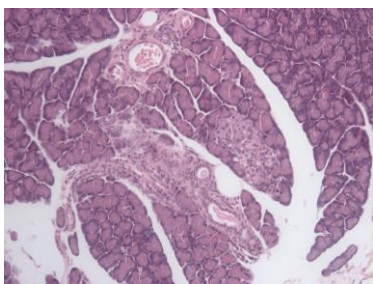


Figura 3-1 – Porção exócrina e endócrina do tecido pancreático (10X, ML)

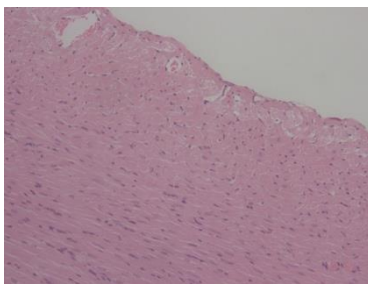


Figura 3-2 – Tecido cardíaco (10X, ML)

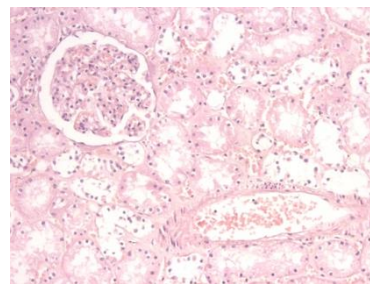


Figura 3-3 – Diferentes estruturas do tecido renal (10X, ML)

Todos os resultados foram obtidos através da visualização das amostras por eletrões secundários, uma vez que não foi possível por acidente imprevisto e não imputável ao trabalho da tese, a instalação do detetor de eletrões retrodifundidos no MEV utilizado neste trabalho.

3.1 Otimização dos protocolos de preparação das amostras

3.1.1 Influência da espessura do corte

Foram analisadas três espessuras de corte diferentes: corte com $5\mu\text{m}$, $10\mu\text{m}$ e $15\mu\text{m}$.

A uma baixa ampliação, não é visível grande diferença pois há muita informação, independente da espessura usada (Figura 3-4 a Figura 3-9).

Dependendo do tipo de tecido analisado (pâncreas e coração), a lâmina de 15 μ m dá diversas informações. Na lâmina com tecido pancreático, é visível uma maior noção de tridimensionalidade na lâmina de 15 μ m, como seria esperado, por ser mais espessa. Na lâmina da mesma espessura com o tecido cardíaco, não apresenta muita informação.

Quando se faz a análise de uma estrutura mais tubular, entra em linha de conta a orientação da secção: Figura 3-10, Figura 3-11 e Figura 3-12. Com 5 μ m, não se tem a noção de profundidade, que já se encontra presente nos cortes de 10 μ m e 15 μ m.

A utilização da inclinação da amostra para o detetor não produz grandes alterações da imagem nas diversas espessuras observadas (Figura 3-13 e Figura 3-14).

Quando se faz a análise de uma estrutura com mais elementos e no qual é possível analisar a profundidade, os cortes de 15 μ m apresentam mais informação, mas não é tão detalhada como nas lâminas de 5 μ m ou 10 μ m. Tomemos como exemplo os vasos (Figura 3-15 a Figura 3-17). Com a lâmina de 5 μ m percebe-se que o corte não é profundo e pode não ser suficiente para analisar o seu interior, o que já acontece na lâmina de 10 μ m. Contudo, quando se compara o corte de 15 μ m com o de 10 μ m, nota-se que não há uma grande definição das estruturas que rodeiam o vaso, perdendo-se assim informação.

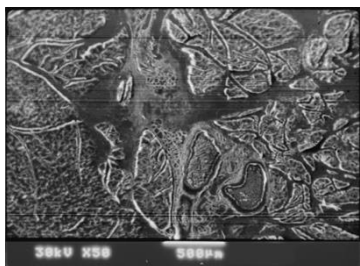


Figura 3-4 – Tecido pancreático a 5 μ m



Figura 3-5 – Tecido pancreático a 10 μ m

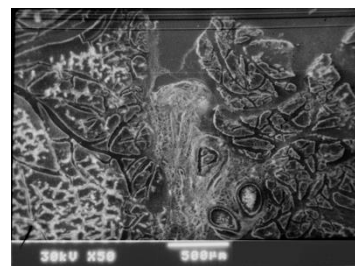


Figura 3-6 - Tecido pancreático a 15 μ m

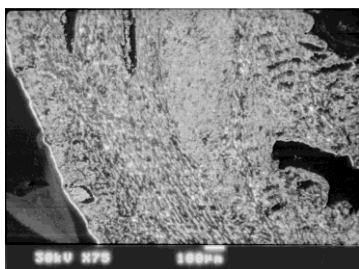


Figura 3-7 – Tecido cardíaco a 5 μ m

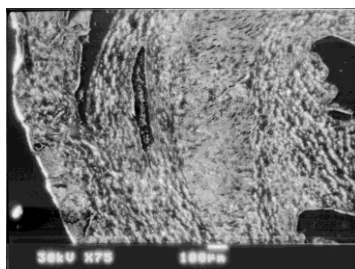


Figura 3-8 – Tecido cardíaco a 10 μ m

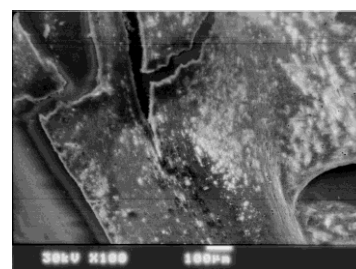


Figura 3-9 - Tecido cardíaco a 15 μ m

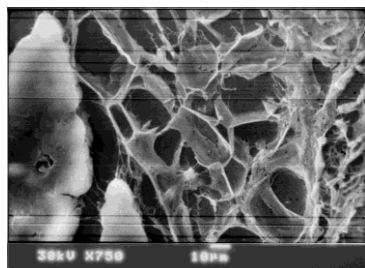


Figura 3-10 – Tecido pancreático a 5µm – estrutura tubular

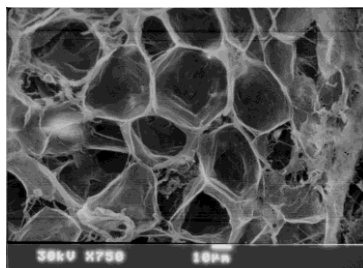


Figura 3-11 – Tecido pancreático a 10µm – estrutura tubular

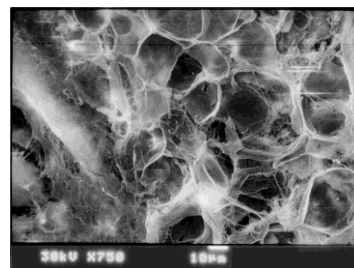


Figura 3-12 – Tecido pancreático a 15µm – estrutura tubular

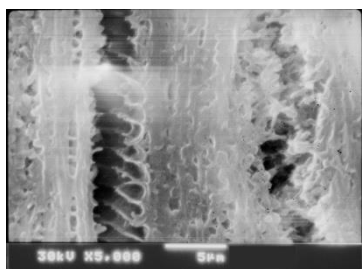


Figura 3-13 – Tecido cardíaco a 5µm sem inclinação

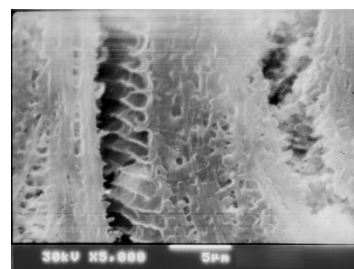


Figura 3-14 – Tecido cardíaco a 5µm com inclinação

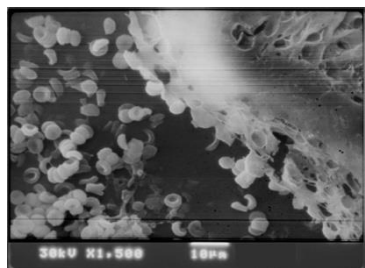


Figura 3-15 – Tecido pancreático a 5µm – estrutura vascular

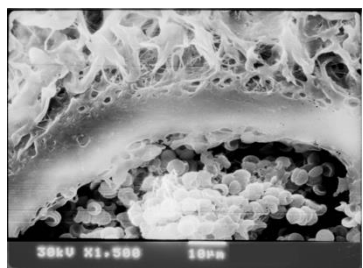


Figura 3-16 – Tecido pancreático a 10µm – estrutura vascular

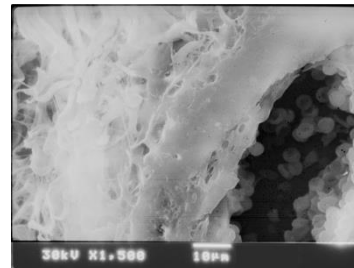


Figura 3-17 – Tecido pancreático a 15µm – estrutura vascular

3.1.2 Influência da secagem do corte

Foram analisados três métodos de secagem de corte diferentes: corte seco a partir de HMDS, a partir de T-butanol e a partir de água. Tendo em conta os resultados obtidos anteriormente, para esta análise, os cortes foram de 10µm de espessura.

A uma baixa ampliação, é possível notar que com o HMDS, o tecido parece mais definido do que na lâmina tratada com T-butanol (Figura 3-18 a Figura 3-23).

A altas ampliações, em zonas que apresentam estruturas mais finas, estas estão mais presentes, ou melhor, parecem ser mais numerosas com o protocolo de T-butanol do que com HMDS (Figura 3-24 a Figura 3-29).

A utilização da água serviu como controlo. Embora seja possível a visualização razoável das estruturas a baixas ampliações, quando se aumenta a ampliação, começa-se a perceber que as estruturas mais finas ou mais frágeis não aguentaram a enorme tensão superficial da água e colapsaram, não sendo, por isso, tão evidentes como nos outros cortes.

Quando se analisam os vasos, que são estruturas quase sempre presentes em todos os tecidos, é possível notar, a uma mesma ampliação, que o tecido tratado com o HMDS parece mais retraído (mais pequeno) que o tratado com o T-butanol, o que é confirmado nas imagens tiradas com um FESEM (Figura 3-30, Figura 3-31 e Figura 3-32).

Recorreu-se à visualização das amostras num FESEM pois é possível ver, com maior detalhe a presença de estruturas finas e, assim, perceber qual o melhor resultado.

Ao analisar as imagens do FESEM, é possível visualizar a retração dos tecidos, já detetada no MEV convencional, bem como é possível ver com mais nitidez a existência de mais estruturas finas com a lâmina tratada com T-butanol do que a que foi tratada com HMDS, na mesma zona do corte (Figura 3-33 a Figura 3-37).

