

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
INSTITUTO DE BIOFÍSICA CARLOS CHAGAS FILHO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO PARA A
PESQUISA BIOMÉDICA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO PROFISSIONAL

NOÊMIA RODRIGUES GONÇALVES

PADRONIZAÇÃO DE TÉCNICAS DE MICROSCOPIA
ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO E VARREDURA PARA O
ESTUDO DA ULTRAESTRUTURA DOS ESPOROS DO FUNGO
Encephalitozoon hellem

Orientadora: Susana Frases Carvajal

2016

NOÊMIA RODRIGUES GONÇALVES

**PADRONIZAÇÃO DE TÉCNICAS DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE
TRANSMISSÃO E VARREDURA PARA O ESTUDO DA ULTRAESTRUTURA DO
FUNGO *Encephalitozoon hellem***

Dissertação de Mestrado Profissional apresentada ao Programa de Pós-graduação para a pesquisa Biomédica (Biofísica), Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Ciências Biomédicas (Biofísica).

Orientadora: Susana Frasés Carvajal

2016

G635p

Gonçalves, Noêmia Rodrigues

Padronização de Técnicas de Microscopia
Eletrônica de Transmissão e Varredura para o
Estudo do Esporo do Fungo *Encephalitozoon hellem* / Noêmia
Rodrigues Gonçalves. -- Rio de Janeiro, 2016.
104 f.

Orientadora: Susana Frasés Carvajal. Dissertação (mestrado) -
Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Biofísica,
Programa de Pós-Graduação em Biofísica, 2016.

1. Microscopia Eletrônica. 2. Ultraestrutura.
3. *Encephalitozoon hellem*. I. Carvajal, Susana Frasés, orient. II. Título.

Noêmia Rodrigues Gonçalves

Padronização de técnicas de microscopia eletrônica de transmissão e varredura para o estudo da ultraestrutura do fungo *Encephalitozoon hellem*

Orientadora: Susana Frases Carvajal

Dissertação submetida ao Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho da Universidade Federal do Rio de Janeiro visando à obtenção do grau de mestre em Ciências Biológicas (Biofísica).

Aprovada por:

Prof. Dra. Susana Frases Carvajal
Prof. Adjunta Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho – UFRJ

Dra. Sonia Rozental
Prof. Adjunta do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filha – UFRJ

Dra. Eliana Barreto
Prof. Adjunta Instituto de Microbiologia Paulo de Goés – UFRJ

Dr. Celso Sant'Anna
Pesquisador em Biotecnologia do – INMETRO

Suplente interno:

Dra. Valéria Coelho
Prof. Adjunto Instituto de Ciências Biológicas – UFRJ

Revisor/suplente externo:

Dra. Emile Barrias
Pesquisadora em Biotecnologia – INMETRO

Ao meu pai, de quem me despedi com a certeza de um "até breve".

Amor sempre.

AGRADECIMENTOS

A Deus, inteligência suprema e causa primária de todas as coisas.

Aos meus pais, seu José (*in memoriam*) e d. Etelvina, que me deram a vida, o sustento e os valores. Sem eles eu não existiria.

A Luiza, que tem sido minha motivação desde que chegou, pelo amor incondicional, pelo apoio, pela compreensão nas minhas ausências, pelas risadas descontroladas e por ser filha, irmã, amiga e até mãe, quando se fez necessário.

À minha família: irmãs, sobrinhos, cunhados e agregados, que compreenderam sem cobranças, minhas muitas ausências e me supriram de amor e energia.

À querida professora Marlene Benchimol, que acreditou em mim antes de todos, pelas broncas e pelos abraços, ambos intensos e necessários.

A Susana Frases Carvajal, minha orientadora, que sem me conhecer aceitou o desafio de me orientar, me acolheu e confiou em mim e tornou-se uma amiga preciosa.

A Emile Barrias, por ter revisado essa dissertação, pelas dicas valiosas sobre cultivo celular e por se mostrar uma pessoa solidária.

A Aline Alves e Camila Wendt, duas doçuras em forma de meninas, sempre prontas a me ajudarem, com dicas valiosíssimas.

À Glauber Araújo pela solicitude, pela paciência, pela boa vontade em ajudar e por uma humildade incrível. Gente boa!

A Vânia Vieira e Celso Santana, pela pronta ajuda e boa vontade sempre presentes. Sem eles, grande parte do trabalho não teria sido possível.

A Luciana Lobo, que me ensinou o caminho da paz, em meio às tempestades.

Ao corpo técnico do Lab. Hertha Meyer, em especial a Otávio, Raphinha e Heloísa, força-tarefa do nitrogênio líquido e à linda Verônica, pelo tanto que dividimos: disciplinas, desesperos e cervejas....

Aos membros da banca, que dispuseram de seu tempo na avaliação desse trabalho.

Enfim, a todos os membros do laboratório Hertha Myer que, de alguma forma, contribuíram com esse trabalho, companheiros de um longo tempo. Em especial às amigas Técia Ulisses e Cristina Motta, pelos longos papos e por sempre terem palavras de incentivo; à professora Rossiane Vommaro, pela presteza e boa vontade, quando precisei de sua ajuda; a Erica Martins por todas as dicas e ajuda preciosas; a Helcio e Igor, por tornarem dias difíceis em motivo para bailar e ao prof. Wanderley de Souza, por todas as oportunidades de trabalho e crescimento, que me proporcionou em muitas esferas de minha vida.

Sabemos uma gota, ignoramos um oceano.

Isaac Newton

RESUMO

Gonçalves, Noêmia Rodrigues. Padronização de técnicas de microscopia eletrônica de transmissão e varredura para o estudo da ultraestrutura dos esporos do fungo *Encephalitozoon hellem*. Rio de Janeiro, 2016.

Microsporidia é o termo genérico, não taxonômico usado para designar um grupo de organismos formadores de esporo, parasitas intracelulares obrigatórios, caracterizados pela presença de uma organela peculiar, denominada tubo polar. Foram descritos pela primeira vez na Europa, em 1857, como parasitas de bichos-da-seda e, desde então, vem sendo observados em praticamente todos os grandes grupos de animais, com representantes em todas as classes de vertebrados. Até há alguns anos a microsporidiose humana era considerada como um caso raro, no entanto, em 1985 foi identificada uma nova espécie (*Enterocytozoon bieneusi*) que, acredita-se, seja um parasita natural do homem, causando doença em pacientes imunodeprimidos. O mecanismo preciso de invasão da célula hospedeira pelos microsporídios ainda é desconhecido, pela falta de técnicas eficientes que permitam a observação da ultraestrutura dos esporos. Essa dificuldade pode ser justificada pela elevada complexidade ultraestrutural desses organismos, bem como a quantidade de eventos celulares que ocorrem nos processos de extrusão do tubo polar e invasão da célula hospedeira. Neste trabalho, algumas técnicas de preparo de amostra, consagradas para microscopia eletrônica, foram testadas e comparadas, afim de que o melhor conjunto de condições fosse estabelecido, padronizando um protocolo eficiente no preparo dos esporos do microsporídio *Encephalitozoon hellem*. As amostras foram preparadas para microscopia eletrônica de transmissão utilizando diferentes protocolos de fixação química e física. Duas diferentes resinas foram utilizadas na infiltração e inclusão das amostras. Cortes de diferentes espessuras foram realizados e protocolos diferenciados de contrastação foram aplicados. Amostras foram preparadas com o emprego da radiação micro-ondas. No preparo para microscopia eletrônica de varredura aplicamos dois diferentes ciclos de secagem pelo ponto crítico e na metalização foram utilizados o ouro e a platina. Pudemos observar que para esses organismos a fixação pela solução de Karnovsky é a mais indicada e a inclusão deve ser feita em resina spurr, por ser menos viscosa e penetrar melhor nas amostras, como já demonstrado em seres portadores de parede celular. As secções dessas amostras devem ser de 65nm, pois cortes de 70nm ou mais se mostram eletrondensos ao microscópio eletrônico. O tempo de incubação no acetato de uranila deve ser de 20 minutos. Amostras processadas pelo micro-ondas geraram as melhores imagens. Na microscopia de varredura pudemos identificar deformações em amostras submetidas ao ciclo curto de secagem pelo ponto crítico (15 trocas com intervalo de 1 minutos entre as trocas), defeitos não observados naquelas amostras submetidas ao ciclo longo (20 trocas com intervalo de 4 minutos entre elas). Também pudemos observar granuloses nas amostras metalizadas pelo ouro, ausentes nas amostras metalizadas pela platina. Desse modo inferimos que as melhores condições para o preparo dos esporos de *E. hellem* para MET são: fixação pelo método de Karnovsky; inclusão em resina spurr; cortes de 65 nm de espessura; contrastação por 20 minutos no acetato de uranila. O uso do micro-ondas otimiza os resultados. Para MEV: ciclo longo de secagem pelo ponto crítico e metalização pela platina.

ABSTRACT

Gonçalves, Noêmia Rodrigues. Standardization of transmission and scanning electron microscopy techniques for finestructure studies of the fungal *Encephalitozoon hellem*. Rio de Janeiro, 2016.

Microsporidia is a generic term used to designate a group of eukaryotic spore forming organisms that are obligate intracellular parasites. These organisms are defined by the presence of a peculiar organelle, the polar tube. They were described first at 1857, in Europe, as a silkworm parasite. Since then, they have been recognized as a parasite of the major animal groups, including all classes of vertebrates. For many years, human microsporidiosis was considered a rare disease and the *microsporidia* were described as opportunistic human pathogens. However, in 1985 a new specie (*Enterocytozoon bieneusi*) was described as a natural human parasite, infecting the immune-compromised hosts. The mechanism of cell invasion is still unknown because there are no efficient assays to study these events. That difficulty could be explained by the highly complex ultrastructural organization of these organisms as well as the great amount of cellular events that occurs in the polar tube extrusion and host cell invasion. In this present work, previously established techniques of transmission and scanning electron microscopy were tested and compared in order to establish and standardize the best conditions to the spores of *Encephalitozoon hellem* preparation. The samples were prepared for transmission electron microscopy (TEM) using different protocols of chemical and physical fixation. We used two different resins for samples infiltration and inclusion and make ultrathin sections in different thicknesses. A different protocol of staining was used too. We also used a microwave radiation to evaluate its action on the obtained results. For scanning electron microscopy (SEM), we applied two different protocols of critical point air dry and the metallization of the samples was done by with gold and platinum. We could observe that the fixation by Karnovsky's solution is the best for these organisms and the spurr resin must be used, because its low viscosity allows the quick penetration, as described in literature for organisms that have cell wall. The 70 nm sections, stained by the usual protocols, seems at electron microscope too dense. Thus, the sections of these samples must be thinner than the usual and the period of staining must be shorter than the usual too. The samples processed under microwave radiation were the best ones. At SEM, we could identify surface deformations at samples submitted on short cycle of critical point dryer (CPD - 15 changes of medium, with an interval of 1 minute between them). Such deformations were not seem at samples submitted on longer cycle of CPD (20 changes with an interval of 4 minutes). We also could observe a surface irregular aspect, when it was covered by gold. Such irregularity is not visible when the samples were covered by platinum. We conclude that the best conditions to prepare spores of *E. hellem* for TEM are: fixation by Karnovsky's solution and post fixation by OTO (osmium – thiocarbohidrazide – osmium); infiltration and inclusion in spurr resin; ultrathin sections of 65 nm thickness and staining for 20 minutes in uranyl acetate. The use of microwave radiation optimizes the results. For SEM: long cycle of CPD and metallization by platinum.

SUMÁRIO

1.	Introdução	16
1.1.	Microsporídios	16
1.2.	Mi.crosporidiose	20
1.3.	Microscopia eletrônica de materiais biológicos	22
1.3.1.	Métodos convencionais de fixação química	24
1.3.2.	Métodos de fixação física por congelamento	26
1.3.3.	Preparo para MET	28
1.3.3.1.	Desidratação	28
1.3.3.2.	Infiltração e inclusão	29
1.3.3.3.	Ultramicrotomia	31
1.3.3.4.	Contrastação	32
1.3.4.	Preparo para MEV	33
1.3.4.1.	Secagem pelo ponto crítico	33
1.3.4.2.	Cobertura metálica	33
1.3.5.	Uso do micro-ondas	34
2.	Justificativa	35
3.	Objetivos	35
3.1.	Objetivo geral	35
3.2.	Objetivos específicos	35
4.	Metodologia	36
4.1.	Cultivo de células e obtenção dos esporos	36
4.2.	Preparo das amostras para MET	37
4.2.1.	Fixação química	37
4.2.2.	Fixação física por congelamento	38
4.2.3.	Desidratação	39
4.2.4.	Infiltração e inclusão em resina	39
4.2.5.	Ultramicrotomia e contrastação	40
4.2.6.	O uso do micro-ondas	41
4.3.	Preparo das amostras para MEV	42
4.3.1.	Secagem pelo ponto crítico	42
4.3.2.	Cobertura metálica	42
4.4.	Observação aos microscópios	43
5.	Resultados	43
5.1.	Comparação entre os protocolos de fixação química	43
5.2.	Comparação entre os métodos de fixação por congelamento	53
5.3.	Comparação entre as resinas de inclusão	57
5.4.	Comparação entre espessuras dos cortes e protocolos de contrastação	62
5.5.	Avaliação do uso do micro-ondas	65
5.6.	Comparação entre os métodos de preparo para MEV	68
5.6.1.	Ciclo de secagem curto e metalização por ouro observação ao MEV convencional	68
5.6.2.	Ciclo de secagem longo e metalização por ouro observação ao MEV convencional.....	70
5.6.3.	Ciclo de secagem curto e metalização por platina observação ao MEV convencional	71
5.6.4.	Ciclo de secagem longo e metalização por platina observação ao MEV convencional	72
5.6.5.	Ciclo de secagem curto e metalização por ouro Observação ao MEV de alta resolução	73
5.6.6.	Ciclo de secagem longo e metalização por ouro Observação ao MEV de alta resolução	74
5.6.7.	Ciclo de secagem curto e metalização por platina Observação ao MEV de alta resolução	75
5.6.8.	Ciclo de secagem longo e metalização por platina Observação ao MEV de alta resolução	76
6.	Discussão	78
7.	Conclusões	89
8.	Referências	91
	Apêndices	100

Lista de figuras

Figura 1: Esquema de um esporo de microsporídeo	18
Figura 2: Ciclo de vida dos microsporídios	19
Figura 3: Diagrama de fase do ponto crítico.....	33
Figura 4: Ultraestrutura da célula HFF por microscopia eletrônica de transmissão fixada pelo método padrão FQ1	44
Figura 5: Ultraestrutura do esporo de <i>E. hellem</i> processado para microscopia eletrônica de transmissão fixado pelo método FQ1	45
Figura 6: Ultraestrutura da célula HFF processada para microscopia eletrônica de transmissão fixada pelo método FQ2	47
Figura 7: Ultraestrutura do esporo de <i>E. hellem</i> processado para microscopia eletrônica de transmissão fixado pelo método FQ2	49
Figura 8: Ultraestrutura da célula HFF não infectada processada para microscopia eletrônica de transmissão fixada pelo método FQ3	50
Figura 9: Ultraestrutura do esporo de <i>E. hellem</i> processado para microscopia eletrônica de transmissão fixado pelo método FQ3	52
Figura 10: Ultraestrutura do esporo de <i>E. hellem</i> fixado por alta pressão.....	54
Figura 11: Ultraestrutura do esporo de <i>E. hellem</i> processado para crioultramicrotomia.....	56
Figura 12: Aspecto geral das amostras incluída em resina epon.....	58
Figura 13: Ultraestrutura do esporo de <i>E. hellem</i> incluído em epon.....	59
Figura 14: Aspecto geral da amostra incluídas em resina spurr.....	60
Figura 15: Ultraestrutura do esporo de <i>E. hellem</i> incluído em spurr.....	61
Figura 16: Painel comparativo de espessuras de corte e métodos de contrastação	63
Figura 17: Comparação entre o método convencional de corte e contrastação e o método sugerido	64
Figura 18: Amostras processadas por micro-ondas	66
Figura 19: Aspecto da ultraestrutura dos esporos processados pro micro-ondas	67
Figura 20: Amostra processada para MEV submetida ao ciclo curto de ponto crítico e metalizada por ouro observada ao microscópio de varredura convencional	69
Figura 21: Amostra processada para MEV submetida ao ciclo longo de ponto crítico metalizada por ouro observada ao microscópio de varredura convencional	70
Figura 22: Amostra processada para MEV submetida ao ciclo curto de ponto crítico metalizada por platina observada ao microscópio de varredura convencional	71
Figura 23 Amostra processada para MEV submetida ao ciclo longo de ponto crítico metalizada por platina observada ao microscópio de varredura convencional.....	72

Figura 24: Amostra processada para MEV submetida ao ciclo curto de ponto crítico metalizada por ouro observada ao microscópio de varredura de alta resolução.....	73
Figura 25: Amostra processada para MEV submetida ao ciclo longo de ponto crítico metalizada por ouro observada ao microscópio de varredura de alta resolução.....	74
Figura 26 Amostra processada para MEV submetida ao ciclo curto de ponto crítico metalizada por platina observada ao microscópio de varredura de alta resolução:.....	75
Figura 27: Amostra processada para MEV submetida ao ciclo longo de ponto crítico metalizada por platina observada ao microscópio de varredura de alta resolução.....	77

Lista de tabelas

Tabela 1: Infiltração e inclusão por resinas plásticas	40
Tabela 2: Processamento por micro-ondas	41
Tabela 3: Ciclos de secagem pelo ponto crítico	42

Lista de siglas e abreviaturas

BDMA	Benzildimetilamina
CPD	Critical point dry – secagem pelo ponto crítico
DDSA	Anidrido dodecenilsuccínico
DER 736	Diglicildielter de prolipropilenoglicol
DMEM	Dubbecco's Modified Eagle's Media
DMP 30	Tridimetilaminametilfenol
DMAE	Dimetilaminoetil
DMSO	Dimetil sulfóxido
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HPF	High pressure freezing – Congelamento por alta pressão
KV	Kilovolt
ME	Microscopia Eletrônica
MEM	Minimal Essential Media
Mm	Milímetro
MET	Microscopia eletrônica de transmissão
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
NMA	Anidrido metil náxico
NSA	Anidrido nonetilsuccínico
OTO	Ósmio – tiocarbohidrazida – ósmio
PBS	Salina tamponada por fosfato
PVA	Polivinil álcool
PVP	Polivinil pirrolidona
SEM	Scanning electron microscopy
SIDA	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
TEM	Transmission electron microscopy
VCD	Vinil ciclohexeno dióxido
WD	Distância de trabalho

1 – INTRODUÇÃO

1.1. MICROSPORÍDIOS: CARACTERÍSTICAS GERAIS E CICLO DE VIDA.

Microsporidia é uma designação não taxonômica utilizada para se referir a um grupo de organismos eucariotos, formadores de esporos, parasitas intracelulares, pertencentes ao filo Microspora, capazes de infectar todos os principais grupos de animais. Na atualidade 6 gêneros são reconhecidamente patógenos humanos, acometendo pacientes imunodeprimidos e imunocompetentes. Os esporos dos microsporídios são comuns no meio ambiente, particularmente nos grandes reservatórios de água, gerando focos de infecção para os seres humanos (BRASIL *et al.*, 1997).

O filo Microspora consiste de aproximadamente 144 gêneros e mais de 1000 espécies. Atualmente, os gêneros reconhecidos como agentes causadores de infecções humanas são: *Brachiola*, *Encephalitozoon*, *Enterocytozoon*, *Nosema*, *Pleistophora*, *Trachipleistophora* e *Vittaforma* (WEISS, 2001).

Estes organismos têm os menores genomas eucarióticos conhecidos, menores que 3 Mb (VÁVRA, 2013). A análise das sequências de RNA ribossômico de representantes do Filo Microspora provaram que esses organismos estão relacionados com os fungos, porém as semelhanças estruturais e fisiológicas entre microsporídios e os fungos são limitadas e se restringem a: capacidade de formação de esporos, presença de quitina na parede celular, formação de núcleos diploides, assim como algumas características da meiose (CAVALIER- SMITH , 2001; THOMARAT *et al.*, 2004). A composição química da parede celular é bastante complexa, constituída principalmente por polissacarídeos, ligados ou não a proteínas ou lipídeos, polifosfatos e íons inorgânicos formando a matriz de cimentação. Quitina, glucanas, galactomananas e proteínas são compostos mais freqüentes, embora sua quantidade varie entre as diferentes espécies de fungos (FUKUDA *et al.*, 2009).

São verdadeiros eucariontes contendo um núcleo com envoltório nuclear e um sistema de membranas intracitoplasmáticas; apresentam separação de cromossomos em fusos mitóticos (TAKVORIAN & CALI, 1994), mas não têm centríolos ou mitocôndria. Os genes da subunidade pequena do RNA dos microsporídios são menores do que os típicos de eucariotos e exibem características de procariotos (VOSSBRINCK *et al.*, 1993).

Duas características unificam os representantes do Filo Microspora: o fato de só existirem como esporos fora da célula hospedeira (parasitas intracelulares obrigatórios) e a presença de uma organela singular, denominada tubo polar, que desempenha um importante papel na invasão da célula alvo através de um mecanismo de extrusão sofisticado e ainda não esclarecido (WEISS, 2001).

Um esporo maduro apresenta pequenas dimensões (2–7 μ m de comprimento por 1,5–5 μ m de diâmetro), um envoltório espesso e o aparelho de extrusão completamente formado (**Figura 1**). O envoltório dos esporos é formado por um exósporo denso e de natureza proteica e um endósporo constituído por quitina e proteínas, o que confere resistência aos fatores ambientais (BIGLIARDI & SACCHI, 2001).

O tubo polar, o disco de ancoragem e o polaroplasto são organelas já descritas, presentes no esporo. O tubo polar é um tubo fechado, que circunda o esporoplasma em espiral e termina em uma estrutura denominada disco de ancoragem. A porção terminal do tubo polar, logo abaixo do disco de ancoragem é denominado manubróide. O número de voltas do tubo em torno do esporoplasma pode variar entre 4 e 20, dependendo da espécie. O polaroplasto é uma organela membranosa, em forma de lamelas e vesículas, presente na porção anterior do parasita, que parece estar associado ao processo de extrusão do filamento polar (TAKVORIAN *et al.*, 2013).

Sob condições favoráveis, o tubo polar é expelido a partir da parte anterior do esporo, o que permite a transferência e a liberação do material infeccioso (esporoplasma) no citoplasma de uma célula alvo, onde o desenvolvimento intracelular ocorre (WEISS, 2001). No entanto, os mecanismos de sinalização celular que deflagram o processo ainda não são conhecidos e, devido a grande quantidade de elementos envolvidos nesse evento, bem como a grande rapidez com que ocorre, ele ainda não está esclarecido. O desenvolvimento intracelular envolve uma grande variedade de eventos, dos quais grande parte já se encontra descrita na literatura (BJORSON, 2013).

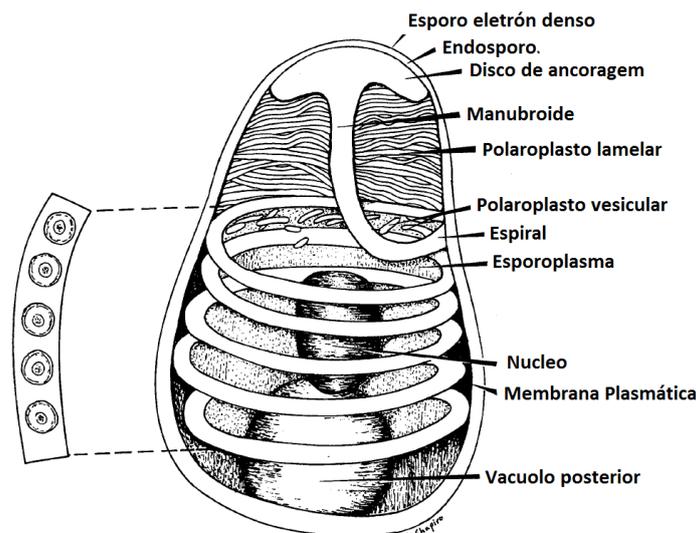


Figura 1: Esquema de um esporo de microsporídeo (adaptado de Weiss L, 2003).

O ciclo de vida dos microsporídios acontece por merogonia, seguida de esporogonia, no interior da célula hospedeira. A merogonia é a fase proliferativa, quando ocorre o aumento massivo de parasitas, por reprodução assexuada, através de fissão binária, dando origem aos merontes, células que podem ter um ou mais núcleos. Nessa fase, algumas organelas começam a ser formadas. A fase esporogônica é caracterizada pela transformação dos merontes em esporontes, pela cariogamia, seguida de meiose e fissão múltipla, gerando os esporoblastos – células que amadurecem e não mais se dividem. A maturação dos esporoblastos em esporos se caracteriza pelo espessamento da membrana, para posterior formação do exósporo e formação de organelas. Em representantes do gênero *Encephalitozoon*, é nessa fase que ocorre a morfogênese do aparelho de extrusão (BIGLIARDI *et al.*, 1996).

Algumas espécies apresentam ciclos onde as células se dividem por fissão binária imediatamente após cariocinese (por exemplo, membros do gênero *Brachiola*). No gênero *Nosema*, um outro tipo de divisão pode ser observada – células se dividem por vários eventos de fissão. Os estágios intracelulares na fase proliferativa podem ocorrer em contato direto com o citoplasma da célula hospedeira ou perto do retículo endoplasmático, como acontece nos gêneros *Nosema*, *Ichthyosporidium*, *Brachiola*, *Tetramicra* e *Enterocytozoon* ou em um vacúolo parasitóforo, derivado do hospedeiro, como ocorre com os representantes do gênero *Encephalitozoon* ou ainda circundados por uma fina camada de

secreções do parasita, que se destaca, formando uma vesícula na fase de esporogonia, como acontece com os representantes do gênero *Pleistophora* (WITTNER & WEISS, 1999).

Fora da célula hospedeira, os representantes do filo Microspora podem sobreviver como formas resistentes, particularmente nos grandes reservatórios de água, graças ao envoltório celular (WITTNER & WEISS, 1999).

O mecanismo de penetração do tubo polar na célula alvo não é bem conhecido. Por muito tempo se acreditou que a única rota de penetração fosse pela punção da membrana plasmática da célula hospedeira e injeção do material infeccioso em seu citoplasma (**Figura 2A**). No entanto, estudos recentes revelaram que o vacúolo parasitóforo, formado no estágio inicial da infecção por representantes do gênero *Encephalitozoon*, é constituído por membrana da célula hospedeira, o que sugere o mecanismo de invasão desse parasita por vias endocíticas (BIGLIARDI & SACCHI, 2001), como demonstrado no esquema (**figura 2A**).

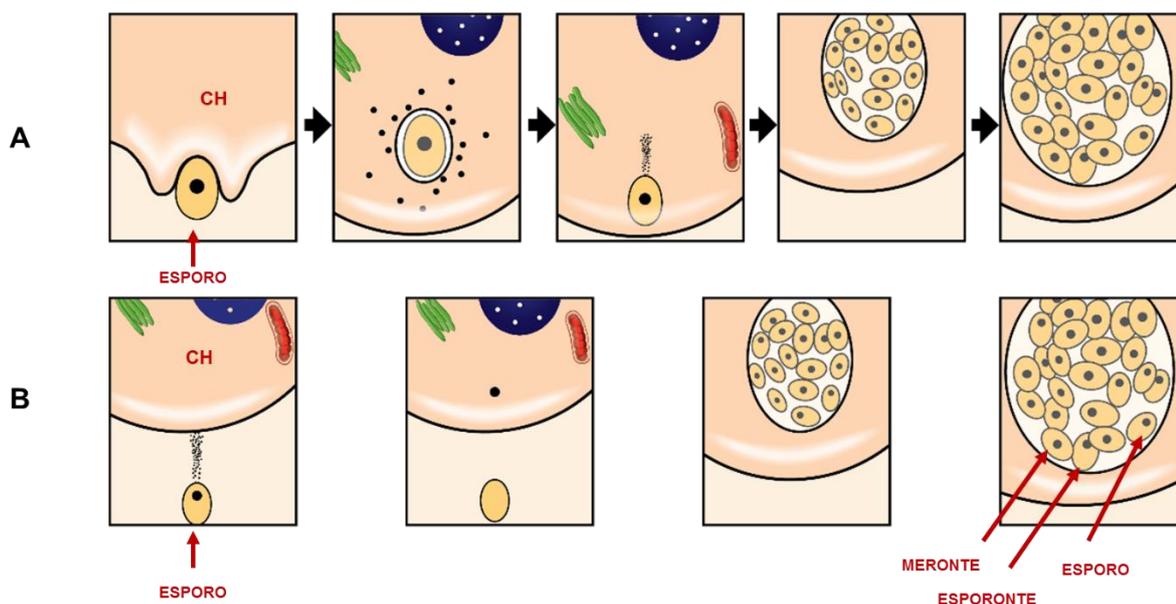


Figura 2: Esquema demonstrando o ciclo de vida de um microsporídeo: A) Invasão celular ativa por punção da membrana plasmática da célula hospedeira. CH – Célula hospedeira. B) Invasão celular passiva, por via endocítica.

Imagem de Paulo Crepaldi, adaptado de Open Parasitology Journal, 2008.

1.2. MICROSPORIDIOSE

A fisiopatologia da microsporidiose humana não é completamente entendida. Categorias diversas de interação parasita-hospedeiro foram descritas entre humanos e o gênero *Encephalitozoon*, variando de infecção latente assintomática ou infecção crônica moderada à doença aguda potencialmente fatal, em função do estado imune do hospedeiro (POLONAI, V. *et al.*, 2010)

As manifestações clínicas da microsporidiose humana variam desde o acometimento ocular, muscular ou intestinal isolados, até o comprometimento sistêmico. No indivíduo infectado pelo HIV, a manifestação mais prevalente é a intestinal, com síndrome diarreica (BRASIL, 1997).

A epidemiologia da microsporidiose humana varia de acordo com o estado imune do hospedeiro e com a espécie do parasita (BRASIL, 1997).

As dificuldades diagnósticas, na dependência da demonstração morfológica do organismo, limitam a realização de inquéritos epidemiológicos. A interpretação e utilidade de soroprevalência são controversas. A alta prevalência de soropositividade ao *Encephalitozoon cuniculi*, sem correlação clínica ou epidemiológica, assim como a possibilidade de reações cruzadas entre diferentes antígenos de *Microsporidia*, dificulta a sua interpretação (BRYAN, 1995).

Até agora cinco gêneros foram identificados como agentes causadores de doença no homem: *Nosema*, *Pleistophora*, *Encephalitozoon*, *Enterocytozoon* e, mais recentemente, *Septata*. *Enterocytozoon bieneusi*, previamente exclusivo de indivíduos infectados pelo HIV, foi recentemente detectado como causa de diarreia autolimitada em viajantes imunocompetentes e em pacientes com imunossupressão secundária à quimioterapia pré-transplante (WEBER, 1994). Relatos de indivíduos assintomáticos, portadores do *Enterocytozoon bieneusi* sugerem a possibilidade de portadores sãos do parasita. No indivíduo infectado pelo HIV, 4 dos 5 gêneros foram identificados como causa de microsporidiose: *Pleistophora*, *Encephalitozoon* (*E. cuniculi*, *E. hellem*), *Enterocytozoon* (*E. bieneusi*) e *Septata* (*S. intestinalis*), sendo a maioria causada pelo *E. bieneusi*, associada a sintomas digestivos (STENTIFORD *et al.*, 2016; WEISS, 2011).

