

Preparação do Material Biológico para Observação em TEM



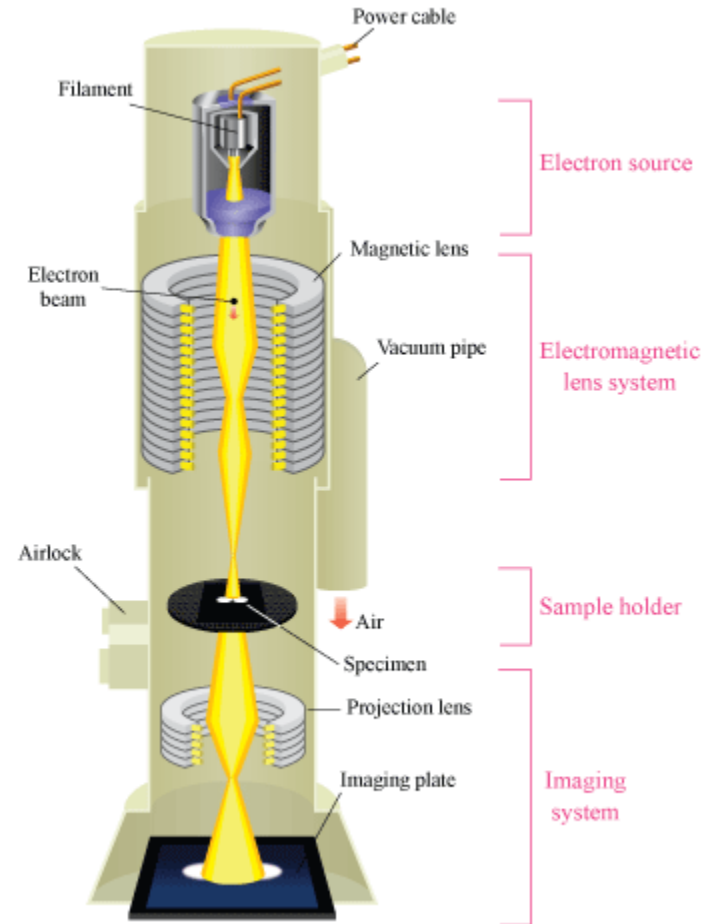
16º Workshop SEMAT/UM - Caracterização Avançada de Materiais

Sandra Mariza Monteiro
(smonteir@utad.pt)

Preparação do Material Biológico para Observação em TEM

✓ Vácuo na coluna do microscópio

✓ Baixo poder de penetração do feixe de elétrons



Fixação

✓ **Deve ser feita o mais rapidamente possível**

- A velocidade de penetração dos fixadores não é elevada
- Utilização de fragmentos de tecido de dimensões muito reduzidas (não exceder 1 mm³)
- Fragmentos demasiado grandes:
 - fixação deficiente;
 - dificultam a impregnação (inclusão)

Fixação

✓ Onde tudo começa ou tudo se perde

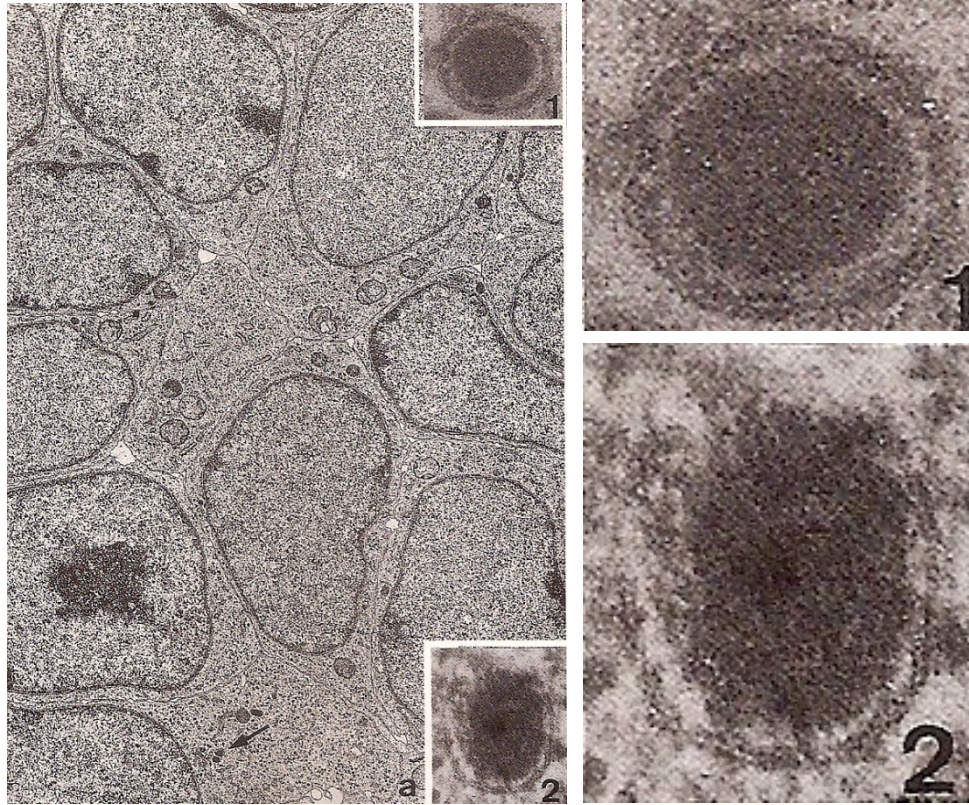
- Os reagentes utilizados na fixação introduzem alterações nas células;
- O pH, durante a fixação deve ser mantido dentro de certos valores – uso de tampões como veículos dos reagentes fixadores
- Composição em íões, osmolaridade, temperatura, tempo de fixação, concentração da substância fixadora