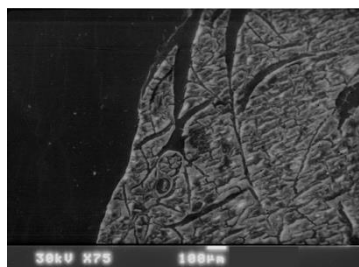


Figura 3-18 – Tecido pancreático tratado com HMDS

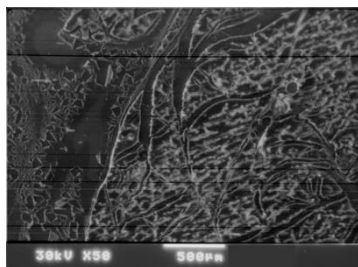


Figura 3-19 – Tecido pancreático tratado com T-butanol

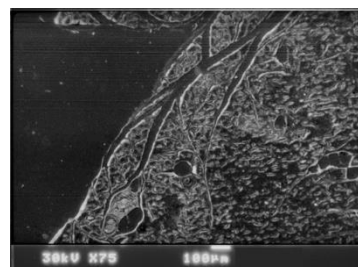


Figura 3-20 – Tecido pancreático tratado com água

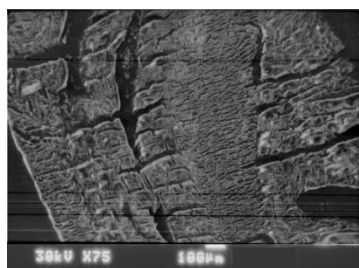


Figura 3-21 – Tecido cardíaco tratado com HMDS

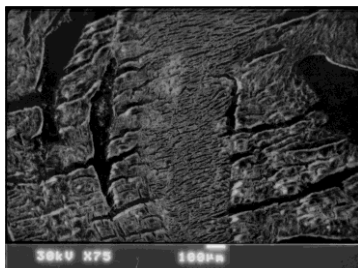


Figura 3-22 – Tecido cardíaco tratado com T-butanol

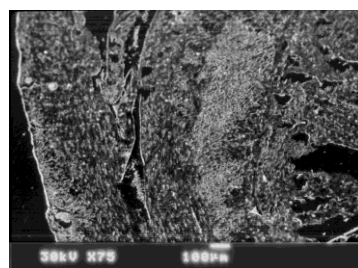


Figura 3-23 – Tecido cardíaco tratado com água

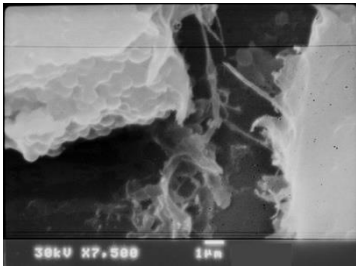


Figura 3-24 – Tecido pancreático tratado com HMDS – detalhe de estruturas finas

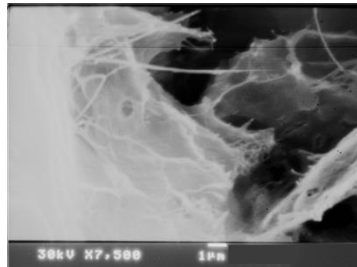


Figura 3-25 – Tecido pancreático tratado com T-butanol – detalhe de estruturas finas

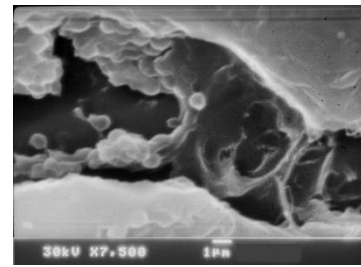


Figura 3-26 – Tecido pancreático tratado com água – detalhe de estruturas finas

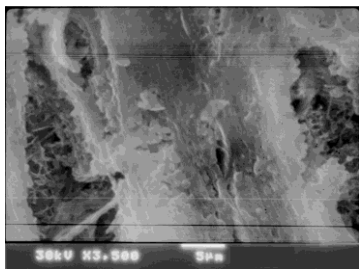


Figura 3-27 – Tecido cardíaco tratado com HMDS – detalhe de estruturas finas

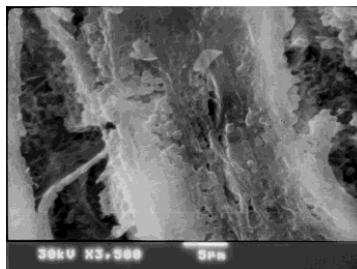


Figura 3-28 – Tecido cardíaco tratado com T-butanol – detalhe de estruturas finas

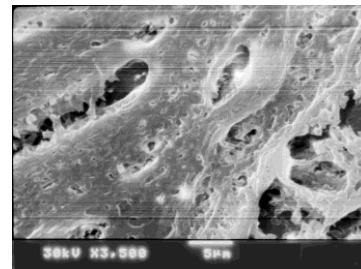


Figura 3-29 – Tecido cardíaco tratado com água – detalhe de estruturas finas

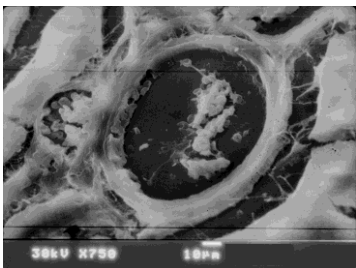


Figura 3-30 – Tecido pancreático tratado com HMDS – estrutura vascular

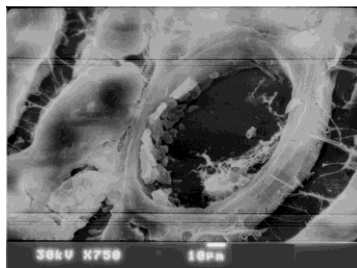


Figura 3-31 – Tecido pancreático tratado com T-butanol – estrutura vascular

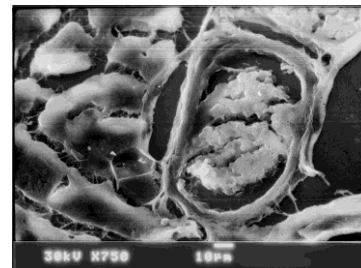


Figura 3-32 – Tecido pancreático tratado com água – estrutura vascular

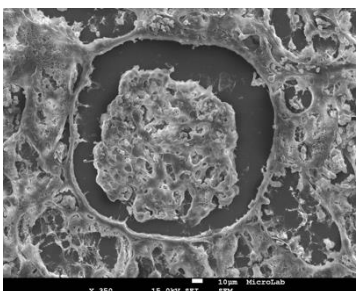


Figura 3-33 – Tecido renal tratado com HMDS (FESEM)

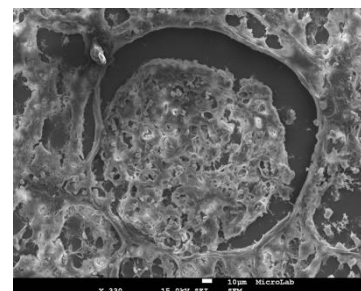


Figura 3-34 – Tecido renal tratado com T-butanol (FESEM)

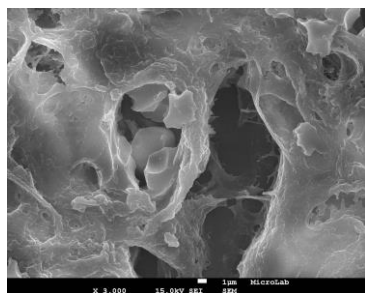


Figura 3-35– Tecido renal tratado com HMDS (FESEM)

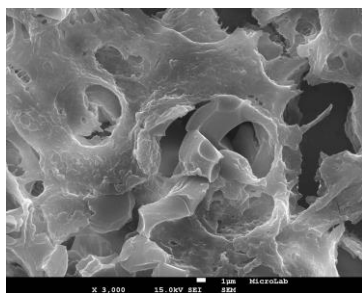


Figura 3-36 – Tecido renal tratado com T-butanol (FESEM)

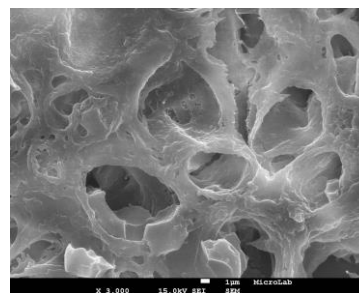


Figura 3-37 – Tecido renal tratado com T-butanol (FESEM) – detalhe podócito

3.1.3 Influência da condutividade do corte

Foram analisados quatro métodos diferentes de melhorar a condutividade de corte: corte com o protocolo de secagem do corte coberto com IL, com cobertura metálica, com cobertura metálica e IL e um outro corte que não foi seco e que foi coberto com IL. Assim, para a análise da condutividade da amostra, os cortes são de 10µm de espessura e o protocolo de secagem foi realizado com HMDS devido à facilidade de execução da técnica, comparada com o T-butanol, quando aplicado.

A presença de IL na amostra sem que esta seja seca, faz com que o contraste seja diferente e menor quando comparados com o cobertura metálica. Logo, não é possível visualizar qualquer tipo de estrutura na lâmina. Após este resultado, decidiu-se que seria mais viável secar sempre a amostra.

Após a realização da secagem da amostra, é depositado o IL, que é seco ao ar, ficando a amostra com um contraste diferente. A baixas ampliações, parece que a diferenciação das diversas estruturas não é tão evidente (Figura 3-38 a Figura 3-43).

Quando se aplica o IL, o contraste é muito menor do que quando se utiliza o cobertura metálica. Não se tem a noção da presença de várias estruturas, ou noção da orientação das fibras como se tem no cobertura metálica.

Quando se analisam os cortes e estruturas a altas ampliações, o baixo contraste continua presente, mas não impede a boa visualização das estruturas (Figura 3-44 a Figura 3-49). Nota-se também uma maior intensidade na lâmina que foi tratada apenas com o cobertura metálica, do que na que foi tratada com a combinação dos métodos, já para não falar da que foi apenas tratada com o IL, cuja intensidade de sinal é ainda menor.

Quando comparando o cobertura metálica com a combinação dos métodos, a diferença no contraste é quase nula, estando só presente em maior quantidade, as linhas dos efeitos de cargas, quando se utilizou a combinação dos métodos (Figura 3-50, Figura 3-51 e Figura 3-52).