A prevalência da infecção por *Microsporidia* nos pacientes com SIDA e diarreia crônica varia de 7% a 50% no mundo, com ampla distribuição geográfica: Alemanha, Austrália, Brasil, Canadá, Estados Unidos, França, Inglaterra, Itália, Países Baixos, Porto Rico, Suíça e Zâmbia (BRYAN, 1995). Essas diferenças de

prevalência podem refletir diversidade de exposição, emprego de diferentes técnicas diagnósticas ou variação geográfica. A propósito da alta incidência dessa infecção, alguns autores acreditam que *E. bienersi* seja um parasita natural do homem, infectando transitoriamente o indivíduo com o sistema imune competente, causando doença somente em imunodeprimidos (STENTIFORD *et al.*, 2016).

As fontes de infecção e os modos de transmissão da microsporidiose são incertos. Não há confirmação da presença de um reservatório animal na infecção humana, nem de hospedeiros intermediários ou vetores invertebrados (CANNING, 1987; CANNING, 1992). A presença de *Microsporidia* na superfície de águas poderia sugerir a possibilidade do meio ambiente como fonte de infecção, se não fosse a ausência de identificação de espécies que infectam o homem nesses locais (BRASIL, 1997).

Desde que foram descritos, no século XIX, os microsporídios vêm sendo observados como causadores de infecção nos principais grupos de animais, sendo portanto, sua transmissão através da cadeia alimentar, de grande relevância (STENTIFORD, 2016).

Encephalitozoon hellem – Embora representantes do filo Microspora sejam encontrados na superfície de águas ambientais, nenhum dos gêneros que parasita o homem foi identificado nesses locais. O *E. hellem* tem sido observado apenas em humanos, indicando que a transmissão seja interpessoal. Sua ausência no intestino exclui a possibilidade de infecção pela ingestão de alimentos contaminados por fezes contendo esporos (BRASIL, 1997). A disseminação desse parasita no trato urinário, assim como sua presença associada a infecções prostáticas sugerem a possibilidade de transmissão sexual (WEBER *et al.*, 1993). Sua presença nas vias respiratórias adiciona a possibilidade de transmissão aérea (Weber *et al.*, 1992). A auto infecção é a hipótese mais provável para a ceratoconjuntivite causada por *E. hellem* (Bryan, 1995). Transmissão vertical nunca foi identificada em humanos, embora ocorra experimentalmente (WEBER *et al.*, 1994).

Relato de infecção por esses organismos em indivíduos assintomáticos sugerem a possibilidade de portadores sãos do parasita (RABENECK, 1993). Foram encontrados causando doença em pacientes imunodeprimidos pela Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA), em pacientes com imunossupressão secundária causada por quimioterapia pré transplante (Weber *et al.*, 1994), e em pacientes imunocompetentes (SANDFORT, 1994).

1.3. MICROSCOPIA ELETRÔNICA APLICADA A MATERIAIS BIOLÓGICOS

Com o advento da microscopia eletrônica, nos anos 1930, ocorreu um grande avanço no conhecimento da ultraestrutura celular. No entanto, as primeiras imagens obtidas por essa nova técnica que surgia, gerava imagens de qualidade inferior àquelas obtidas por microscopia óptica (MARTON, 1934), demandando o desenvolvimento de métodos de preparo de material biológico, que preservassem células e tecidos do modo mais fiel possível. O desenvolvimento dessas técnicas levou a um maior conhecimento da organização celular, significando um grande ganho no campo das ciências da vida. O avanço tecnológico na área da microscopia eletrônica tem sido constante e, associado ao desenvolvimento de técnicas de preparo de material biológico, cada vez mais acuradas, tem permitido um significativo avanço no conhecimento da ultraestrutura celular (DE SOUZA, *et al.*, 2001)

Basicamente existem duas modalidades de microscopia eletrônica – a microscopia eletrônica de transmissão (MET), cuja proposta é, na maioria das vezes, a observação do interior da célula e a microscopia eletrônica de varredura (MEV), cuja finalidade é a observação de superfícies (BOZZOLA & RUSSEL, 1992). O preparo de material biológico, em ambos os casos, envolve uma série de processos, que se inicia com a fixação da célula ou tecido e termina com sua observação ao microscópio eletrônico. Tais procedimentos têm por finalidade sanar o conflito intrínseco entre a natureza das amostras, hidratadas e espessas e as condições ambientais existentes na coluna do microscópio eletrônico, como por exemplo o alto vácuo e a colisão dos elétrons com a amostra (ATTIAS, 2011). Nas amostras processadas para observação por MET, é necessário que a água presente na amostra seja removida e substituída por um fluido que permita seu endurecimento e a torne passível de corte, processos que denominamos desidratação e inclusão, respectivamente (BOZZOLA & RUSSEL, 1992). Existem várias resinas utilizadas na inclusão de amostras biológicas, cuja aplicação irá variar de acordo com o que se espera observar, o que discutiremos, posteriormente. Após a inclusão, o material é seccionado em cortes ultrafinos e em seguida, é submetido à ação de agentes contrastantes, que realçam as estruturas celulares, facilitando sua observação ao microscópio (HAYAT, 1970). Cada uma dessas etapas será posteriormente.

A microscopia eletrônica de varredura é uma modalidade da microscopia eletrônica que se utiliza de um fino feixe de elétrons que percorre a amostra num padrão de linhas paralelas, gerando vários sinais que são coletados para formar uma imagem ou analisar a sua superfície (BOZZOLA & RUSSEL 1992). É uma técnica que pode ser aplicada a amostras de diversas dimensões. Entre as amostras biológicas, os exemplos variam de insetos inteiros a células isoladas, passando por grãos de pólen, espículas de esponjas, escamas de répteis e dentes. O preparo de amostras biológicas para MEV deve contornar as condições adversas da coluna do microscópio, além de sanar a questão da baixa condutividade elétrica do material, tornando-o resistente e condutor (SILVEIRA, 2011).

A essência do limite de resolução do microscópio de varredura é o diâmetro do feixe e sua capacidade de gerar um sinal que possa ser convertido em imagem (ATTIAS, 2011). Em relação ao feixe, dois tipos principais de fontes podem ser utilizadas. A primeira fonte de elétrons utilizada nessa técnica foi um canhão de emissão termiônica, que consiste em um filamento de tungstênio, cuja ponta mede em torno de 100 μ m de diâmetro e que, quando aquecido emite elétrons espontaneamente a uma temperatura de 2700K (BOZZOLA & RUSSEL, 1992). No início dos anos 1980, Tanaka publicou trabalhos pioneiros com um novo tipo de microscópio de varredura, cuja fonte de emissão de elétrons era um cristal de hexaboreto de lantânio (LaB₆), com cerca de 100 μ m de diâmetro, polido de modo que sua ponta possui apenas 1 μ m (TANAKA, 1981).

O filamento de tungstênio tem um custo relativamente baixo, quando comparado ao LaB₆ e não requer alto vácuo. Por outro lado, sua vida média é curta, com uma duração em torno de 100 horas (ATTIAS, 2011). A mesma quantidade de elétrons emitida por um filamento de tungstênio pode ser obtida por um filamento de cristal LaB₆ numa temperatura bem mais baixa e a vida média desse tipo de filamento é cerca de 10 vezes maior que a do anterior. No entanto, o grande ganho tecnológico obtido com esse tipo filamento se baseia na emissão de campo, que ocorre pela emissão de elétrons por tunelamento mecânico quântico, quando o filamento é posto próximo a um eletrodo positivamente carregado em relação à ele. Essa tecnologia permite a geração de sinal com brilho cerca de 5 a 10 vezes maior que o filamento de tungstênio. Como já foi dito, o que determina a resolução de um MEV é o brilho ou sinal que emite, aliado ao diâmetro do feixe. O desenvolvimento dessa tecnologia elevou o poder de resolução da microscopia de varredura para 1-

2nm, possibilitando a observação de estruturas sub celulares que antes eram impossíveis de serem observadas (SANT'ANNA *et al.*, 2005).

O feixe de elétrons interage com as amostras, causando diversos fenômenos dos quais, a geração de elétrons secundários e elétrons retroespalhados são de interesse para a formação de imagens por MEV. Elétrons secundários representam uma interação inelástica. Quando o feixe primário se choca com o campo elétrico do elétron da amostra, ocorre transferência de energia para o átomo da amostra e a expulsão do elétron deste átomo como o elétron secundário. A energia do elétron secundário é, por definição, menor que 50eV. Se a vacância criada com a geração do segundo elétron for preenchida com outro elétron de orbital mais energético, um raio-X característico será produzido. Ao contrário, ao interagir com o campo elétrico do núcleo, os elétrons do feixe primário têm sua direção alterada, porém sem perda significativa de energia. Este é o exemplo de choque elástico. A perda de energia é inferior a 1eV. Se este feixe elasticamente espalhado for refletido para fora da amostra, elétrons retroespalhados serão obtidos. A combinação dos efeitos dos espalhamentos elásticos e inelásticos pode ser ilustrada pela distribuição do feixe de elétrons através da sua interação em volume com a amostra. Todos os efeitos influenciam na qualidade dos sinais que serão detectados para resolução da amostra (DEDAVID, 2007).

1.3.1 – Métodos convencionais de fixação química de amostras biológicas

O processo de fixação é aquele pelo qual se obtém a estabilização dos sistemas biológicos, ou seja, das estruturas celulares e intercelulares. A fixação ideal deve ser aquela onde a morfologia das moléculas, suas relações topológicas bem como a fase aquosa e seus solutos sejam preservados o mais próximo possível da situação *in vivo* (HAYAT, 1970). Mesmo alcançando-se a situação ideal de fixação, sabe-se que esse procedimento introduz uma série de perturbações no sistema e que, por conseguinte, as imagens obtidas em microscopia são necessariamente artefatuais. Observações feitas em amostras fixadas por congelamento rápido e ultrarrápido mostraram que esse método de fixação é mais eficaz do que os demais, pois, provavelmente preserva as estruturas celulares bem mais próximo da situação *in vivo* (HAYAT, 1981).

A fixação química de material biológico se processa pela reação de substâncias presentes nos fixadores com determinadas estruturas moleculares presentes na amostra, estabilizando-as, quimicamente. No entanto, fixadores químicos quase sempre acarretam a desnaturação de proteínas, como é o caso daqueles que se classificam com fixadores não aditivos, que têm ação coagulante sobre as proteínas, alterando, de forma irreversível, a sua conformação. O etanol, por exemplo, é um fixador que, na maioria das vezes, tem ação coagulante sobre as proteínas. Tais fixadores não são utilizados em microscopia eletrônica (SESSO, 2011)

Os mais utilizados na rotina de microscopia eletrônica são aqueles que fazem ligações cruzadas com a amostra, também denominados aditivos. Fixadores aditivos fazem uma “amarração” entre as suas moléculas e as moléculas da amostra, sem distorcer muito essas últimas. Portanto, eles passam a incorporar a amostra. Uma das vantagens desse processo é que, após serem fixadas por um fixador aditivo, estruturas coaguláveis tornam-se estáveis e não podem mais ser coaguladas por outras substâncias coagulantes. Assim, as proteínas não podem mais ser coaguladas pelo etanol ou acetona, aos quais serão submetidas, posteriormente para desidratação (SESSO, 2011).

O glutaraldeído ou aldeído glutárico é um fixador aditivo, eleito como fixador de escolha na rotina do preparo de amostras biológicas para microscopia eletrônica. Esse fixador tem a propriedade de se ligar aos grupamentos amina das proteínas, fazendo ligações cruzadas, de forma irreversível, sendo, portanto, o responsável pela fixação da porção proteica das células (HAYAT, 1981).

O tetróxido de ósmio, que também é um fixador aditivo, foi utilizado pela primeira vez em microscopia eletrônica em 1952 por Palade (PALADE, 1952). Sabe-se que o tetróxido de ósmio atua protegendo as lipoproteínas dos tecidos, evitando sua coagulação e produzindo uma gelificação que, ao microscópio eletrônico se apresenta como uma estrutura homogênea. O ósmio estabiliza e contrasta, principalmente, os fosfolípidios de membrana. Sua ação sobre as proteínas não é bem conhecida. É, portanto, o responsável pela fixação da porção lipídica das amostras (PALADE, 1952).

O formaldeído é um péssimo fixador quando se considera a preservação de estruturas submicroscópicas. Por ser um monoaldeído, não é eficiente em fazer ligações cruzadas, tendo, portanto, a possibilidade de reversão em sua ação

fixativa. No entanto, atividades enzimáticas e imunogênicas são menos prejudicadas pelo formaldeído do que pelos demais fixadores. Portanto, quando o objetivo é estudar tais atividades, o uso desse fixador é indicado. Um dos responsáveis pela ação nociva do formaldeído é o metanol presente em sua forma comercial disponível, denominada formalina. A formalina apresenta entre 11 a 16% de metanol. Para se obter formaldeído livre de metanol, parte-se de sua forma polimérica que é o paraformaldeído. O uso conjugado desses fixadores tem sido o mecanismo de rotina para preservação das estruturas e atividades celulares (GLAUERT, 1975).

1.3.2 – Métodos de fixação física por congelamento ou criofixação

Uma das formas de se preservar amostras biológicas para observação por microscopia eletrônica é o congelamento. Quando se fixa uma amostra biológica por congelamento, não se deve matá-la, mas sim estabilizá-la pela extração de calor. O fundamento dessa técnica é que, submetendo-se as células a um congelamento ultrarrápido, com uma velocidade na ordem de -1000°C por segundo, a água intracelular passa do estado líquido ao sólido, formando cristais tão diminutos que não podem ser percebidos ao microscópio eletrônico (BENCHIMOL & MIRANDA, 2011). Mesmo sendo uma metodologia que dispensa o uso de fixadores químicos, eventualmente eles podem ser admitidos em pequenas doses, como é o caso da criofractura e da crioultramicrotomia, onde uma fixação química suave é admitida (TOKUYASU, 1973; DE SOUZA & SOUTO-PADRON, 2011). O congelamento ideal seria aquele onde a água passaria diretamente do estado líquido ao sólido sem a formação de cristais de gelo. Esse processo chama-se vitrificação e, ainda hoje, não está demonstrado que isso seja possível. (BENCHIMOL & MIRANDA, 2011).

Vários fatores interferem no processo de congelamento de material biológico, entre os quais se destacam o tamanho e a forma da amostra, a velocidade do congelamento, a pressão e a concentração de solutos da amostra. Um outro fator a ser considerado é o criogênio a ser usado. Os mais comuns são o nitrogênio líquido (-196°C), o propano (-175°C) e o hélio líquido (-217°C) (ECHLIN, 1992).

Os métodos de congelamento podem ser classificados como lentos, rápidos ou ultrarrápidos. Quando um tecido é exposto a um congelamento lento, na

ordem de -1°C por segundo, a água presente transforma-se em gelo e, à medida que isso ocorre no meio extracelular, aumenta a concentração dos solutos pericelulares, aumentando a pressão osmótica e fazendo com que a célula perca água para o meio. À essa velocidade, a perda de água é total e não ocorre a formação de cristais dentro da célula, no entanto, ela apresentará severas deformações e distorções. No meio extracelular duas regiões ficarão bem definidas – a que contém os cristais de gelo e outra denominada eutética, onde estarão os solutos congelados (BENCHIMOL & MIRANDA, 2011).

Substâncias denominadas crioprotetores são adjuvantes no processo de congelamento lento, prevenindo os efeitos acima citados. A sacarose, em concentrações que variam entre 2,0 e 2,3 M, o dimetilsulfóxido (DMSO) e o glicerol são exemplos de substâncias crioprotetoras. O congelamento lento com o uso de crioproteção é muito usado para a estocagem de células, com manutenção da viabilidade, para uso posterior (MERYMAN, 1971).

Congelamento sob alta pressão (HPF) – Grande parte dos congelamentos de material biológico, para fins de observação por microscopia eletrônica são feitos sob pressão atmosférica ambiente. No entanto, a aplicação de alta pressão imediatamente antes da criofixação, modifica o padrão de congelamento da água de modo que é possível preservar a estrutura celular com a formação de uma quantidade mínima de cristais de gelo. Em um bom congelamento rápido, à pressão atmosférica, a profundidade não ultrapassa os $30\mu\text{m}$ (ECHLIN, 1992). O congelamento sob alta pressão (~ 2050 bar) permite o bom congelamento de fragmentos com cerca de 2mm de diâmetro numa profundidade de $200\mu\text{m}$ da superfície. No congelamento sob alta pressão, as amostras são inseridas em suportes apropriados e recebem um jato de nitrogênio, num equipamento próprio, congelando-as instantaneamente (BENCHIMOL, 2011). Amostras biológicas congeladas por esse método necessitam passar, posteriormente, por fixação química e desidratação a baixa temperatura. Esse processo é denominado substituição a frio (ECHLIN, 1992).

Substituição a frio – As amostras fixadas fisicamente pelo congelamento recebem um fixador químico, a baixa temperatura e passam por uma curva de aquecimento, até atingirem a temperatura ambiente, quando são, então processadas para observação ao MET, pelos métodos de rotina. O meio utilizado

na substituição a frio deve ter características que permitam que ele se mantenha líquido a temperaturas muito baixas, sem gerar riscos de cristalização e consequente dano as amostras. Após serem colocadas no meio de substituição a -90°C , as amostras são aquecidas gradualmente, em aparelho apropriado para esse fim (GIRARD-DIAS *et al.*, 2012).

Crioultramicrotomia – Quando uma amostra biológica é fixada quimicamente, uma série de procedimentos são necessários para sua observação ao microscópio eletrônico, entre as quais a desidratação e sucessivas lavagens, que causam a extração de uma grande quantidade de biomoléculas, como demonstrado por Girard-Dias e colaboradores (2012). No processamento para crioultramicrotomia, tais etapas são desnecessárias e a preservação da morfologia celular é bem superior às técnicas de processamento convencional. O uso de crioprotectores previne a formação de cristais de gelo e os danos por eles causados. Nessa metodologia, as amostras passam por um processo de fixação química suave, seguida de infiltração por sacarose, que atua como crioprotetor e, em seguida são congeladas por imersão em nitrogênio líquido. A ultramicrotomia dos blocos congelados é efetuada sob baixa temperatura (em torno de -90°C). Os cortes obtidos são incluídos em um filme de polivinil álcool (PVA) ou metilcelulose para evitar que o contato com o ar acarrete retração dos mesmos (TOKUYASU, 1973; BOS *et al.*, 2011).

1.3.3. Preparo de amostras para MET

1.3.3.1. Desidratação – é uma etapa do processamento de amostras para microscopia eletrônica, que visa substituir a água presente nos tecidos e células por um fluido miscível nas resinas de inclusão. Basicamente o processo de desidratação consiste em banhos sucessivos em um agente desidratante, cuja concentração é progressivamente aumentada (HAYAT, 1981). Em geral a desidratação é feita após a fixação e pós-fixação, em acetona ou etanol, tendo sido assegurado que todos os resíduos de fixadores não ligados tenham sido removidos por lavagens sucessivas, em tampão. É indicado que o tampão utilizado nas lavagens seja o veículo do fixador (BOZZOLA & RUSSEL, 1992). No presente trabalho, o agente desidratante escolhido foi a acetona, pois além de ser mais higroscópica, também provoca menor retração dos tecidos e sua miscibilidade com

as resinas utilizadas na rotina de MET é considerada melhor que a do etanol. (HAYAT, 1981)

1.3.3.2. Infiltração e inclusão – o processo de infiltração tem o mesmo fundamento que o da desidratação. Assim como o agente desidratante substitui gradualmente a água presente na amostra biológica, a resina de inclusão deve substituir o agente desidratante, preenchendo todos os espaços, primordialmente preenchidos pela água. A inclusão é a etapa do processamento que visa conferir à amostra biológica consistência para que seja seccionada em cortes ultrafinos (BOZZOLA & RUSSEL 1992). Nessa etapa, as amostras são impregnadas por uma resina que permita a infiltração da amostra e que, após polimerizada, admita a contrastação dos cortes (REYNOLDS, 1963; VENABLE, 1965).

Existem várias resinas disponíveis comercialmente. Elas se dividem basicamente em dois grupos: as do tipo epóxi e as acrílicas (BOZZOLA & RUSSEL 1992).

As resinas epóxi são as mais utilizadas em microscopia eletrônica e as mais conhecidas são o epon, o spurr e o araldite, que apresentam viscosidade variável, em função do peso molecular. Quimicamente as resinas epóxi são classificadas como polialil-ésteres, que apresentam grupamentos epóxi terminais. A reação desses grupamentos com substâncias endurecedoras, conhecidas como catalisadores é o que irá determinar as dimensões da malha formada na resina, que será tanto menor quanto maior for o número de grupamentos epóxi presentes na molécula (DE SOUZA, 2011). Durante a polimerização, uma grande quantidade de ligações cruzadas podem ocorrer, fazendo com que tais resinas atuem como potenciais fixadores de algumas proteínas e de ácidos nucleicos (CAUSTON, 1984). Outra marcante característica dessas resinas é sua baixa capacidade de absorver água, devido à sua natureza hidrofóbica (DE SOUZA, 2011). Dadas essas características, as resinas epóxi não são as mais indicadas em para técnicas imunocitoquímicas pós-inclusão (DE SOUZA, 2011). O epon, a resina epóxi mais utilizada em rotina de ME, é comercializado sob diversos nomes e marcas: Epon 812, Eponate 12, Polybed, etc. A resina básica é misturada ao anidrido dodecenilsucínico (DDSA) e anidrido metil náxico (NMA), segundo as proporções ditadas na fórmula de Luft (1961). Um catalisador é adicionado à essa mistura para que ocorra a polimerização. Os catalisadores mais utilizados são o 2,4 tridimetilaminametilfenol (DMP-30) e o benzildimetilamina (BDMA). A variação nas

proporções entre o DDSA e o NMA permite a obtenção de blocos mais ou menos duros. O epon é um composto potencialmente tóxico e cancerígeno e sua manipulação deve ser feita em ambiente com exaustão adequada e acessórios de segurança, tais como luvas e máscaras (LUFT, 1961).

O spurr é uma resina epóxi menos viscosa que o epon. Foi introduzido em 1969 (SPURR, 1969). Devido à sua baixa viscosidade, seu uso se aplica à amostras mais compactas, com parede celular ou cutícula, como é o caso de tecidos, vegetais, fungos e vermes. É uma mistura de resinas do tipo epóxi, como o VCD (vinil ciclohexeno dióxido) e a DER-736 (diglicidileter de prolipropilenoglicol) com o NSA (anidrido nonetilsuccínico) e o catalisador DMAE (dimetilaminoetil), comercializada sob vários nomes e marcas. Sua fórmula também pode ser alterada para obtenção de blocos mais macios ou mais duros, para reduzir o tempo de polimerização ou, ainda, para que a mistura possa ser armazenada por mais tempo (SPURR, 1969).

As resinas acrílicas, devido à sua natureza hidrofílica, são permeáveis aos anticorpos utilizados nos procedimentos de imunomarcção (CAUSTON, 1984). Porém, exigem condições de polimerização específicas, a fim de preservar a antigenicidade das amostras, tais como baixa temperatura e foto catalisadores. Existem dois grupos de resinas hidrofílicas utilizadas em técnicas de imunomarcção pós-inclusão em ME: o grupo dos acrílicos aromáticos, como o LRWhite e o LRGold, por exemplo e o grupo dos acrílicos alifáticos, como o Lowicryl e o Unicryl, por exemplo (DE SOUZA, 2011).

Resinas hidrofílicas devem satisfazer duas condições, para atuarem como meios de inclusão em técnicas de imunocitoquímica pós-inclusão em ME: devem imobilizar a amostra, evitando rearranjos moleculares que desnaturem os componentes da amostra e devem ter natureza polar, a fim de manter pontes de hidrogênio em substituição àquelas que existiam entre a amostra e a água, antes da desidratação. A polimerização das resinas acrílicas podem ocorrer mediante a adição de um agente químico, denominado "*cross linker*", de modo que, variando a natureza dele, é possível variar também a condição de polimerização da resina – calor, radiação ultravioleta ou catálise química (DE SOUZA, 2011).

As resinas LRWhite e LRGold possuem um único componente e viscosidade próxima à da água, o que permite seu uso em qualquer tipo celular, particularmente aqueles de difícil penetração. A resina LRGold é a mais indicada para material não fixado quimicamente, permitindo a detecção de antígenos sensíveis à fixação

química. A resina LRWhite polimeriza a temperatura ambiente, com adição de catalisador ou puro, a 60° C. A resina LRGold requer foto polimerização a baixa temperatura. Amostras processadas para inclusão em resinas da família LR não devem ser desidratadas em acetona, pois ela inibe a polimerização das resinas (ATTIAS, 2011).

O Lowicryl (CALERMALM, 1985) é uma resina hidrofílica, formada por acrilato e metacrilato, cuja principal característica é a baixa viscosidade. Além disso, essa resina se mantém líquida a baixas temperaturas (-35°C). Sua polimerização pode ocorrer sob várias condições, bastando para isso, alterar alguns componentes do catalisador. É uma resina que se hidrata facilmente, dificultando a obtenção de cortes ultrafinos (ATTIAS, 2011).

O Unicryl, desenvolvido em 1992 (SCALA, 1992), é uma resina de baixa viscosidade, derivada do metacrilato, cujo uso pode ser aplicado tanto na microscopia de luz quanto na ME. Essa resina não forma ligações cruzadas com ácidos nucleicos ou proteínas, favorecendo sua detecção pelas técnicas de citoquímica pós-inclusão. Mantém-se líquido à baixas temperaturas (-30°C) e possui baixa viscosidade. Por ter em sua composição apenas um componente, seu manuseio é mais fácil. A polimerização ocorre a baixa temperatura sob radiação ultravioleta, o que previne a retração significativa da amostra. O Lowicryl vem sendo gradualmente substituído pelo Unicryl nos últimos anos, devido às vantagens que o segundo apresenta em relação ao primeiro (DE SOUZA, 2011; ATTIAS, 2011).

1.3.3.3. Ultramicrotomia – A maior parte das amostras biológicas é naturalmente espessa para a maioria dos microscópios eletrônicos. Para observar adequadamente a ultraestrutura celular, necessário se faz que as amostras sejam seccionadas em fatias extremamente finas. Esse processo é denominado ultramicrotomia e é realizado nos ultramicrótomos, aparelhos capazes de fatiar uma amostra biológica em cortes muito delgados, na ordem de nanômetros. Os primeiros ultramicrótomos foram desenvolvidos na década de 1950, com projeto de Porter e Blum, executados pela Sorvall (PORTER E BLUM, 1953). Os cortes ultrafinos podem ser obtidos em facas de vidro (LATTA E HARTMAN, 1950) ou de diamante (FERNÁNDEZ-MORAN, 1953).

A crioultramicrotomia é uma variação da ultramicrotomia e consiste na obtenção de cortes ultrafinos de amostras congeladas, eliminando-se várias etapas

no preparo de material biológico pelo método de rotina, tais como a pós-fixação, a desidratação e a inclusão em resina, permitindo a exposição de moléculas, melhor preservadas pelos processos de criofixação (BENCHIMOL, 2011). As primeiras tentativas de se obter cortes ultrafinos de material congelado datam de 1952, quando Fernández-Moran obteve cortes de material congelado, não incluso em resina, num micrótomo Spencer, de baixa temperatura (-35° C), utilizando facas de vidro. Como os resultados não foram bons, essa técnica foi abandonada e só voltou a despertar interesse nos anos 1960 (LEDUC *et al.*, 1967). Após as várias modificações na técnica, introduzidas por Tokuyasu na década de 1970, a crioultramicrotomia ganhou vários adeptos (BOS, 2014).

1.3.3.4. Contrastação – Em geral, as amostras biológicas possuem pouco contraste, pois os elementos predominantes em sua composição são de baixo número atômico. Para aumentar o contraste das estruturas biológicas, os cortes ultrafinos são incubados em soluções de metais pesados que reagem com os componentes celulares, realçando as estruturas. Esta etapa do processamento pode ser feita logo após a pós-fixação química ou após a obtenção dos cortes ultrafinos. No primeiro caso denominamos o processo por *contrastação in bloco*. Soluções de metais pesados também podem ser utilizadas para contrastar macromoléculas, membranas ou vírus diretamente aderidos a um filme com que se reveste as grades. Esse processo é chamado *contrastação negativa* (DE SOUZA, 2011). As duas substâncias mais empregadas na *contrastação* de cortes ultrafinos são sais de uranila e chumbo, que reagem com determinados componentes da célula, particularmente proteínas e ácidos nucleicos (BOZZOLA & RUSSEL, 1992).

A técnica consiste em se inverter a grade com os cortes sobre uma gota de acetato de uranila, lavar, suavemente, em água corrente e, em seguida repetir o processo com o citrato de chumbo (REYNOLDS, 1963). No caso do citrato de chumbo, o contato com o CO₂, presente no ar, pode levar à sua precipitação. Portanto, para prevenir esses problemas, as grades devem estar protegidas do ar, durante o processo de *contrastação* e a solução de citrato de chumbo deve estocada cuidadosamente (BOZZOLA & RUSSEL, 1992).

1.3.4 – Preparo de amostras para MEV

1.3.4.1. Secagem pelo ponto crítico – em amostras preparadas para observação por MEV, é necessário que se faça uma secagem, pelo método do ponto crítico,

com objetivo substituir a água presente nas células por um gás, que, via de regra é o CO₂. Um ponto crítico, também chamado de estado crítico, ocorre sob condições (tais como valores específicos de temperatura e pressão) nas quais não há distinção entre a fase líquida e a fase gasosa de uma substância, isto é, o ponto em que a fronteira entre a fase líquida e gasosa termina (**Figura 3**). O ponto crítico da água ocorre a 374°C e 218atm e o do CO₂ ocorre a 31,1°C e 73atm (ANDERSON, 1951).

Assim, as amostras desidratadas, como descrito acima, são levadas, em etanol absoluto, para um equipamento apropriado, onde o etanol remanescente da desidratação é substituído, gradualmente pelo CO₂ em estado líquido que, sob as condições de temperatura e pressão acima citadas, passa ao estado gasoso, sem que ocorram os efeitos da tensão superficial sobre o material (SILVEIRA, 2011).

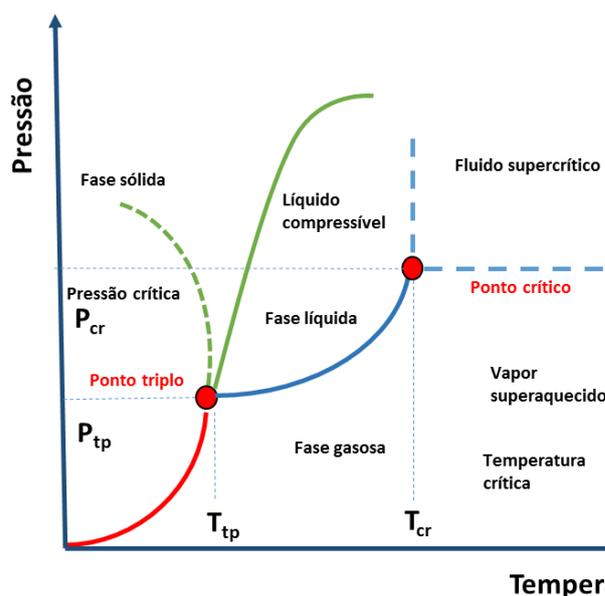


Figura 3: Diagrama de fase típico, demonstrando o ponto crítico

1.3.4.2. Cobertura metálica – amostras biológicas não têm boa condutividade elétrica, por isso é necessário fazer uma cobertura metálica para aumentar essa condutividade de sua superfície, bem como aumentar a emissão de elétrons desta. A camada depositada sobre a superfície da amostra deve ser bem delgada, para que não mascare as estruturas celulares (HERMANN E MULLER, 1991). O método mais eficaz de deposição é através de um sistema de evaporação, conhecido pelo termo em inglês “sputtering”, que em português significa pulverização catódica. Neste processo, o metal é removido de um alvo por bombardeamento com íons pesados de argônio; os átomos são ejetados e se depositam na forma de um filme

contínuo sobre todas as reentrâncias e proeminências da superfície da amostra. Os metais mais utilizados nessa técnica são o ouro, a platina, o cromo ou a combinação ouro-paládio (GOLDSTEIN, 1992). Eventualmente uma cobertura não metálica, usando carbono, também pode ser utilizada (BOZZOLA E RUSSEL, 1992).