Fixação

✓ Temperatura, Duração e Concentração

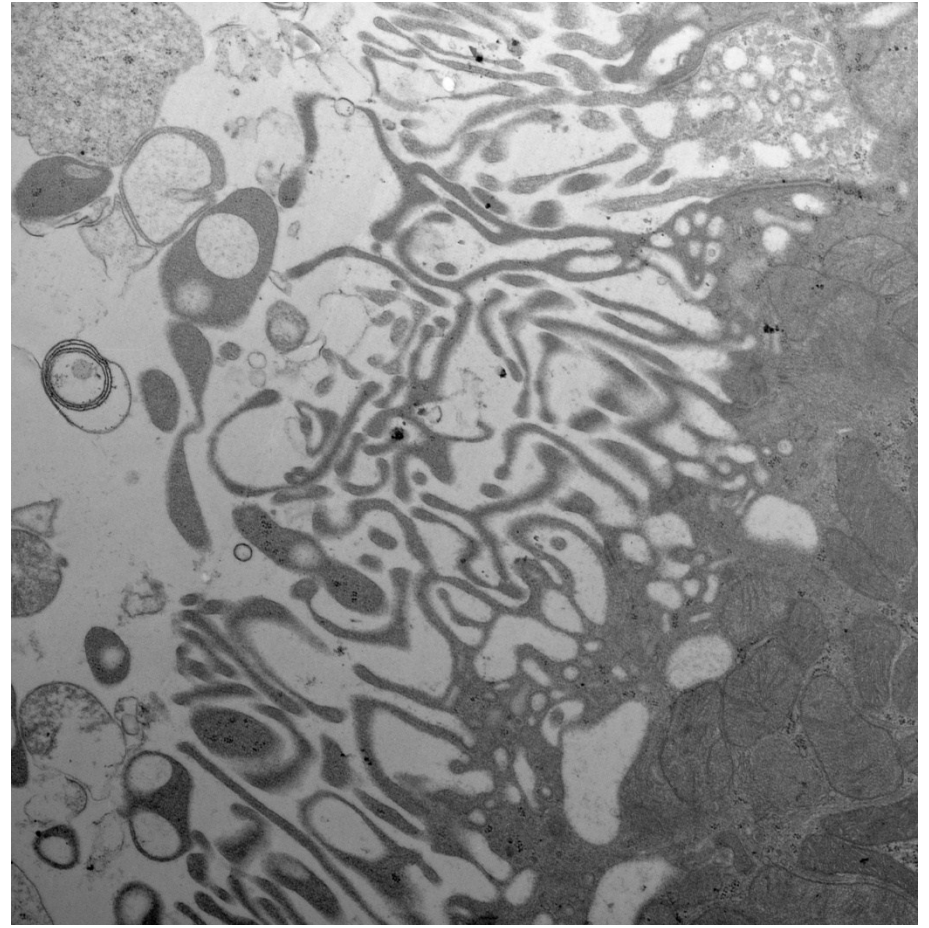
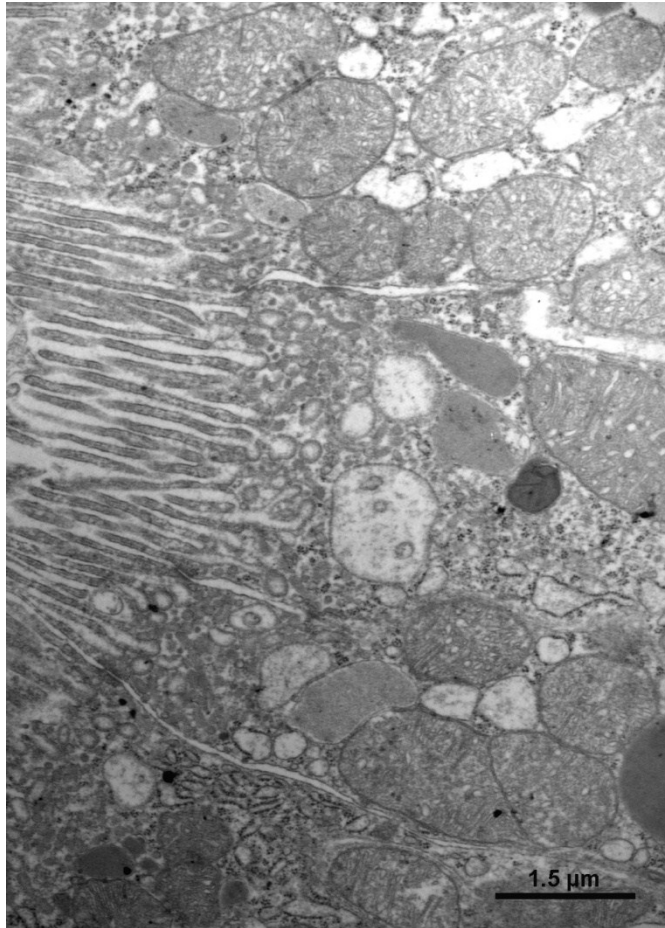
- Diminuição da temperatura atrasa a penetração do fixador; aumento da temperatura promove atividade autolítica
- A duração da fixação é, geralmente, exagerada (pode conduzir à extração de material celular)
- Concentração da substância fixadora, influencia a preservação de vários tipos de células/diferentes estruturas celulares

Fixação



(Salema e Santos, 1992)

Fixação



Fixação

✓ Tampões - Agentes ativos na fixação

- Reações com componentes celulares ou com os próprios fixadores
- Quando se usam tampões diferentes na pré-fixação e pós-fixação podem surgir produtos complexos de reação
- Tampões fosfato, tampão cacodilato

Fixação

✓ Fixadores - Tetróxido de Ósmio

- Reação com lípidos celulares (aspeto trilaminar nas membranas biológicas)
- Fixa as proteínas sem as coagular
- A reação com DNA e RNA é baixa
- Não apresenta reação com a maior parte das pentoses, hexoses e seus polímeros. Reage fracamente com o glicogénio [adição de $K_3Fe(CN)_6$]
- Forte reação com compostos fenólicos