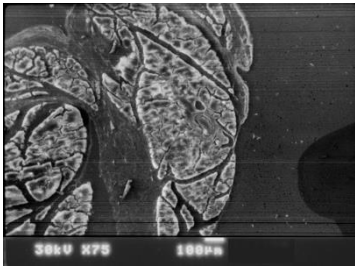


Figura 3-38 – Tecido pancreático coberto com crómio

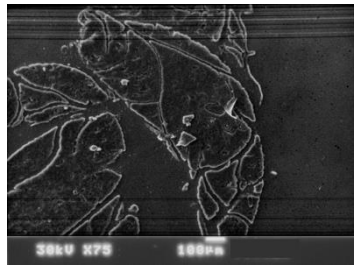


Figura 3-39 – Tecido pancreático coberto com IL

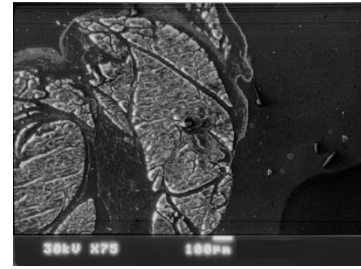


Figura 3-40 – Tecido pancreático coberto com crómio e IL

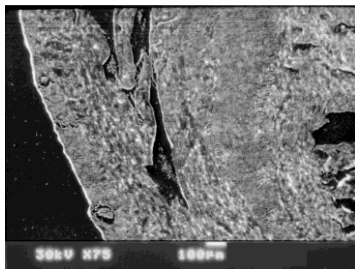


Figura 3-41 – Tecido cardíaco coberto com crómio

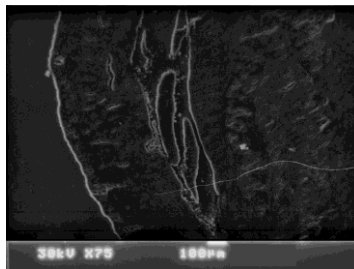


Figura 3-42 – Tecido cardíaco coberto com IL

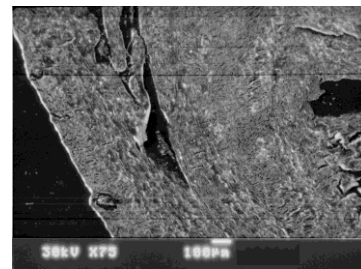


Figura 3-43 – Tecido cardíaco coberto com crómio e IL

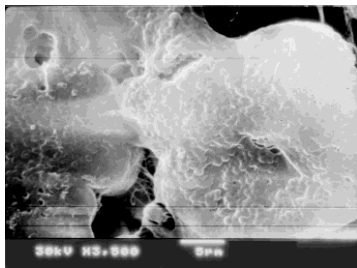


Figura 3-44 – Tecido pancreático coberto com crómio – altas ampliações

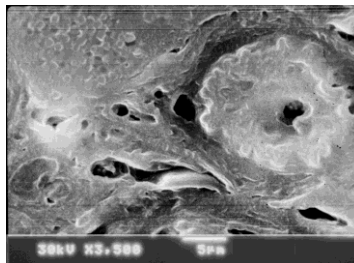


Figura 3-45 – Tecido pancreático coberto com IL – altas ampliações

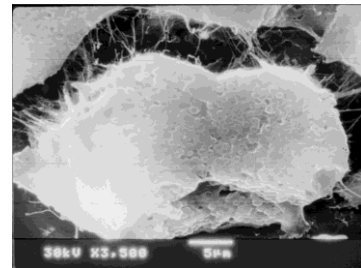


Figura 3-46 – Tecido pancreático coberto com crómio e IL – altas ampliações



Figura 3-47 – Tecido cardíaco coberto com crómio – altas ampliações

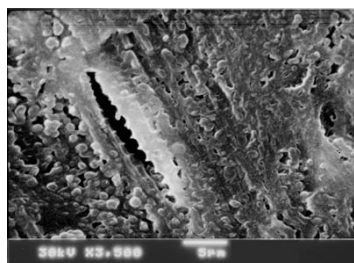


Figura 3-48 – Tecido cardíaco coberto com IL – altas ampliações

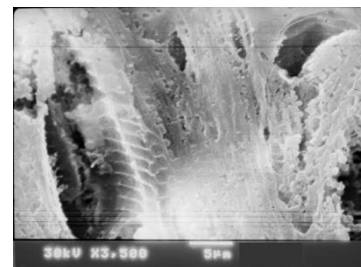


Figura 3-49 – Tecido cardíaco coberto com crómio e IL – altas ampliações

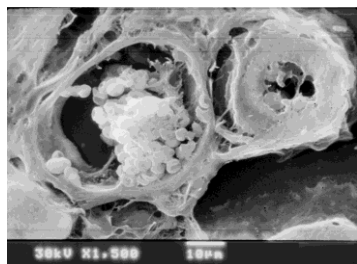


Figura 3-50 – Tecido pancreático coberto com crómio – diferentes intensidades

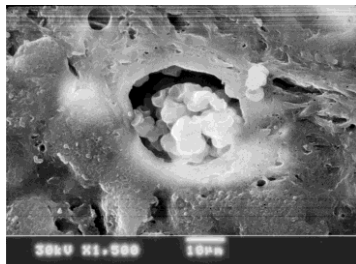


Figura 3-51 – Tecido pancreático coberto com IL – diferentes intensidades

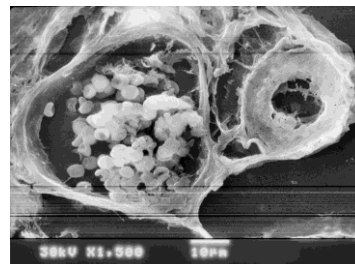


Figura 3-52 – Tecido pancreático coberto com crómio e IL – diferentes intensidades

3.2 Observações após otimização do protocolo de preparação de amostras

Após a otimização de um protocolo que permitia a visualizar de cortes histológicos com qualidade no MEV, procedeu-se à sua aplicação em diversos tecidos, cujos resultados se apresentam de seguida.

3.2.1 Coração

A uma baixa ampliação é possível reparar nas diferentes orientações das fibras musculares, bem como a presença de vasos na periferia do tecido (epicárdio) (Figura 3-56). Estes vasos são de fácil visualização e identificação graças à presença de eritrócitos no seu interior. É possível ainda visualizar a parede interna dos vasos, principalmente quando se inclina amostra na direção do detetor e tem-se a noção de profundidade graças à espessura do corte.

A presença de vasos, e consequentemente, de eritrócitos, permite ter uma ideia não só de dimensões, pois os eritrócitos servem de medida relativa, bem como da preservação da amostra, pois os eritrócitos sofrem com as alterações do seu meio (Figura 3-57).

Sendo o coração composto maioritariamente por músculo cardíaco (músculo estriado), é fácil encontrar diversas orientações das fibras - sejam elas mais longitudinais, em que se vê a fibra no seu comprimento, sejam elas mais transversais, em que se vê o interior de toda a fibra (Figura 3-58).

Quando a fibra está cortada longitudinalmente, é possível observar o que separa as diferentes fibras, como elas se ligam, bem como a sua superfície/topografia, que não é de fácil acesso. Também é possível visualizar alguns eritrócitos no interstício (Figura 3-59 e Figura 3-60).

Quando a fibra se encontra cortada transversalmente, é possível observar a presença de miofibrilhas (Figura 3-61 e Figura 3-62).

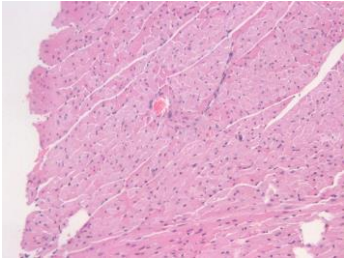


Figura 3-53 – Tecido cardíaco (10X, ML)

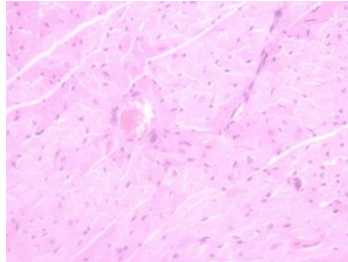


Figura 3-54 – Vaso (20X, ML)

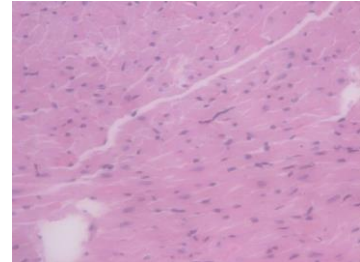


Figura 3-55 – Diferentes orientações das fibras (20X, ML)

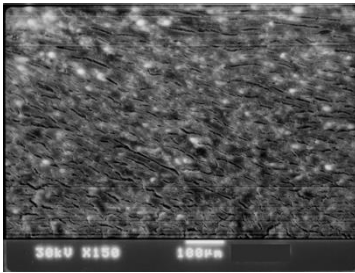


Figura 3-56 - Baixa ampliação (MEV)

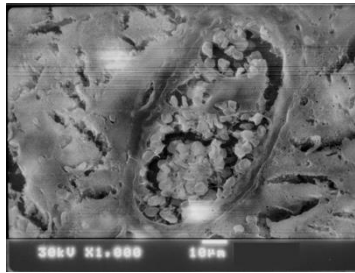


Figura 3-57 – Vaso (MEV)

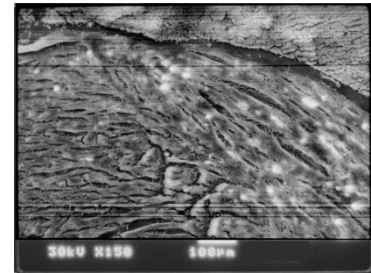


Figura 3-58 - Diferentes orientações das fibras (MEV)

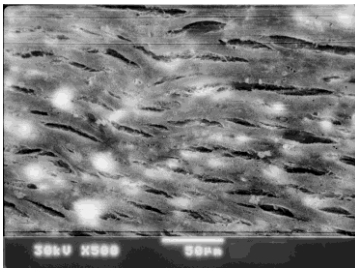


Figura 3-59 - Fibras longitudinais (MEV)

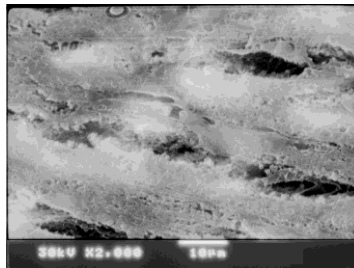


Figura 3-60 – Fibras longitudinais, alta ampliação (MEV)

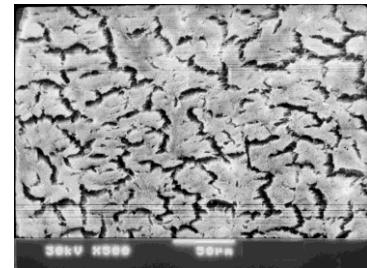


Figura 3-61 – Fibras transversais (MEV)

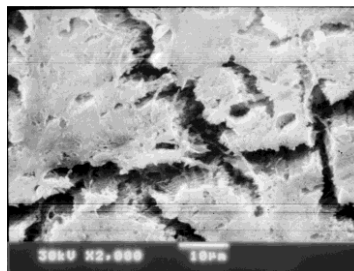


Figura 3-62 – Fibras transversais, alta ampliação (MEV)

3.2.2 Rim

O rim é composto por uma parte medular (Figura 3-70), como maior predominância dos túbulos, e uma parte cortical (Figura 3-66), em que há uma maior predominância dos glomérulos.