1.3.5 – Uso do micro-ondas no preparo de amostras para MET

Micro-ondas são ondas eletromagnéticas com comprimentos de onda maiores que os dos raios infravermelhos. A incidência de micro-ondas sobre moléculas como as da água, por exemplo, causa sua vibração, com consequente aumento da temperatura, o que leva ao cozimento dos alimentos. Em microscopia eletrônica, o uso do micro-ondas reduz exponencialmente o tempo necessário para o processamento de amostras, pois acelera a difusão de fixadores e outros fluidos utilizados na técnica, tornando mais rápida e eficiente sua interação com a amostra (BENCHIMOL *et al.*, 1993). Os fornos micro-ondas utilizados em laboratório têm características próprias, diferentes daquelas presentes nos modelos de uso residencial, tais como abertura para exaustão, câmaras de vácuo e placas de refrigeração (ATTIAS, 2011).

A maior vantagem no uso do micro-ondas na fixação primária é o aumento na permeabilidade e a aceleração da difusão dos fixadores e demais fluidos pela amostras (JAMUR *et al.*, 1995). Tais características são particularmente interessantes para amostras dotadas de parede celular, cápsulas ou cutículas (vegetais, fungos, helmintos). As etapas posteriores do processo (pós-fixação, desidratação, infiltração e inclusão) também são beneficiadas pelo uso do microondas, uma vez que a dispersão dos solventes é mais homogênea pelo volume da amostra. (JAMUR *et al.*, 1995).

2. JUSTIFICATIVA

Microsporídios são parasitas intracelulares obrigatórios, reconhecidos, atualmente como patógenos oportunistas de humanos, que podem estar associados à pacientes imunodeprimidos ou imunocompetentes. Rotas distintas podem ser utilizadas pelos microsporídios para invadir uma célula hospedeira: o

tubo polar pode atuar como uma agulha para perfurar a membrana da célula hospedeira; pode acontecer uma entrada por um processo fagocítico actina dependente seguido de um processo de evasão ou ainda, pode ocorrer a entrada por invaginação da membrana como consequência da força mecânica da descarga do próprio tubo. As vias de sinalização que levam à extrusão do tubo polar na germinação de esporos *in vivo* permanecem desconhecidos.

Um dos motivos pelos quais esses processos não são bem conhecidos é a falta de técnicas eficientes para visualização das estruturas dos esporos. Um dos problemas é a elevada complexidade ultraestrutural dos esporos dos Microsporidia e a grande quantidade de elementos que interagem no processo de germinação, liberação do tubo polar e penetração na célula hospedeira.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Analisar as diferentes metodologias usadas no preparo de amostras biológicas para microscopia eletrônica, no estudo do fungo *Encephalitozoon hellem*, a fim de estabelecer um protocolo padrão para o estudo de sua ultraestrutura.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 3.2.1.** Avaliar e confrontar diferentes protocolos de fixação química e estabelecer o que gera melhores resultados na preservação da ultraestrutura dos esporos de *E. hellem*.
- 3.2.2.** Analisar diferentes métodos de fixação por congelamento e avaliar sua eficiência na preservação da ultraestrutura do *E. hellem*, comparando-os aos métodos de fixação química.
- 3.2.3.** Estabelecer o melhor protocolo de pós-fixação, através da comparação entre a técnica usual, em que se utiliza o ósmio apenas uma vez e a técnica do OTO, onde se alterna o ósmio com um mordente, por mais de uma vez.
- 3.2.4.** Comparar as resinas epon e spurr e estabelecer a que melhor se aplica à infiltração e inclusão dos esporos de *E. hellem*.
- 3.2.5.** Avaliar e estabelecer a melhor espessura para seccionamento dos esporos de *E. hellem*, para observação ao microscópio eletrônico de transmissão.

- 3.2.6. Estabelecer o melhor protocolo de contrastação dos cortes ultrafinos dos esporos de *E. hellem*.
- 3.2.7. Avaliar a influência do uso da radiação de micro-ondas nos resultados obtidos no preparo das amostras dos esporos de *E. hellem* para microscopia eletrônica de transmissão.
- 3.2.8. Estabelecer as melhores condições de secagem pelo ponto crítico para preservação dos esporos de *E. hellem*, para estudo de sua superfície ao microscópio eletrônico de varredura.
- 3.2.9. Comparar a cobertura metálica por ouro e platina, avaliando qual delas promove as melhores condições para observação dos esporos de *E. hellem* ao microscópio eletrônico de varredura.

4. METODOLOGIA

4.1. Cultivo de células hospedeiras e obtenção dos esporos: Para manutenção dos esporos de *E. hellem* em cultivo, foi utilizada a linhagem de fibroblastos de origem humana HFF ATCC-SCRC-104, que foram mantidas em meio DMEM (Dubbecco's Modified Eagle's Medium – Gibco Thermo), suplementadas com 10% de soro fetal bovino (Gibco Thermo) e 1% de glutamina (Sigma Aldrich). As culturas foram mantidas a 37°C com 5% de CO₂. A cada 72 horas os meios de cultura eram substituídos por meios novos e, tendo ocorrido confluência, as células eram tripsinizadas e uma nova cultura era estabelecida. Esporos de *E. Hellem* foram inoculados nas culturas confluentes, na proporção de 0,5 ml da solução estoque de esporos para cada 5 ml de cultura. Após 72 horas de infecção nas células da linhagem HFF, os esporos foram recuperados da seguinte forma: as células foram tripsinizadas, por 5 minutos a 37°C e centrifugadas a 400G por 10 minutos. O pellet formado foi ressuspenso em PBS (phosphate buffered saline) p.H 7,2 e centrifugado por 400G por 10 minutos a temperatura ambiente. Esse processo foi repetido por mais duas vezes. Após as lavagens com solução salina (PBS), os esporos encontravam-se prontos para os processamentos descritos a seguir, para reinfecção das células hospedeiras ou para estocagem, a 4 °C.

4.2. Preparo das amostras para microscopia eletrônica de transmissão:

4.2.1.- Fixação química: Para avaliar o melhor procedimento de fixação química dos esporos de *E. hellem* extracelulares e intracelulares, quatro protocolos, representando quatro diferentes condições foram testados:

FQ1 (Fixação padrão) – as células foram fixadas com 2,5% de glutaraldeído tipo 2 (Sigma Aldrich) em tampão cacodilato de sódio 0,1M, p.H 7,2 por 2 horas a 28°C. Em seguida, as amostras foram lavadas três vezes em tampão cacodilato de sódio 0,1M, p.H 7,2 para remoção do fixador e pós-fixadas em uma solução de 1% tetróxido de ósmio (Ted Pella) diluído em água, 0,8% de ferrocianeto de potássio (Ted Pella), diluído em água, contendo 5mM de CaCl₂ (Sigma Aldrich) por 30 minutos a 28°C, sendo posteriormente lavadas por 3 vezes no tampão cacodilato de sódio 0,1M, p.H 7,2 para remoção do pós fixador (HAYAT, 1970)

FQ2 (Solução de Karnovsky, 1965): as células foram fixadas pela solução de Karnovsky – 2,5% de glutaraldeído tipo 2 (Sigma Aldrich), 4% de formaldeído em água ((EMS)) em tampão cacodilato de sódio 0,1M, p.H 7,2 a 28°C. Foram feitas três lavagens em tampão cacodilato de sódio 0,1M, p.H 7,2. A seguir as células foram pós-fixadas em uma solução de 1% tetróxido de ósmio (Ted Pella) diluído em água, 0,8% de ferrocianeto de potássio (Ted Pella), diluído em água, contendo 5mM de CaCl₂ (Sigma Aldrich) por 30 minutos a 28°C (KARNOVSKY, 1965).

FQ3: as células foram fixadas com 2,5% de glutaraldeído em tampão cacodilato de sódio 0,1M, p.H 7,2 a 25°C por 2 horas, seguida de pós-fixação em 1% ósmio (Ted Pella) em água a 25°C por 15 minutos; 1% tiocarbohidrazida (Sigma Aldrich) em água por 5 minutos; 1% de ósmio (Ted Pella) por 15 minutos. Esse método é conhecido como OTO (ATTIAS, 2011). Seguiram-se lavagens em tampão cacodilato de sódio 0,1M, p.H 7,2 por três vezes.

FQ4: as células foram fixadas com 0,1% de glutaraldeído tipo 2 (Sigma Aldrich), 4% de formaldeído nascente (EMS) em água e 3,8% de sacarose em tampão cacodilato de sódio 0,1M, p.H 7,2, por 2 horas a 28°C. Em seguida as células foram lavadas três vezes em tampão cacodilato de sódio 0,1M, p.H 7,2.

4.2.2. Fixação física por congelamento ou criofixação: No presente trabalho duas metodologias de criofixação foram utilizadas:

4.2.2.1. Congelamento sob alta pressão (*High Pressure Freezing- HPF*) e substituição a frio: Para essa técnica, foi utilizado o equipamento BAL-TEC HPM

010 (Balzers, Bedford, UK). As amostras foram congeladas em dois suportes diferentes que garantem um congelamento eficiente.

HP1: parte das amostras foi inserida, por capilaridade em micro-capilares de celulose (Ted Pella) de 200 µm de espessura. O espaço livre foi preenchido com I-hexadeceno (Fluka Chemika) no intuito de evitar bolhas de ar no interior dos suportes. (STUDER *et. al.*, 1989).

HP2: a outra parte da amostra foi congelada em suportes metálicos compostos de duas partes metálicas (tipo sanduíche) onde as células são depositadas entre elas, com o preenchimento dos espaços livres pelo I-hexadeceno (Fluka Chemika).

Após congelamento, as células foram submetidas ao processo de substituição a frio a fim de promover a fixação química das amostras e sua desidratação a baixa temperatura.

Os Meios de substituição a frio testados foram:

MS 1: 1% tetróxido de ósmio (Ted Pella) e 5% de acetato de uranila em acetona (Merck) absoluta.

MS 2: 3% de glutaraldeído tipo 1 (Sigma Aldrich) e 1% de tetróxido de ósmio (Ted Pella) em acetona (Merck) absoluta.

MS 3: 2% de formaldeído (EMS) e 0,2% de glutaraldeído (Sigma Aldrich) em acetona (Merck) absoluta.

Dois métodos de substituição a frio foram empregados: o manual e o automático. No método manual, as amostras foram aquecidas de acordo com o seguinte procedimento: foram transferidas do nitrogênio líquido, em que foram transportadas (-196°C) para um freezer a -80°C, por 72 horas; em seguida, foram passadas 24 horas a -20°C; 4 horas a 4°C e 1 hora a 28°C. O material foi lavado em acetona absoluta (Merck) duas vezes e infiltrado em concentrações crescentes de resina spurr (Ted Pella), conforme tabela 1. No método automático, as amostras foram processadas em um equipamento AFS2 (LEICA Solms, DE). Após transferência para o meio de substituição a uma temperatura de -90°C, foi realizada uma curva de aquecimento, seguindo os seguintes parâmetros: 72 horas a -90°C, 24 horas a -20°C, 4 horas a 4°C e 1 hora a temperatura ambiente foi utilizada. As amostras foram lavadas duas vezes em acetona absoluta por 10 minutos e infiltradas em concentrações crescentes de resina spurr, de acordo com a tabela 1.

4.2.2.2. Congelamento por imersão: Amostras previamente fixadas de acordo com o protocolo 4 de fixação foram montadas sobre um suporte metálico próprio e imersas em nitrogênio líquido, com constante agitação, até obtenção de um bloco vítreo, para posterior obtenção de criocortes.

4.2.3. Desidratação: Amostras fixadas como descrito anteriormente foram submetidas a desidratação em séries crescentes de acetona (Merck) em 30%, 50%, 70%, 90% e 100%, com duração de 20 minutos cada banho, sendo o último banho, na acetona (Merck) 100% repetido três vezes para total remoção da água.

4.2.4. Infiltração e inclusão: Após a desidratação, as amostras fixadas quimicamente foram infiltradas pelas resinas epon (Sigma) e Spurr (Ted Pella,) para a obtenção de blocos e posterior ultramicrotomia de acordo com a tabela 1.

As amostras processadas para crioultramicrotomia foram infiltradas em uma mistura de 1% polivinil pirrolidona (PVP) e sacarose 2,3M (TOKUYASU, 1986).

Tabela 1: Infiltração e inclusão por resinas plásticas

DESIDRATAÇÃO EM ACETONA	INFILTRAÇÃO EM ACETONA:EPON	INFILTRAÇÃO EM ACETONA:SPURR	INCLUSÃO EM EPON	INCLUSÃO EM SPURR
50% 20 minutos	3:1 – 3 horas	3:1 – 3 horas	48 horas 60°C	48 horas 70°C
70% 20 minutos	2:1 – 3 horas	2:1 – 3 horas		
90% 20 minutos	1:1 - overnigth	1:1 - overnigth		
100% 20 minutos (3x)	1:2 – 3 horas	1:2 – 3 horas		
	1:3 – 3 horas	1:3 – 3 horas		
	Epon puro - overnigth	Spurr puro - overnigth		

4.2.5 – Ultramicrotomia e contrastação: Amostras infiltradas e incluídas nas resinas Epon e Spurr foram seccionadas em cortes ultrafinos de 55, 65 e 75nm de espessura em um ultramicrótomo modelo UC6 (LEICA, Solms, DE) com uma faca de diamante de 1mm (Diatome, Nidau, CH) e coletadas em grades de cobre (Ted Pella) de 300 linhas.

Os cortes obtidos por ultramicrotomia foram submetidos a soluções de acetato de uranila 5% em água e citrato de chumbo, com as seguintes variações de tempo:

C1: acetato de uranila 40 minutos e citrato de chumbo 5 minutos.

C2: acetato de uranila 30 minutos e citrato de chumbo 5 minutos.

C3: acetato de uranila 20 minutos e citrato de chumbo 5 minutos.

As grades originadas do processo foram armazenadas e posteriormente analisadas por MET como detalhado posteriormente.

Amostras preparadas para crioultramicrotomia foram seccionadas em cortes ultrafinos de 75 e 85nm em um crioultramicrotomo UC6 (LEICA, Solms, DE) com facas de vidro a temperatura média de -90°C . Os cortes obtidos por crioultramicrotomia foram coletados em grades de cobre (Ted Pella) de 300 linhas, revestidas por um filme de formvar (Ted Pella), diluído em clorofórmio (Merck) a 0,5%. Para contrastação e os e sustentação dos cortes nas grades, eles foram incubados numa solução de 10% de polivinil álcool (PVA) e 5% de uranila aquosa, na proporção de 9:1 por 10 minutos, em seguida foram lavados em água destilada, por três vezes e o excesso foi retirado, delicadamente, com um papel de filtro. As grades contrastadas foram secas ao ar, protegidas da poeira, por 24 horas (TOKUYASU, 1973).

4.2.6. Uso do micro-ondas: As amostras processadas com utilização de radiação de micro-ondas foram aquelas fixadas pelo protocolo FQ3.

Foram testados vários protocolos, com vários tempos e potências, tendo sido os melhores resultados obtidos com as condições relacionadas na tabela 2 de resultados.

A fixação primária foi feita por 2,5% de glutaraldeído em tampão cacodilato de sódio 0,1M p.H 7,2 por 120s em 4 pulsos de 30s. Em seguida as amostras foram pós fixadas pelo método do OTO, descrita em FQ3, por 120s, cada etapa, em pulsos de 30s. As amostras foram, então, desidratadas em séries crescentes de acetona, por 40s em pulsos de 10s. A infiltração foi feita em spurr, de acordo com as proporções indicadas na tabela 1, por 90s, cada etapa, em pulsos de 30s. A infiltração pela resina pura foi feita por 120s, em pulsos de 30s. Entre cada uma das etapas do processamento foi observado o intervalo de 1 minuto de repouso.

Tabela 2: processamento das amostras com utilização de radiação micro-ondas.

Etapa do processamento	Intensidade da radiação	Tempo
Fixação padrão	200 W	120s
Pós – fixação pelo OTO	150 W	120s
Desidratação		
Acetona 50%	250 W	40s
Acetona 70%	250 W	40s
Acetona 90%	250 W	40s
Acetona 100%	250 W	40s
Infiltração (spurr)		
Acetona/resina	200 W	90s
Resina pura	200 W	120s

A polimerização foi realizado por 48 horas em estufa a 70°C.

4.3. PREPARO DE AMOSTRAS PARA MEV

Amostras de *E. hellem* foram fixadas de acordo com o protocolo FQ3 de fixação e desidratadas em etanol (Merck) em séries crescentes de 30%, 50%, 70%, 90% e 100%. A última etapa foi repetida três vezes para assegurar a total retirada da água da amostra.

4.3.1. Secagem pelo ponto crítico – Após esse processo inicial, as amostras foram submetidas a secagem pelo ponto crítico do CO₂. Essa etapa foi realizada em um aparelho de ponto crítico EM CPD 300 (Leica, Solms, DE). Amostras desidratadas foram transferidas para a câmara pressurizada, em etanol absoluto (Merck). Após a temperatura da câmara atingir entre 8 e 10°C, esse compartimento recebeu uma injeção de CO₂ líquido, sob agitação constante, para mistura do etanol com o CO₂. Trocas sucessivas desse meio foram feitas até a completa retirada de etanol da amostra, ficando apenas o CO₂ na câmara resfriada e pressurizada. Após a completa substituição do etanol pelo CO₂, a temperatura na câmara foi gradualmente elevada até atingir 39-40°C e a pressão chegar a 90 atm. O ponto

crítico ocorre a 31,1 °C e 72,9 atm. Ao término da secagem, a câmara foi despressurizada e as amostras secas foram retiradas e levadas para a metalização.

Tabela 3: Métodos de secagem pelo ponto crítico

	Número De Trocas	Intervalo entre as trocas
Ciclo Curto	15	1 minuto
Ciclo longo	20	4 minutos

4.3.2. Cobertura metálica – Com o auxílio de uma fita de carbono de dupla face, as amostras processadas de acordo com o item 4.3.1 foram fixadas sobre um suporte metálico apropriado e receberam uma fina camada de metal, a fim de otimizar a condutibilidade da amostra. Essa cobertura metálica foi feita de duas formas diferentes: algumas amostras receberam uma camada de espessura média em torno 10nm de ouro utilizando um metalizador modelo FL 46 (Balzers Union, Furtestum, Liechentestein) enquanto outros receberam uma camada de espessura média de 10nm de platina em um metalizador modelo EM SCD 500 (Leica, Solms, DE).

4.4. OBSERVAÇÃO POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA.

As amostras preparadas para microscopia eletrônica de transmissão pelo método convencional de inclusão em resina plástica foram observadas em um microscópio modelo EM 900 (Zeiss, Jena, DE), operando em 80 Kv.

As preparações processadas para microscopia eletrônica de transmissão por crioultramicrotomia foram observadas em um microscópio modelo TECNAI Spirit (FEI, Oregon, US), operando em 120 Kv. Por se tratar de um microscópio de corrente mais potente permite a visualização de cortes mais espessos como é o caso dessas amostras.

Os espécimes preparados para microscopia eletrônica de varredura foram observadas em dois diferentes microscópios de diferentes resoluções: EVO MA10 (ZEISS, Jena, DE), operando em 10Kv e distância de trabalho igual a 5 e JSM 6340F (Jeol, Chiba-Ken, JP) para obtenção de imagens de alta resolução, operando em 10Kv e distância de trabalho igual a 5.

5. RESULTADOS

5.1. Comparação entre os protocolos de fixação química:

Para a avaliação dos métodos de fixação química foram empregadas duas técnicas de fixação (fixação de rotina, fixação pela solução de Karnovsky) e duas técnicas de pós-fixação – ósmio/ferrocianeto e OTO (BOZZOLA, 1992).

Na Fixação de padrão (**FQ1**) as células hospedeiras fixadas mostraram-se bem preservadas, com citoplasma bem preenchido, indicativo de que não houve extração do conteúdo celular. As membranas plasmática e de organelas apresentaram aspecto trilaminar típico, demonstrando boa preservação. Foi possível observar estruturas que se assemelham a inclusões lipídicas. Estruturas típicas de células eucarióticas, como o núcleo, mitocôndrias e retículo endoplasmático rugoso são claramente visualizadas (**Figura 4**).

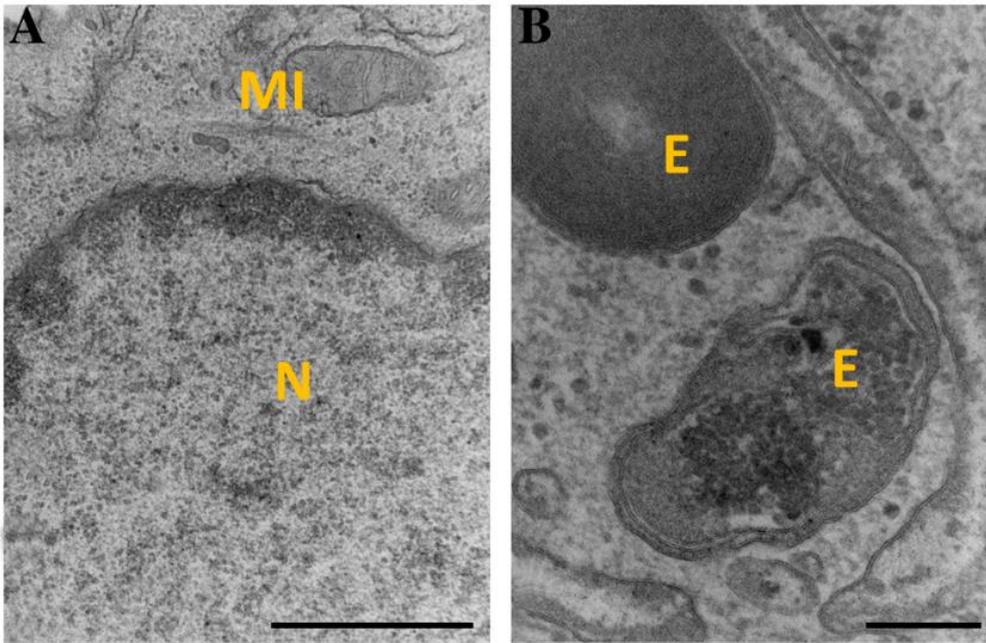


Figura 4: Ultraestrutura da célula HFF por microscopia eletrônica de transmissão. As células foram fixadas por glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato 0,1M, p.H 7,2 e pós-fixadas por tetróxido de ósmio 1% e ferrocianeto de potássio 1.6% em tampão cacodilato de sódio 0,1M, p.H 7,2. A) imagem mostra boa preservação do citoplasma da célula hospedeira: N – núcleo; MI – mitocôndria; B) Célula HFF após 72 horas de infecção pelos esporos de *E. hellem*. E – esporo. Imagens obtidas no microscópio de transmissão Zeiss EM 900, operando em 80Kv. Barras de aumento – 1µm .

Observamos que o esporo de *E. hellem* também foi bem preservado por esse método (**Figura 5**). Em corte transversal, foi possível observar o tubo polar bem conservado (**Figura 5A**). Estruturas desconhecidas, em forma de túbulos e vesículas foram observadas (**Figura 5B**). Em maior aumento foi possível visualizar o polaroplasto bem preservado (Figura 5C, asterisco), assim como o endósporo, onde foi possível observar o depósito de material de aspecto granuloso (**Figura 5C**, seta). O citoplasma preenchido foi indicativo de uma boa preservação pela fixação, sugerindo que não houve extração do conteúdo celular.

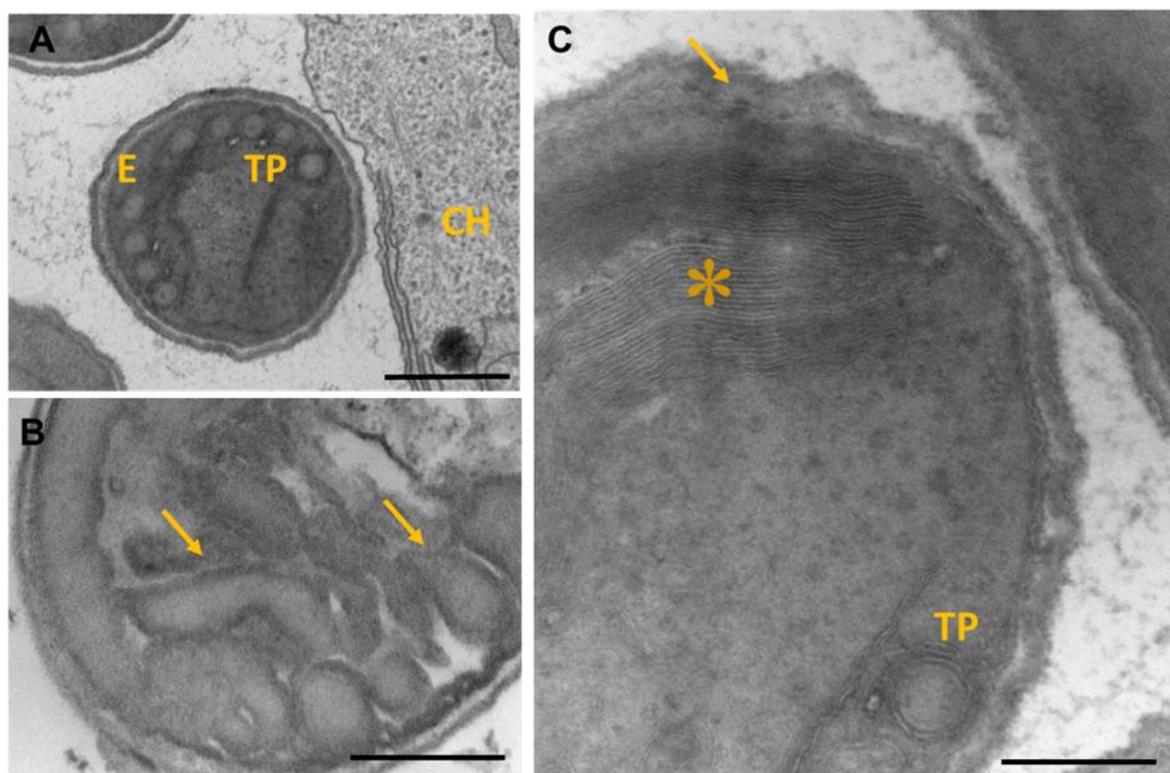


Figura 5: Ultraestrutura do esporo de *E. hellem* fixado por glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,1M, p.H 7,2 e pós-fixado por tetróxido de ósmio 1% e ferrocianeto de potássio 1.6% em tampão cacodilato de sódio 0,1M, p.H 7,2. A) aspecto geral de um corte transversal do esporo em contato com a célula hospedeira. E – esporo; TP – tubo polar. B) Maior aumento onde se observa estruturas em forma de vesículas e túbulos, atípicas do grupo (setas). C) Citoplasma do esporo de *E. hellem*, mostrando organelas típicas, como o tubo polar (TP), o polaroplasto (asterisco) e o envoltório celular duplo. Imagens feitas ao EM 900 da Zeiss, operando em 80Kv. Barras de aumento: A – 0,5 μm ; B e C – 0,2 μm .

Na fixação pela solução de Karnovsky (**FQ2**), observamos que a fixação mostrou-se eficiente na preservação das estruturas intracelulares – núcleo bem preservado, com a cromatina perinuclear bem evidenciada (seta) e organelas típicas, como a mitocôndria bastante visíveis; citoplasma preenchido e sem sinais de extração do material celular (**Figura 6A**). Notamos que as células hospedeiras, mesmo após 48 horas de infecção ainda apresenta-se íntegra. É possível observar o núcleo bem preservado e o citoplasma preenchido. Um grande vacúolo parasitóforo é observado, ocupando uma extensa região da célula (**Figura 6B**), onde é possível observar parasitas em diferentes estágios de desenvolvimento. Não foi observada extração celular na célula hospedeira.

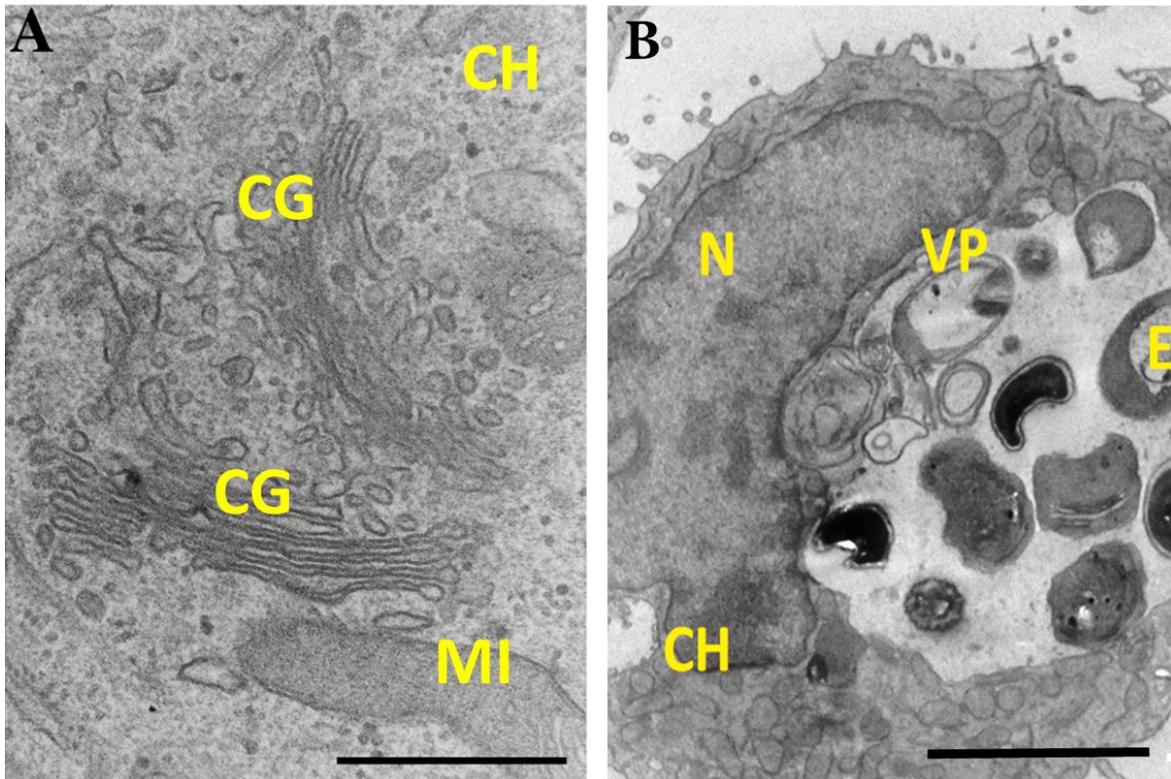


Figura 6: Ultraestrutura da célula HFF fixada por glutaraldeído 2,5% e formaldeído 4% em tampão cacodilato de sódio 0,1M, p.H 7,2 e pós fixadas por tetróxido de ósmio 1% e ferrocianeto de potássio 1.6%. A) mostra boa preservação da célula. Organelas celulares apresentam-se bem preservadas. MI – mitocôndria; CG – complexo de Golgi; CH – célula hospedeira. B) HFF infectada por esporos de *E. hellem*. A imagem mostra um grande vacúolo parasitóforo com vários parasitas em diferentes estágios de desenvolvimento (VP). Com 48 horas de infecção a célula ainda apresenta boa integridade. E – esporo; N – núcleo. Imagens obtidas ao microscópio Zeiss EM 900, operando em 80Kv. Barras de escala – 2 µm.