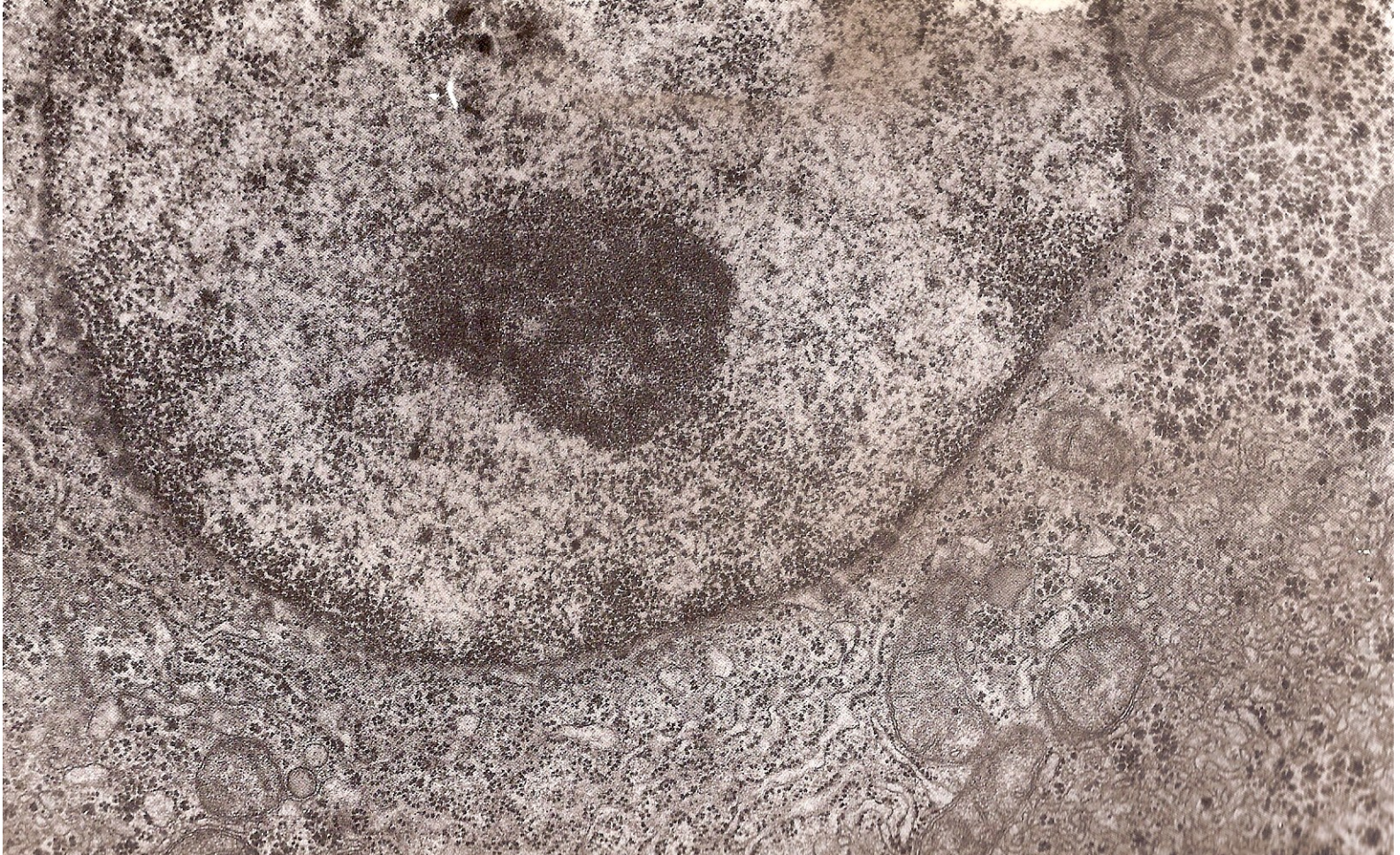
Fixação

✓ Fixadores - Tetróxido de Ósmio

- Utilizado na concentração de 1 a 2% (valores superiores causam clivagem oxidativa)
- Estudos citoquímicos – concentrações da ordem de 0,2 a 0,5%
- Usado como fixador secundário (material previamente fixado em glutaraldeído) – a tumefação provocada pelo OsO_4 compensa a contração provocada pelo glutaraldeído

Fixação

✓ Fixadores - Tetróxido de Ósmio



(Salema e Santos, 1992)

Fixação

✓ Fixadores - Glutaraldeído

- Estabiliza ativamente as proteínas – Pontes de Metileno
- Reage com alguns lípidos, sobretudo fosfolípidos
- A principal causa da retenção dos ácidos nucleicos , em material fixado com glutaraldeído, parece ser a reação com as proteínas associadas
- Reage com alguns hidratos de carbono, nomeadamente glicogénio e mucopolissacáridos

Fixação Dupla

Fixação

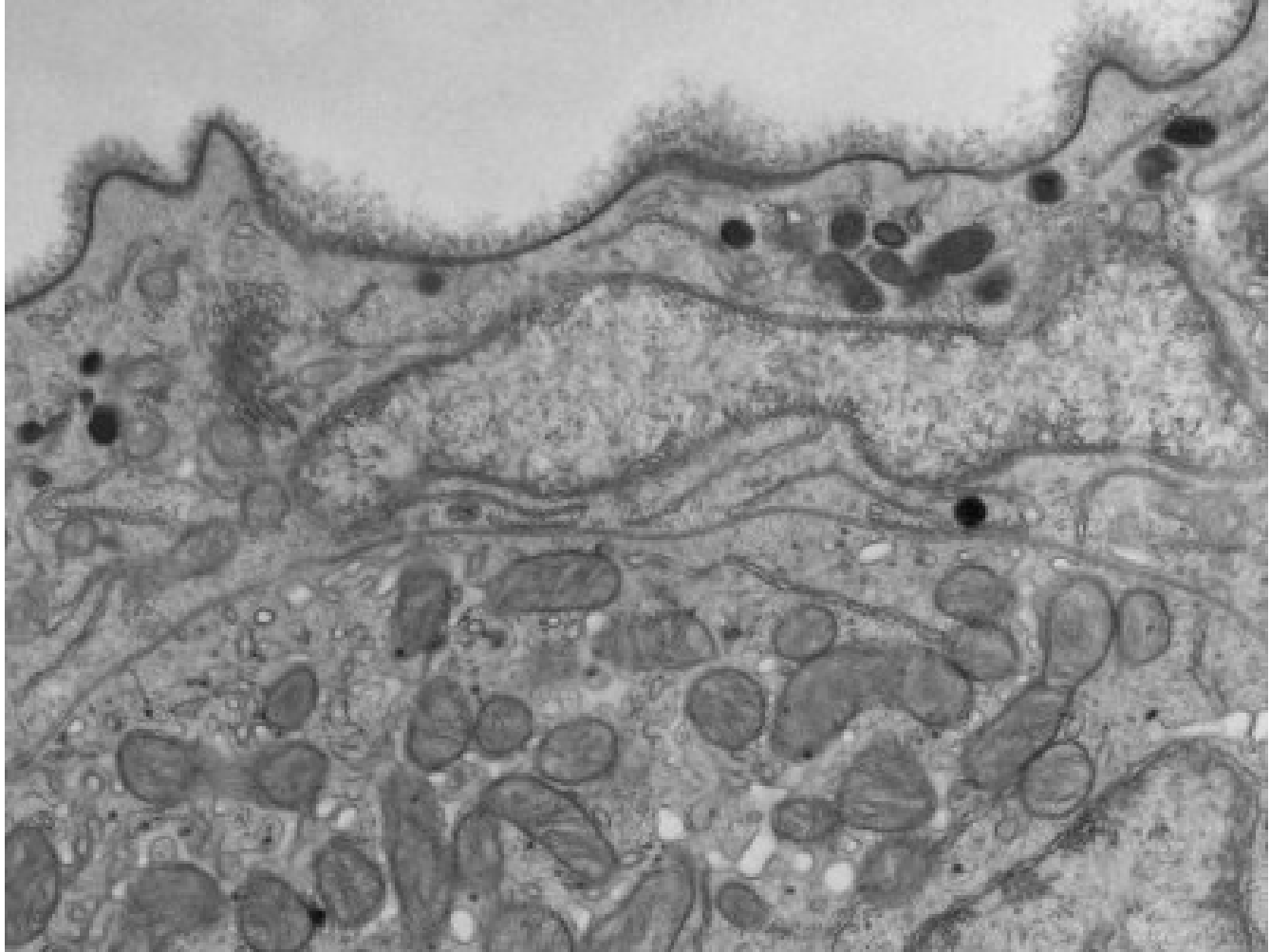
- ✓ Glutaraldeído 2% a 5% em Tampão Fosfato ou Cacodilato de Sódio (2 a 12h)

Pós-fixação

- ✓ Tetróxido de Ósmio 1 - 2 % (sol. H₂O) (1h 30' a 2h)
Manter no frio (4°C) e no escuro

Nota: Se necessário lavagem entre fixação e pós-fixação, com o mesmo tampão usado na fixação.

Fixação Dupla



Desidratação

✓ Por substituição de água em fase líquida

- Banhos com concentrações crescentes de álcool ou acetona
- O tempo de desidratação deve ser reduzido ao mínimo (extração de materiais celulares e contração do volume)



Impregnação/Infusão

✓ Substituição do agente de desidratação pelo plástico de **inclusão** (com utilização ou não de um solvente intermediário)

- Óxido de Propileno (15') + (15')
- Óxido de Propileno + Epon (3/1) (1h)
- Óxido de Propileno + Epon (1/1) (1h) *pode ficar durante a noite a 4°C
- Óxido de Propileno + Epon (1/3) (1h)
- Epon (3h)

* NOTA: 2 horas antes de incluir em Epon, colocar na estufa os moldes dos blocos com Epon no fundo (devidamente etiquetados).