Os glomérulos são novelos de vasos que se encontram numa cápsula, em que a parte visceral é composta pelos podócitos, que são facilmente identificados pois revestem os vasos, e em secção é possível ver os pedicelos, que são as extensões pediculares dos podócitos (Figura 3-67, Figura 3-68 e Figura 3-69).

Os túbulos, por serem estruturas ocas (como os vasos) é possível analisar o seu interior, bem como a suas paredes, podendo ser fácil a distinção entre eles (Figura 3-71 e Figura 3-72).

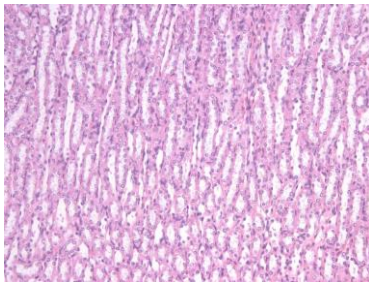


Figura 3-63 – Porção medular (10X, ML)

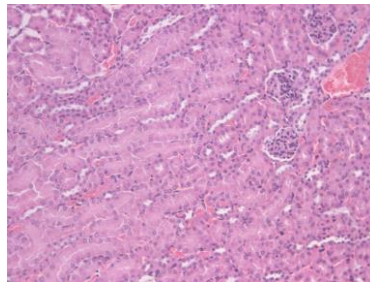


Figura 3-64 – Porção cortical (10X, ML)

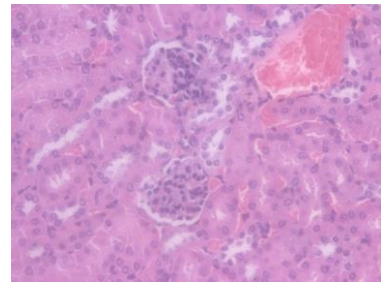


Figura 3-65 – Glomérulo (20X, ML)

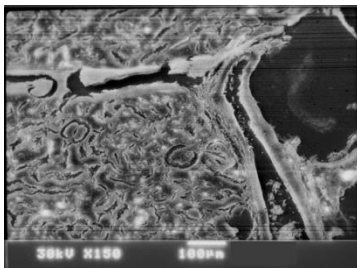


Figura 3-66 – Zona cortical (MEV)

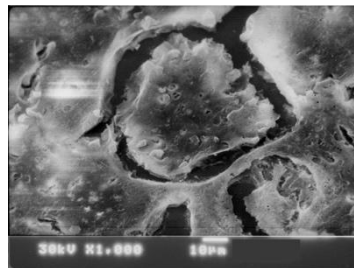


Figura 3-67 – Glomérulo (MEV)

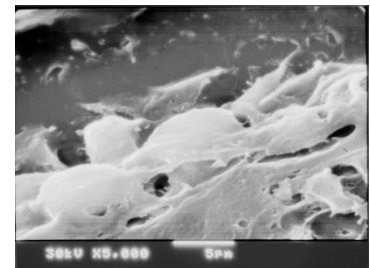


Figura 3-68 – Podócito (MEV)

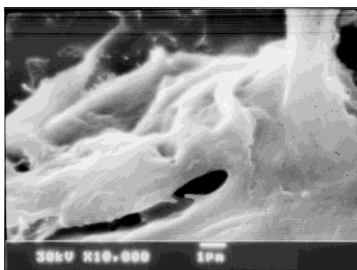


Figura 3-69 – Podócito – detalhe pedicelo (MEV)

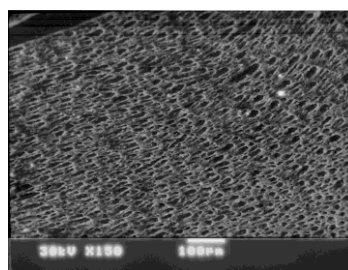


Figura 3-70 – Zona medular (MEV)

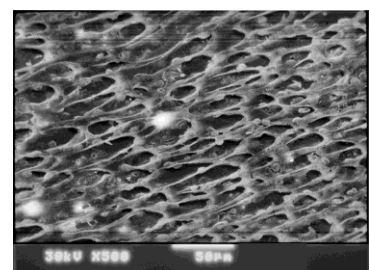


Figura 3-71 – Túbulos (MEV)

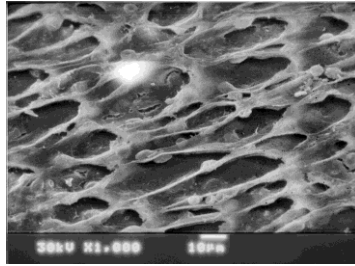


Figura 3-72 – Túbulos – detalhe interior (MEV)

3.2.3 Pulmão

Os pulmões, na sua porção terminal, são compostos pelos alvéolos pulmonares, que são compostos por dois tipos de células: pneumócitos tipo I e tipo II (Figura 3-76 e Figura 3-77).

Além dos alvéolos, também estão presentes os bronquíolos, por onde chega o ar para as trocas. Esta estrutura é revestida por epitélio cúbico (Figura 3-79).

A presença de cartilagem nos canais apenas está presente na zona mais alta da árvore respiratória, como por exemplo, o brônquio ou mesmo traqueia. Na Figura 3-78 é possível ver o brônquiolo, com o seu epitélio. É fácil a identificação da cartilagem no corte, quer no ML (Figura 3-75) quer no MEV (Figura 3-80). Numa ampliação à zona de cartilagem, é possível ver que é um material mais amorfo do que o resto do tecido biológico. (Figura 3-81)

Tal como acontece noutros órgãos, este também é irrigado. A presença de eritrócitos ajuda na análise da qualidade de preservação do corte, bem como serve de medida relativa.

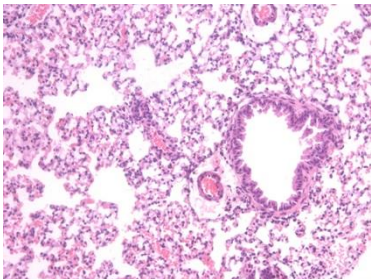


Figura 3-73 – Alvéolos pulmonares (10X, ML)

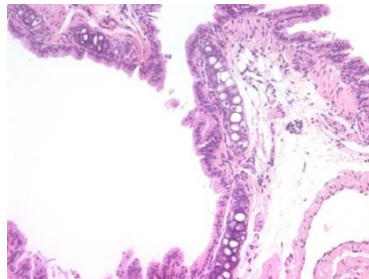


Figura 3-74 - Brônquios (10X, ML)

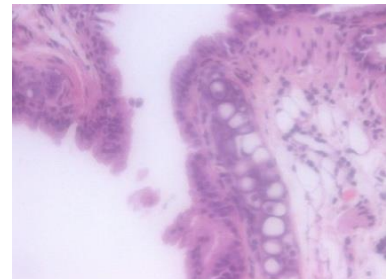


Figura 3-75 – Cartilagem (20X, ML)

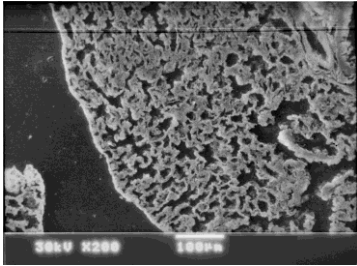


Figura 3-76 - Alvéolos pulmonares (MEV)

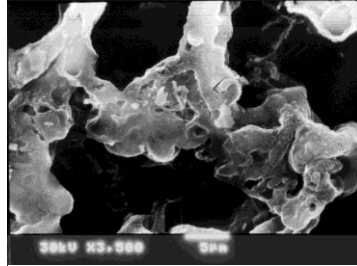


Figura 3-77 – Pneumócitos (MEV)

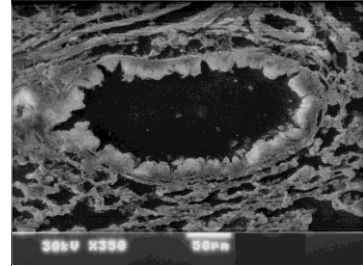


Figura 3-78 – Bronquíolos (MEV)

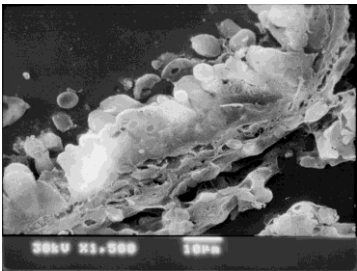


Figura 3-79 – Bronquíolo – detalhe da parede (MEV)



Figura 3-80 – Tecido cartilágneo (MEV)

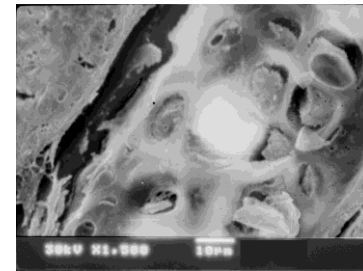


Figura 3-81 – Condrócitos (MEV)

3.2.4 Fígado

O fígado é um órgão maciço, composto por vasos (sanguíneos, linfáticos e hepáticos), bem como células do parênquima (Figura 3-82 e Figura 3-83).

As células do parênquima - hepatócitos - não são facilmente distinguíveis umas das outras. As únicas estruturas que é possível distinguir são os vasos (Figura 3-84, Figura 3-85 e Figura 3-86).

Não há muita informação que possa ser retirada deste tipo de tecido, num indivíduo saudável.

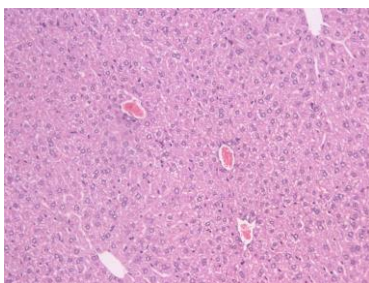


Figura 3-82 – Parênquima Hepático (10X, ML)

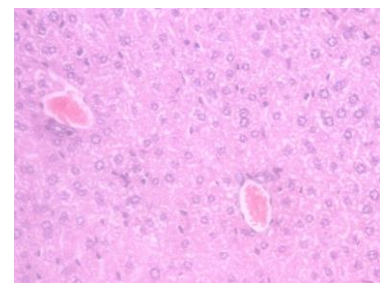


Figura 3-83 – Hepatócitos (20X, ML)

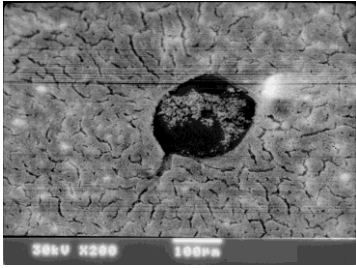


Figura 3-84 – Vaso (MEV)

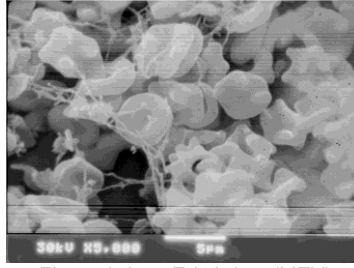


Figura 3-85 – Eritrócitos (MEV)

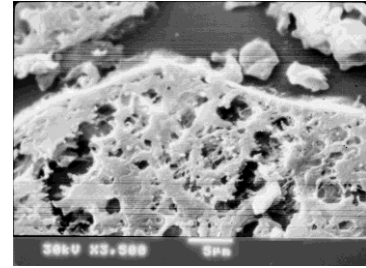


Figura 3-86 – Parênquima hepático (MEV)

3.2.5 Baço

O baço é um tecido de germinação de células linfóides. Não é fácil distinguir as diferentes células nem os centros germinativos, como na microscopia de luz (Figura 3-87 e Figura 3-88).