Os esporos de *E. hellem* apresentaram boa preservação com a utilização do FQ2 de fixação. Observamos o tubo polar, estrutura típica do parasita, bem preservado. Notamos os envoltórios celulares íntegros (**Figura 7**). Em baixo aumento podemos observar um grande espaço eletrólucido entre as membranas do endósporo e do exósporo (**Figura 7A**), o que pode indicar a extração parcial do material anteriormente presente ali. Notamos que amostras fixadas por esse método apresentaram um maior contraste do que aquelas fixadas pelo protocolo FQ1 de fixação. Esse efeito, provavelmente é gerado pela ação do ferrocianeto, que, oxidando o ósmio, gera maior contraste nas estruturas celulares. Em maior aumento é possível observar o acúmulo de material de aspecto granular aderido às faces externa e interna do exósporo. Notamos um espessamento do envoltório celular em sua parte mais externa, mas não foi observada a configuração típica de parede celular observadas nos demais fungos. Membranas concêntricas são observadas em torno do filamento polar (**Figura 7B**).

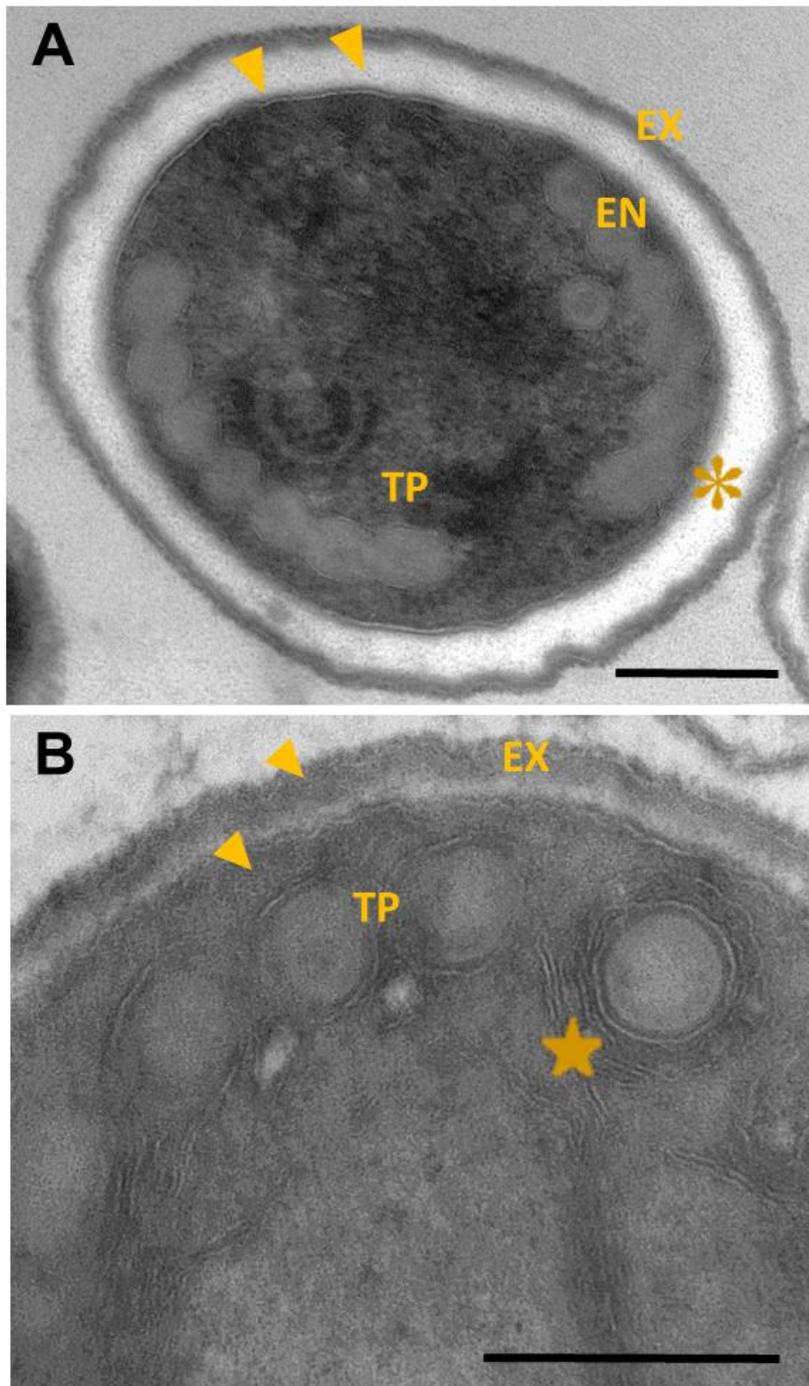


Figura 7: Ultraestrutura do esporo de *E. hellem* fixado por glutaraldeído 2,5% e formaldeído 4% em tampão cacodilato 0,1M, p.H 7,2 e pós-fixado em tetróxido de ósmio 1% e ferrocianeto de potássio 1,6%. A) É possível observar o aspecto trilaminar típico das membranas biológicas. Os envoltórios do exósporo (EX) e do endósporo (EN) também apresentam boa preservação. Observa-se a deposição de material granular entre as duas membranas (cabeças de seta). Em alguns locais parece ter ocorrido extração do material entre as duas membranas (*asterisco*); B) Deposição de material na parte interna e externa do exósporo é observada (cabeça de seta). É possível observar um conjunto de membranas concêntricas em torno do tubo polar (*estrela*). Imagens do EM 900 da Zeiss, operando em 80Kv. Barra de aumento – 0,2 μ m.

No correspondente as células submetidas ao protocolo FQ3 de fixação, pudemos visualizar um contraste de qualidade superior aquele encontrado nas células que foram pelo protocolo FQ1 (**Figura 8**). As membranas, tanto a plasmática como as de organelas apresentam-se bem realçadas. Além de atuar como fixador, a combinação acima descrita funciona como um excelente agente contrastante. Observamos que tanto a célula não infectada quanto a infectada apresentam ótimo resultado quando pós-fixadas pelo OTO (**Figuras 8A e 8B**).

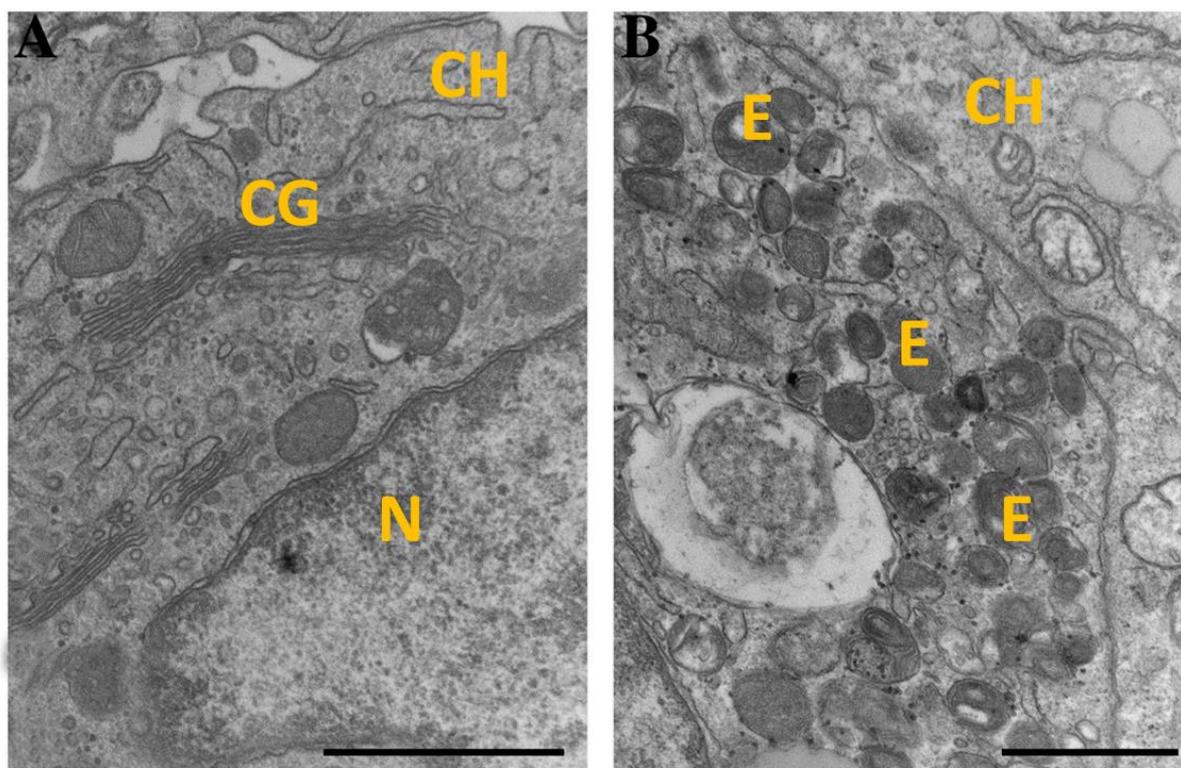


Figura 8: Ultraestrutura da célula HFF fixada pelo método FQ3. A) Célula HFF não infectada. O citoplasma celular apresenta grande eletrondensidade. É possível perceber um maior contraste das membranas. CG – complexo de Golgi. B) Célula HFF infectada por esporos de *E. hellem*. O citoplasma apresenta-se com contraste realçado. O envoltório nuclear, bem como a cromatina perinuclear estão bem contrastados. E – esporo; CH – célula hospedeira. Barra de aumento – 2 μm . Imagens obtidas ao EM 900 da Zeiss.

A observação dos esporos de *E. hellem* (**Figura 9**) revelou um citoplasma rico em estruturas membranosas. Observamos uma estrutura bastante eletrondensa, circundada por membrana, que não pudemos identificar com uma organela conhecida (**Figura 9A**). Em algumas secções pudemos ver um espaço bastante expressivo entre as duas membranas envoltórias do corpo celular e em outros cortes pudemos observar esse espaço reduzido (**Figura 9A e 9B**). Em alguns casos esse espaço se apresentava vazio e em outros, se encontrava preenchido por material de aspecto granuloso, sugerindo que o material ali presente pode ter sido extraído. Notamos, ainda, uma estrutura em forma de rede, tipicamente encontrada em outros microsporídios. Também observamos uma estrutura membranosa, de aspecto laminar que se assemelha ao polaroplasto, observado em outros representantes do filo (**Figura 9C**).

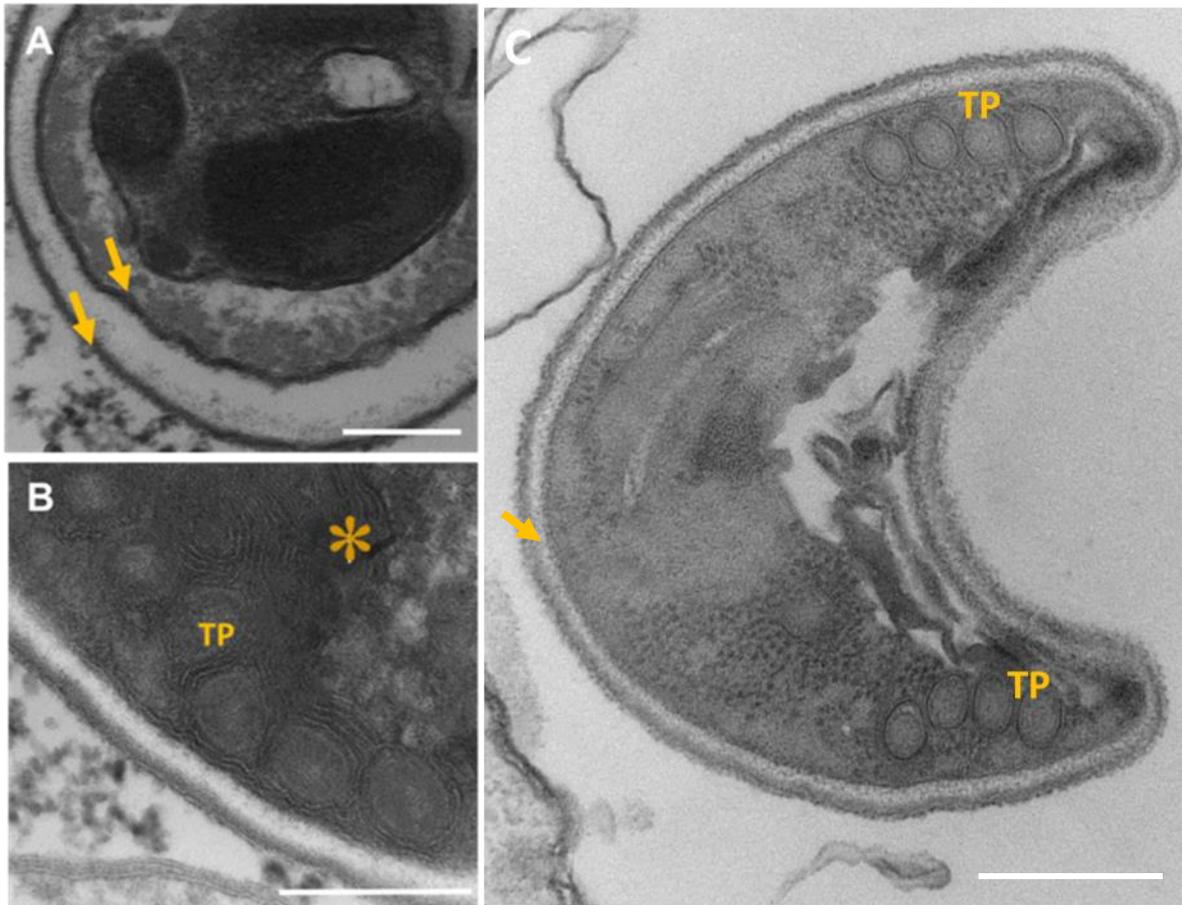


Figura 9: Ultraestrutura do esporo de *E. hellem* fixado pelo método de Karnovsky e pós fixado pelo OTO. A) Envoltórios celulares apresentam excelente preservação (setas). B) A imagem mostra o corpo polar em corte transversal bem preservado (TP). Estruturas laminares assemelhando-se a vesículas empilhadas podem ser observadas (asterisco); C) Material de aspecto granuloso pode ser observado depositado no espaço entre as membranas plasmática e o exósporo (seta). A técnica do OTO proporciona um maior contraste de estruturas membranosas, evidenciando estruturas e realçando o depósito de material entre as membranas. Imagens obtidas no EM 900 da Zeiss, operando em 80Kv. Barras de aumento – 0,2 μm .

5.2. Comparação entre os métodos de fixação por congelamento

Para avaliar o efeito dos métodos de fixação por congelamento nas células hospedeiras e nos esporos de *E. hellem*, duas criotécnicas foram avaliadas, o congelamento sob alta pressão e congelamento lento por imersão.

De forma geral, ambas criotécnicas demonstraram resultados de qualidade inferior aos obtidos por métodos químicos.

O congelamento sob alta pressão (HPF) de uma cultura rica em esporos (10^6 cel/ml de cultura) resultou em poucas células íntegras após o processo. A maior parte absoluta da amostra (esporos e célula hospedeira) estavam rompidos ou extraídos, como observado na figura 10. Nas poucas células íntegras que encontramos (cerca de 20% da amostra total) pudemos observar irregularidades nos envoltórios celulares e muitos espaços vazios no citoplasma (**Figura 10A e 10B**). Nas células observadas não foram visualizadas estruturas típicas, como tubo polar ou polaroplasto. No entanto, notamos a presença de uma camada de material granular e eletrondenso na face externa da membrana da parede (**Figura 10C**), sugerindo a presença de uma parede celular mais espessa, não observada pelos métodos químicos. A baixa densidade celular nas amostras observadas ao microscópio indica a necessidade de melhor dequação da técnica ao modelo em utilizado. Não observamos diferenças nos diferentes métodos de congelamento (HP1 e HP2).

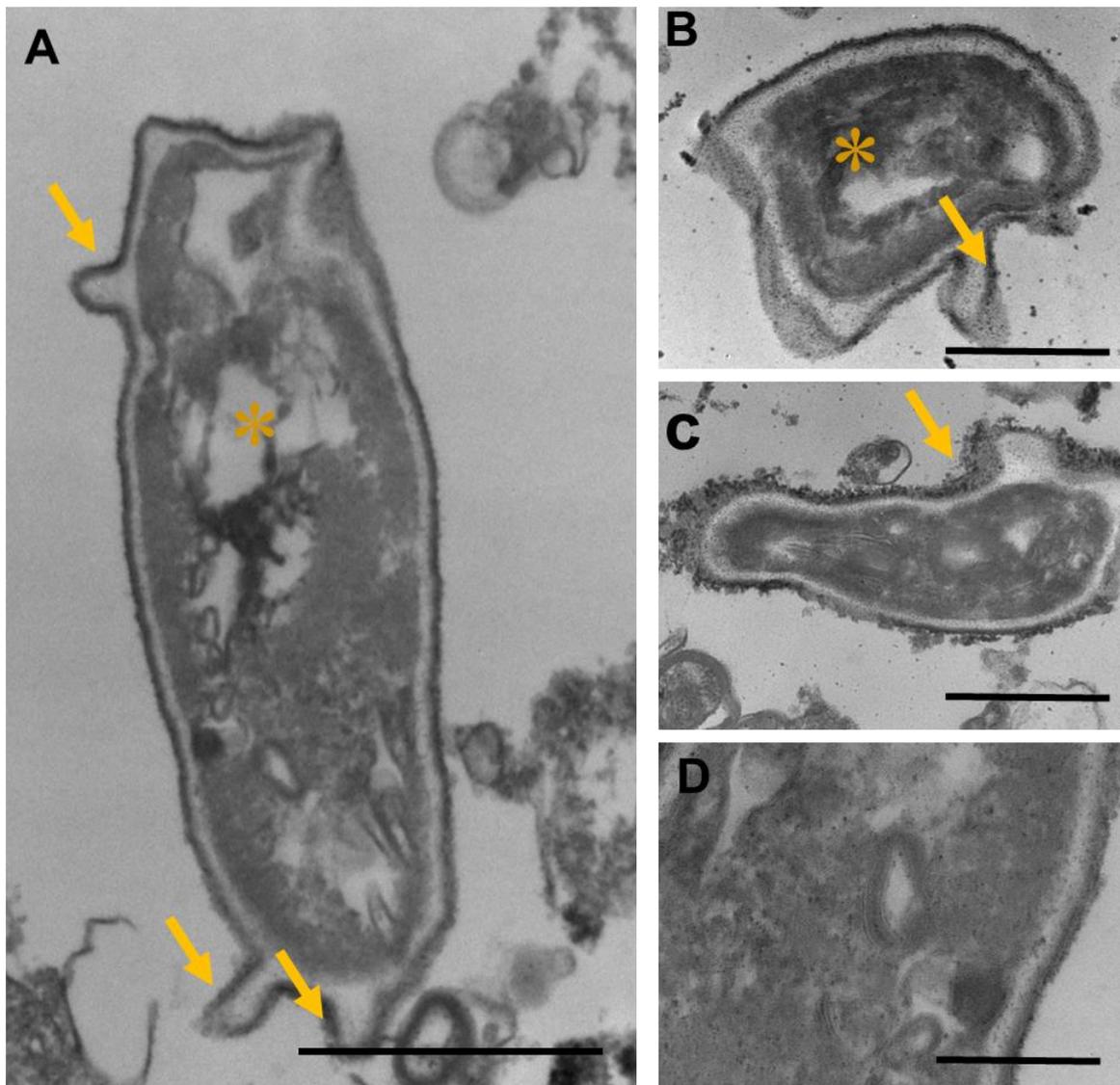


Figura 10: Ultraestrutura do esporo de *E. hellem* fixado por congelamento sob alta pressão (HPF). A) Alterações podem ser vistas nos envoltórios celulares; o citoplasma exibe grandes áreas vazias, sugerindo extração do conteúdo celular (asterisco); protusões do envoltório podem ser observadas (setas) B e C) São observados o espessamento da parede celular e o acúmulo de material de aspecto granular em maior quantidade do que o observado pelas técnicas de fixação química. D) o aumento maior evidencia um citoplasma desorganizado, diferente do que foi observado pelas técnicas convencionais, indicando má preservação das estruturas. Imagens obtidas ao microscópio FEI Tecnai Spirit, operando em 120Kv. Barras de aumento em A, B e C – 1 μm ; D – 0,2 μm .

As amostras fixadas por congelamento lento, por imersão e processadas para crioultramicrotomia também não geraram bons resultados. Raras células foram encontradas na observação ao microscópio de transmissão (**Figura 11**). Porém, nessas poucas células foi possível observar o espaço entre as membranas envoltórias do corpo celular totalmente preenchido por um material de aspecto granuloso e levemente eletrondenso. Um grande espaço eletronalucente foi observado na região central do esporo (**Figura 11A**). Em maior aumento observamos que esse espaço está preenchido por um material de textura semelhante àquele presente entre os envoltórios. Notamos também o material agregado às faces interna e externa da membrana da parede. Pudemos observar o aspecto perfeitamente circular do tubo polar em corte transversal e o citoplasma totalmente preenchido (**Figura 11B**). Esses dados necessitam ser corroborados com a correta adequação do método ao modelo.

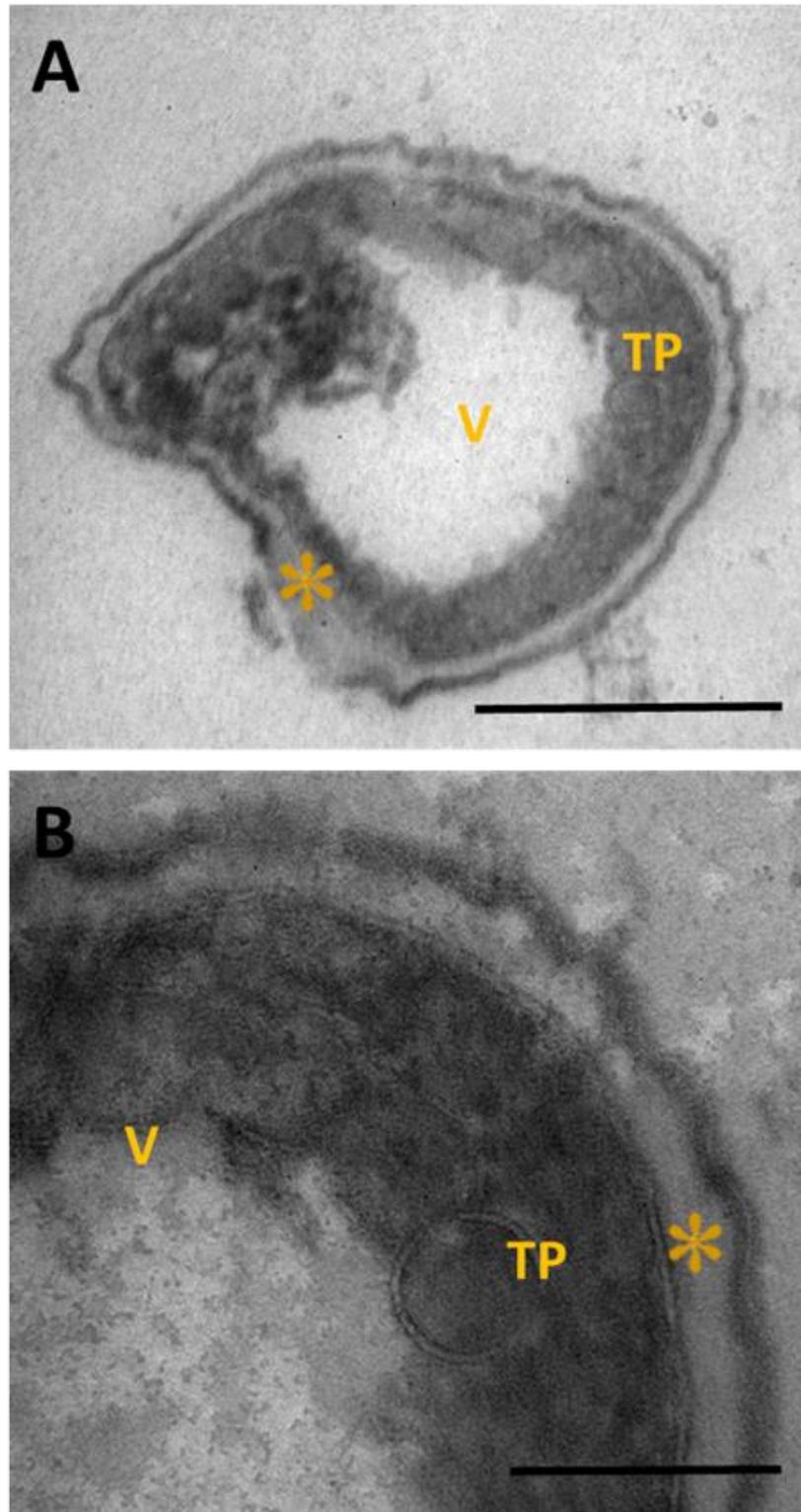


Figura 11 Ultraestrutura do esporo de *E. hellem* fixado pelo protocolo FQ4 de fixação e congelado por imersão em nitrogênio líquido, processado em seguida para crioultramicrotomia. A) mostra o tubo polar bem preservado, assim como os envoltórios celulares; B) É possível identificar um conteúdo no grande espaço visível em A. As cabeças de seta mostram o depósito de material granular entre as membranas. É possível observar a presença de material levemente eletrondenso entre as duas membranas. Imagens obtidas no microscópio FEI TECNAI Spirit, operando em 120Kv. Barra de aumento A – 1 μ m; B – 0,2 μ m.

5.3. Comparação entre as resinas de inclusão – Após eleger o método de fixação e pós fixação adequados aos nossos experimentos, passamos a experimentar as resinas plásticas que possuem melhor penetrabilidade nos esporos de *E. hellem*. Para esta comparação utilizamos o protocolo FQ3 e incluídas em epon ou spurr.

Nas amostras incluídas em epon observamos grandes lacunas formadas entre a resina e as células. Cortes feitos com a espessura de rotina (75 nm) se mostraram espessos e não permitiram a observação das estruturas citoplasmáticas (**Figura 12**). Sob o feixe eletrônico foi possível observar que essas lacunas se expandiam, causando grandes danos aos cortes. Notamos esporos inteiros quase que totalmente soltos da resina (**Figura 12A e 12B**). Os esporos se mostraram muito densos, dificultando muito a visualização da ultraestrutura celular. Em maior aumento pudemos observar grandes espaços eletrolucentes no citoplasma dos esporos, indicando na inclusão pela resina (**Figura 13**).

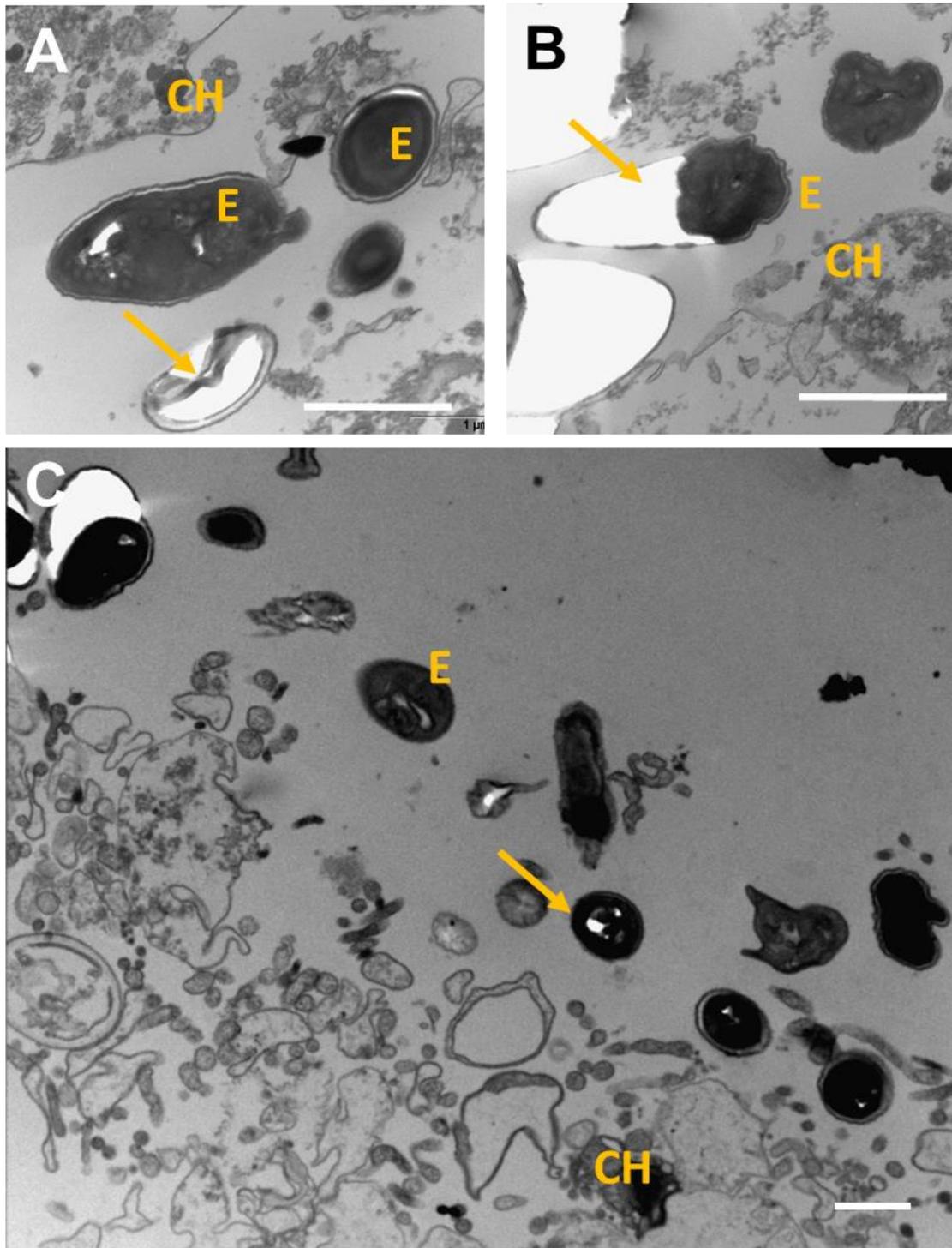


Figura 12: Aspecto geral das amostras fixadas pela solução de Karnovsky, pós fixadas pelo OTO e infiltradas por Epon. **A)** É possível observar a grande eletrondensidade dos esporos. Espaços vazios podem ser observados no interior dos esporos (seta). **B)** Grandes lacunas entre a resina e as amostras podem ser observadas, indicando que não houve infiltração adequada. **C)** Visão geral do aspecto da célula hospedeira e o esporo incluídos por epon, evidenciando a má infiltração. Imagens feitas ao EM 900 da Zeiss, operando em 80Kv. Barras de aumento – 1 µm.