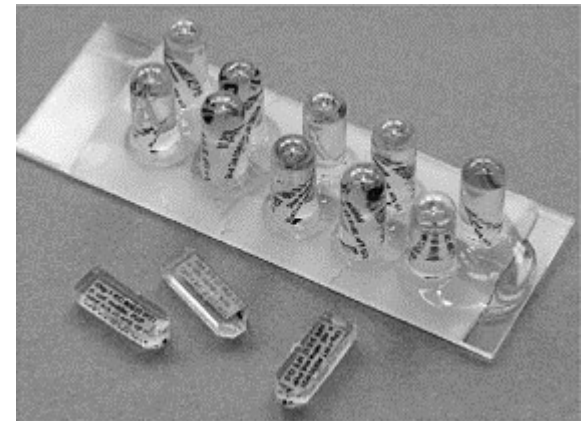
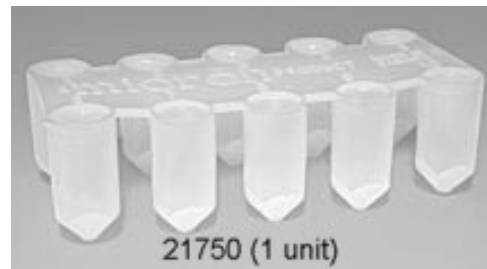
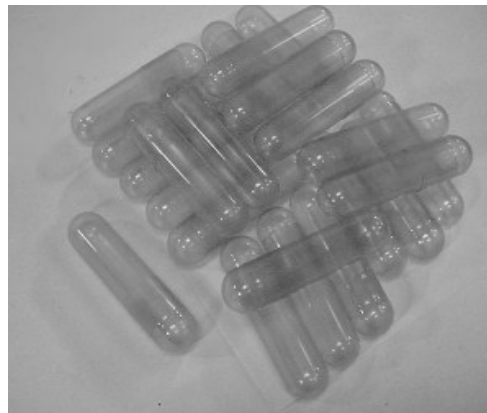
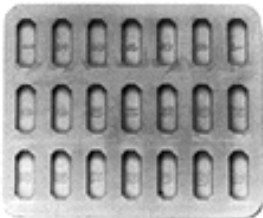
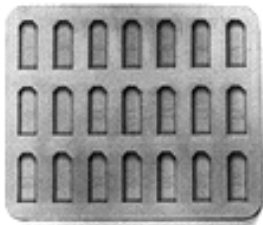
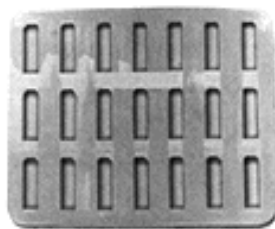
Impregnação/Infiltração

✓ Meios de inclusão

- LR White (baixa viscosidade)
- Resinas poliéster
- Resinas Epoxi (mais utilizados):
 - Boa estabilidade sob o feixe de elétrons
 - Reduzida contração na polimerização
 - Facilidade de corte e contrastação
 - Ex: Araldite, Epon 812
- Meios de inclusão hidrossolúveis (gelatina, agar, albumina sérica bovina)

Impregnação/Infiltração

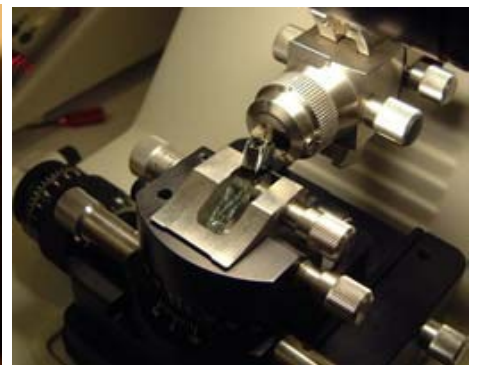
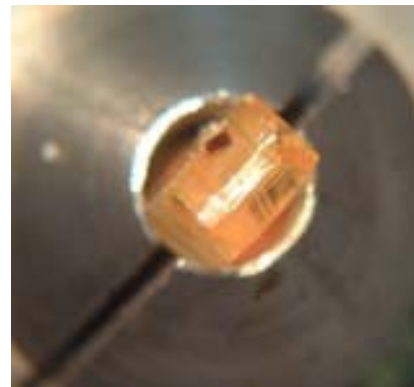
✓ Moldes de inclusão



Ultramicrotomia

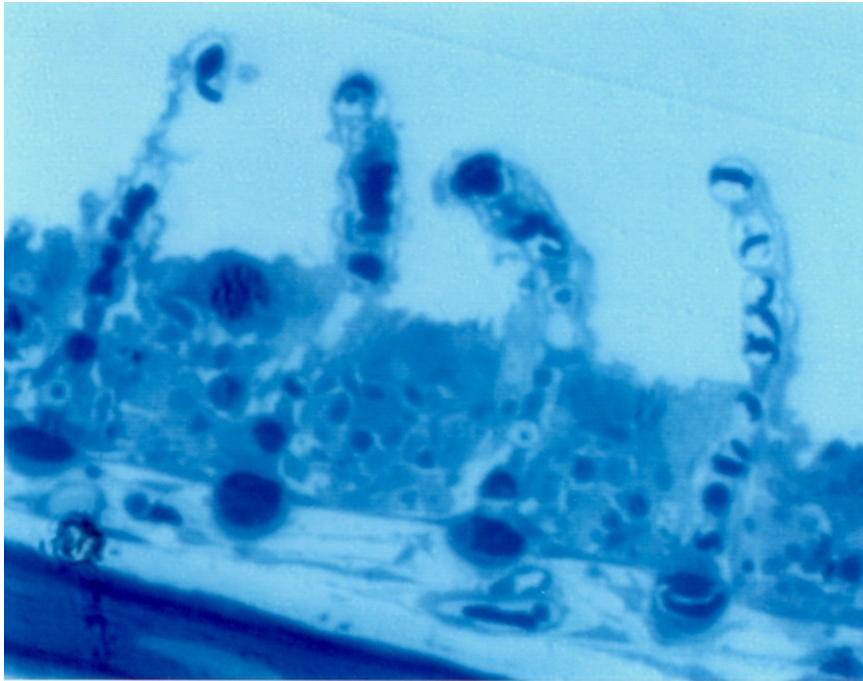
✓ Cortes semi-finos

- Talhar um trapézio no bloco com bisturi ou lâmina manual.
- Corte semi-fino, $1\mu\text{m}$ (faca de vidro) utilizando um ultramicrotomo (observação ao MO)