Embora de difícil identificação, é possível distinguir a presença de células do tecido linfóide no meio do parênquima (Figura 3-90). Tal como acontece em todos os órgãos, estão presentes vasos onde é possível ver células na parede do endotélio (Figura 3-91).

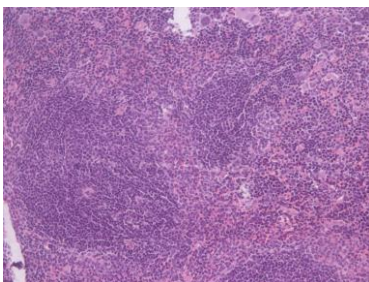


Figura 3-87 – Centros germinativos (10X, ML)

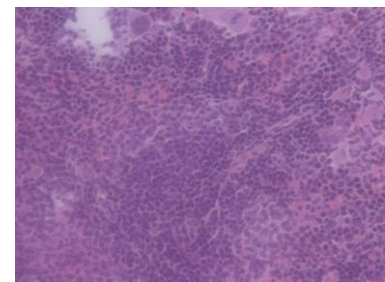


Figura 3-88 – Células (20X, ML)

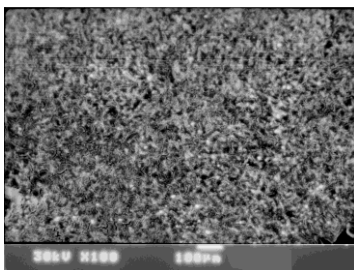


Figura 3-89 – Parênquima esplênico (MEV)

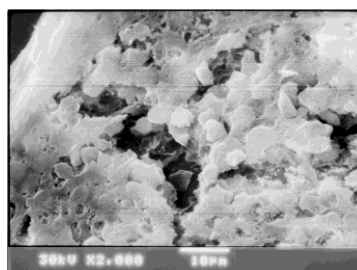


Figura 3-90 – Células (MEV)

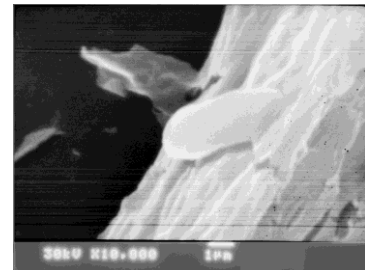


Figura 3-91 – Célula na parede do vaso (MEV)

3.2.6 Músculo Esquelético

O músculo esquelético é estriado, como o cardíaco, e devido ao facto de se estar a observar uma secção, tal como no coração, estamos perante vários tipos de orientação das fibras (Figura 3-92).

Numa baixa ampliação é fácil identificar as diferentes orientações das fibras. Por ser possível as diferentes orientações, visualizam-se as fibras longitudinais e fibras transversais.

Numa grande ampliação, é possível observar as miofibrilhas (num corte longitudinal) (Figura 3-94).

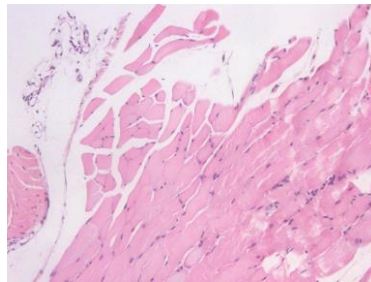


Figura 3-92 – Tecido muscular (10X, ML)

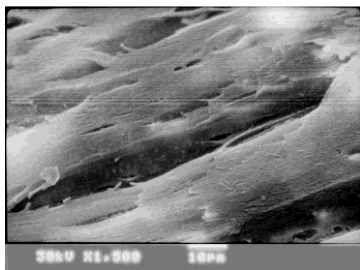


Figura 3-93 – Fibras longitudinais (MEV)

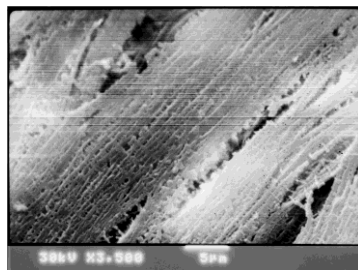


Figura 3-94 – Fibras longitudinais – detalhe (MEV)

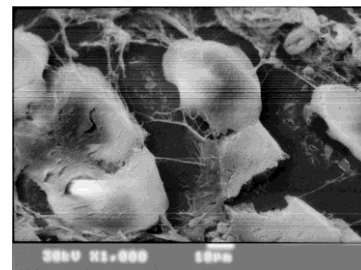


Figura 3-95 – Fibras transversais (MEV)

4 Discussão

4.1 Otimização do protocolo

A pouca bibliografia encontrada sobre a visualização de cortes histológicos num MEV fez com que fosse necessário a adaptação e otimização de protocolos de observação.

4.1.1 Espessura do corte

Uma das características que é importante ter bem definida é a espessura do corte, pois há que ter em atenção a aparência de tridimensionalidade que o MEV oferece.

No tecido pancreático, seria interessante encontrar os diferentes tecidos hormonais - o tecido endócrino (ilheus de Langerhans) e o tecido exócrino -, mas não foi possível visualizar o tecido endócrino nas lâminas usadas na visualização no MEV. A conclusão a que se pode chegar é que não é de fácil identificação dos diferentes tipos de tecido hormonal pela sua superfície, mas esta é possível pelo conteúdo das células, e essa distinção é feita quando se usam colorações para a visualização no ML, ou então, por ME, utilizando marcadores de elevada densidade de massa detetáveis por imagens de elétrões retrodifundidos.

Analisando agora a parte da profundidade de campo, concluiu-se os cortes de 5 μ m não são os ideais pois não apresentam tanta informação como os de 10 μ m ou 15 μ m. O mesmo acontece com estruturas circundantes, que não se consegue perceber com detalhe se são ductos ou apenas depressões, devido ao facto de não se perceber se tem fundo ou não, pois poderá ter sido cortado, na lâmina com o corte de 5 μ m, quando comparada com as restantes.

Relativamente à comparação entre as lâminas de 10 μ m e 15 μ m, não se encontram grandes diferenças, exceção feita à vaga referência que a lâmina de 15 μ m poderia ter mais informação relevante, mas que não acontece. Ou seja, ambas as lâminas dão informações sobre a profundidade das estruturas visualizadas. Contudo, a de 15 μ m, seria esperado que desse ainda mais informação sobre a profundidade, por ser mais espessa e conter, assim, mais material.

No tecido cardíaco, é suposto ver-se as três camadas que constituem o tecido: (1) epicárdio que possui tecido epitelial pavimentoso, vasos linfáticos e sanguíneos, tecido adiposo e conjuntivo; (2) miocárdio, que possui as células cardíacas, tecido conjuntivo, capilares e discos intercalares; (3) endocárdio, que possui tecido adiposo e conjuntivo.

Como no processamento para a visualização da amostra em ML o tecido adiposo não é conservado, esse não é visualizado nestas lâminas. Contudo, é possível distinguir qual é a parte do epicárdio pela presença abundante de vasos.

Relativamente ao miocárdio, é esperado ver as diversas camadas de tecido muscular com diferentes orientações. Numa maior ampliação dessa zona é possível ver uns prolongamentos, que não são

mais que os discos intercalares, vistos longitudinalmente (comunicações e adesões entre duas fibras musculares) (Figura 3-13 e Figura 3-14).

Relativamente à profundidade de campo, analisando a lâmina de 15 μ m não dá para perceber com nitidez a informação que possa ser recolhida, como acontece com as lâminas de 10 μ m e 5 μ m. Isto pode dever-se ao protocolo usado, mas não é muito seguro, pois existem partes da amostra que se encontram bem nítidas e outras que não, por isso crê-se que o problema esteja mesmo no tipo de tecido e não no protocolo. Analisando as lâminas de 5 μ m e 10 μ m, acontece o mesmo que aconteceu no tecido pancreático. Os cortes de 5 μ m não apresentam tanta informação de profundidade como os cortes de 10 μ m.

Assim, tendo em conta esta experiência, foi escolhida a lâmina de 10 μ m devido à melhor interpretação da informação nela contida, bem como devido às dificuldades técnicas de preparação das amostras, ou seja, na obtenção de cortes com a espessura de 15 μ m na sua melhor qualidade, tal como descrito na bibliografia [2], [66].

Tendo em conta as conclusões retiradas desta experiência, os cortes de 10 μ m são os ideais para a visualização de tecido animal no MEV.

Na tabela apresentada (Tabela 4-1) está resumido a conclusão desta experiência.

Tabela 4-1- Tabela comparativa entre as diversas espessuras em análise

	5 μ m	10 μ m	15 μ m
<i>Identificação das estruturas</i>	Fraco	Forte	Moderado
<i>Profundidade de campo</i>	Moderado	Forte	Forte

4.1.2 Secagem do corte

Nos protocolos para a visualização de amostras biológicas em MEV procede-se à secagem das mesmas. Na maioria da bibliografia, quando se analisavam amostras biológicas, usava-se o CPD, alternativamente pode ser usada a liofilização com o T-butanol, que oferece resultados idênticos e nalguns casos melhores que o CPD. Este método pode também ser realizado com equipamento habitualmente disponível nos laboratórios, tendo sido, portanto, adotado neste estudo, juntamente com a secagem a partir de HMDS, de uso generalizado pela sua facilidade. O protocolo com a secagem a partir da água serviu como controlo, principalmente por se querer evitar os resultados obtidos neste protocolo.

Analisando agora a definição das estruturas, o método com água apresenta pior definição que o método de HMDS, como é expectável, e o método de T-butanol apresenta os melhores resultados nesta característica. Ainda assim, é possível ver bastantes características do tecido quando se fez a secagem do corte a partir de água, desde que estas não contenham estruturas pequenas ou frágeis.

Relativamente à retração do tecido, é possível estudar esta alteração do tecido quando se analisa o mesmo campo da amostra. Um bom exemplo disto são os glomérulos (Figura 3-33 à Figura 3-37), em que, na mesma ampliação, o glomérulo é ligeiramente menor no corte tratado com HMDS do que no corte tratado com o T-butanol. Tal artefacto pode-se dever aos efeitos da tensão superficial na amostra ser seca ao ar, havendo uma interface líquido-ar, enquanto que com o T-butanol, o reagente é sublimado, não havendo a interface, não alterando a preservação da amostra, tal como descrito na bibliografia [78].