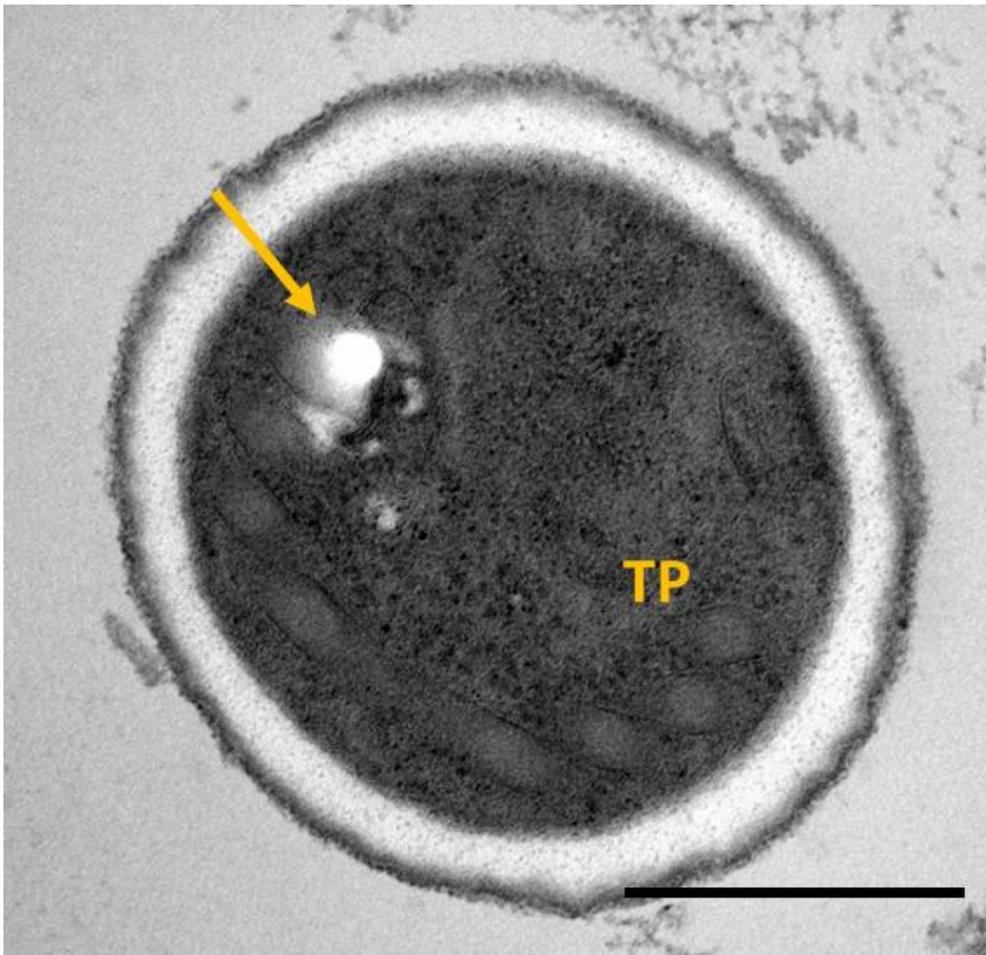


Figura 13: Ultraestrutura do esporo de *E. hellem* pela solução de Karnovsky e pós fixado pelo OTO, incluído em epon. As setas indicam lacunas formadas no interior do esporo, indicando má infiltração. O citoplasma da célula apresenta-se bastante eletrondenso. Não é possível identificar as estruturas membranosas presentes. A seta indica lacuna, indicando má infiltração. TP – tubo polar. Imagens obtidas no EM Zeiss 900, operando em 80Kv. Barra de aumento – 500 nm.

Amostras incluídas em resina spurr apresentaram melhor infiltração, mostrando um aspecto mais homogêneo e uniforme. Não foram observados espaços vazios tão grandes quanto aqueles observados quando o epon foi utilizado. Notamos que mesmo com a utilização do spurr algumas poucas áreas eletrônicas foram observadas, indicando má inclusão pela resina e sugerindo que essas amostras devem ser infiltradas do modo mais lento possível tão lentamente quanto possível (**Figura 14**).

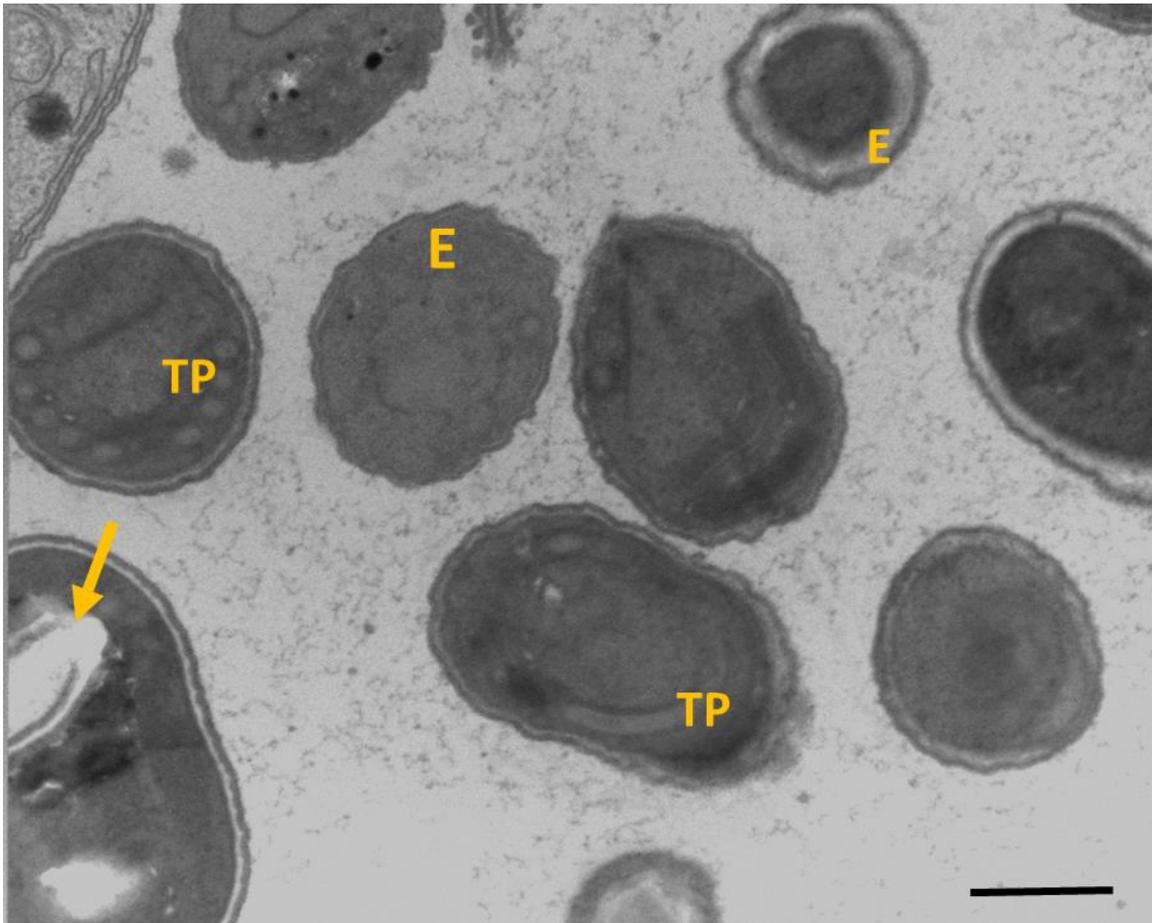


Figura 14: Aspecto geral dos esporos de *E. hellem* por glutaraldeído 2,5% e formaldeído 4% e pós-fixado pelo OTO, incluídos em spurr. O aspecto geral da amostra demonstra a boa infiltração e a boa preservação de estruturas típicas do organismo. Não se observa lacunas entre a resina e o material biológico. A seta indica a presença de região eletrônica. TP – tubo polar; E – esporo; Imagens obtidas ao EM Zeiss 900, operando em 80Kv. Barras de aumento – 500 nm.

Observamos o citoplasma do esporo bem preservado. Na maioria das vezes não foi observada a formação de lacunas ou espaços intracelulares, causados pela má infiltração. Além de proporcionar um aspecto mais uniforme das amostras, percebemos que o contraste também foi realçado. O aspecto homogêneo do citoplasma sugere uma infiltração eficiente. Em maior aumento observamos envoltórios celulares íntegros, com depósito de material de aspecto granuloso, observado anteriormente, bem evidente. O tubo polar e as organelas membranosas se mostraram íntegros, evidenciando a boa infiltração das amostras pela resina (**Figura 15**).

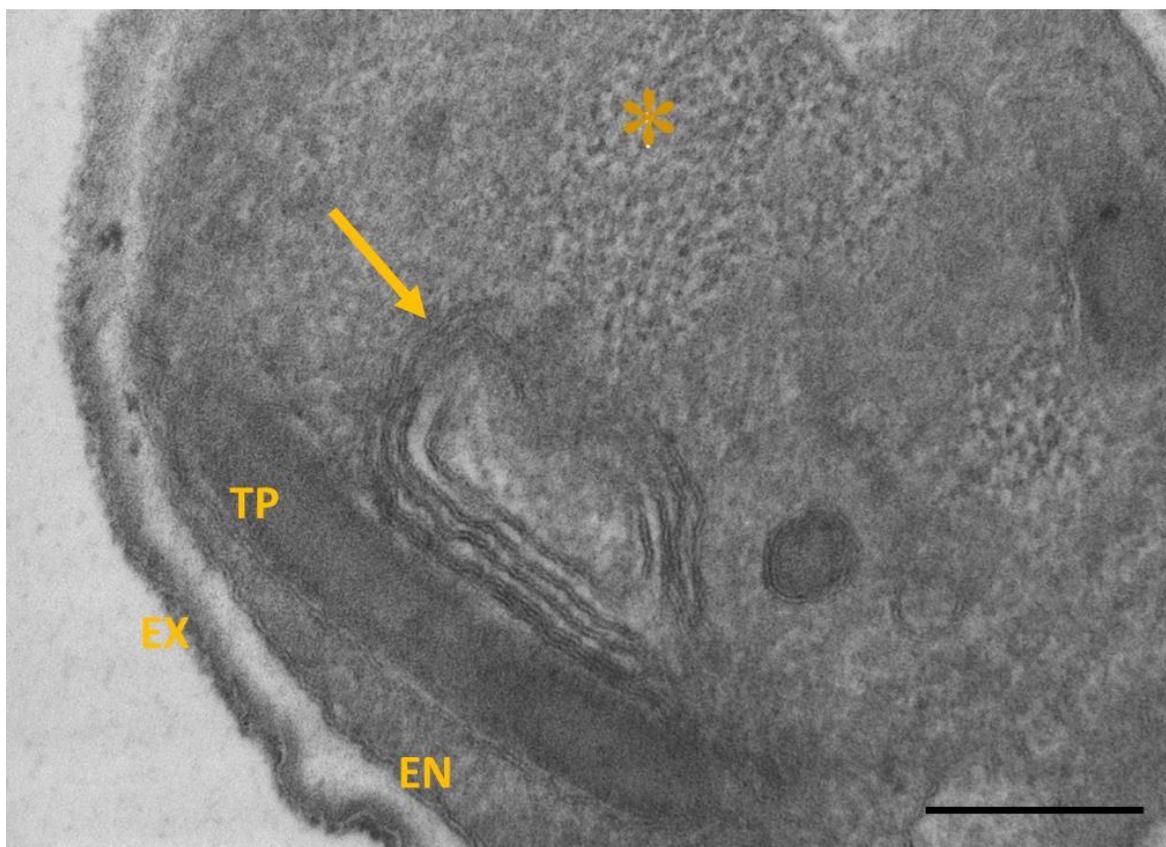


Figura 15: Ultraestrutura do esporo de *E. hellem* fixado pela solução de Karnovsky e pós fixado pelo OTO, incluído em resina spurr. O citoplasma bem preenchido indica boa infiltração pela resina. O bom contraste da amostra permite a observação de organelas típicas do parasita. TP – tubo polar; EX – exósporo; EN – endósporo; A seta indica o polaroplasto. É possível observar uma fina estrutura em forma de retículo (asterisco). Imagens obtidas ao EM Zeiss 900, operando em 80Kv. Barra de aumento – 200 nm.

5.4. Comparação na variação da espessura dos cortes e do tempo de contrastação

Amostras processadas para MET pelo protocolo FQ3 foram incluídas em spurr, seccionadas em 75, 65 e 55nm de espessura, sendo cada uma delas submetida aos protocolos C1, C2 e C3 de contrastação. As amostras seccionadas a 75 nm submetidas ao protocolo C1 de contrastação mostraram-se extremamente eletrondensas, não permitindo a observação de qualquer estrutura intracitoplasmática (**Figura 16A**). Amostras com a mesma espessura submetidas ao protocolo C2 não apresentaram diferenças significativas em relação às amostras anteriores, sugerindo que a espessura do corte é mais crucial que o tempo de incubação no acetato de uranila para observação do citoplasma do esporo de *E. hellem* (**Figura 16B**). Amostras seccionadas em 75nm e submetidas ao protocolo C3 não se mostraram muito melhores que as anteriores (**Figura 16C**). Amostras seccionadas a 65nm de espessura e submetidas ao protocolo C1 mostraram-se levemente melhores que as anteriores, permitindo a visualização de algumas estruturas membranosas do citoplasma do esporo (**Figura 16 D**). Amostras seccionadas a 65 nm submetidas ao protocolo C2 mostraram discreta melhora sobre as amostras anteriores, sendo possível observar as estruturas intracitoplasmáticas com mais clareza (**Figura 16E**). Amostras seccionadas a 65nm e submetidas ao protocolo C3 mostraram-se flagrantemente melhores que as demais, possibilitando a observação das estruturas intracitoplasmáticas dos esporos, permitindo a identificação de organelas (**Figura 16F**). As amostras seccionadas a 55nm de espessura submetidas aos protocolos C1, C2 e C3 mostraram-se eficientes para observação do esporo, com discreta diferença entre elas, mas mostraram-se frágeis, rompendo-se com facilidade quando submetidas ao feixe eletrônico. Além disso, a célula hospedeira mostrou-se com baixo contraste, dificultando sua observação. Desse modo, se se pretende observar a interação entre o parasita e sua célula hospedeira, esses protocolos não são recomendáveis (**Figura 16G, 16H e 16I**).

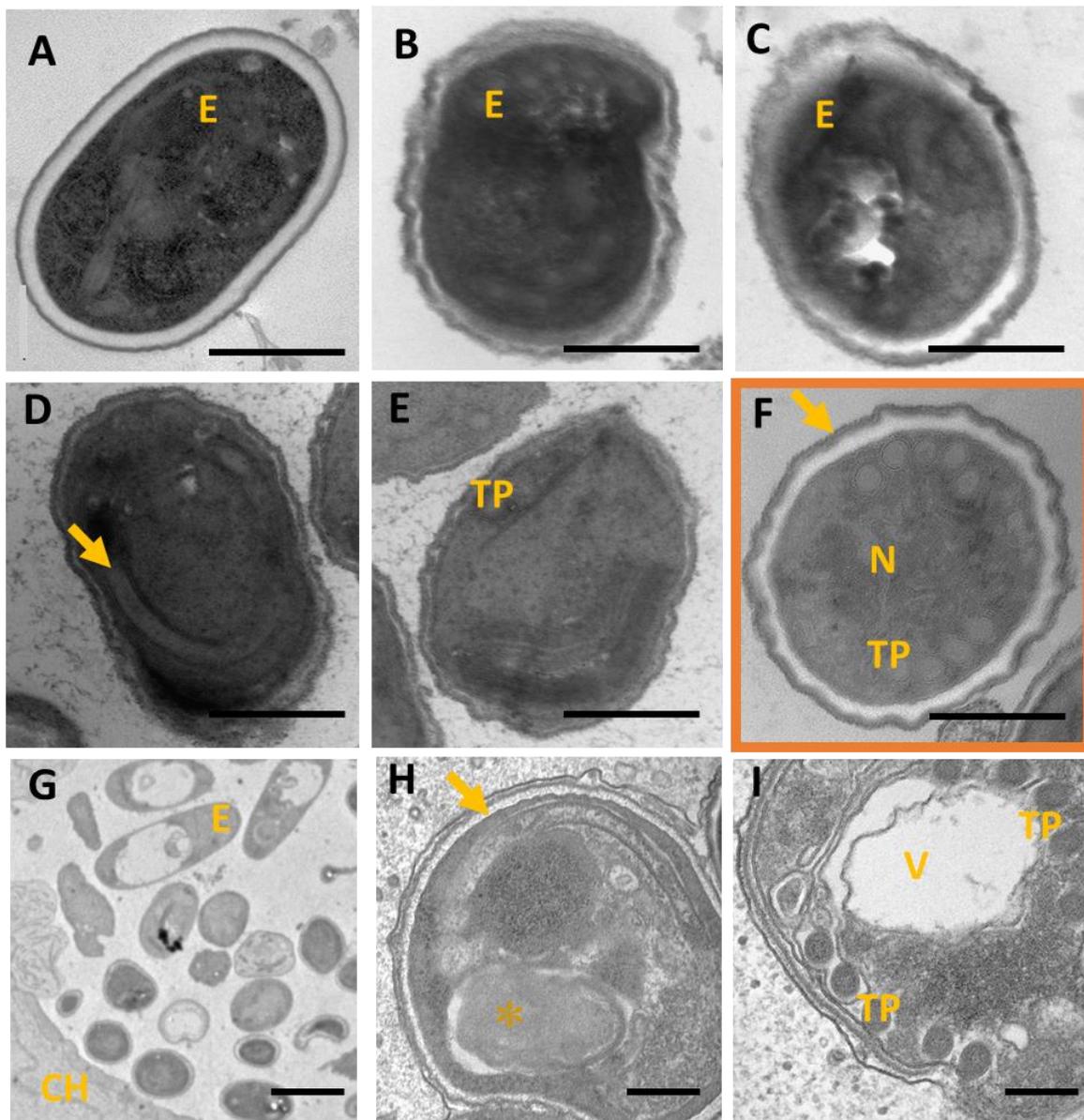


Figura 16: Painel comparativo das espessuras de corte e protocolos de contrastação. A, B e C – cortes de 75nm, contrastados por C1, C2 e C3, respectivamente. O Citoplasma muito eletrondenso não permite observação das estruturas intracitoplasmáticas. D, E e F – cortes de 65nm contrastados por C1, C2 e C3, respectivamente. Em D não é possível observar diferenças significativas em relação às imagens anteriores. E mostra discreta melhora das condições de observação em relação aos métodos anteriores. F) Imagem demonstra diferença expressiva em relação aos métodos anteriores, possibilitando a observação das estruturas intracitoplasmáticas do esporo. G, H e I – cortes de 55nm contrastados por C1, C2 e C3, respectivamente. Essas condições se mostram bastante favoráveis à observação do conteúdo citoplasmático dos esporos (asterisco). Em contrapartida, a célula hospedeira se mostra com baixo contraste. N – núcleo; CH – célula hospedeira; TP – tubo polar; V – vacúolo. A seta indica o envoltório celular bem visível. Imagens obtidas ao EM Zeiss 900, operando em 80Kv. Barras de aumento: A – F – 500nm; G – 1 μ m; H e I – 200nm.

Considerando tais diferenças, sugerimos que as condições ideais de corte e contrastação, para observação dos esporos isolados de *E. hellem* são: secções de 65nm de espessura contrastados pelo método C3. Na figura 17 comparamos a imagem obtida a partir de um esporo cortado e contrastado pelos métodos convencionais (75nm e protocolo C1 de contrastação) com uma obtida a partir de um esporo processado de acordo com as condições sugeridas (65nm e protocolo C3 de contrastação).

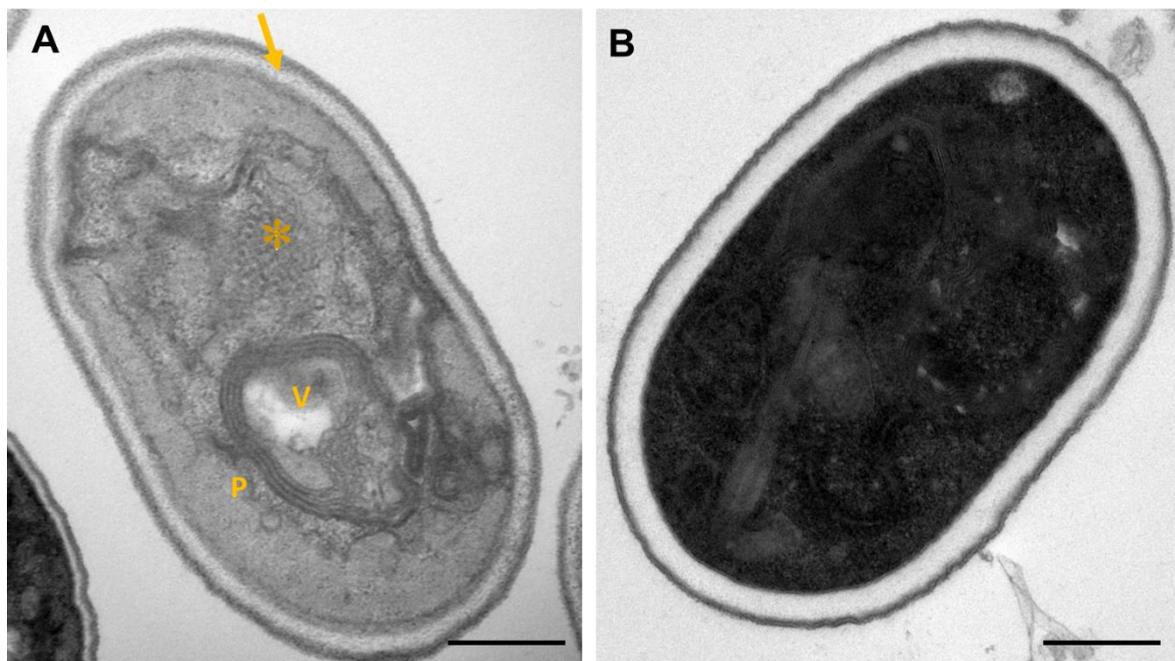


Figura 17: Comparação entre o método convencional de corte e contrastação e o método sugerido. A) Corte de 65nm e contrastação pelo método C3. É possível observar a ultraestrutura intracitoplasmática do esporo. Uma delicada estrutura em forma de rede pode ser observada (asterisco). V – vacúolo; P – polaroplasto. B) Corte de 75nm contrastado pelo método C1. O citoplasma muito eletrondenso não permite observação com clareza das estruturas intracitoplasmática. Imagens obtidas ao EM Zeiss 900, operando em 80Kv. Barras de aumento – 200nm.

5.5. Avaliação do uso do micro-ondas.

Outro método avaliado foi o uso de radiações micro-ondas no processo de preparo das amostras. As imagens mostraram excelente preservação das estruturas citoplasmáticas por esse método (**Figura 18**). Nossos melhores resultados foram obtidos com a utilização do micro-ondas. Os blocos obtidos por este método foram seccionados a 65nm e contrastados pelo protocolo C3. Observamos a preservação do material granuloso entre as membranas envoltórias do esporo; uma estrutura em forma de rede, descrita anteriormente foi melhor visualizada. Pudemos observar que as membranas constituintes do polaroplasto parecem em maior quantidade que nas técnicas anteriores. Notamos que o citoplasma do esporo parece mais preenchido e mais rico em detalhes (**Figura 18A**). Um corte longitudinal do esporo permitiu que observássemos um espaço mais extenso e mais espesso entre as duas membranas do envoltório celular (**Figura 18B**).

A melhor preservação observada nas amostras processadas com o uso do micro-ondas sugere que a velocidade proporcionada por esse método favoreça a penetração dos fluidos através do denso envoltório do esporo de *E.hellem*, gerando imagens ricas em contraste, capazes de melhor evidenciar estruturas já descritas e possibilitando a observação de outras, ainda não observadas (**Figura 19A**). A excelente preservação do envoltório celular permite a observação de uma espessa camada de material granuloso na face interna e externa do exósporo (**Figura 19B**).

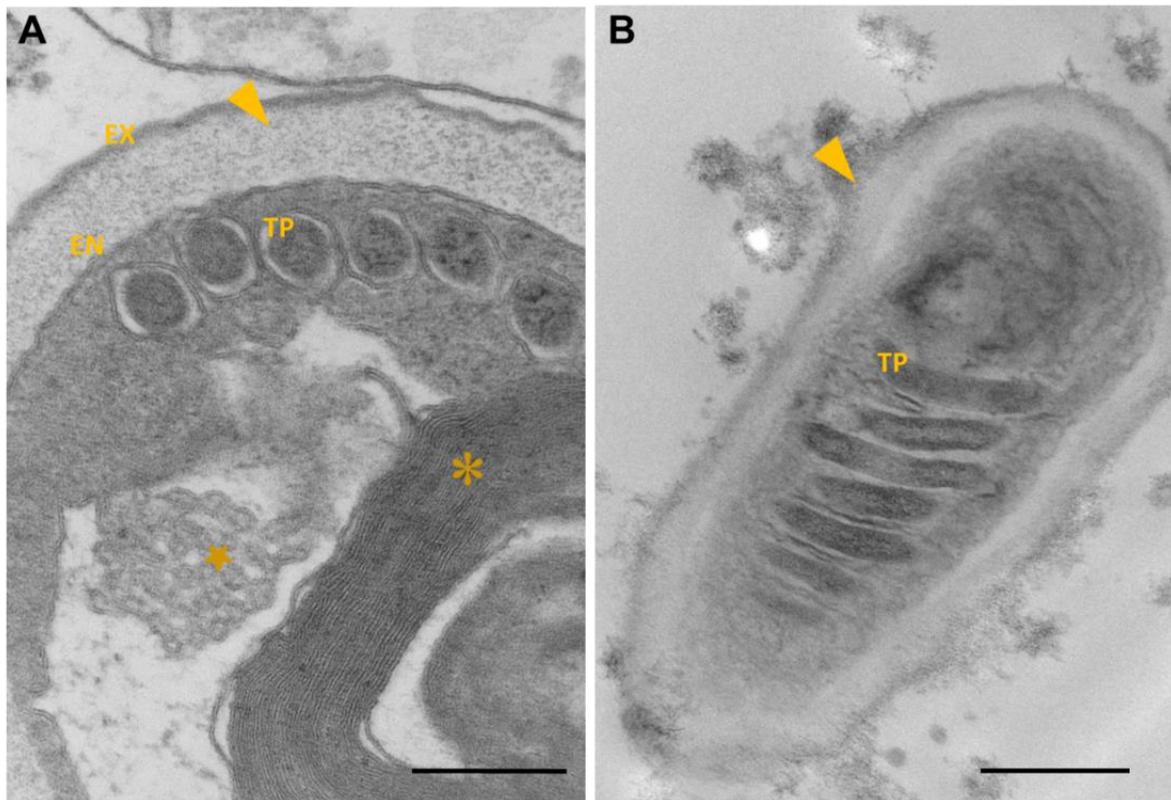


Figura 18 Ultraestrutura do esporo de *E. hellem* processados para MET com o uso do micro-ondas. A) As organelas citoplasmáticas estão bem preservadas e bem contrastadas. É possível observar as duas membranas com sua estrutura trilaminar típica (EN e EX). Um grande acúmulo de material granuloso é observado entre as duas membranas. É possível observar uma estrutura em forma de rede (estrela) e a estrutura laminar observada por outras técnicas, bem melhor preservada (asterisco); B) Corte longitudinal do esporo, mostrando o tubo polar (TP) e espessamento da parede (cabeça de seta). Barras de aumento A e B – 0,2 μm . Imagens obtidas no microscópio Zeiss EM 900.

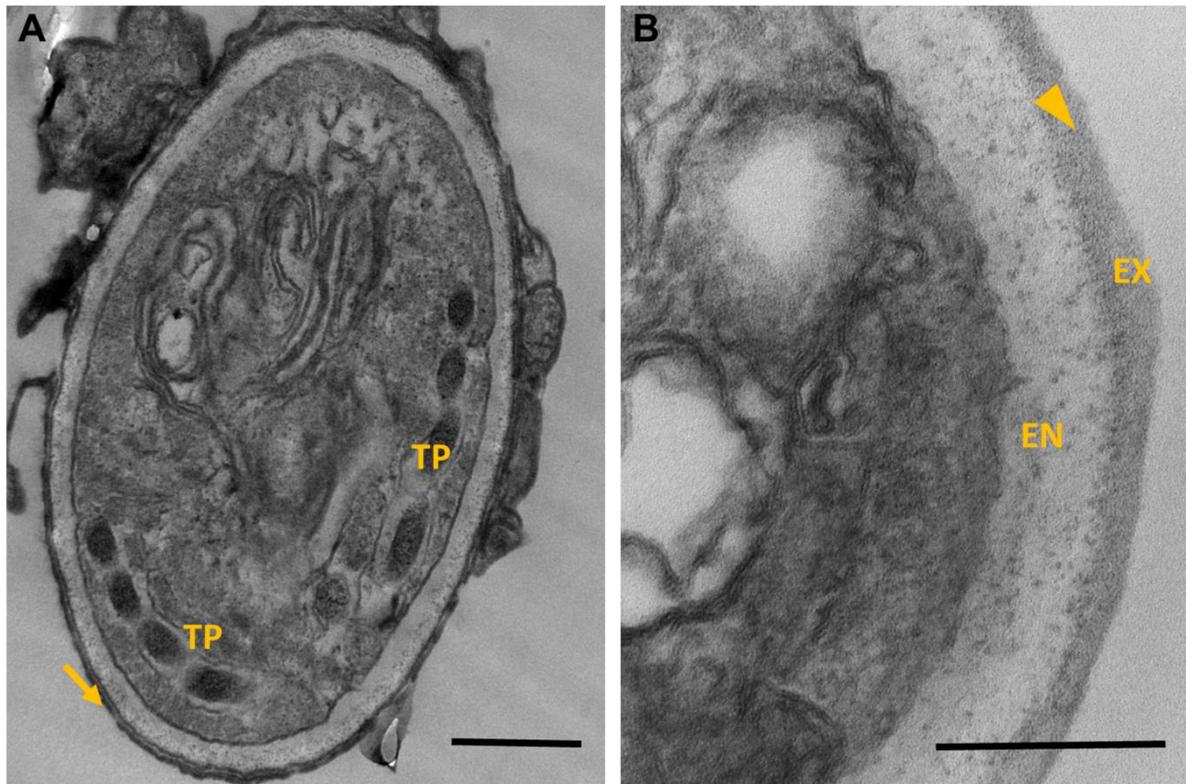


Figura 19: Aspecto das amostras processadas com o uso de radiação micro-ondas. A) Estruturas típicas do organismo, como o tubo polar (TP) podem ser observadas com clareza. É possível observar uma unidade de membrana circundando o exósporo (seta). B) Em maior aumento é possível observar o aspecto granuloso do endósporo (EN), assim como o depósito de material no exósporo (EX) nas faces interna e externa (cabeça de seta). Imagens obtidas no EM Zeiss 900, operando em 80Kv. Barras de aumento: A – 200nm; B – 100 nm.

5.6. Comparação entre os protocolos de preparo para microscopia de varredura

Duas variáveis foram comparadas no processamento das amostras para MEV: o ciclo de secagem pelo ponto crítico e a metalização. A secagem pelo ponto crítico foi realizada sob duas condições. Na primeira foram realizadas 15 substituições dos meios, com intervalo de 1 minuto entre eles. Na segunda condição, que chamamos ciclo longo de secagem, foram feitas 20 trocas, com um intervalo de 4 minutos entre elas.

A cobertura metálica foi feita usando o ouro e a platina, em espessuras aproximadas de 10nm. As amostras foram observadas no microscópio Zeiss EVO MA10 (convencional) e no Jeol JSM 6340F (alta resolução), ambos operando em 10Kv e distância de trabalho 10.