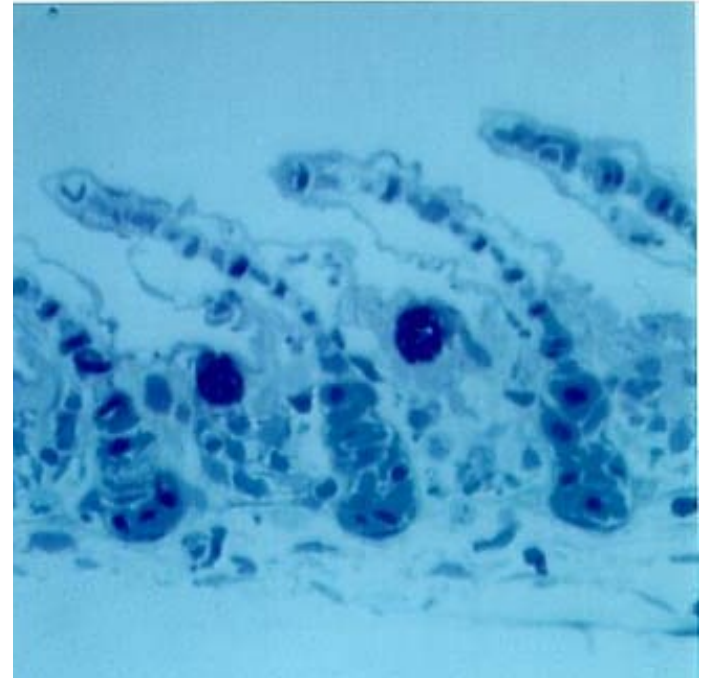


Ultramicrotomia

✓ Cortes semi-finos



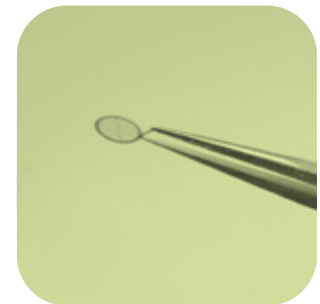
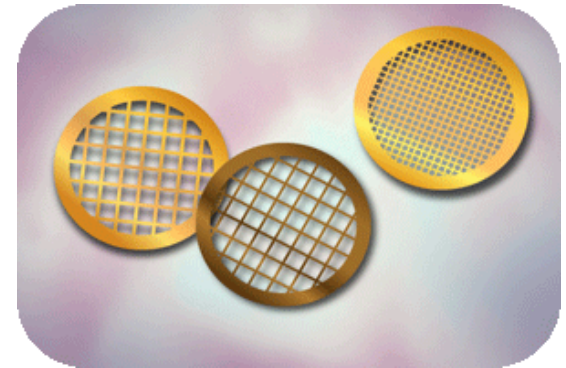
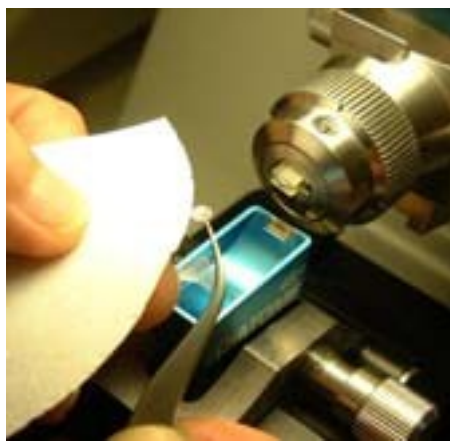
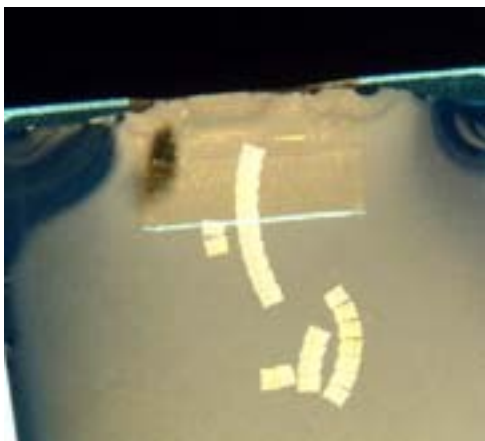
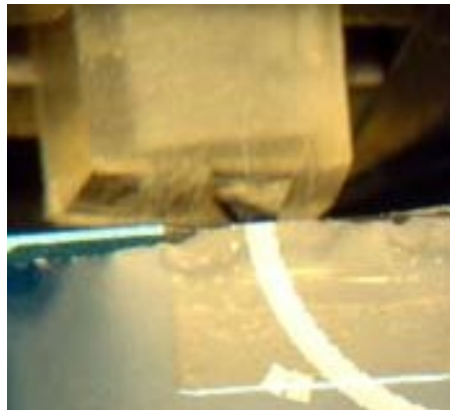
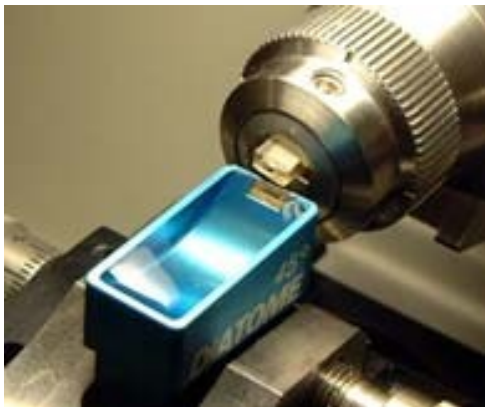
Azul de metileno a 1%



Ultramicrotomia

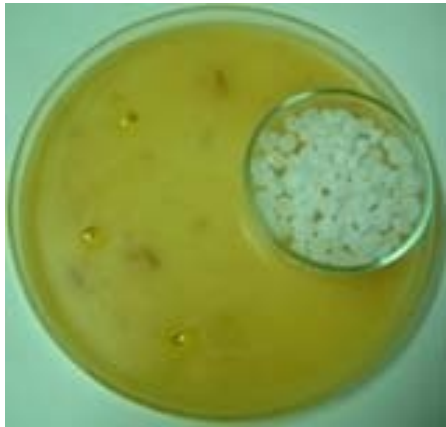
✓ Cortes ultrafinos

- Corte ultra-fino, 50-70 nm, (faca de diamante) utilizando um ultramicrotomo
- Colagem nas grelhas (observação ao MO)