Analisando o colapso estrutural das amostras, notou-se que este estava bastante presente no método que utiliza a secagem a partir da água, tal como seria de esperar, e menos presente no método com o HMDS. O método com o T-butanol, é o que provoca menos colapso, tal como descrito na bibliografia [69], [70].

De um modo geral, quer no tecido pancreático quer no tecido cardíaco, quando se utilizaram baixas ampliações, não foi possível distinguir com clareza qual o melhor protocolo. No entanto, com ampliações mais elevadas, para ver as estruturas mais pequenas e frágeis, estas estruturas apresentam uma melhor preservação com o T-butanol.

Uma das conclusões que se pode tirar é que o método de secagem pelo HMDS é bom, tendo em conta o tempo de execução que é necessário, quando comparado com o método de T-butanol. No entanto, se se quer visualizar estruturas muito finas, pequenas e frágeis, a altas ampliações, o melhor método é o que utiliza o T-butanol, pois foi esse que apresentou melhores resultados, quando os cortes foram vistos num FESEM (microscópio de maior resolução). Porque quando vistos os dois cortes num MEV convencional, as diferenças entre protocolos eram mínimas, a não ser a presença de retração dos tecidos.

Tendo em conta as conclusões retiradas desta experiência, os cortes tratados com o T-butanol são os ideais para a visualização de tecido animal no MEV, principalmente quando é necessário visualizar estruturas pequenas e frágeis.

Na tabela apresentada (Tabela 4-2) está resumido a conclusão desta experiência.

Tabela 4-2 - Tabela comparativa entre os diversos métodos de secagem em análise

	<i>Água</i>	<i>HMDS</i>	<i>T-butanol</i>
<i>Colapso estrutural</i>	Forte	Moderado	Fraco
<i>Definição da estrutura</i>	Fraco	Moderado	Forte
<i>Retração do tecido</i>	Forte	Forte	Fraco

4.1.3 Condutividade do corte

Para a visualização de amostras biológicas em MEV, estas têm que ter a superfície condutora. Para o efeito, recorre-se ao revestimento da amostra com uma camada condutora, em regra metálica. No entanto, os líquidos iónicos são usados com alguma frequência para amostras biológicas, por serem miscíveis em água e por tornar a amostra condutora. Resolveu-se testar o método para perceber se neste caso, com cortes histológicos tal funcionaria, pois se funcionasse, não seria necessária a utilização do passo de secagem da amostra [82], tornando o protocolo mais simples.

No entanto, a metodologia de utilizar o IL sem antes recorrer à secagem da amostra biológica não deve ser aplicada, pois não foi possível visualizar qualquer tipo de estrutura nem tecido quando colocado no MEV. Um dos fatores que estará a contribuir para que este protocolo não ter funcionado poderá ser a necessidade de reidratar a amostra seccionada, pois o IL necessita que a amostra possua água, o que não acontece numa secção de parafina.

Quando o corte é coberto com IL, não apresenta grande detalhe e apresenta um contraste diferente, quando comparado com os outros protocolos, quer no tecido pancreático quer no tecido cardíaco. Este contraste diferente encontra-se descrito na bibliografia, pois o IL não é um condutor elétrico, mas sim iónico, podendo também apresentar pouca intensidade de sinal, que interfere com a interpretação da imagem devido ao ruído produzido.

Quando o corte é coberto com um metal (cromio, neste caso) são visíveis os efeitos de cargas, mas estes são ultrapassáveis quando se faz um recobrimento mais denso da amostra, quer no tecido pancreático quer no tecido cardíaco. Relativamente à intensidade de sinal, este é mais intenso que o IL simples.

Quando se fez a combinação dos métodos, com a incubação do corte com IL e depois cobrimento metálico, é possível observar a redução dos efeitos de carga. No tecido cardíaco é possível observar mais contraste e mais efeitos de cargas, o que não é benéfico para uma boa qualidade da imagem.

Tendo em conta as conclusões retiradas desta experiência, os cortes tratados com o cobrimento metálico (cromio) são os melhores nas condições utilizadas para a visualização de tecido animal preparado para ML no MEV.

Na tabela apresentada (Tabela 4-3) está resumido a conclusão desta experiência.

Tabela 4-3 - Tabela comparativa entre os diversos métodos de condutividade em análise

	<i>IL</i>	<i>Metais</i>	<i>IL com Metais</i>
<i>Intensidade do sinal</i>	Fraco	Forte	Forte
<i>Efeitos de cargas</i>	Fraco	Moderado	Moderado

4.2 Observações após otimização do protocolo de preparação de amostras

Após ter sido feita a otimização do protocolo para a visualização de cortes histológicos no MEV, aplicou-se o mesmo protocolo em diversos tecidos, para verificar a exequibilidade em diferentes tecidos.

Alguns tecidos apresentam mais estruturas que outros, sendo, assim, mais fácil analisá-los.

4.2.1 Coração

O tecido cardíaco é um tecido com diversas estruturas visíveis no MEV. As diferentes orientações das fibras, as ligações entre células, o interior dos vasos, são quase tudo estruturas que não são muito visíveis na microscopia de luz, mas visível na ME. Ao serem visíveis no MEV, com o devido estudo dessas estruturas, será possível identificar as alterações celulares que não são visíveis na microscopia de luz.

Comparando as estruturas vistas a uma baixa ampliação em ambos os microscópios (Figura 3-53 e Figura 3-56, bem como Figura 3-55 e Figura 3-58), é possível notar a capacidade que o MEV apresenta de apresentar uma imagem muito semelhante à apresentada pelo ML. Isto permite ao utilizador do microscópio ter uma orientação facilitada do tecido e a partir daí analisar estruturas a uma ampliação muito maior, como acontece quando se observa um vaso - Figura 3-54 e Figura 3-57.

4.2.2 Rim

O tecido renal, tal como acontecia no tecido cardíaco, é um tecido com diversas estruturas visíveis no MEV. A facilidade de ampliação numa parte do nefrónio - o glomérulo (Figura 3-65 e Figura 3-67) - permite a visualização de células como os podócitos (Figura 3-68) com grande clareza, bem como a visualização dos prolongamentos das mesmas – pedicelos (Figura 3-69) -, que fazem com que a utilização do MEV juntamente com a microscopia de luz, seja útil para estudar a estrutura da membrana glomérulo-capilar.

A visualização de cortes com maior resolução, como as imagens obtidas no MEV, facilita a exploração e identificação de certas estruturas, como os vasos, que poderão fornecer informações sobre a fisiologia e patologias renais.

O estudo dos podócitos e dos seus pedicelos, que é algo que é feito, normalmente em MET, pode consequentemente ser feita em MEV, havendo patologias que estão relacionadas com alterações nestas células [85]. Relativamente ao MET; o MEV permite um processamento mais simples e rápido, levando a que seja feito também um diagnóstico em menos tempo.

4.2.3 Pulmão

O tecido pulmonar também é um dos tecidos analisados em que se observam diversas estruturas de fácil identificação e que poderão dar mais informação. Contudo, só com o sinal de eletrões secundários, as informações obtidas não são diferentes das obtidas em ML, tal como é mostrado quando comparado as duas microscopias:

- Figura 3-73 com Figura 3-76 – a identificação imediata dos alvéolos pulmonares, sendo a única diferença a percepção de profundidade presente no MEV;
- Figura 3-75 com Figura 3-80 – a identificação do material cartilágneo é feita em ML pela diferente afinidade do corante, enquanto que em MEV é feita pela diferente interação com os eletrões, tornando-se ligeiramente mais brilhante.

A utilização de outros sinais, como os eletrões retrodifundidos ou os raios-X oferecem a possibilidade de identificar e analisar partículas no parênquima pulmonar [51].

4.2.4 Fígado

O tecido hepático, ao contrário dos tecidos até agora mencionados, quando visto no MEV, nas condições experimentais, não fornece mais informação que aquela obtida no ML, tirando a facilidade de ampliação da imagem (Figura 3-82 e Figura 3-86). Aliás, a utilização de outras colorações para o ML dão mais informação que no MEV, como o exemplo das colorações de prata para a reticulina [24]. De assinalar que o MEV também poderá ser usado, por exemplo com imagens de eletrões retrodifundidos para analisar secções coradas com metais pesados, como a prata.

4.2.5 Baço

O tecido esplénico, sendo um tecido germinativo linfóide, é composto por uma imensa variedade de células diferentes. Contudo, estas não são de fácil identificação no MEV, pois à superfície, elas não diferem muito entre si. Assim, tal como acontece no fígado, a informação que se pode obter no MEV não é uma mais-valia nas condições da experiência, quando comparada com as informações obtidas pelas outras microscopias.

4.2.6 Músculo Esquelético

No músculo esquelético, é possível observar as diferentes orientações das fibras e observar as miofibrilhas quando estas se encontram cortadas longitudinalmente. Mas tal como acontece com os tecidos hepáticos e esplénicos, não existem mais estruturas para observar no músculo que poderão dar mais informação sobre as alterações celulares. E tal como acontece com o coração, o músculo estriado não é um tecido muito frequente na AP, sendo só feita uma biópsia deste tecido, na maioria das vezes, para determinar alguma patologia neurológica, realizando histoenzimologia.

5 Considerações finais

5.1 Conclusão

De acordo com os resultados obtidos, é possível concluir que a utilização do MEV na prática do diagnóstico, usando a microscopia correlativa, é exequível. No entanto, alguns tipos de tecido não revelaram benefícios com a metodologia utilizada para a observação de tecidos normais. O estudo de amostras patológicas, em particular as produzidas por corpos estranhos, poderá eventualmente revelar aplicações com indicações para o uso do MEV.

A escassa bibliografia existente, no que diz respeito à metodologia que poderia ser aplicada neste tipo de amostras - tecido fixado em FNT e incluído em parafina - fez com que fosse necessário fazer uma adaptação dos diversos protocolos existentes para este tipo de material – em particular na observação de cortes histológicos.

A obtenção de cortes histológicos para que o tecido possa ser visto no MEV mostrou-se ser uma técnica que tem algum valor no diagnóstico. A visualização de certas estruturas numa maior ampliação, mas ainda assim, sem qualquer disrupção da amostra vista em ML, dá mais informação, podendo fornecer informação vital para um melhor diagnóstico.

O MEV disponível no laboratório só tinha instalado o detetor de eletrões secundários, que foi o utilizado no trabalho, e a partir do qual todas estas conclusões foram retiradas. No entanto, os sinais que poderiam ser obtidos pelo detetor de eletrões retrodifundidos ou mesmo pela espectroscopia de dispersão de energia de radiação-X forneceriam outro tipo de informação, também possivelmente relevante para o diagnóstico de diversas patologias. Contudo, diversos aspetos das patologias teriam que ser estudados para melhor os classificar usando estes detetores.