5.6.1. Ciclo de secagem curto e metalização por ouro – Por esse método conseguimos observar a superfície dos esporos deformada com depressões e irregularidades bem evidentes, em desacordo com o que foi observado por microscopia de transmissão, nas amostras processadas sob as melhores condições de preparo, ou seja, fixação pelo método FQ3 e inclusão em spurr (Figura 20). Em algumas células pudemos ressaltar o acúmulo de material na superfície que poderiam ser restos de células (Figura 20A). A formação de depressões e o aspecto amassado sugerem tempo insuficiente no processo de secagem pelo ponto crítico (Figura 20B). O aspecto irregular da superfície tanto pode ser pela ineficácia da secagem como pelo acúmulo de material na superfície do esporo.

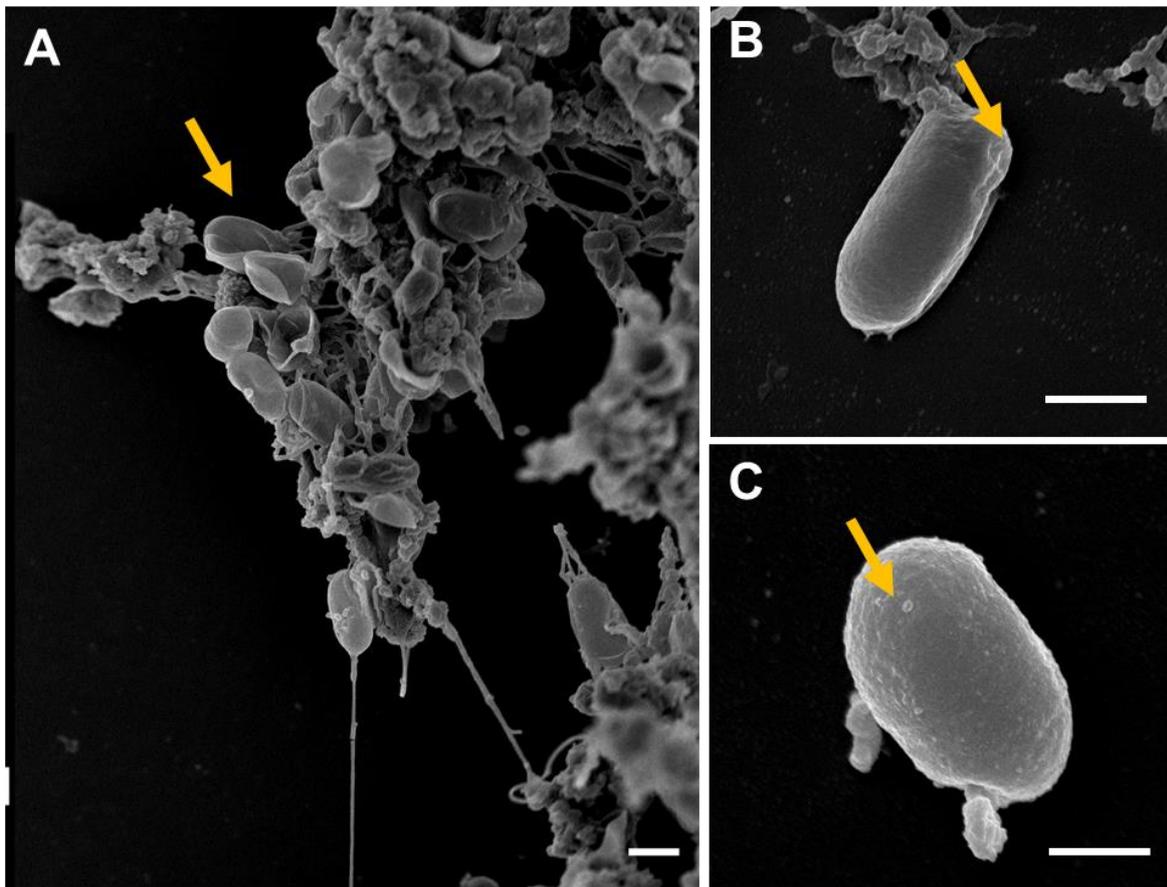


Figura 20: Amostras de *E. hellem* processadas para MEV, fixadas pela solução de Karnovsky e pós fixadas pelo OTO, submetidas ao ciclo curto de ponto crítico e metalizadas por ouro. A) É possível identificar profundas deformações na superfície dos esporos (setas); B) Em maior aumento, detalhe das deformações da parede celular (seta); C) O aspecto granuloso da superfície pode ser observado (cabeça de seta). Imagens obtidas ao MEV Zeiss EVO MA10, operando a 10Kv, e WD – 10. Barras de aumento – 1 μ m.

5.6.2. Ciclo de secagem longo e metalização por ouro – Por esse método de preparo, as amostras exibem um aspecto mais uniforme e menos deformado da superfície, coerente com o que foi observado por microscopia de transmissão (Figura 21). Em alguns esporos observamos a presença de manchas diminutas e regularmente distribuídas pela superfície da amostra (Figura 21C). Em outros esporos foi possível observar o aspecto áspero da superfície (Figura 21B). No entanto, o aspecto geral dos esporos e a forma cilíndrica se mostra regular e compatível com que se observa por microscopia óptica, nas culturas celulares e por microscopia de transmissão. É possível observar o tubo polar extruído (Figura 21C).

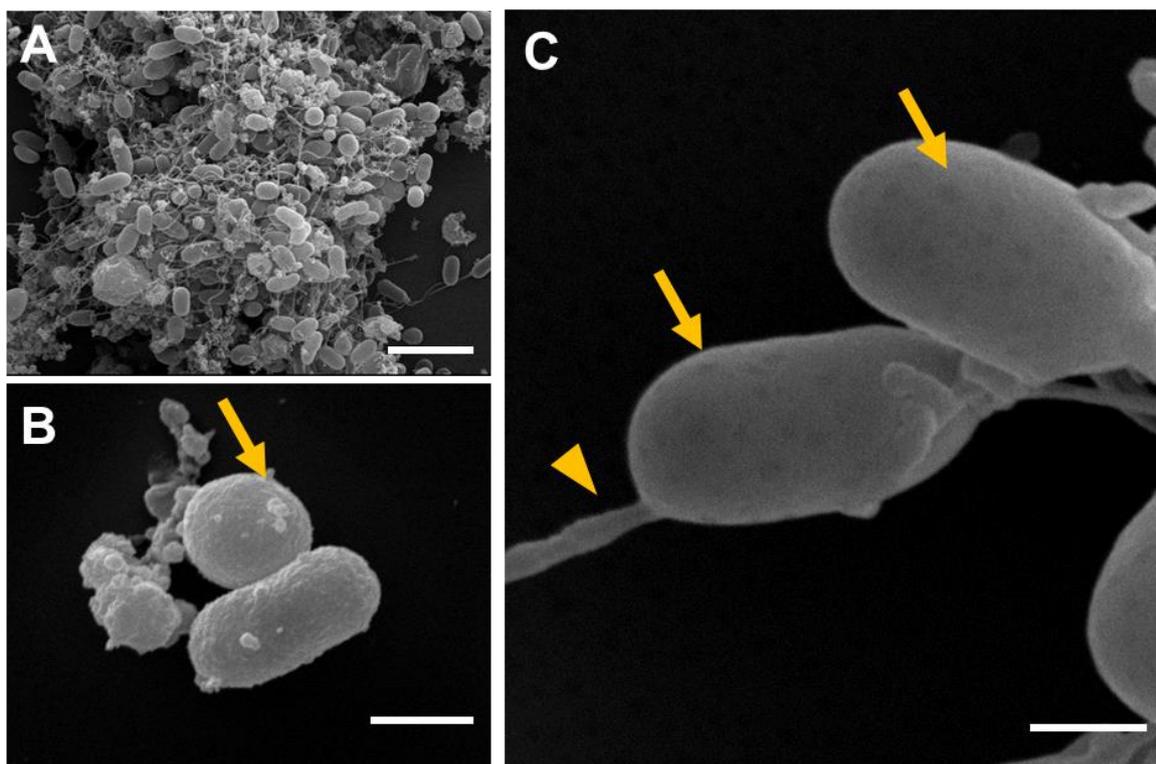


Figura 21: Amostras de *E. hellem* preparadas para MEV, fixadas pela solução de Karnovsky e pós fixadas pelo OTO, submetidas à secagem pelo ponto crítico em ciclo longo e metalizadas por ouro, com espessura aproximada de 10 nm. A) Célula hospedeira e esporos; B) O aspecto da superfície das células não parece deformado, mas ainda assim com aspecto granuloso, artefato típico causado pela metalização com ouro. C) Pode-se observar algumas pequenas manchas na superfície das células (setas). É possível observar a germinação do tubo polar (cabeça de seta). Barras de aumento A – 5 μm ; B – 1 μm e C – 0,5 μm . Imagens obtidas no microscópio de varredura convencional EVO MA 10 da Zeiss, WD – 10.

5.6.3. Ciclo de secagem curto e metalização por platina – Os esporos processados por esse método apresentaram a superfície lisa, porém com grandes deformações, sugerindo que o tempo de secagem foi insuficiente, causando o colapso das membranas envoltórias. A metalização pela platina proporciona a observação de uma superfície lisa e regular, livre das granulações observadas nas amostras metalizadas pelo ouro (Figura 22A, B, C e D).

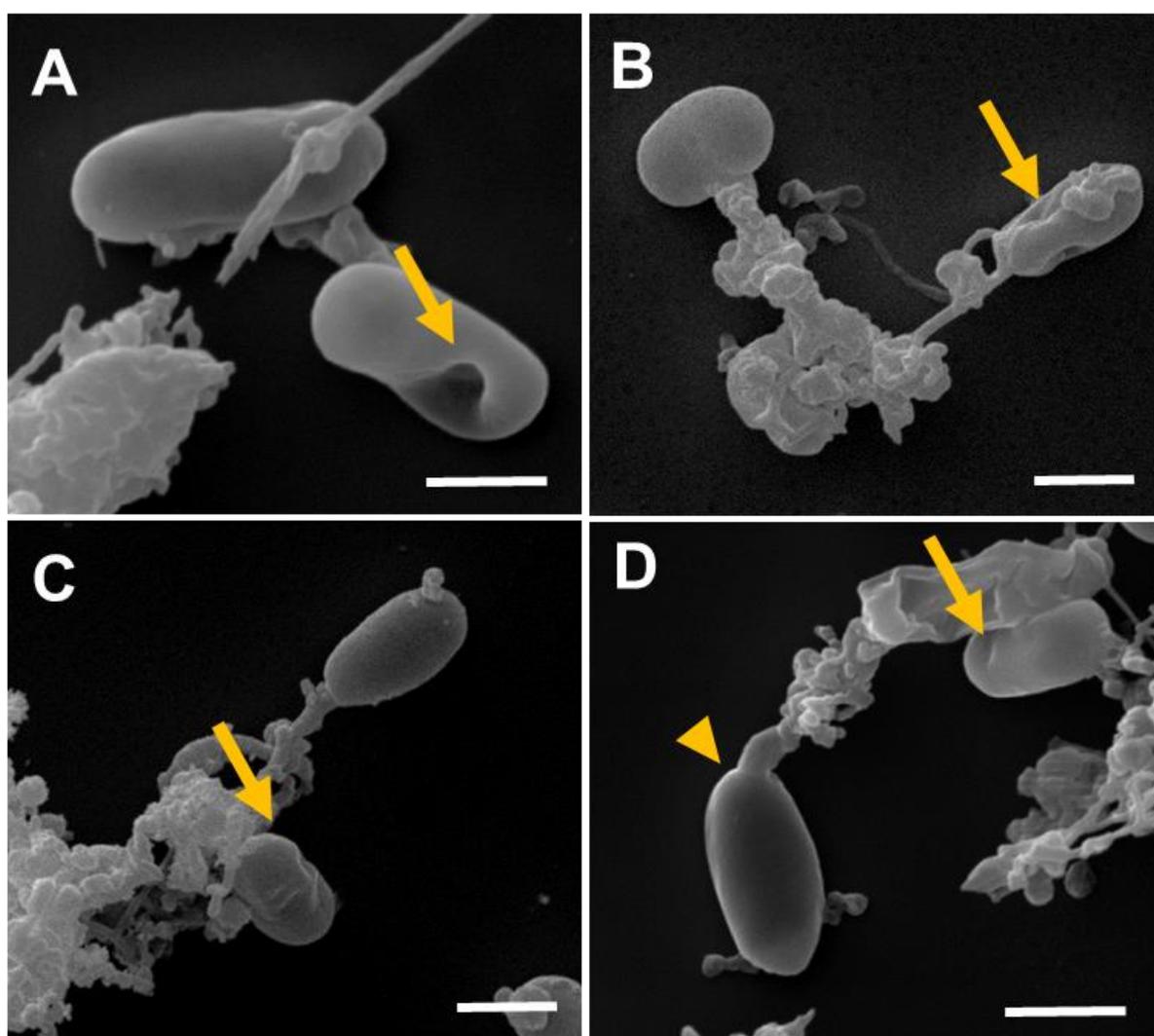


Figura 22: Amostras de *E. hellem* processadas para MEV, fixadas pela solução de Karnovsky e pós fixadas pelo OTO, submetidas ao ciclo curto de ponto crítico e metalizadas por platina. Em A, B e C observa-se a formação de depressões na superfície das amostras (setas); C) Pode-se observar que, embora ocorram depressões na superfície, a metalização pela platina revela uma superfície mais lisa (cabeça de seta). Imagens feitas no microscópio Zeiss EVO MA 10, operando em 10KV. WD – 10. Barras de aumento – 1 μ m.

5.6.4. Ciclo longo de secagem e metalização por platina – a associação dessas duas variáveis permitiu a obtenção dos melhores resultados nesse primeiro conjunto de experimentos para MEV (Figura 23). Tanto os esporos de *E. hellem* quanto a célula hospedeira HFF infectada (Figura 23A) mostraram-se com aspecto de boa preservação, sem deformações expressivas das superfícies. A textura da superfície dos esporos mostrou-se mais lisa e uniforme (Figuras 23B e 23C). Em maior aumento pudemos observar a possível cicatriz deixada pela extrusão do tubo polar (Figura 23C).

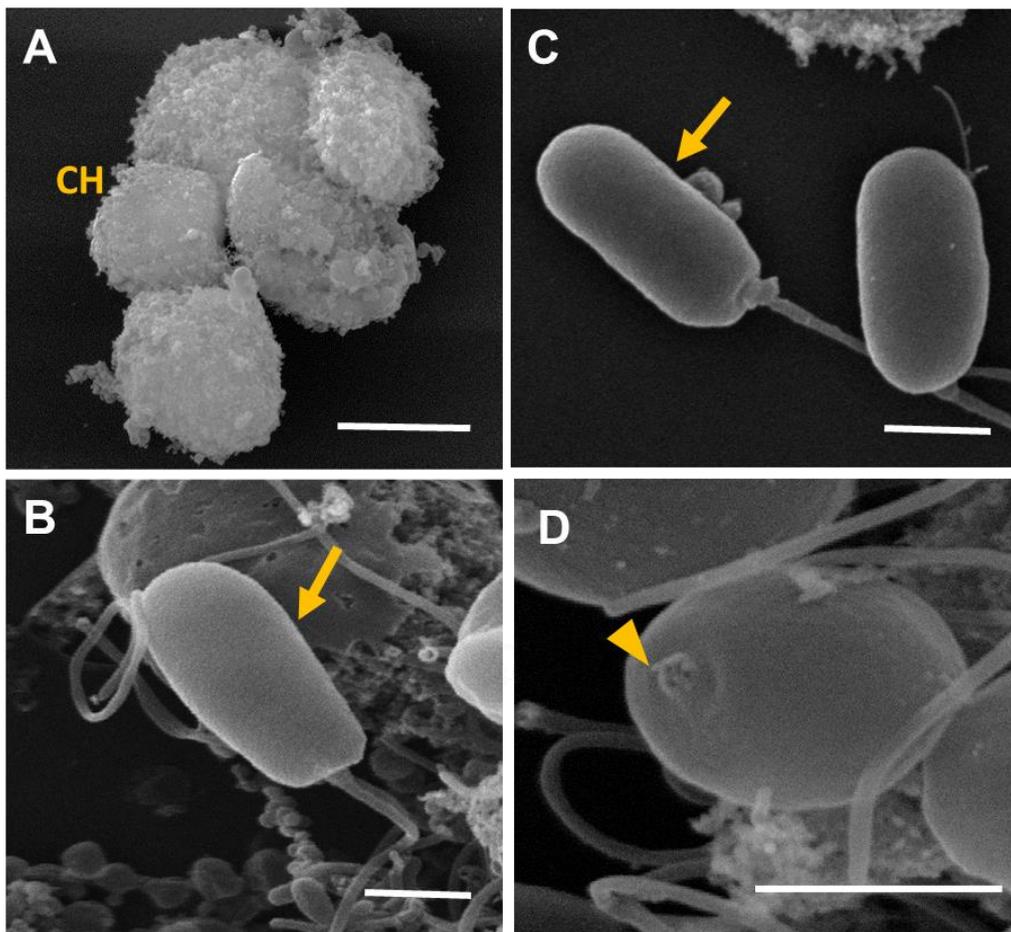


Figura 23: Amostras de *E. hellem* processadas para MEV, fixadas pela solução de Karnovsky e pós fixadas pelo OTO, submetidas ao ciclo longo de ponto crítico metalizadas por platina. A) Célula hospedeira + esporo início da infecção B e C) O aspecto da superfície das células é liso e sem deformações; D – É possível observar a possível cicatriz deixada pelo extrusão do corpo polar. Barras de aumento A – 5 μ m; B, C e D – 1 μ m. Imagens obtidas no microscópio de varredura EVO MA 10 da Zeiss, operando em 10Kv. WD – 10.

5.6.5. Ciclo curto de secagem e metalização por ouro – Observação ao microscópio de alta resolução Jeol JSM 6340F. Nessas condições pudemos notar as deformações presentes na superfície dos esporos de *E. hellem* (Figura 24). A célula hospedeira apresenta uma grande irregularidade na superfície, sugerindo a presença dos esporos interiorizados (Figura 24A). O esporo apresenta deformações e aspecto levemente granuloso da superfície, lembrando a irregularidade de uma casca de laranja (Figura 24B).

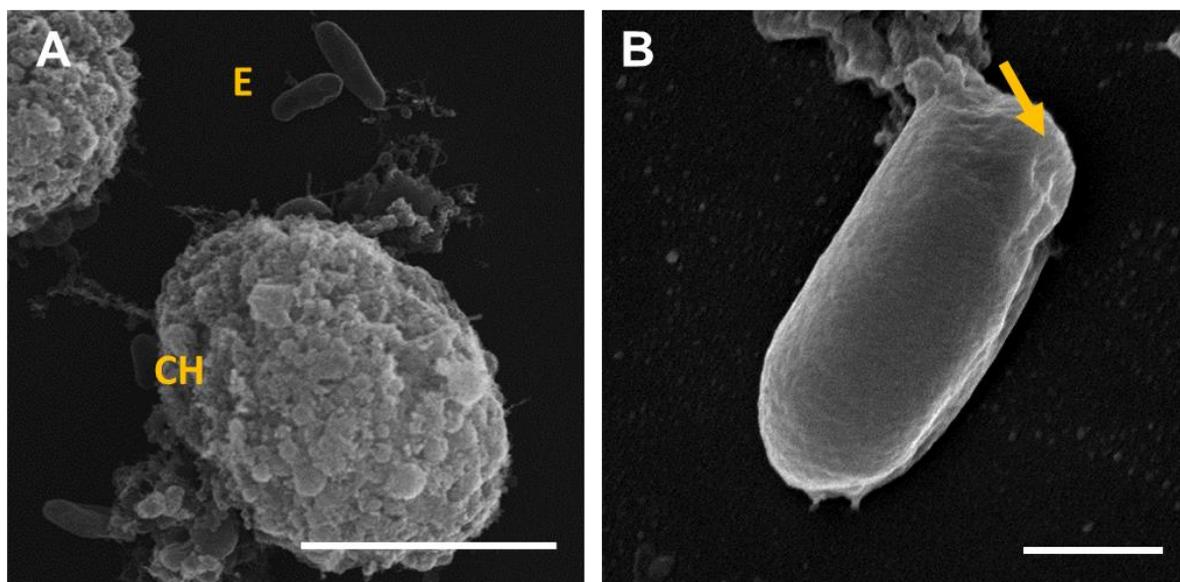


Figura 24: Amostras de *E. hellem* processadas para MEV, fixadas pela solução de Karnovsky e pós fixadas pelo OTO, submetidas à secagem pelo ciclo curto de ponto crítico e metalizadas por ouro. A) Esporos de *E. hellem* aderidos à restos da célula hospedeira danificada. Aspecto irregular da membrana da célula hospedeira sugere a presença de esporos interiorizados. B) As células apresentam aspecto não granuloso na superfície, mas apresentam profundas deformações (setas). Imagens obtidas ao microscópio de varredura de alta resolução Jeol JSM 6340, operando em 10Kv. WD – 10mm. Barras de aumento: A – 5 μ m; B – 1 μ m.

5.6.6. Ciclo longo de secagem e metalização por ouro – O aspecto do esporo mostrou-se regular e cilíndrico, como o que se observa por microscopia óptica, nas culturas e por microscopia de transmissão (Figura 25). Em grande aumento notamos o aspecto granuloso da superfície metalizada pelo ouro, nos remetendo ao aspecto irregular de casca de laranja (Figura 25A e 25B). É possível observar que esse método mostrou-se eficiente na preservação da conformação tridimensional do esporo, o que era esperado, uma vez que o envoltório espesso desse organismo demanda um processo mais lento, para eficaz penetração dos fluidos. A metalização pelo ouro gera depósitos de aspecto granular que pode encobrir detalhes finos da ultraestrutura da superfície (Figura 25C).

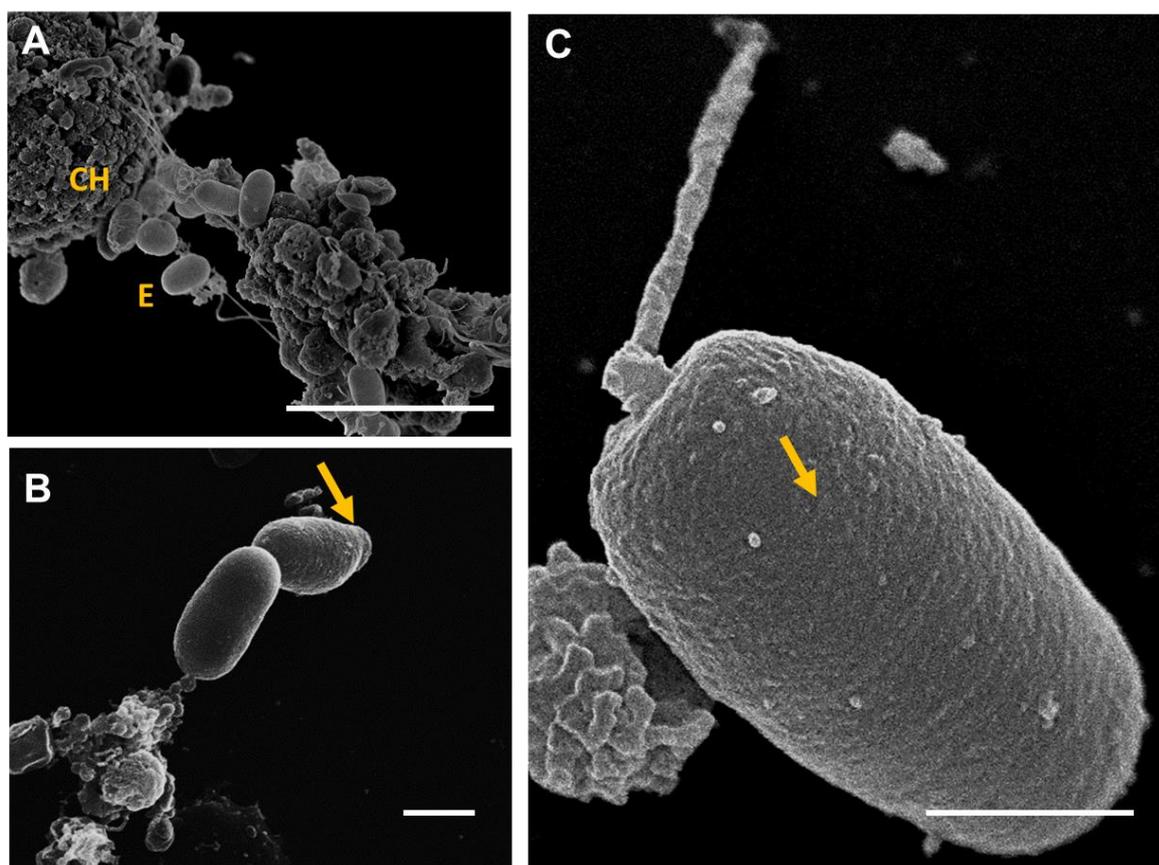


Figura 25: Amostras de *E. hellem* processadas para MEV, fixadas pela solução de Karnovsky e pós fixadas pelo OTO, submetidas à secagem pelo ciclo longo de ponto crítico e metalizadas por ouro com espessura aproximada de 10nm. A) Esporos de *E. hellem* aderidos à restos da célula hospedeira lisada; B) É possível observar o aspecto granuloso da superfície da célula. C) Não são observadas deformações da parede celular, mas é possível observar o aspecto extremamente granuloso da superfície. Imagens obtidas ao microscópio de varredura de alta resolução Jeol JSM 6340, operando em 10Kv. WD – 10. Barras de aumento A – 5 μ m; B e C – 1 μ m.

5.6.7. Ciclo curto de secagem e metalização por platina – As amostras apresentaram grandes deformações na superfície. No entanto, a superfície não exibe o aspecto granuloso, observados nas amostras metalizadas por ouro (Figura 26). Esse resultado corrobora os anteriores, através dos quais se constata a ineficácia do ciclo curto de secagem. A metalização pela platina revela uma superfície lisa e regular (Figura 26B).

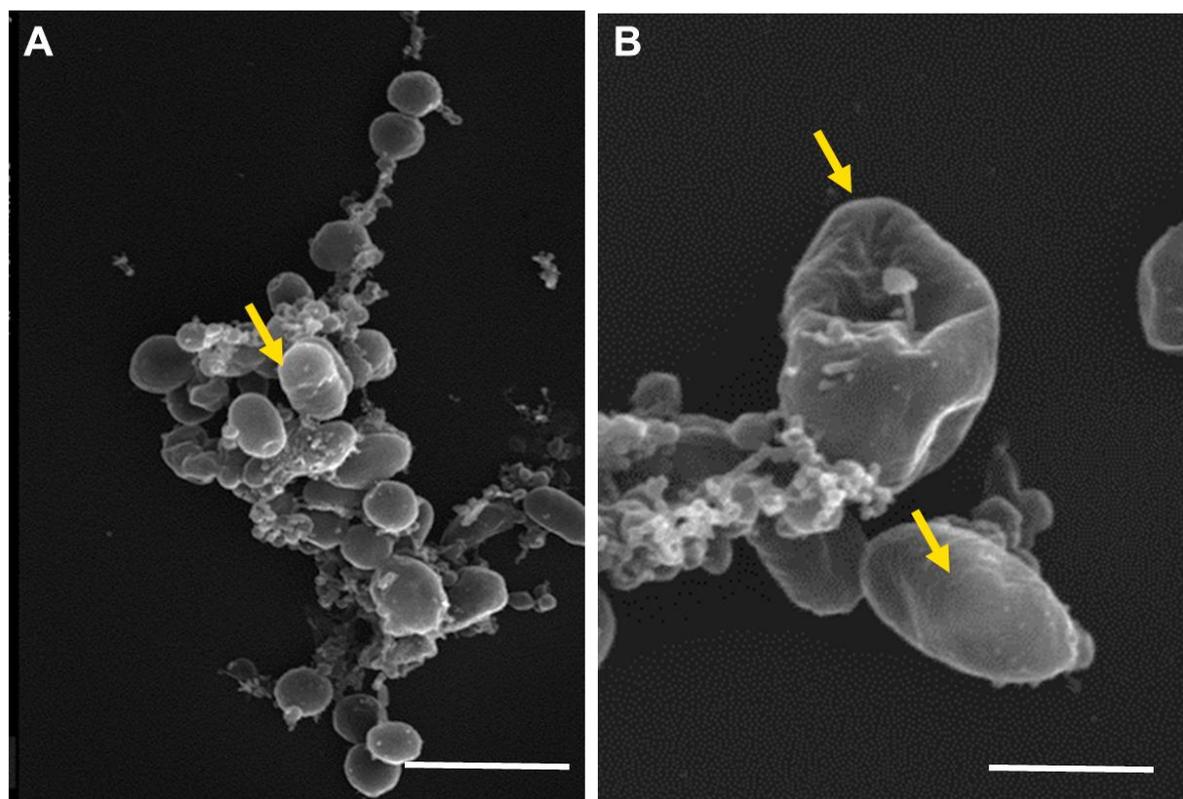


Figura 26: Amostras de *E. hellem* processadas para MEV, fixadas pela solução de Karnovsky e pós fixadas pelo OTO, submetidas à secagem pelo ciclo curto de ponto crítico e metalizadas por platina, com espessura aproximada de 10 nm. A) Esporos de *E. hellem* aderidos à restos da célula hospedeira lisada; B) As células apresentam aspecto não granuloso na superfície, mas apresentam profundas deformações (setas). Imagens obtidas ao microscópio de varredura de alta resolução Jeol JSM 6340, operando em 10Kv. WD – 10. Barras de aumento: A – 5 μ m; B – 1 μ m.

5.6.8. Ciclo longo de secagem e metalização por platina – Observamos os esporos com forma cilíndrica e dimensões proporcionais entre o diâmetro e o comprimento, coerente com o que se observa por microscopia de transmissão (1-2 μ m de diâmetro e, aproximadamente o dobro de comprimento). Observamos o volume celular preservado e conformação tridimensional compatível com a observação dos esporos *in vivo*, por microscopia óptica. Observamos com clareza a interação do parasita com a célula hospedeira (Figura 27A). As amostras fixadas 72 horas de infecção revelaram um emaranhado de filamentos na superfície da célula hospedeira, cuja procedência não se pode saber ao certo, podendo ser de origem do parasita ou da célula hospedeira. A elucidação dessa questão demanda estudos mais profundos (Figura 27B). Observamos em grande aumento o que deve ser a cicatriz deixada pelo tubo polar, após sua extrusão. Essa imagem também foi observada por microscopia convencional, nas mesmas condições de secagem e metalização. Pequenos grumos foram observados na superfície do esporo, sobre um fundo bem liso e uniforme, que pode ser restos de células aderidos. Esse é um dado que precisa de estudos mais acurados (Figura 27C). As imagens indicam que esse conjunto de condições são as ideais para o estudo da ultraestrutura de *E. hellem* por microscopia de varredura.