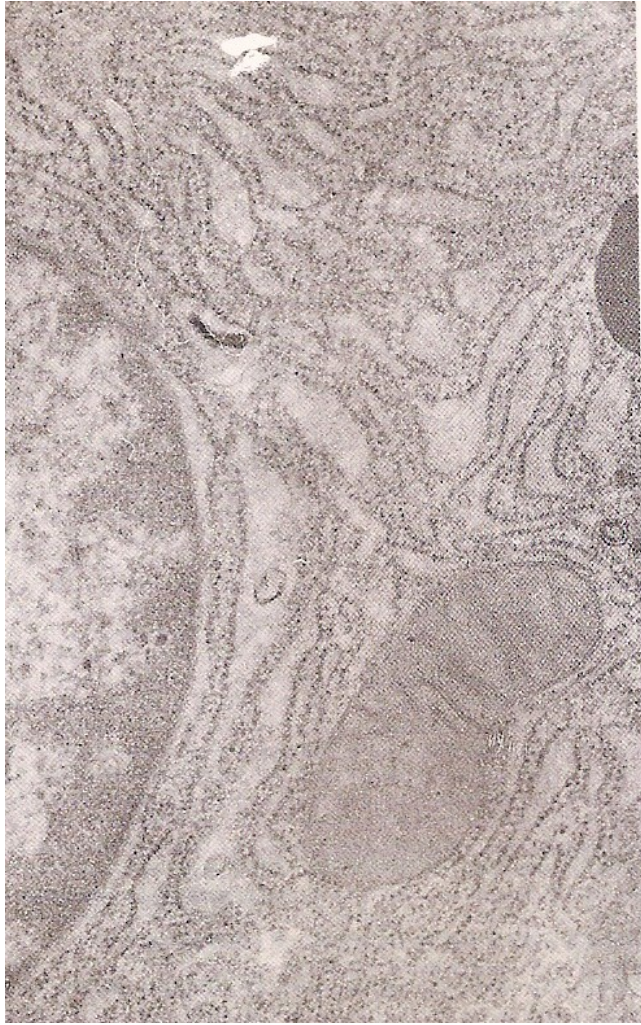


Contrastação

- ✓ Melhora a visibilidade da imagem e aumenta a resistência do material aos efeitos do feixe de elétrons
- ✓ Citrato de chumbo e acetato de urânio



Contraste

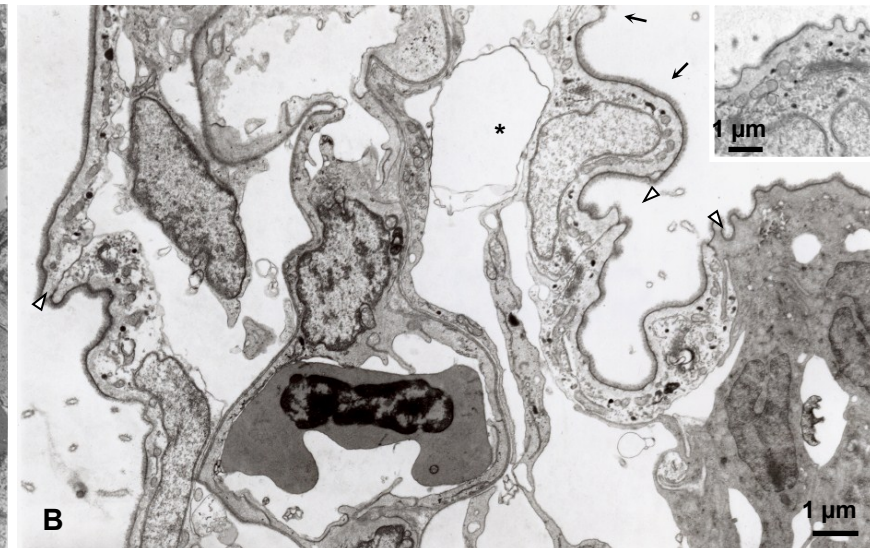
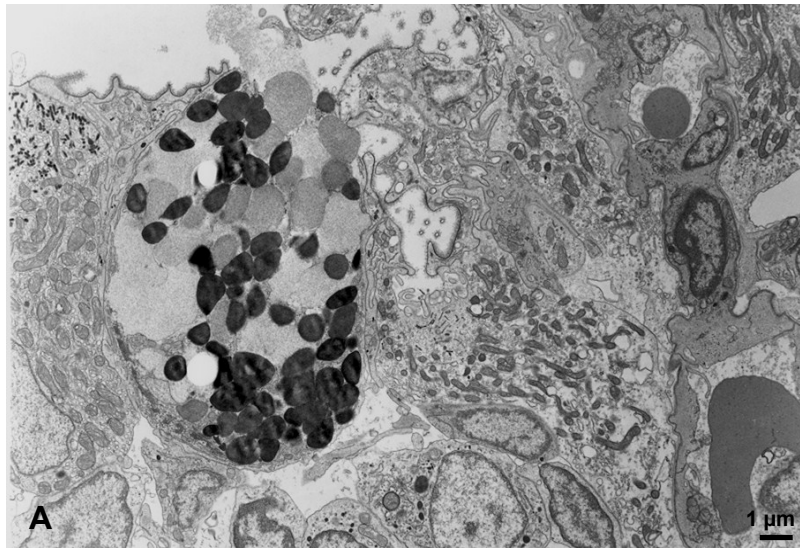


Sem contrastação



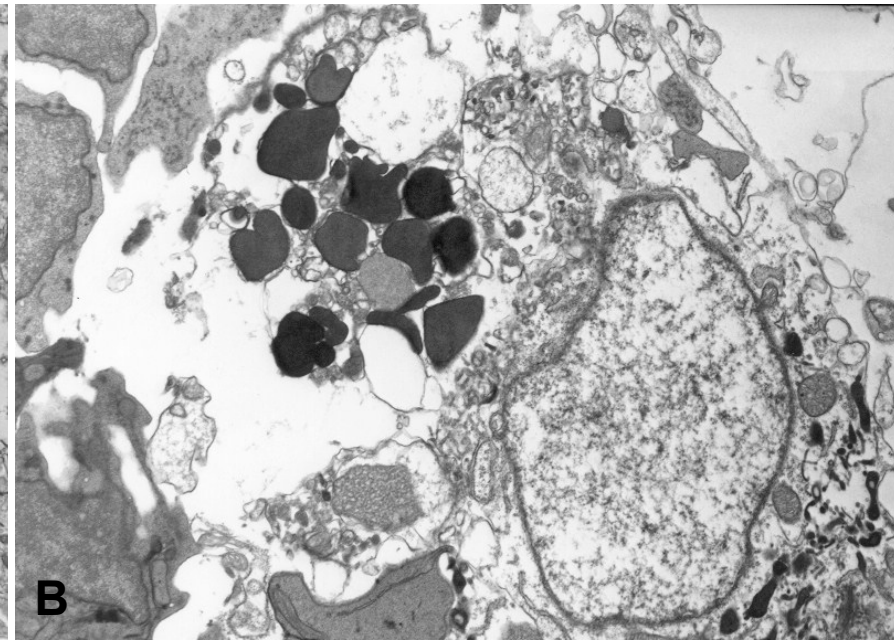
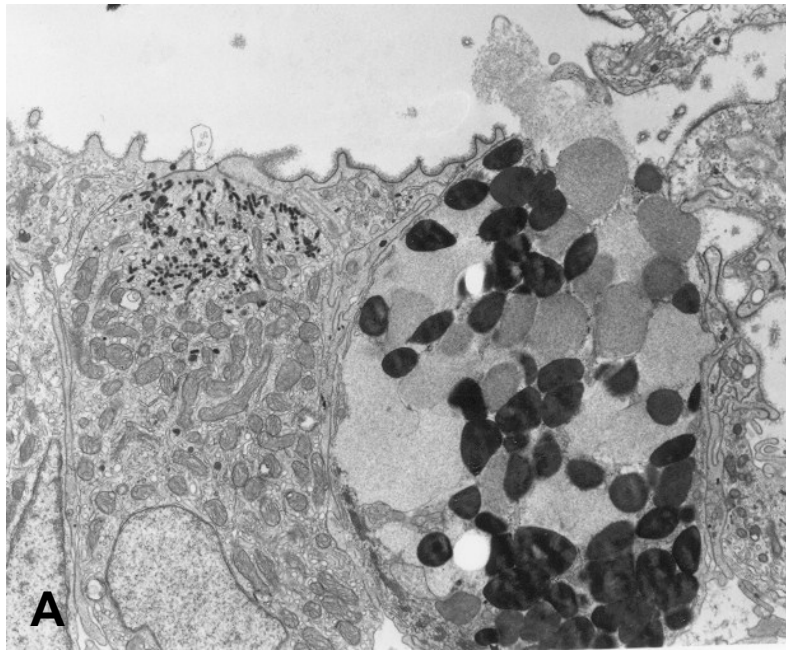
Contrastado com acetato de uranilo e citrato de chumbo