5.2 Sugestões para trabalhos futuros

Tendo em conta as conclusões retiradas deste trabalho, considera-se pertinente fazer algumas sugestões para estudos futuros:

- estudar outras características da amostra, em particular cortes corados com metais pesados com o MEV, para explorar outras potencialidades;
- estudar outros tipos de tecido, bem como analisar tecidos já com patologias, para perceber o verdadeiro impacto desta técnica, no diagnóstico das mesmas;
- estudar os diferentes tipos de sinais que se podem obter de um MEV além dos eletrões secundários - eletrões retrodifundidos, espectroscopia de dispersão de energia de radiação-X, entre outros.

6 Bibliografia

- [1] K. A. Sjollema, U. Schnell, J. Kuipers, R. Kalicharan, e B. N. G. Giepmans, «Correlated Light Microscopy and Electron Microscopy», em *Methods in Cell Biology*, vol. 111, Elsevier, 2012, pp. 157–173.
- [2] S. D. Russell e C. P. Daghljan, «Scanning electron microscopic observations on deembedded biological tissue sections: Comparison of different fixatives and embedding materials», *J. Electron Microsc. Tech.*, vol. 2, n. 5, pp. 489–495, 1985.
- [3] H. M. Goldman, J. Kindsvater, e T. G. Bromage, «Correlative light and backscattered electron microscopy of bone--Part I: Specimen preparation methods.», *Scanning*, vol. 21, n. 1, pp. 40–43, 1998.
- [4] K. Jahn, D. Barton, e F. Braet, «Correlative Fluorescence- and Scanning, Transmission Electron Microscopy for Biomolecular Investigation», *Mod. Res. Educ. Top. Microsc.*, pp. 203–211, 2007.
- [5] F. Braet, E. Wisse, P. Bomans, P. Frederik, W. Geerts, A. Koster, L. Soon, e S. Ringer, «Contribution of high-resolution correlative imaging techniques in the study of the liver sieve in three-dimensions», *Microsc. Res. Tech.*, vol. 70, n. 3, pp. 230–242, Mar. 2007.
- [6] M. S. Lucas, M. Günthert, P. Gasser, F. Lucas, e R. Wepf, «Bridging Microscopes», em *Methods in Cell Biology*, vol. 111, Elsevier, 2012, pp. 325–356.
- [7] K. L. McDonald, «A review of high-pressure freezing preparation techniques for correlative light and electron microscopy of the same cells and tissues», *J. Microsc.*, vol. 235, n. 3, pp. 273–281, 2009.
- [8] A. A. Mironov e G. V. Beznoussenko, «Correlative Microscopy», em *BS:MCB*, vol. 113, Elsevier, 2013, pp. 209–255.
- [9] K. A. Jahn, D. A. Barton, K. Kobayashi, K. R. Ratinac, R. L. Overall, e F. Braet, «Correlative microscopy: Providing new understanding in the biomedical and plant sciences», *Micron*, vol. 43, n. 5, pp. 565–582, 2012.
- [10] S. S. Biel, K. Kawaschinski, K.-P. Wittern, U. Hintze, e R. Wepf, «From tissue to cellular ultrastructure: closing the gap between micro- and nanostructural imaging», *J. Microsc.*, vol. 212, n. 1, pp. 91–99, Out. 2003.
- [11] K. Tánaka, «High resolution scanning electron microscopy of the cell», *Biol. Cell*, vol. 65, n. 2, pp. 89–98, 1989.
- [12] J. L. Norenburg e J. M. Barrett, «Steedman's polyester wax embedment and de-embedment for combined light and scanning electron microscopy», *J. Electron Microsc. Tech.*, vol. 6, n. 1, pp. 35–41, Mai. 1987.

- [13] H. Kondo e T. Ushiki, «Polyethylene glycol (PEG) embedding and subsequent de-embedding as a method for the correlation of light microscopy, scanning electron microscopy, and transmission electron microscopy», *J. Electron Microsc. Tech.*, vol. 2, n. 5, pp. 457–462, 1985.
- [14] M. Slater, «A method for the examination of the same cell using light, scanning and transmission electron microscopy.», *Biotech. Histochem.*, vol. 1, n. 2, pp. 63–8, Jan. 1991.
- [15] P. J. Goodhew, F. J. Humphreys, e R. Beanland, «Electron microscopy and analysis», *Ann. Phys. (N. Y.)*, vol. 54, p. 258, 2001.
- [16] M. Abramowitz e M. Davidson, «Introduction to Microscopy», *Molecular Expressions*, 2007. [Em linha]. Disponível em: <http://micro.magnet.fsu.edu/primer/anatomy/introduction.html>.
- [17] R. F. Egerton, *Physical Principles of Electron Microscopy*. Boston, MA: Springer US, 2005.
- [18] M. F. Chisholm, *Scanning Microscopy for Nanotechnology*. New York, NY: Springer New York, 2007.
- [19] K. E. CARR, P. G. TONER, e K. M. SALEH, «Scanning electron microscopy», *Histopathology*, vol. 6, n. 1, pp. 3–24, Jan. 1982.
- [20] K. Cortese, A. Diaspro, e C. Tacchetti, «Advanced Correlative Light/Electron Microscopy: Current Methods and New Developments Using Tokuyasu Cryosections», *J. Histochem. Cytochem.*, vol. 57, n. 12, pp. 1103–1112, Dez. 2009.
- [21] I. M. Watt, *The principles and practice of electron microscopy*. Cambridge: Cambridge University Press, 1997.
- [22] D. B. Murphy e M. W. Davidson, *Fundamentals of Light Microscopy and Electronic Imaging: Second Edition*. 2012.
- [23] ammf: Australian Microscopy & Microanalysis Research Facility, «Train for advanced research with MyScope™: Confocal Microscopy».
- [24] D. Bancroft e A. Stevens, *Theory and practice of histological techniques*, 3rd ed. 1990.
- [25] C. Freudenrich, «How Light Microscopes Work», *How St. Work.*, 2001. <http://science.howstuffworks.com/light-microscope.htm>
- [26] D. A. Gaudet e E. G. Kokko, «Application of Scanning Electron Microscopy to Paraffin-Embedded Plant Tissues to Study Invasive Processes of Plant-Pathogenic Fungi», *Phytopathology*, vol. 74, n. 9, p. 1078, 1984.
- [27] J. I. Goldstein, D. E. Newbury, P. Echlin, D. C. Joy, C. E. Lyman, E. Lifshin, L. Sawyer, e J. R. Michael, *Scanning Electron Microscopy and X-ray Microanalysis*. Boston, MA: Springer US, 2003.
- [28] D. J. Stokes, *Principles and Practice of Variable Pressure/Environmental Scanning Electron*

- Microscopy (VP-ESEM)*. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2008.
- [29] O. C. Wells, M. S. Gordon, e L. M. Gignac, «Past, present, and future of backscatter electron (BSE) imaging», vol. 8378, n. 914, p. 837802, 2012.
- [30] W. Denk e H. Horstmann, «Serial Block-Face Scanning Electron Microscopy to Reconstruct Three-Dimensional Tissue Nanostructure», *PLoS Biol.*, vol. 2, n. 11, p. e329, Out. 2004.
- [31] R. M. Glaeser, «Electron microscopy of biological specimens in liquid water», *Biophys. J.*, vol. 103, n. 1, pp. 163–164, 2012.
- [32] C. E. Lyman, J. I. Goldstein, A. D. Romig, P. Echlin, D. C. Joy, D. E. Newbury, D. B. Williams, J. T. Armstrong, C. E. Fiori, E. Lifshin, e K.-R. Peters, *Scanning Electron Microscopy, X-Ray Microanalysis, and Analytical Electron Microscopy*. Boston, MA: Springer US, 1990.
- [33] D. E. Newbury, D. C. Joy, P. Echlin, C. E. Fiori, e J. I. Goldstein, *Advanced Scanning Electron Microscopy and X-Ray Microanalysis*. Boston, MA: Springer US, 1986.
- [34] R. F. Egerton, *Physical principles of electron microscopy: an introduction to TEM, SEM, and AEM*. New York, NY: Springer, 2005.
- [35] J. Goldstein, D. E. Newbury, P. Echlin, D. C. Joy, A. D. R. Jr, C. E. Lyman, C. Fiori, e E. Lifshin, *Scanning Electron Microscopy and X-Ray Microanalysis: A Text for Biologists, Materials Scientists, and Geologists*. Springer Science & Business Media, 2012.
- [36] J. Goldstein, *Practical Scanning Electron Microscopy: Electron and Ion Microprobe Analysis*. Springer Science & Business Media, 2012.
- [37] ammr: Australian Microscopy & Microanalysis Research Facility, «Microanalysis», *MyScope*.
- [38] ammr: Australian Microscopy & Microanalysis Research Facility, «Scanning Electron Microscope - Training module», *MyScope - Train. Adv. Res.*, pp. 8–38, 2008.
- [39] R. Mehta, *Scanning Electron Microscopy*. InTech, 2012.
- [40] D. B. Williams e C. B. Carter, «The Transmission Electron Microscope», pp. 3–17, 1996.
- [41] J. Caplan, M. Niethammer, R. M. Taylor, e K. J. Czymmek, «The power of correlative microscopy: multi-modal, multi-scale, multi-dimensional», *Curr. Opin. Struct. Biol.*, vol. 21, n. 5, pp. 686–693, Out. 2011.
- [42] C. Loussert Fonta e B. M. Humbel, «Correlative microscopy», *Arch. Biochem. Biophys.*, vol. 581, pp. 98–110, Set. 2015.
- [43] C. Wrede, C. Heller, J. Reitner, e M. Hoppert, «Correlative light/electron microscopy for the investigation of microbial mats from Black Sea Cold Seeps», *J. Microbiol. Methods*, vol. 73, n. 2, pp. 85–91, Mai. 2008.
- [44] H. M. Abandowitz e H. D. Geissinger, «Preparation of cells from suspensions for correlative