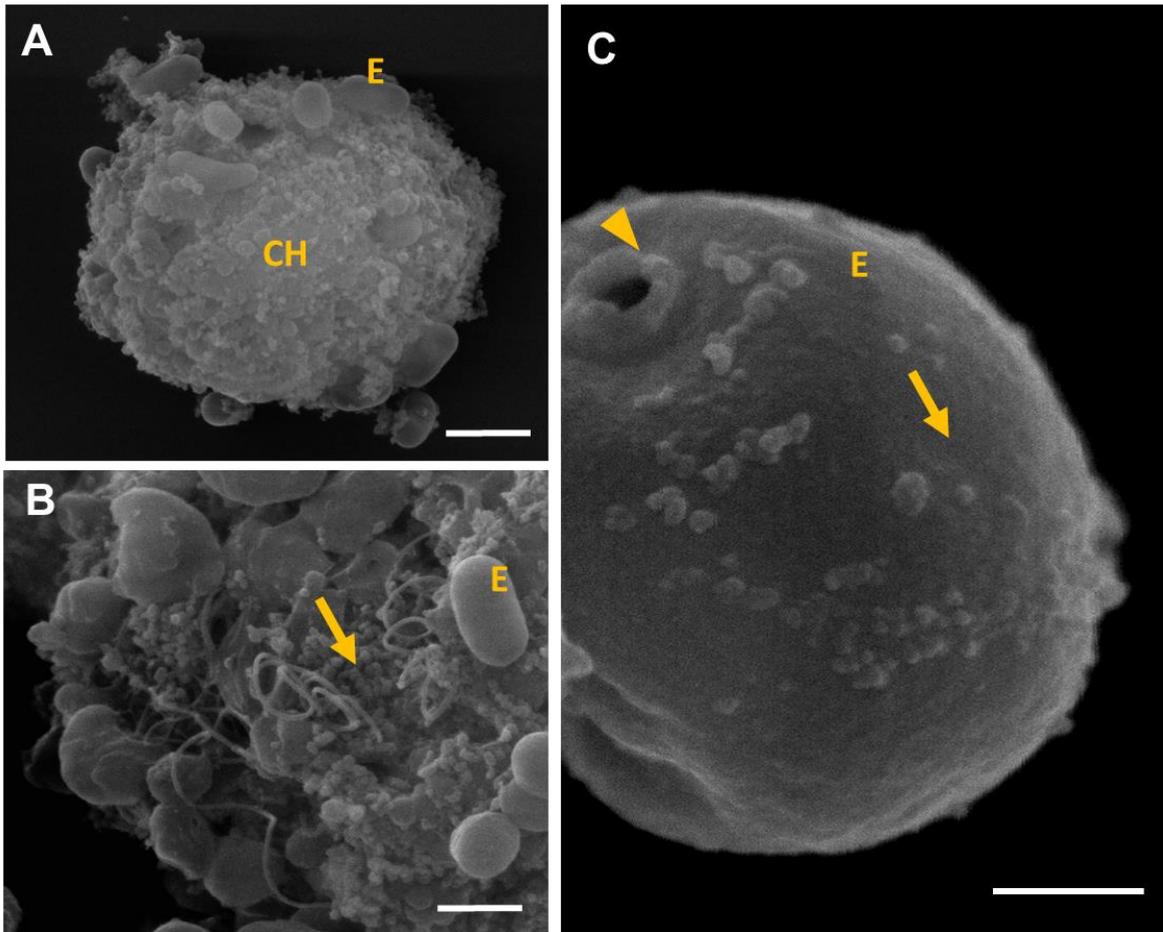


Figura 27: Amostras de *E. hellem* processadas para MEV, fixadas pela solução de Karnovsky e pós fixadas pelo OTO, submetidas à secagem pelo ciclo longo de ponto crítico, metalizadas por platina, com espessura aproximada de 10nm. A) Célula hospedeira HFF + esporo com 48 horas de infecção. É possível observar os esporos (E) em contato com a membrana da célula hospedeira (CH). B) Observa-se filamentos em contato com a membrana da célula hospedeira, possivelmente emissões do tubo polar (seta); C) Em grande aumento é possível ver pequenos grânulos aderidos à superfície externa do esporo. Barras de aumento A – 2 μ m; B – 1 μ m; C – 0,2 μ m. Imagens obtidas ao microscópio de varredura de alta resolução Jeol JSM 6340F, WD – 10.

6. Discussão

Microsporídios constituem um interessante grupo de organismos tanto do ponto de vista médico como do ponto de vista evolutivo. São eucariotos formadores de esporo, desprovidos de organelas típicas dos demais eucariotos, como mitocôndria e complexo de Golgi (WEISS, 2001). Duas características qualificam um organismo como microsporídio e unifica o Filo: o fato de só existirem fora da célula como esporos (parasitas intracelulares obrigatórios) e um mecanismo único de invasão da célula hospedeira, pela extrusão do tubo polar, uma organela típica do grupo (BIGLIARD E SACCHI, 2001). Um esporo maduro apresenta dimensões diminutas, que variam de 2-7 μm de comprimento por 1,5-5 μm de diâmetro; Em contato com a célula hospedeira, o parasita a invade, de forma extremamente rápida e eficaz (menos de 2s, em observações *in vitro*). Esse mecanismo de invasão celular não é bem conhecido. Até pouco tempo acreditava-se que a membrana da célula hospedeira fosse puncionada pelo tubo polar e o material infectivo, o esporoplasma, fosse injetado diretamente em seu citoplasma. No entanto, estudos recentes sugerem que a penetração do parasita na célula hospedeira possa ocorrer por processos endocíticos (GILL E FAST, 2006).

Assim como os fungos, os microsporídios têm uma parede celular bastante complexa (BIGLIARD E SACCHI, 2001), motivo pelo qual nem sempre as técnicas convencionais de preparo de amostra para microscopia eletrônica geram os melhores resultados. Por apresentar um mecanismo de invasão celular bastante peculiar e extremamente rápido, uma parede celular e um citoplasma bastante complexos, é necessário que se estabeleça um método eficaz de preservação e observação dessas estruturas e eventos. Por isso, nesse trabalho avaliamos as técnicas consagradas de preparo de amostras biológicas para ME e padronizamos um protocolo que atende à demanda desse micro-organismo. Pudemos observar estruturas típicas do organismo, por microscopia eletrônica de transmissão e varredura, melhor evidenciadas pelo uso conjunto de técnicas determinadas, indicando o melhor método a ser aplicado no estudo da ultraestrutura dos microsporídios, a fim de que, conhecendo o organismo e o seu mecanismo de invasão celular se possa traçar estratégias de controle do parasita.

No processo de fixação de um sistema biológico o objetivo é estabilizar as estruturas celulares tão fiéis quanto possível à situação *in vivo*. A condição ideal de

fixação é aquela em que a morfologia e as relações topológicas das biomoléculas sejam bem preservadas, assim como a fase aquosa e seus respectivos solutos (HAYAt, 1970).

Nesse trabalho, a fixação química pelo método padrão (**FQ1**) permitiu a observação de estruturas intracitoplasmáticas da célula hospedeira e dos esporos do *E. hellem* bem preservadas, pois o aldeído glutárico ou glutaraldeído é um fixador não coagulante, cujo sítio preferencial de reatividade é o grupamento amino da cadeia lateral dos polipeptídios, devido à presença de lisina (BOZZOLA E RUSSEL 1992). Essas ligações cruzadas com componentes estruturais das moléculas biológicas faz com que esse fixador seja incorporado às amostras, motivo pelo qual é classificado como um fixador aditivo (BOZZOLA E RUSSEL, 1992). Numa amostra biológica fixada por glutaraldeído estruturas proteicas são bem preservadas. Assim, organelas membranosas, tanto do parasita quanto de sua célula hospedeira apresentaram-se com aspecto típico. Foi possível identificar, na célula hospedeira, estruturas comuns nos eucariotos, como mitocôndrias, complexo de Golgi, retículo endoplasmático e núcleo, todos com aspecto típico, bem preservado. No esporo observamos estruturas descritas em outros representantes do grupo, como o tubo polar, o polaroplasto, vacúolo e núcleo, todos bem preservados; a organização polarizada das estruturas citoplasmáticas do esporo (BIGLIARD *et al.*, 1999) também pode ser observada. Não identificamos o disco de ancoragem nessas amostras. Essa estrutura é bem descrita na literatura (VÀVRA, 1972) e o fato de não a termos observado, pode gerar um questionamento sobre a eficiência do método para essa organela.

Neste trabalho, não observamos diferenças marcantes entre as amostras fixadas pelo método padrão e a fixação de Karnovsky (**FQ2**), que associa o uso do glutaraldeído ao formaldeído. Assim como o glutaraldeído, o formaldeído também é um fixador não coagulante, no entanto, sua ação pode ser revertida, pois por ser um monoaldeído, é menos eficiente em formar ligações cruzadas com as proteínas (SESSO, 2011). Além disso, cerca de 11 a 16% de sua composição é metanol, que extrai e coagula grande parte dos componentes citosólicos. No entanto, o formaldeído penetra mais rapidamente nos tecidos que o glutaraldeído, além de preservar melhor as atividades antigênicas e enzimáticas das amostras. O preparo do formaldeído a partir de sua forma polimérica, o paraformaldeído, e seu uso

imediatamente previne a formação de metanol, melhorando sua atuação como fixador (SESSO, 2011). O princípio da fixação pela solução de Karnovsky (KARNOVSKY, 1965) é que o formaldeído penetra cerca de 5 a 10 vezes mais rapidamente nos tecidos e estabiliza temporariamente estruturas que serão, em seguida, permanentemente fixadas pelo glutaraldeído. As amostras fixadas por esse protocolo apresentaram-se tão bem preservadas quanto as anteriores. Em alguns cortes foi possível observar a presença de vacúolo parasitóforo, repletos de parasitas, em diferentes estágios de desenvolvimento. Em corte transversal observamos membranas concêntricas em torno do tubo polar, como descrito para outros membros do filo, em trabalhos anteriores (WEISS, 2003). A presença de um número variável de voltas do tubo polar, observada em diferentes cortes dos esporos corrobora os dados da literatura, que indicam que no gênero *Encephalitozoon* esse número pode variar entre 6 e 11 (VÀVRA, 1999). No entanto, nas amostras analisadas em nosso trabalho nunca observamos mais que 7 voltas. Em todos os cortes que observamos também pudemos notar a presença de apenas um núcleo. Como a fixação pelo método de Karnovsky proporciona maior rapidez e, como não notamos diferenças significativas entre os dois métodos analisados, sugerimos que a fixação primária dos esporos de *E. hellem* seja feita por esse meio, acarretando ganhos na velocidade de fixação e na preservação de sítios antigênicos e enzimáticos.

O tetróxido de ósmio tem sido utilizado como fixador em ME desde o começo do século XX, por Palade (PALADE, 1952). Sua atuação é comprovada sobre os componentes lipídicos das amostras biológicas, particularmente fosfolipídeos constituintes das membranas, estabilizando essas estruturas e contrastando-as, pela formação de ésteres de ósmio instáveis que se decompõem e se depositam sob a forma de óxidos ou hidróxidos de ósmio (KORN, 1967). Amostras tratadas pelo ósmio apresentam membranas e estruturas lipídicas bem preservadas.

No presente trabalho, nas amostras pós fixadas pela técnica do OTO (**FQ3**), que alterna o ósmio com um mordente, potencializando sua ação, pudemos identificar membranas bem realçadas na célula hospedeira, mas especialmente nos esporos, onde pudemos observar o citoplasma rico em detalhes: identificamos o tubo polar, em torno do qual pudemos observar uma série de membranas concêntricas; identificamos o polaroplasto, uma estrutura membranosa bem

realçada por esse método; notamos grandes estruturas eletrondensas, não observadas anteriormente. Como uma das principais características do tetróxido de ósmio é a preservação de lipídios, a presença dessas estruturas sugere inclusões lipídicas, presentes no citoplasma do esporo. Nas amostras que receberam esse tratamento pudemos observar uma estrutura em forma de rede, típica desse grupo, não observada ou observada de forma pouco clara pelos outros métodos de fixação. Bigliardi afirma que essa estrutura em forma de rede, é provavelmente um resíduo do aparelho de Golgi e está implicada, no sofisticado processo de morfogênese do tubo polar e que, quando ela surge, dentro de um vacúolo, como o que observamos em nosso trabalho, é indicativo do início da germinação do esporo (BIGLIARD E SACCHI, 2001), evidências corroboradas por nossos resultados de MEV. O envoltório dos microsporídios tem sido relatado como uma estrutura complexa (STENTIFORD et al., 2016), sendo o exósporo formado por camadas. Nas amostras pós fixadas pelo OTO, pudemos observar a formação dessas camadas o que levanta a questão da constituição dessas camadas ser de natureza lipídica. Microsporídios são eucariotos desprovidos de mitocôndria, embora proteínas Hsp 70 tenham sido encontradas em representantes do filo (GILL E FAST, 2006). Nesse trabalho não identificamos mitocôndrias típicas, ratificando dados da literatura.

Sabe-se que a fixação química pode alterar drasticamente a morfologia celular e os processos de desidratação e sucessivas lavagens podem extrair importantes moléculas das amostras, como demonstrado por Girard e colaboradores (GIRARD-DIAS *et al*, 2012). A solução para tais problemas tem sido a utilização das criotécnicas, que associam a baixa temperatura, para imobilização das moléculas biológicas à uma alta taxa de congelamento ou ao uso de crioprotetores, que previnem a formação de artefatos (BENCHIMOL *et al*, 2011). Há algumas décadas as criotécnicas vêm sendo a ferramenta de escolha para aqueles que querem manter a maior fidelidade possível à situação da célula *in vivo*. Nos últimos trinta anos a fixação de material biológico por métodos físicos de congelamento rápido e ultrarrápido vem ganhando espaço cada vez maior, entre os estudiosos que querem manter maior fidelidade à realidade das amostras *in vivo* (GIRARD-DIAS *et al*, 2012).

Em nosso trabalho, utilizamos duas técnicas de congelamento ou criotécnicas, mas, a despeito de todas as vantagens da fixação por esses métodos sobre as técnicas de fixação química, ambos os protocolos utilizados demonstraram resultados de qualidade inferior àqueles em que foram utilizados os métodos químicos. A fixação por HPF foi realizada por duas diferentes metodologias: congelamento nos capilares – previne a perda das amostras quando de sua manipulação após o congelamento, etapa que é feita no nitrogênio líquido e que exige muita habilidade. A desvantagem é ter um material em torno das amostras, o que pode dificultar a busca ao microscópio eletrônico; a – o congelamento nas moedas, que é mais trabalhoso no momento da manipulação pós congelamento, mas garante um bloco final com 100% de amostra (GIRARD-DIAS *et al*, 2012). A vantagem dessa técnica é a de manter as características da amostra o mais próximo possível do seu estado *in vivo*, uma vez que não serão utilizados fixadores químicos, além de propiciar um bom congelamento em uma superfície maior que todas as demais. Na observação ao microscópio eletrônico, encontramos poucas células com aspecto de boa preservação em amostras fixadas pelos dois métodos, tornando esse dado não confiável por sua inexpressividade. As amostras processadas para crioultramicrotomia, sofreram uma fixação química suave prévia e foram crioprotetidas por sacarose. A observação ao ME não revelou resultados diferentes daqueles obtidos por HPF. Encontramos poucas células preservadas. A grande maioria sofreu algum tipo de rompimento ou extração. Isso provavelmente ocorreu pela presença de um envoltório denso, que impediu que o congelamento das amostras ocorresse de modo homogêneo. Concluimos, então, que os protocolos de criopreservação utilizados não foram bons para o modelo, demandando adaptações, que não foram possíveis nesse trabalho, por falta de tempo hábil.

A maior parte das células conhecidas é espessa ao feixe de elétrons, ou seja, são eletrondensas. Para observação ao microscópio eletrônico é necessário que as células sejam seccionadas em cortes ultrafinos, que permitam serem atravessados pelo feixe eletrônico. A inclusão do material biológico em resinas plásticas tem o papel de conferir a consistência necessária ao seccionamento. No presente trabalho, duas resinas plásticas foram testadas: o epon, uma mistura de componentes, cujas proporções podem ser alteradas, gerando blocos mais ou menos duros (LUFT, 1961). Apresenta alta viscosidade, o que leva a penetração

mais lenta nas amostras; o spurr (SPURR, 1969), menos viscoso que o epon e que por isso, penetra com mais facilidade em amostras mais compactas, como vegetais, fungos e helmintos, portadores de parede e/ou cutícula.

Neste estudo, a comparação entre as duas resinas revelou que as amostras infiltradas pelo epon geraram resultados insatisfatórios. Mesmo com tempo mais longo que o usual em cada etapa da infiltração, os esporos apresentaram-se mal infiltrados. Notamos muitos espaços vazios no citoplasma dos parasitas, assim como grandes lacunas entre a amostra e a resina. Sob o feixe eletrônico os esporos se soltavam facilmente da resina, formando grandes espaços e impossibilitando a observação. Mesmo antes da observação ao ME, foi possível observar que as amostras se soltavam facilmente da resina, durante a ultramicrotomia, dificultando o recolhimento dos cortes. Outro aspecto observado nessas amostras foi a grande eletondensidade do citoplasma dos esporos, o que dificultou a observação dos mesmos. Amostras submetidas à infiltração e inclusão pelo spurr mostraram um aspecto mais homogêneo entre a resina e as células. Uma das desvantagens do do spurr em relação ao epon é sua menor aceitação dos agentes contrastantes. No entanto, em nosso trabalho pudemos notar que o contraste das células também se mostrou de qualidade superior à obtida com o epon, realçando estruturas intracitoplasmáticas do parasita e permitindo inferir informações relevantes. Esses resultados corroboram dados bibliográficos, e comprovam a melhor penetrabilidade do spurr em organismos portadores de envoltórios densos, como células vegetais, vermes e fungos (OLIVEIRA *et al*, 1983).

Ao observarmos as amostras aos microscópios eletrônicos, notamos que os cortes realizados nas espessuras preconizadas pelas técnicas convencionais (70-90nm) não nos permitiam uma observação adequada das estruturas intracitoplasmáticas do parasita. Pudemos observar que cortes ultrafinos, de espessura igual ou superior a 70nm se mostravam extremamente espessos e hipercontrastados. Desse modo, passamos a realizar cortes ainda mais finos, na tentativa de obter uma espessura ideal para observação do conteúdo celular, ao mesmo tempo em que variamos o período de incubação no acetato de uranila. Observamos que os cortes feitos com espessura de 75nm, submetidos aos três protocolos de contrastação (C1, C2 e C3), mostraram-se espessos ao feixe eletrônico, não permitindo que examinássemos o conteúdo intracitoplasmático dos

esporos, sinalizando que a espessura do corte é mais crucial na definição das estruturas do que o tempo de incubação na uranila. Cortes realizados com 65nm, quando corados pelo protocolo C1 não exibiram diferenças significativas em relação aos cortes de 75nm. Cortes de 65nm contrastados pelo protocolo C2 exibiam discreta vantagem sobre os cortes de mesma espessura contrastados pelo método C1 e sobre os cortes de 75nm contrastados pelo método C2, demonstrando que a combinação da redução na espessura do corte e do tempo de incubação pela uranila permitem um ganho maior de informações sobre a célula. Amostras cortadas com espessura de 65nm e contrastadas pelo protocolo C3 foram as que exibiram melhores resultados, permitindo a observação com clareza das estruturas intracitoplasmáticas do esporo e revelando que a associação da espessura mais delgada e um tempo menor de incubação pela uranila são as melhores condições de observação para essas amostras. Amostras seccionadas com 55nm de espessura, contrastadas pelos 3 protocolos (C1, C2 e C3) revelaram bons resultados para observação do esporo, no entanto, tais cortes se revelaram frágeis sob o feixe eletrônico, rompendo-se com facilidade.

No presente trabalho, utilizamos o aparelho de micro-ondas a fim de avaliar a interferência da velocidade de penetração dos fluidos utilizados no preparo das amostras nos resultados obtidos. Um dos fatores mais importantes no processamento de uma amostra biológica para microscopia eletrônica é o tempo de penetração dos reagentes nas estruturas. A incidência de micro-ondas sobre as moléculas aumenta sua energia cinética, acelerando os processos de difusão de fixadores e demais fluidos utilizados no preparo de amostras para MET (BENCHIMOL *et al.*, 1993).

Obtivemos ótimos resultados com a utilização do micro-ondas. Pudemos identificar organelas celulares típicas, com grande clareza. A obtenção de imagens informativas com uso do micro-ondas, em tempo bem menor que o empregado no preparo pelos métodos convencionais, corroboram o uso do equipamento na otimização da técnica, também para os microsporídios. Organelas membranosas mostraram excelente preservação. O contraste das membranas muito realçado, permitiu a visualização de várias estruturas, antes não observadas, com tanta clareza. Foi possível observar a presença de uma maior quantidade de unidades de membrana no polaroplasto do que a se observou pelas demais técnicas; o

espaço compreendido entre o endósporo e o exósporo mostrou-se mais preenchido e com aspecto granular mais evidente. A excelente preservação dos envoltórios sugere que a velocidade de penetração dos fluidos é crucial para preservação dessa estrutura. Um grande depósito de material nas faces interna e externa do exósporo foi melhor evidenciada com o uso do micro-ondas. Tais resultados nos levam a concluir que, a associação de resinas menos viscosas e a rapidez de penetração dos fluidos otimiza sensivelmente a obtenção de informações relevantes sobre esses organismos.

A microscopia de varredura é uma ferramenta de grande valia nas investigações biológicas, preenchendo um considerável espaço entre a microscopia de luz e a microscopia eletrônica de transmissão. O feixe de elétrons colimados age como uma sonda, que se desloca sobre a amostra, gerando sinais que serão captados e formarão imagens tridimensionais com notável profundidade de foco (BOZZOLA E RUSSEL, 1992). A microscopia de varredura convencional utiliza microscópios que funcionam sob alto vácuo. O preparo das amostras prevê a secagem pelo ponto crítico (Anderson, 1951) e cobertura metálica, para melhora da condutibilidade elétrica das amostras biológicas (HERMAN E MILLER, 1992).

Neste trabalho, comparamos dois ciclos de ponto crítico, que consideramos longo e curto e dois tipos de metalização, a fim de identificar o conjunto de técnicas, que, associados, melhores resultados trazem no estudo da superfície dos esporos de *E. hellem* e sua interação com a célula hospedeira.

A secagem final da amostra para observação no MEV é feita sob condições tais que por ela não passe um menisco de transição de fases evitando as forças resultantes da tensão superficial (SILVEIRA, 2011). Esse processo é denominado ponto crítico, geralmente utilizando-se CO₂ como agente de troca. Sabe-se que para cada fluido, existe uma condição de temperatura e pressão característica, em que as fases líquida e gasosa não podem coexistir. Esta combinação corresponde ao ponto crítico do fluido. Para se fazer a secagem das amostras pelo ponto crítico do CO₂ leva-se a amostra já fixada e completamente desidratada, à câmara de CPD, em um pequeno volume do agente desidratante que deve ser miscível em água e em CO₂ líquido. Em geral, os solventes usados são o etanol ou a acetona. Com a câmara isolada e pressurizada injeta-se o CO₂ líquido, fazendo-se várias substituições até remoção total do agente desidratante. Segue-se o aquecimento

controlado da câmara. O CO₂ torna-se gasoso a 31,1°C e 73atm, sem que se forme o menisco de transição e sem que exista a modificação na estrutura do material biológico (ANDERSON, 1951).

Em nosso trabalho, as amostras que foram submetidas a secagem pelo ponto crítico em ciclo curto, no qual foram realizadas 15 trocas num intervalo médio de tempo (de acordo com parâmetros do equipamento EM CPD 300), apresentaram grandes deformações na superfície. As amostras submetidas ao ciclo de 20 trocas, considerado por nós como ciclo longo, no qual os intervalos de troca foram mais extensos, também de acordo como equipamento usado, não apresentaram deformações. Como demonstrado por Araújo e colaboradores, a boa preservação da morfologia externa dos fungos, observada por MEV tem implicação direta com o tempo de secagem pelo ponto crítico (ARAUJO *et al.*, 2015). Semelhanças entre a parede de fungos e de microsporídios foi relatada por Prigneau e colaboradores. Nossos resultados são compatíveis com esses dados.

O espécime seco precisa ser montado de modo adequado no suporte, que será levado ao MEV. Nesse processo, vários tipos de adesivos podem ser usados, sendo os mais comuns a cola de prata coloidal e a fita adesiva de carbono de dupla face. A escolha dependerá das características da amostra. Depois da montagem o próximo passo é a cobertura da amostra com metal. Este passo visa prover ou aumentar a condutividade da superfície da amostra através de uma fina camada de material condutor (ouro, cromo, platina, carbono). O processo mais eficaz de deposição é através de um sistema de evaporação conhecido como “sputtering”, no qual o ouro é removido de um eletrodo maciço, por bombardeamento com íons pesados de argônio, e se deposita sobre todas as reentrâncias e proeminências da superfície da amostra. Para outros materiais é possível aplicação de outros métodos de metalização, como a evaporação térmica em alto vácuo. Após a metalização, a amostra está pronta para ser examinada com o MEV. (DE SOUZA *et al.*, 2011).

Embora o metal mais comumente utilizado em MEV seja o ouro, pudemos observar que as amostras metalizadas assim exibiam uma fina granulação na superfície, quando observadas em grandes aumentos. No entanto, quando utilizamos a platina, tal granulação desapareceu, dando lugar à uma superfície mais lisa e uniforme. Como a platina é um componente de granulação mais delicada

constatamos que o efeito granuloso da superfície não é um componente da parede do esporo, mas sim um artefato, produzido pelas partículas do ouro. Desse modo, concluímos que o material de escolha para cobertura metálica dos esporos de *E. hellem* é a platina.

As amostras foram observadas ao MEV (Zeiss EVO MA10) de emissão termoiônica, por filamento de tungstênio e ao MEV de alta resolução, com emissão a frio, por um filamento de cristal LB_6 (Jeol FESEM 6340F), cujo poder de resolução é da ordem de 1-2nm. Importante ressaltar que algumas informações só foram possíveis de serem inferidas ao microscópio de alta resolução, pela associação de fatores que elevam a capacidade de resolução do microscópio. Variáveis como a distância de trabalho e a voltagem foram mantidas, mas a emissão a frio que permite a obtenção de um probe mais eficiente, possibilitou a obtenção de tais resultados. A superfície dos esporos metalizados por ouro, quando observados ao microscópio convencional, mostrou-se lisa tanto quanto aquela metalizada pela platina. A superfície granulosa observada com a metalização pelo ouro é, provavelmente resultado de um artefato intrínseco à esse metal, que se acumula em camadas espessas, formando grânulos. Sob condições de preparo semelhantes e utilizando as mesmas variáveis na observação aos MEVs, pudemos constatar que a utilização de uma ferramenta mais adequada nos permitiu inferir uma informação mais compatível com a realidade.

Não se sabe ao certo como o tubo polar penetra na célula hospedeira. Estudos da interação de *E. hellem* com fibroblastos de pulmão de bovinos sugerem que esse processo possa ocorrer através mecanismos endocíticos, demonstrado por micrografias de varredura (revisto por FRANZEN, 2004); estudos similares realizados com *E. intestinalis* e sua interação com macrófagos também demonstraram invaginação da célula hospedeira, sugerindo a invasão por meio de processos endocíticos (MAGAUD et al., 1997).

Nesse trabalho, não foi possível identificar a invaginação da célula hospedeira ao contato com os esporos do parasita, como visto por alguns autores (SACCHI, 2001), sugerindo para o *E. hellem* a via de invasão celular por processos endocíticos.

A metodologia desenvolvida nessa dissertação permite a observação de estruturas intracitoplasmáticas do esporo de *E. hellem*, por técnicas clássicas de microscopia eletrônica de transmissão e varredura, com obtenção de resultados muito satisfatórios. Protocolos de preparo dessas amostras para MET e MEV são propostos nos apêndices I e II, respectivamente, onde os melhores resultados de fixação química, infiltração, ultramicrotomia e contrastação são associados.

O conhecimento da ultraestrutura desses organismos permitirá a elucidação de uma série de eventos ainda desconhecidos, dando ensejo a que, no futuro, se possa desenvolver estratégias de controle do parasita.

7. CONCLUSÕES

- ✓ A fixação química convencional, utilizada em microscopia eletrônica é eficiente para *E. hellem*, sendo o uso do paraformaldeído em associação como glutaraldeído preferível ao uso do glutaraldeído puro.
- ✓ A fixação por congelamento, utilizando os protocolos estabelecidos não preservam bem os esporos de *E. hellem*, sendo necessário a adaptação para o modelo.
- ✓ A pós fixação pelo OTO é realça melhor o contraste das membranas celulares, proporcionando um incremento no ganho de informações sobre o parasita.
- ✓ A resina de escolha para *E. hellem* é o spurr, que demonstrou ser mais eficaz que o epon na infiltração e na aceitação dos agentes contrastantes, sob as condições aplicadas.
- ✓ Esporos de *E. hellem* devem ser seccionados em espessuras inferiores àquelas preconizadas no protocolo convencional (entre 70 e 90nm). Os melhores cortes são os de espessura entre 60 e 65 nm, quando forem observadas as interações com a célula hospedeira e 50 e 55 nm, quando o objetivo for a observação do esporo isoladamente.
- ✓ Para obtenção do contraste ideal, o tempo de incubação no acetato de uranila deve ser inferior àquele preconizado no protocolo convencional (40 minutos), não devendo exceder de 20 minutos;
- ✓ O uso do micro-ondas é indicado, uma vez que as amostras processadas por esse método apresentaram contraste e preservação flagrantemente melhores que pelos métodos anteriores, em tempo bem menor;
- ✓ As condições ideais para preparo dessas amostras para MEV devem ser: ciclo longo de secagem pelo ponto crítico (20 trocas lentas) e metalização pela platina ou outro componente de granulação inferior à do ouro;

- ✓ A observação por MEV é preferível em microscópios de alta resolução em detrimento dos microscópios convencionais, trazendo informações mais relevantes, que não podem ser observadas pela microscopia convencional.
- ✓ Essas condições se aplicam quando utilizados os microscópios sob os parâmetros explicitados em cada resultado.

8. REFERÊNCIAS

ATTIAS, M. Técnicas de Microscopia Eletrônica Aplicadas às Ciências Biológicas. **Técnicas de Microscopia Eletrônica Aplicadas às Ciências Biológicas**. 3ª Edição Rio de Janeiro: SBMM, 2011.

BENCHIMOL, M., MIRANDA, K. Criofixação, criosubstituição e crio eletrontransferência – **Técnicas de Microscopia Eletrônica Aplicadas Às Ciências Biológicas** – 3ª Edição – SBMM, 2011.

BENCHIMOL M., GONÇALVES N.R., DE SOUZA W. Rapid primary microwave-glutaraldehyde fixation preserves the plasma membrane and intracellular structures of the protozoan *Tritrichomonas foetus*. **Microsc. Res. Tech.**, p. 286-290, 1993.

BERMAN, J. J. Microsporidia. **Taxonomic Guide to Infectious Diseases**. [s.l: s.n.]. p. 209–211.

BIGLIARDI, E. SELMI, M.G., LUPETTI, P., CORONA, S., GATTI, S., SCAGLIA, M. AND SACCHI, L. Microsporidian spore wall: ultrastructural findings on *Encephalitozoon hellem* exospore. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v.43, p.181-6, 1996.

BIGLIARDI, E.; SACCHI, L. Cell biology and invasion of the microsporidia. **Microbes and infection / Institut Pasteur**, v. 3, n. 5, p. 373–9, 2001.

BJORNSON, S. *et al.* Ultrastructure and molecular characterization of the microsporidium, *Nosema chrysoperlae* sp. nov., from the green lacewing, *Chrysoperla, Carnea* (Stephens) (*Neuroptera: Chrysopidae*) used for biological pest control. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 114, n. 1, p. 53–60, 2013.

BOGNER, A. *et al.* A history of scanning electron microscopy developments: towards & quot; wet-STEM & quot; imaging. **Micron Oxford, England** , v. 38, n. 4, p. 390–401, 2007.