Exemplos de Aplicação:

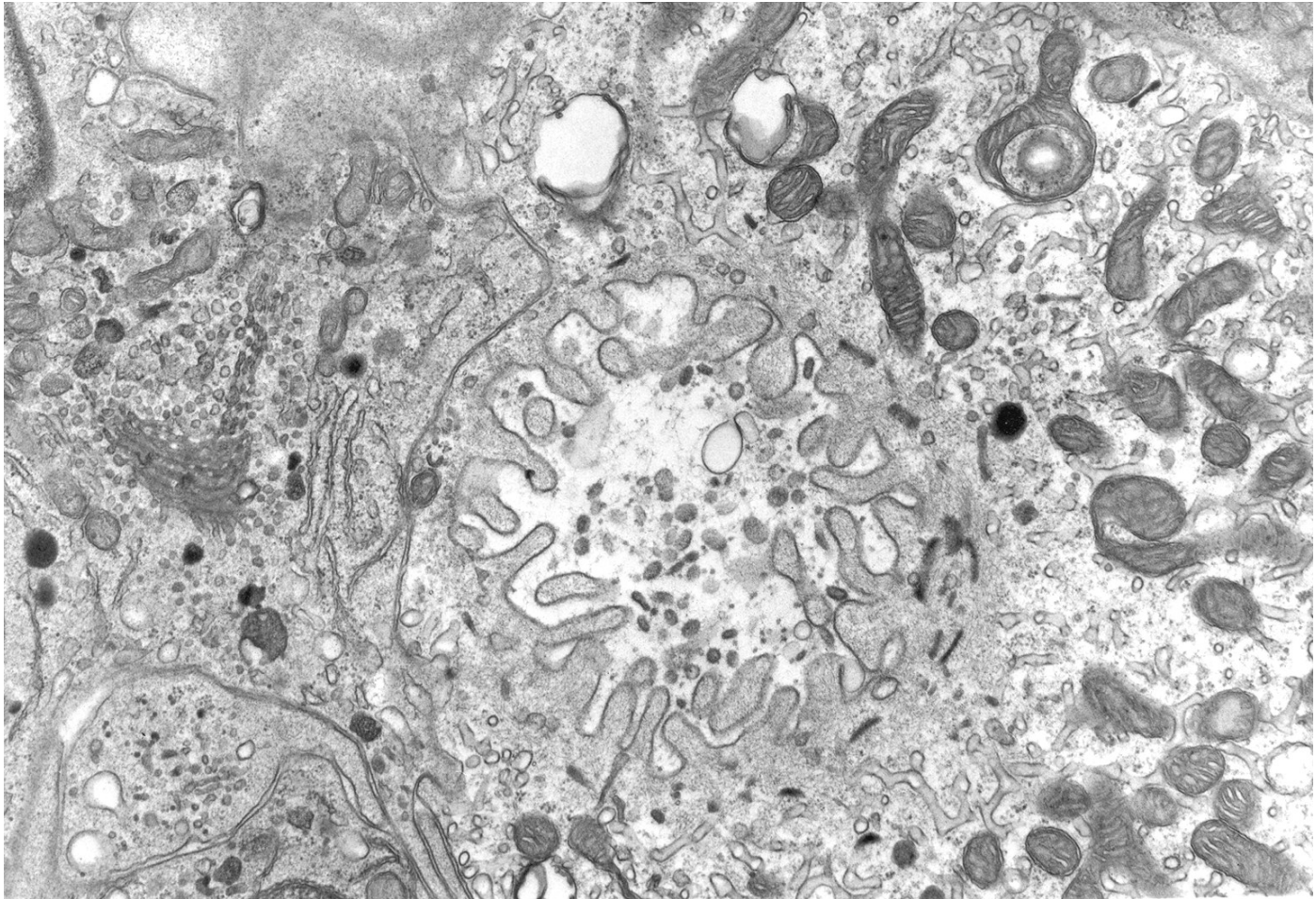


Epitélio branquial de tilápia *O. niloticus*. A) animais controlo; B) animais expostos a doses sub-letais de cobre na água.

Exemplos de Aplicação:

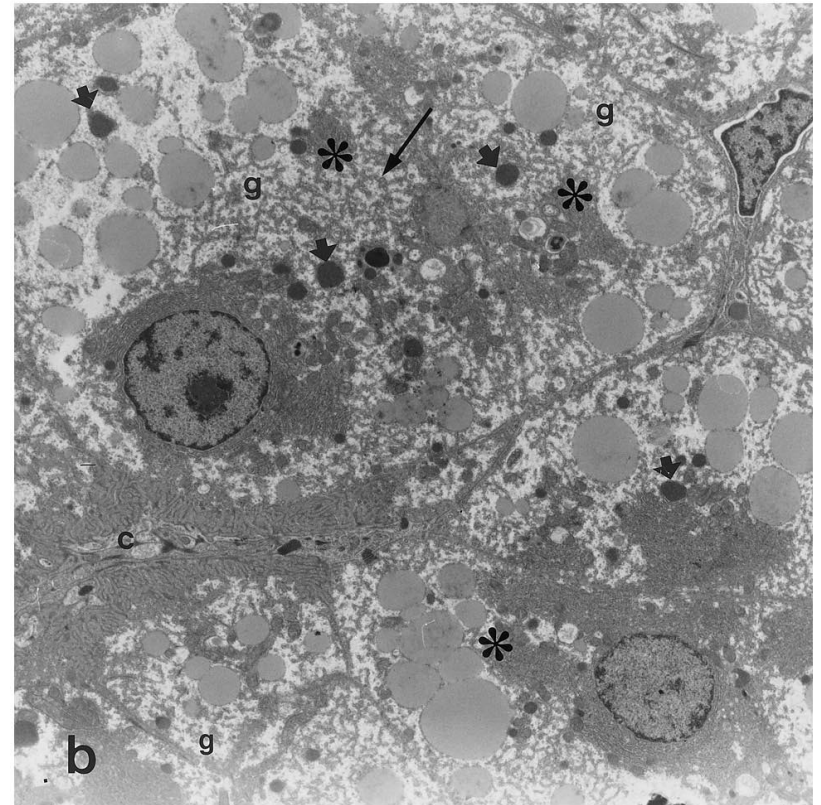
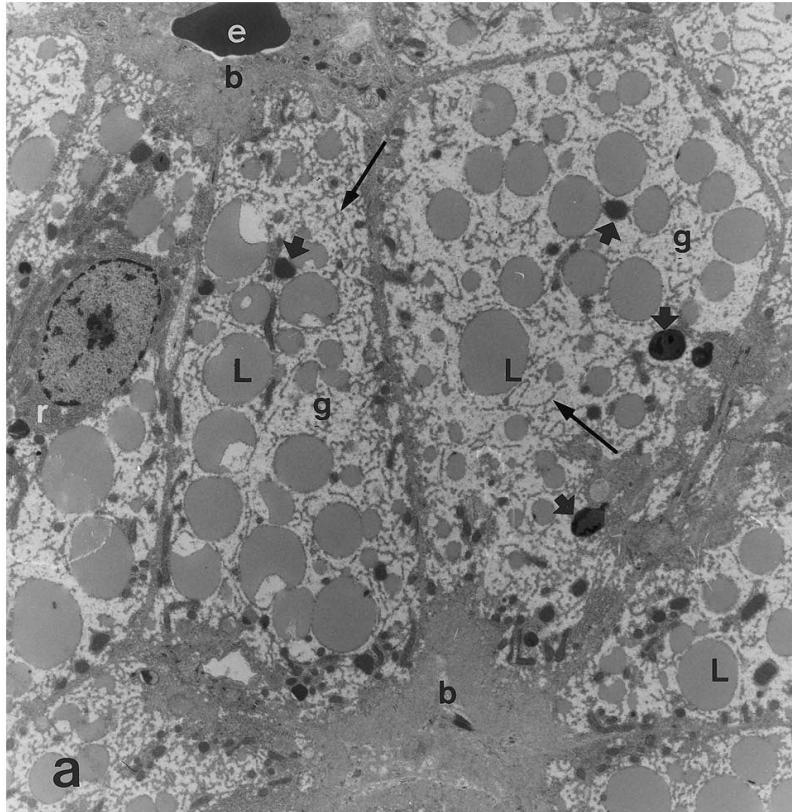