- scanning electron and interference microscopy.», *Histochemistry*, vol. 45, n. 2, pp. 89–94, Nov. 1975.
- [45] K. L. MCDONALD, «A review of high-pressure freezing preparation techniques for correlative light and electron microscopy of the same cells and tissues», *J. Microsc.*, vol. 235, n. 3, pp. 273–281, Set. 2009.
- [46] I. Solomonov, D. Talmi-Frank, Y. Milstein, S. Addadi, A. Aleshin, e I. Sagi, «Introduction of correlative light and airSEM™ microscopy imaging for tissue research under ambient conditions.», *Sci. Rep.*, vol. 4, p. 5987, 2014.
- [47] M. Razi e S. A. Tooze, «Chapter 17 Correlative Light and Electron Microscopy», em *Methods Enzymol*, 1.ª ed., vol. 452, n. 8, Elsevier Inc., 2009, pp. 261–275.
- [48] F. J. Timmermans e C. Otto, «Contributed Review: Review of integrated correlative light and electron microscopy», *Rev. Sci. Instrum.*, vol. 86, n. 1, p. 11501, Jan. 2015.
- [49] E. A. Smith, B. P. Cinquin, G. McDermott, M. A. Le Gros, D. Y. Parkinson, H. T. Kim, e C. A. Larabell, «Correlative microscopy methods that maximize specimen fidelity and data completeness, and improve molecular localization capabilities», *J. Struct. Biol.*, vol. 184, n. 1, pp. 12–20, Out. 2013.
- [50] K. Ohta, S. Sadayama, A. Togo, R. Higashi, R. Tanoue, e K. Nakamura, «Beam deceleration for block-face scanning electron microscopy of embedded biological tissue», *Micron*, vol. 43, n. 5, pp. 612–620, Abr. 2012.
- [51] S.-B. Or, H. K. Ngai, e W. L. Yau, «Resin-slide for x-ray analysis of inorganic deposits on paraffin sections in the scanning electron microscope», *Pathology*, vol. 16, n. 3, pp. 319–323, 1984.
- [52] M. M. Jones, *Histological Atlas of the Laboratory Mouse*, vol. 140, n. Pt 1. 1985.
- [53] P. M. Treuting e S. M. Dintzis, *Comparative Anatomy and Histology*. Elsevier, 2012.
- [54] M.-F. Fortin, *O Processo de Investigação: Da concepção à realização*, 2 ed. Loures: Lusociência, 1999.
- [55] M. C. Abreu, L. Matias, e L. F. Peralta, *FÍSICA EXPERIMENTAL : UMA INTRODUÇÃO*, 1.ª ed. Lisbon: Editorial Presença, 1994.
- [56] F. Bergtold, *Circuitos Integrados aplicações práticas*. Porto: Editorial Presença, 1978.
- [57] M. Leach, «Ideal Op Amp Circuits», 2010.
- [58] J. J. Cathey, *Schaum's Outline of Electronic Devices and Circuits*. McGraw-Hill Education, 2002.
- [59] D. Hardt, «Introduction to the Operational Amplifier», Massachusetts, 2004.

- [60] M. Chaniotakis e D. Cory, «Operational Amplifier Circuits», 2006.
- [61] M. Psenicka, M. Tesarová, J. Tesitel, e J. Nebesárová, «Size determination of *Acipenser ruthenus* spermatozoa in different types of electron microscopy», *Micron*, vol. 41, n. 5, pp. 455–460, 2010.
- [62] A. K. Pathan, J. Bond, e R. E. Gaskin, «Sample preparation for scanning electron microscopy of plant surfaces-Horses for courses», *Micron*, vol. 39, n. 8, pp. 1049–1061, 2008.
- [63] Y. Ishigaki, Y. Nakamura, T. Takehara, N. Nemoto, T. Kurihara, H. Koga, H. Nakagawa, T. Takegami, N. Tomosugi, S. Miyazawa, e S. Kuwabata, «Ionic liquid enables simple and rapid sample preparation of human culturing cells for scanning electron microscope analysis», *Microsc. Res. Tech.*, vol. 74, n. 5, pp. 415–420, 2011.
- [64] R. Lighezan, F. Baderca, A. Alexa, M. Iacovliev, D. Bontę, E. D. Murărescu, e A. Nebunu, «The value of the reprocessing method of paraffin-embedded biopsies for transmission electron microscopy.», *Rom. J. Morphol. Embryol.*, vol. 50, n. 4, pp. 613–7, 2009.
- [65] M. A. Clark, «Salvage of paraffin-embedded material for use in scanning electron microscopy», *Stain Tech.*, vol. 47, n. 6, pp. 321–322, 1972.
- [66] H. Miyazaki, H. Uozaki, A. Tojo, S. Hirashima, S. Inaga, K. Sakuma, Y. Morishita, e M. Fukayama, «Application of low-vacuum scanning electron microscopy for renal biopsy specimens», *Pathol. Res. Pract.*, vol. 208, n. 9, pp. 503–509, 2012.
- [67] I. E. El Shennawy, D. J. Gee, e S. R. Aparicio, «A new technique for visualization of internal structure by SEM», *J. Microsc.*, vol. 132, n. 2, pp. 243–246, 1983.
- [68] A. Leis, B. Rockel, L. Andrees, e W. Baumeister, «Visualizing cells at the nanoscale», *Trends Biochem. Sci.*, vol. 34, n. 2, pp. 60–70, Fev. 2009.
- [69] F. Braet, R. De Zanger, e E. Wisse, «Drying cells for SEM, AFM and TEM by hexamethyldisilazane: a study on hepatic endothelial cells.», *J. Microsc.*, vol. 186, n. Pt 1, pp. 84–87, 1997.
- [70] J. Kistler e E. Kellenberger, «Collapse phenomena in freeze-drying», *J. Ultrastructure Res.*, vol. 59, n. 1, pp. 70–75, 1977.
- [71] D. Gusnard e R. H. Kirschner, «Cell and organelle shrinkage during preparation for scanning electron microscopy: effects of fixation, dehydration and critical point drying.», *J. Microsc.*, vol. 110, n. 1, pp. 51–7, Mai. 1977.
- [72] N. H. Hazrin-Chong e M. Manefield, «An alternative SEM drying method using hexamethyldisilazane (HMDS) for microbial cell attachment studies on sub-bituminous coal», *J. Microbiol. Methods*, vol. 90, n. 2, pp. 96–99, 2012.
- [73] P. Ruwin, «EM Sample Preparation», *Leica Microsystems*, n. July, pp. 3–16, 2013.

- [74] D. F. Bray, J. Bagu, e P. Koegler, «Comparison of hexamethyldisilazane (HMDS), Peldri II, and critical-point drying methods for scanning electron microscopy of biological specimens.», *Microsc. Res. Tech.*, vol. 26, n. 6, pp. 489–95, Dez. 1993.
- [75] J. L. Nation, «A new method using hexamethyldisilazane for preparation of soft insect tissues for scanning electron microscopy.», *Stain Technol.*, vol. 58, n. 6, pp. 347–51, 1983.
- [76] T. I. Baskin, T. J. Orr, M. Jercinovic, e M. Yoshida, «Sample Preparation for Scanning Electron Microscopy: The Surprising Case of Freeze Drying from Tertiary Butanol», *Microsc. Today*, vol. 22, n. 3, pp. 1–4, 2014.
- [77] E. E. Wheeler, J. B. Gavin, e R. N. Seelye, «Freeze-drying from tertiary butanol in the preparation of endocardium for scanning electron microscopy.», *Stain Technol.*, vol. 50, n. 5, pp. 331–7, Set. 1975.
- [78] T. Inoue e H. Osatake, «Drying Method of Biological Specimens for Scanning Method Microscopy: The t-Butyl Alcohol», *Arch. Histol. Cytol*, vol. 51, n. 1, pp. 53–59, 1988.
- [79] O. E. Zhuravlev, A. I. Ivanova, e R. M. Grechishkin, «Preparation of samples for SEM studies using an ionic liquid», *J. Surf. Investig. X-ray, Synchrotron Neutron Tech.*, vol. 9, n. 5, pp. 904–907, 2015.
- [80] H. PLUK, D. J. STOKES, B. LICH, B. WIERINGA, e J. FRANSEN, «Advantages of indium-tin oxide-coated glass slides in correlative scanning electron microscopy applications of uncoated cultured cells», *J. Microsc.*, vol. 233, n. 3, pp. 353–363, Mar. 2009.
- [81] L. E. Malick, R. B. Wilson, e D. Stetson, «Modified Thiocarbohydrazide Procedure for Scanning Electron Microscopy: Routine use for Normal, Pathological, or Experimental Tissues», *Stain Technol.*, vol. 50, n. 4, pp. 265–269, Jan. 1975.
- [82] S. Arimoto, M. Sugimura, H. Kageyama, T. Torimoto, e S. Kuwabata, «Development of new techniques for scanning electron microscope observation using ionic liquid», *Electrochim. Acta*, vol. 53, n. 21, pp. 6228–6234, 2008.
- [83] M. Bassi e C. Giacobini, «Scanning electron microscopy: a new technique in the study of the microbiology of works of art», *Int. Biodeterior. Biodegradation*, vol. 48, n. 1–4, pp. 55–66, Jan. 2001.
- [84] S. Kuwabata, T. Torimoto, a Imanishi, e T. Tsuda, «Use of Ionic Liquid Under Vacuum Conditions», *Ion. Liq. - New Asp. Futur.*, 2013.
- [85] K. Asanuma e P. Mundel, «The role of podocytes in glomerular pathobiology», *Clin. Exp. Nephrol.*, vol. 7, n. 4, pp. 255–259, Dez. 2003.
- [86] «Scanning electron microscopy (SEM)». .
- [87] M. H. Ross e W. Pawlina, *Histology: A Text and Atlas With Correlated Cell and Molecular*

Biology, 7.^a ed. Wolters Kluwer, 2015.

[88] «Ampop configurations» .

7 Apêndices

7.1 Material, Reagentes e Equipamentos de Proteção Individual

1. Material

- Banho-maria;
- Bateria de coloração para HE;
- Bisturi;
- Blocos de material arquivado (Coração, Rim e Pâncreas);
- Bomba rotativa;
- Cestos de lâminas plásticos;
- Cola de carbono;
- Esguicho de água destilada;
- Estirador;
- Estufa;
- Evaporador;
- Faca de microtomia;
- Fita-cola de carbono;
- Frascos de biopsia de 50 mL;
- Frigorífico;
- Funil;
- Gobelets de capacidade de 200 mL;
- Lamelas;
- Lâminas não adesivadas *Mariefeld*;
- Microscópio eletrônico de varrimento – Jeol JMS-5400;
- Microscópio de luz visível composto – Leica DMLB;
- Micrótomo de Minot;
- Pinças metálicas;
- Pincel;
- Pipetas de Pasteur;
- Placa fria;
- Processador automático;
- Provetas graduadas de 250 ml;
- Suportes metálicos;
- Tesoura;

- Tina de água fria.

2. Reagentes

- 2-metil-2-propanol (T-butanol);
- Água corrente;
- Água destilada;
- Etanol a 100%;
- Etanol a 70%;
- Etanol a 96%;
- Formaldeído neutro tamponado (FNT);
- Hexametildisilazano (HMDS);
- Líquido Iónico (IL);
- Parafina;
- Xileno.

3. Equipamentos de proteção individual

- Bata;
- Luvas de nitrilo.