BOHNE, W.; BÖTTCHER, K.; GROS, U. The parasitophorous vacuole of *Encephalitozoon cuniculi*: Biogenesis and characteristics of the host cell-pathogen

interface. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 301, n. 5, p. 395–399, 2011.

BOS, E. *et al.* A new approach to improve the quality of ultrathin cryo-sections; its use for immunogold EM and correlative electron cryo-tomography. **Journal of Structural Biology**, v. 175, n. 1, p. 62–72, 2011.

BOS, E. *et al.* Vitrification of Tokuyasu-style immuno-labelled sections for correlative cryo light microscopy and cryo electron tomography. **Journal of Structural Biology**, v. 186, n. 2, p. 273–82, 2014.

BOS, E., SANT'ANNA, C., GNAEGI, H., PINTO, R.F., RAVELLI, R.B.G., KOSTER, A.J., DE SOUZA, W., PETERS, P.J. A new approach to improve the quality of ultrathin cryo-sections; use for immunogold EM and correlative electron cryo-tomography. **J. of Struct. Biol** v. 175, p. 62-72, 2011.

BOZZOLA, J.J. AND RUSSEL L.D. Electron microscopy: principles and techniques for biologists. **Jones and Bartlett Publishers**, Inc., p. 50-56, 1992.

BRASIL P., BONFIM DE LIMA D., MOURA H. Microsporidiose humana na síndrome de imunodeficiência adquirida. **Rev Ass Med Brasil**: p. 254-64, 1997.

BRYAN, R.T. Microsporidiosis as an AIDS-related opportunistic infection. **Clin Infect Dis**. 21(suppl.1): s-62-65, 1995.

CARLEMALM, E., VILLINGER, W., HOBOT, J. A., ACETARIN, J. D., KERLENBERGER, E. Low temperature embedding with Lowicryl resins: two new formulations and some applications. **J. Microscop**. v.140, p. 55-63, 1985.

CANNING, E.U., HOLLISTER, W.S. Microsporidia of mammals – widespread pathogens or opportunistic curiosities? **Parasitol Today**, v.3, p.262-73, 1987.

CANNING, E.U., CURRY, A., LACEY C.J. *et al.* Ultrastructure of Encephalitozoon sp infecting the conjunctiva, corneal and nasal epithelia of patient with AIDS. **Eur J Parasitol**, v.28, p. 226-37

CAPELA-GUTIÉRREZ, S. *et al.* Phylogenics supports microsporidia as the earliest diverging clade of sequenced fungi. **BMC Biology Journal of Biology**, 10:47, 2012.

CAUSTON, B. E. The choice of resins for electron immunocytochemistry. In: Immunolabeling for electron microscopy. **Elsevier Science Publishers**, p. 29-36, 1984.

CAVALIER-SMITH, A., SPEHNER, D., HUMBEL, B. Handbook of cryo-preparation methods for electron microscopy. **CRC Press Inc.**, Boca Raton, Florida, USA, 2009.

CAVALIER-SMITH, T. What are fungi? The Mycota. **Edited by McLaughin DJ. New York**, 2001.

DE SOUZA, W. Técnicas de Microscopia Eletrônica Aplicadas às Ciências Biológicas. **Técnicas de Microscopia Eletrônica Aplicadas às Ciências Biológicas**. 3. ed. Rio de Janeiro: SBMM, 2011.

DEDAVID, B.A. Microscopia eletrônica de varredura: aplicações e preparação de amostras: materiais poliméricos, metálicos e semicondutores [recurso eletrônico] / Porto Alegre: **EDIPUCRS**, 2007.

DIDIER, E. S., WEISS, L. M. Microsporidiosis: not just in AIDS patients. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 24, n. 5, p. 490–5, out. 2011.

DIDIER, P. J. *et al.* Fine structure of a new human microsporidian, *Encephalitozoon hellem*, in culture. **The Journal of Protozoology**, v. 38, n. 5, p. 502–7.

ECHLIN, P. Low-temperature microscopy and analysis. **Plenum Press. N. York and London**, 1992.

FERNANDEZ-MORAN, H. Low-temperature preparation techniques for electron microscopy of biological specimens based on rapid freezing with liquid helium II. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 85, p. 689–713, 13 abr. 1960.

FUKUDA, K., VASCONCELOS A. F. D., MATIAS A. C., BARBOSA A., DEKKER R. F. H., SILVA M. C. Fungal cell wall polysaccharides: purification and characterization.: **Ciências Agrárias, Londrina**, v. 30, n. 1, p. 117-134, 2009.

GHOSH, K. *et al.* Branching network of proteinaceous filaments within the parasitophorous vacuole of *Encephalitozoon cuniculi* and *Encephalitozoon hellem*. **Infection and Immunity**, v. 79, n. 3, p. 1374–85, mar. 2011a.

GILL, E.E., FAST, N.M. Assessing the Microsporidia-fungi relationship: Combined phylogenetic analysis of eight genes. **Gene** 375, 103-109, 2006.

GIRARD-DIAS, W. *et al.* On the ultrastructural organization of *Trypanosoma cruzi* using cryopreparation methods and electron tomography. **Histochemistry and cell biology**, v. 138, n. 6, p. 821–31, dez. 2012.

GLAUERT, A.M. Fixation, dehydration and embedding of biological specimens. Practical methods in electron microscopy. **Edited by Audrey M. Glauert North-Holland publishing company – Amsterdam, Oxford, Elsevier publishing Co. Inc., New York**, 1975.

GOLDSTEIN, J. I., NEWBURY, D. E., ECHLIN, P., JOY, D. C., ROMIG, A. D., LYMAN, C. E., FIORI, C., LIFSHIN, E. Scanning electron microscopy and X-ray microanalysis. **Plenum Press, N. York and London**, 2a ed., 1992.

GRIFFITH, J. *et al.* A cryosectioning procedure for the ultrastructural analysis and the immunogold labelling of yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Traffic Copenhagen, Denmark**, v. 9, n. 7, p. 1060–72, jul. 2008.

GRIFFITH, J.; PEÑALVA, M. A.; REGGIORI, F. Adaptation of the Tokuyasu method for the ultrastructural study and immunogold labelling of filamentous fungi. **Journal of Electron Microscopy**, v. 60, n. 3, p. 211–6, 2011.

GRIFFITHS, G., SIMON, K., WARREN, G., E TOKUYASU, K.T. Immunoelectron microscopy using thin, frozen sections: applications to studies of the intracellular transport of Semliki Forest virus Spike glycoproteins. **Methods Enzymol**: 435-450, 1983.

HAYAT, M. A.; GIAQUINTA, R. Rapid fixation and embedding for electron microscopy. **Tissue & cell**, v. 2, n. 2, p. 191–5, 1970.

HAYAT, M.A. Principles and techniques of electron microscopy. Biological applications volume 1. **Nostrand Reinhold Company, New York, London**, 1970.

HAYAT, M.A. Fixation for electron microscopy. **Academic Press, Inc. London – New York**, 1981.

HEINZ, E. ET AL. The genome of the obligate intracellular parasite *Trachipleistophora hominis*: new insights into microsporidian genome dynamics and reductive evolution. **PLoS Pathogens**, v. 8, n. 10, 2012.

HEUSER, J.E. E REESE, T.S. Freeze substitution applied to the study of quick frozen synapses. **J. Cell. Biol.** 357a, 1976.

HERMANN, R., MULLER M. Pre-requisites of high-resolution scanning electron microscopy. **Scanning Microscopy**, v.5, p. 653-64, 1991.

KEOHANE E.M., ORR G.A., TAKVORIAN P.M., CALI A., TANOWITZ H.B., WITTNER M., WEISS L. M. Analysis of the major microsporidian polar tube proteins. **J. Eukaryot Microbiol.**, 1999.

KEOHANE E.M., ORR G.A., ZHANG H.S, TAKVORIAN P.M., CALI A., TANOWITZ H.B., WITTNER M., WEISS L.M. Polar tube proteins of microsporidia of the family *Encephalitozoonidae*. **J. Eukaryot Microbiol** Jan-Feb: 1-5, 1999.

KEOHANE E.M., ORR, G.A., ZHANG H.S., TAKVORIAN P.M., CALI A., TANOWITZ H.B., WITTNER M., WEISS L.M. The molecular characterization of the major polar tube protein gene from *Encephalitozoon hellem*, a microsporidian parasite of humans. **Mol Biochem Parasitol**: 227-36, 1998.

KEOHANE, E. M. *et al.* Analysis of the major microsporidian polar tube proteins. **The Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 46, n. 5, p. 29S–30S, [s.d.].

KNOTT, G., MARCHMAN, H., WALL, D. AND LICH, B. Serial sectioning scanning microscopy of adult brain tissue using focused Ion Beam Milling. **Journal of Neuroscience**, v. 28, n. 12, p. 2959–2964, 19 mar. 2008.

KORN, E.D. A chromatographic and spectrophotometric study of the products of the reaction of osmium tetroxide with unsaturated lipids. **J. Cell Biol**, 34, 627-39.

LATTA, H.; HARTMANN, J. F. Use of a glass edge in thin sectioning for electron microscopy. Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. **Society for Experimental Biology and Medicine (New York, N.Y.)**, v. 74, n. 2, p. 436–9, jun. 1950.

LATGÉ, J.-P.; BEAUVAIS, A. Functional duality of the cell wall. **Current Opinion in Microbiology**, v. 20, p. 111–7, ago. 2014.

LEDUC, E.H., BERNAHARD, W., HOLT, S.J. E TRANZER, J.P. Ultrathin frozen sections, 11. Demonstration of enzymatic activity. **The Journal of Cell Biology**, v. 34, n. 3, p. 773–86, set. 1967.

LUFT, J. Improvements in epoxy resin embedding materials. **J. Biophysic. Biochem. Cytol.** 9:409, 1961.

MARTON, L. La microscopie electronique des objects biologiques. **Bull Classe Sci Acad. Roy Belg**, series 5, v.20, p. 439-46, 1934.

MERYMAN, H.T. Cryoprotective agents. **Cryobiology**: 173-183, 1971.

MILANI, M., DROBNE, D., DROBNE, S. AND TATTI, F. An ATLAS of FIB/SEM in soft materials and life sciences. **Aracne Editrice, Rome**, 2006.

MOURA, H., HIRSCHFELD, M.P.M., BRASIL, P. *et al.* Microsporidiosis among AIDS patients in Brazil: preliminar results. **Workshop on Microsporidiosis and Cryptosporidiosis in Immunodeficient Patients**. 40, 251, 1993.

POLONAIS, V. *et al.* The human microsporidian *Encephalitozoon hellem* synthesizes two spore wall polymorphic proteins useful for epidemiological studies. **Infection and Immunity**, v. 78, n. 5, p. 2221–30, 2010.

PORTER, K. R., BLUM, J. A study of microtomy for electron microscopy. **Anat. Rec.**117:665, 1953.

PRIGNEAU, O., ACHBAROU, A., BOULADOUX, N., MAZIER, D., DESPORTES-LIVAGE, I. Identification of proteins in *Encephalitozoon intestinalis*, a microsporidian pathogen of immunocompromised human: an immunoglotting and immunocytochemical study. **Journal Eukaryotic Microbiology**, v.47, p. 48 – 56, 2000.

RABENECK L., GYORKEY F., GENTA, R. M. The role of microsporidia in the pathogenesis of HIV-related chronic diarrhea. **Ann Inter Med**: 119: 895-9, 1993.

SANDFORT, J., HANNEMANN A., GELDERBLOM H. *Enterocytozoon bieneusi* in an immunocompetent patient who had acute diarrhea and who was not infected with the human immunodeficiency virus. **Clin Infect Dis**: 19: 514-6, 1994.

SANT' ANNA C., CAMPANATI L., GADELHA C., LOURENÇO D., LABATI-TERRA L., BITTENCOURT-SILVESTRE J., BENCHIMOL M., CUNHA-E-SILVA N., DE SOUZA W. Improvement on the visualization of cytoskeletal structures of protozoan parasites using high-resolution Field emission scanning electron microscopy (FESEM). **Histochem Cell Biol**: 87-95, 2005.

SESSO, A. Técnicas de Microscopia Eletrônica Aplicadas às Ciências Biológicas. Técnicas de Microscopia Eletrônica Aplicadas às Ciências Biológicas. **3. ed. Rio de Janeiro: SBMM, 2011.**

SILVEIRA, M. Técnicas de Microscopia Eletrônica Aplicadas às Ciências Biológicas. Técnicas de Microscopia Eletrônica Aplicadas às Ciências Biológicas. **3. ed. Rio de Janeiro: SBMM, 2011.**

STENTIFORD, G.D. *et al.* Microsporidia – Emergent pathogen in the global food chain. **Trends in Parasitology**, vol. 32, 336-348, 2016.

SVENSON, J., MAC LEAN, E., KOROSKIN-NELSON, J. Microsporidiosis in AIDS patients. **Can Comm Dis Rep**, v.19. p. 13-5, 1993.

SOKOLOVA, O. I. *et al.* Emerging microsporidian infections in Russian HIV-infected patients. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 49, n. 6, p. 2102–8, jun. 2011.

TAKOVARIAN P.M., BUTTLE K.F., MANKUS D., MANELLA C.A., WEISS L.M. The Multilayered Interlaced Network (MIN) in the sporoplasm of the Microsporidium *Annacaliia algarae* is derived from Golgi. **Journal of Eukaryotic Microbiology** ISSN (60) 166-178, 2013.

THOMARAT, F., VIVARES, C.P., GOUY, M. Phylogenetic analysis of the complete genome sequence of *Encephalitozoon cuniculi* supports the fungal origin of microsporidia and reveals a high frequency of fast-evolving genes. **J. Mol. Evol.** v.59, p. 780-791, 2004.

TOKUYASU, K.T A technique for ultracyromicrotomy of cell suspensions and tissues. **J. Cell Biol.** 57: 551-565, 1973.

TOKUYASU, K.T. Immunocytochemistry on ultrathin frozen sections. **Histochem. J.** 12: 381-403, 1980.

VALENCAKOVA, A.; HALANOVA, M. Immune response to *Encephalitozoon* infection review. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 35, n. 1, p. 1–7, 2012.

VAN DONSELAAR, E. *et al.* Immunogold labeling of cryosections from high-pressure frozen cells. **Traffic (Copenhagen, Denmark)**, v. 8, n. 5, p. 471–85, maio 2007.

VÀVRA, J. Structure of microsporidia. **Bulla L.A., Cheng T.C. Comparative Pathobiology, vol. 1, Plenum Press, New York**, p. 1-86, 1976.

VÀVRA, J. Detection of polysaccharides in microsporidian spores by means of periodic acid-thiosemicarbazide-silver proteinate test. **J. Microsc.**, v.14, p. 357-360, 1972.

VÀVRA, J. e LUKES, J. Microsporidia and the art of living together. **Adv. Parasitol.** v.82, p. 254-319, 2013.

VOSSBRINCK, C.R., BAKER, M. D., DIDIER, E. S., DEBRUNNER-VOSSBRINCK, B. A., SHADDUCK, J. A. Ribosomal DNA sequences of *Encephalitozoon hellem* and *Encephalitozoon cuniculi*: species identification and phylogenetic construction. **J. Eukaryot. Microbiol.** 40, 354-362.

WASSON, K.; PEPPER, R. L. Mammalian microsporidiosis. **Veterinary pathology**, v. 37, n. 2, p. 113–28, mar. 2000.

WEBER, R. KUSTER, H., VIVESVARA, G.S. *et al.* Disseminated microsporidiosis due to *Encephalitozoon hellem*: pulmonary colonization, microhematuria and conjunctivitis in a patient with AIDS. **Clin Infect Dis.** v. 17, p. 415-9, 1993.

WEBER, R., KUSTER, H., KELLER, R. Pulmonary and intestinal microsporidiosis in a patient with the acquired immunodeficiency syndrome. **Am Rev Respir Dis**, v. 146, p. 1603-5, 1992.

WEISS L. M. Microsporidia: emerging pathogenic protists. **Acta Tropica** (78) 89-102, 2001.

WINTERS, A. D. *et al.* Ultrastructure and molecular phylogeny of *Pleistophora hyphessobryconis* (Microsporidia) infecting hybrid jundiara (*Leiarius marmoratus* × *Pseudoplatystoma reticulatum*) in a Brazilian aquaculture facility. **Parasitology**, v. 143, n. 01, p. 41–49, 2016.

WITTNER, M. WEISS, L.M. The Microsporidia and microsporidiosis. **ASM Press**, Washington D.C., 1999.

XIANG, H. *et al.* New evidence on the relationship between Microsporidia and Fungi: a genome-wide analysis by Dark Horse software. **Canadian journal of microbiology**, v. 60, n. 9, p. 557–68, set. 2014.

APÊNDICE I

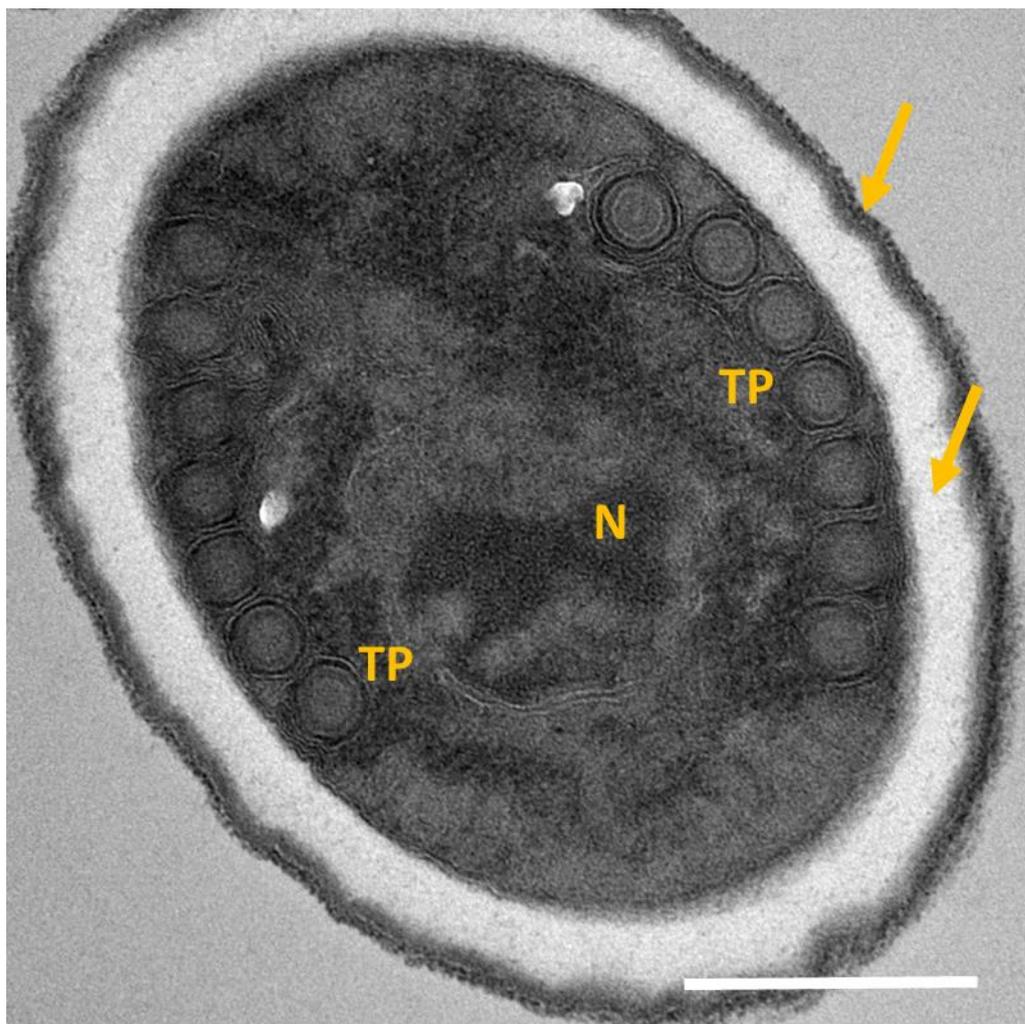
Protocolo para preparo de esporos de *E. hellem* e sua célula hospedeira para MET.

Protocolo 1 – Preparo convencional.

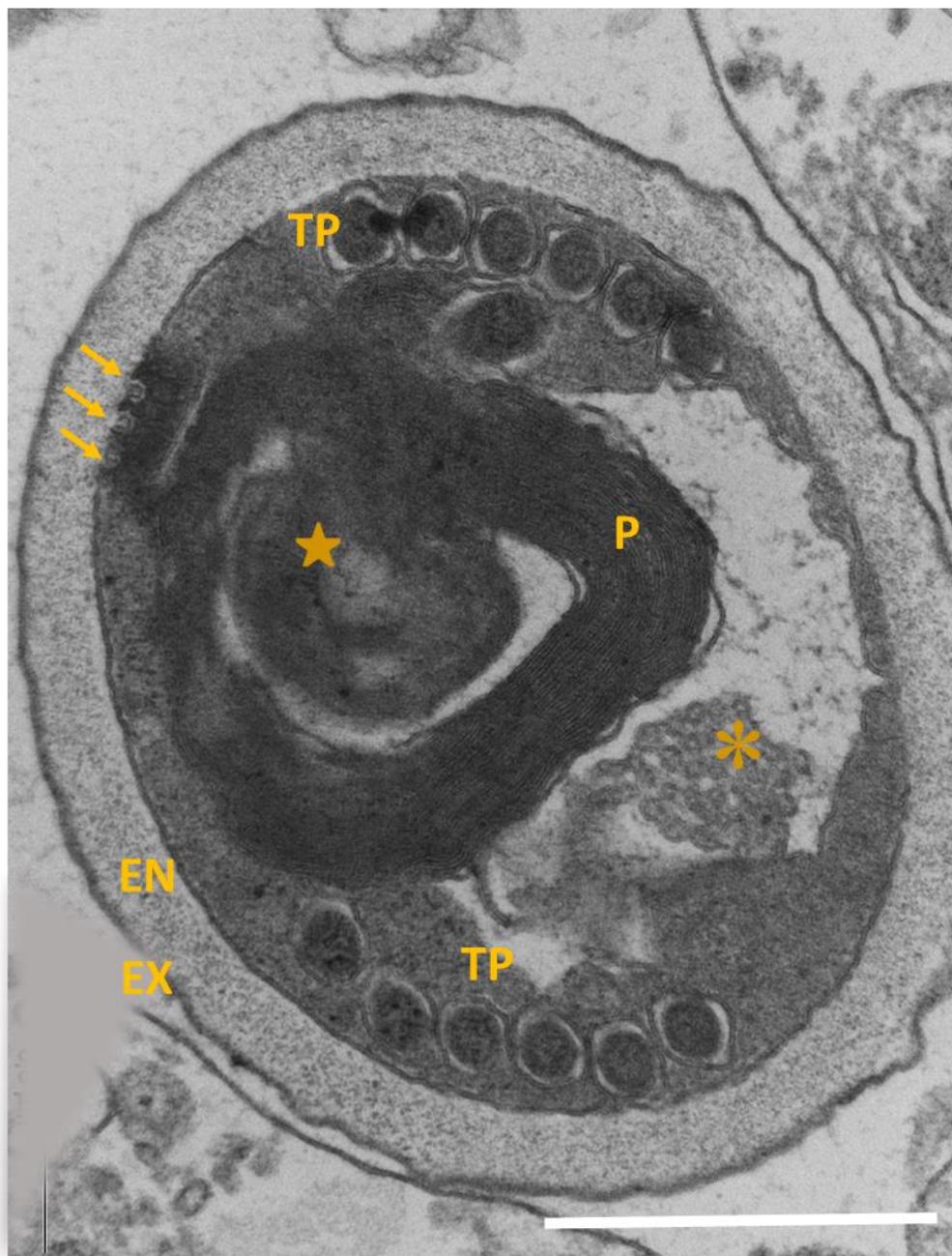
- Fixação em 2,5% glutaraldeído e 4% de formaldeído em tampão cacodilato de sódio 0,1M por 2 horas a temperatura ambiente.
- Lavagem em tampão cacodilato de sódio 0,1M p.H 7,2 três vezes.
- Pós fixação em 1% de tetróxido de ósmio em tampão cacodilato de sódio 0,1M por 15 minutos a temperatura ambiente; 1% de tiocarbohidrazida em água por 5 minutos; 1% de tetróxido de ósmio 1% em tampão cacodilato de sódio 0,1M por 15 minutos.
- Lavagem em tampão cacodilato de sódio 0,1M p.H 7,2 três vezes.
- Desidratação em acetona em concentrações crescentes:30%, 50%, 70%, 90% e 100%. Cada banho deve durar 20 minutos e o último banho de 100% deve ser repetido por três vezes.
- Infiltração lenta em acetona spurr em concentrações crescentes: acetona/spurr 3:1 por 3 horas; acetona/spurr 2:1 por 3horas; acetona/spurr 1:1 12 horas (overnight); acetona/spurr 1:2 por 3 horas e spurr puro 3 horas. Inclusão em spurr e polimerização a 70°C por 48 horas.
- Ultramicrotomia a 65 nm de espessura.
- Contrastação por 20 minutos em acetato de uranila 5% em água e 5 minutos em citrato de chumbo.

Protocolo 2 – Preparo com utilização de micro-ondas.

- Fixação em glutaraldeído 2,5% por 120s em 4 pulsos de 30s – 200W
- Lavagem em tampão cacodilato de sódio 0,1M, p.H 7,2 3 vezes.
- Pós fixação pelo OTO – tetróxido de ósmio 1% em água por 120 s em 4 pulsos de 30s; tiocarbohidrazida 1% em água por 120s em 4 pulsos de 30s; tetróxido de ósmio 1% em água, por 120s em 4 pulsos de 30s – 150W.
- Lavagem em tampão cacodilato de sódio 0,1M, p.H 7,2 3 vezes.
- Desidratação em séries crescentes de acetona: 30%, 50%, 70%, 90% e 100% - cada etapa 40s em 4 pulsos de 10s – 250W
- Infiltração em spurr/acetona como protocolo 1. Cada etapa 90s em pulsos de 30s – 200W
- Resina pura 120s por em 4 pulsos de 30s – 200W
- Polimerização em estufa 70°C, por 48 horas.



Apêndice I – Imagem do protocolo 1 para processamento dos esporos de *E. hellem* para observação por microscopia eletrônica de transmissão. As setas indicam o endósporo e o exósporo. N – núcleo; TP – Tubo polar. Barra de aumento: 200 nm.

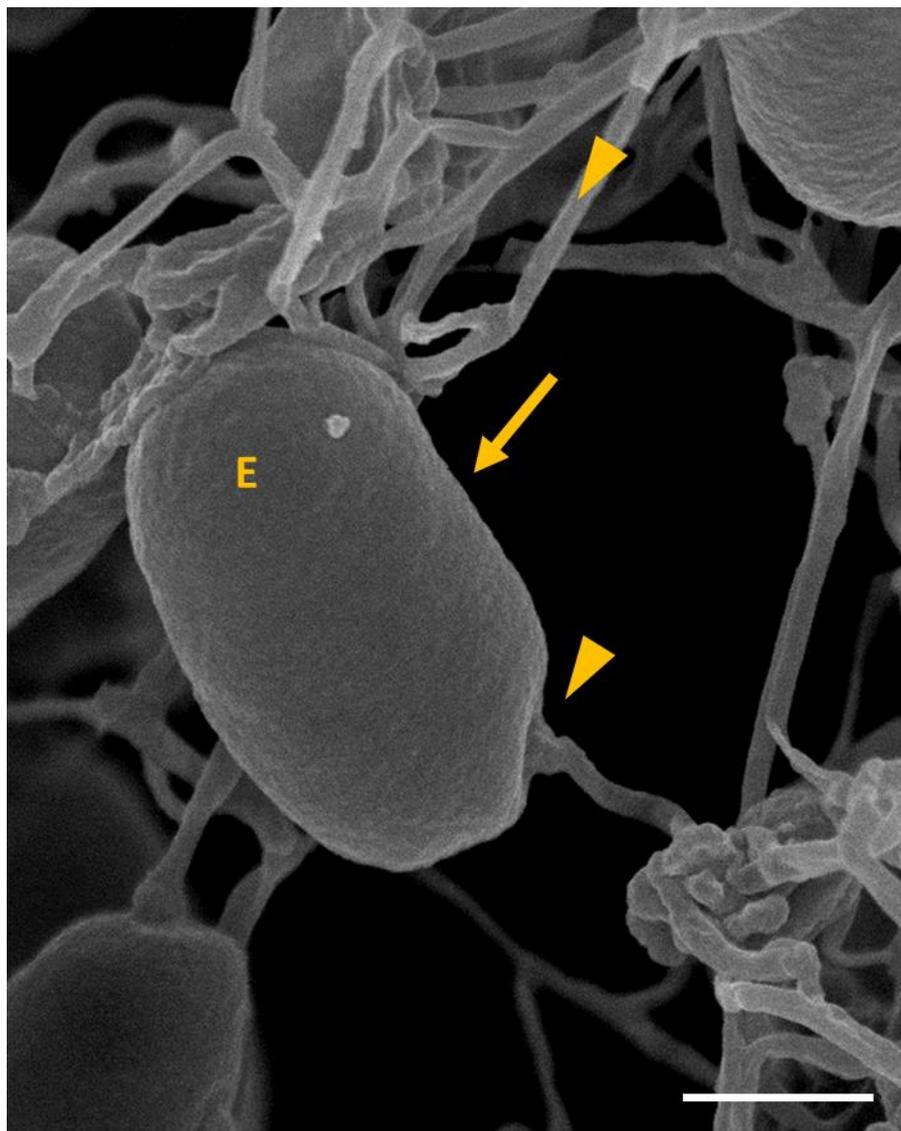


Apêndice I – Protocolo 2 – preparo de amostras com utilização do micro-ondas. É possível observar estruturas típicas do organismo, como o tubo polar, o endósporo e o exósporo. Estruturas desconhecidas também são observadas (asterisco). Foi possível observar uma tríade de estruturas semelhantes a túbulos cortados transversalmente, logo abaixo da membrana plasmática (setas). Um conteúdo celular eletrondenso foi observado, possivelmente o esporoplasma (estrela). O polaroplasto está bem visível (P). Imagens obtidas ao EM Zeiss 900, operando em 80Kv. Barra de aumento – 500nm.

APÊNDICE II

Protocolo para preparo de esporos de *E. hellem* e sua célula hospedeira para MEV.

- Fixação em 2,5% glutaraldeído e 4% de formaldeído em tampão cacodilato de sódio 0,1M por 2 horas a temperatura ambiente.
- Lavagem em tampão cacodilato de sódio 0,1M p.H 7,2 três vezes.
- Pós fixação em 1% de tetróxido de ósmio em tampão cacodilato de sódio 0,1M por 15 minutos a temperatura ambiente; 1% de tiocarbohidrazida em água por 5 minutos; 1% de tetróxido de ósmio 1% em tampão cacodilato de sódio 0,1M por 15 minutos.
- Lavagem em tampão cacodilato de sódio 0,1M p.H 7,2 três vezes.
- Desidratação em série crescente de etanol: 30% três vezes.
- Desidratação em acetona em concentrações crescentes:30%, 50%, 70%, 90% e 100%. Cada banho deve durar 20 minutos e o último banho de 100% deve ser repetido por três vezes.
- Secagem pelo ponto crítico em um ciclo longo de 20 trocas, com um intervalo de 4 minutos entre as trocas.
- Metalização por platina, em camada de 1 nm de espessura.



Apêndice II – Imagem do protocolo ideal para observação dos esporos de *E. hellem* por microscopia eletrônica de varredura. A seta indica a superfície lisa do esporo. É possível observar o tubo polar extruído (cabeça de seta). Barra de aumento – 500nm.