Epitélio branquial de tilápia *O. niloticus*. A) animais controlo; B) animais expostos a doses sub-letais de cobre na água.



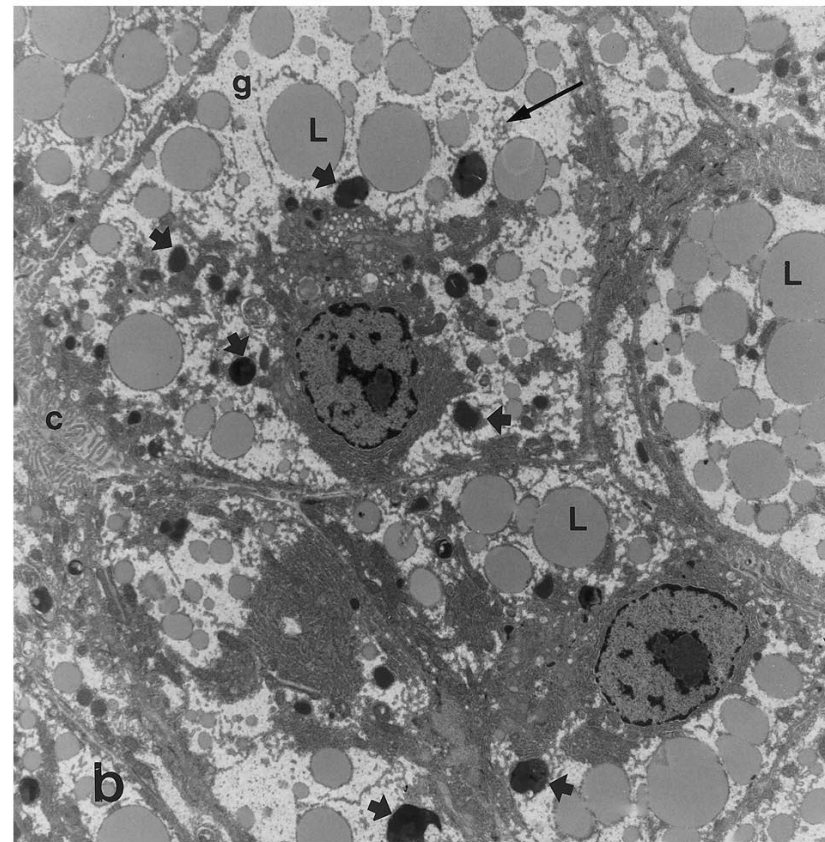
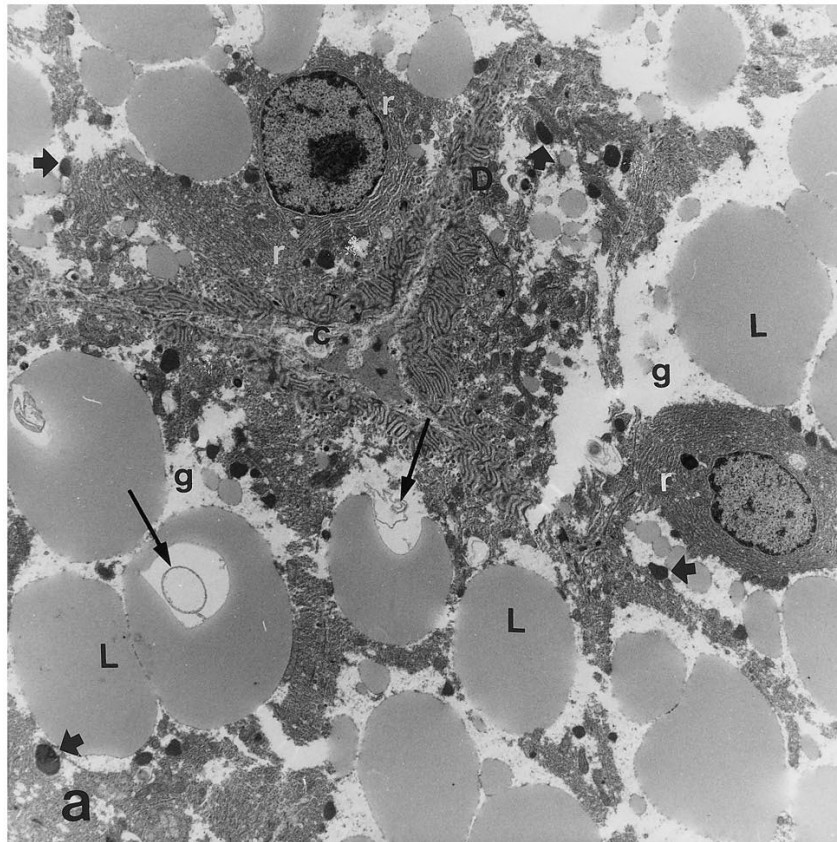
Obrigada pela Atenção!!

Exemplos de Aplicação:



Hepatócitos de machos de tilápia *O. niloticus*. A) animais controlo; B) animais alimentados com bifenis policlorinados (PCBs).

Exemplos de Aplicação:



Hepatócitos de fêmeas de tilápia *O. niloticus*. A) animais controle; B) animais alimentados com bifenis policlorinados (PCBs).