



UFRJ
UNIVERSIDADE FEDERAL
DO RIO DE JANEIRO



IBCCF
INSTITUTO DE BIOFÍSICA
CARLOS CHAGAS FILHO

MESTRADO PROFISSIONAL

**formação
para a pesquisa
biomédica**

IBCCF | UFRJ



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

SHARMILA FIAMA DAS NEVES ORTIZ

Dissertação de Mestrado Profissional

**Métodos Alternativos para Processamento para Microscopia Eletrônica de
Transmissão de Protozoários Patogênicos: Manutenção Estrutural e
Realce de Contraste**

Orientadores:

Profa. Marlene Benchimol

Prof. Wanderley de Souza

RIO DE JANEIRO

2025

SHARMILA FIAMA DAS NEVES ORTIZ

**MÉTODOS ALTERNATIVOS PARA PROCESSAMENTO PARA MICROSCOPIA
ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO DE PROTOZOÁRIOS PATOGÊNICOS:
MANUTENÇÃO ESTRUTURAL E REALCE DE CONTRASTE**

Dissertação de Mestrado
Profissional apresentada ao
Programa de Pós-graduação
em Formação para a Pesquisa
Biomédica, Instituto de
Biofísica Carlos Chagas Filho,
Universidade Federal do Rio de
Janeiro, como parte dos
requisitos necessários à
obtenção do título de Mestre.

Orientadores:

Profa. Marlene Benchimol

Prof. Wanderley de Souza

RIO DE JANEIRO

2025

CIP - Catalogação na Publicação

das Neves Ortiz, Sharmila Fiama

Métodos Alternativos para Processamento para Microscopia Eletrônica de Transmissão de Protozoários Patogênicos: Manutenção Estrutural e Realce de Contraste / Sharmila Fiama das Neves Ortiz. -- Rio de Janeiro, 2025.

117 f.

Orientadora: Marlene Benchimol.
Coorientador: Wanderley de Souza.

1. Microscopia Eletrônica. 2. Protozoários. I. Benchimol, Marlene, orient. II. de Souza, Wanderley, coorient. III. Título.

SHARMILA FIAMA DAS NEVES ORTIZ

**Métodos Alternativos para Processamento para Microscopia Eletrônica de
Transmissão de Protozoários Patogênicos: Manutenção Estrutural e
Realce de Contraste**

Dissertação de Mestrado Profissional apresentada
ao Programa de Pós-graduação em Formação para a
Pesquisa Biomédica, Instituto de Biofísica Carlos Chagas
Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte
dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre.

Aprovada em 23 de janeiro de 2025

"Métodos alternativos de processamento de amostras biológicas para microscopia eletrônica de transmissão"

SHARMILA FIAMA DAS NEVES ORTIZ

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO PROFISSIONAL DE FORMAÇÃO PARA A PESQUISA BIOMÉDICA SUBMETIDA À UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO VISANDO A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM FORMAÇÃO PARA A PESQUISA BIOMÉDICA.

APROVADA POR:

RIO DE JANEIRO, 23 DE JANEIRO DE 2025.

Documento assinado digitalmente

gov.br

FLAVIA FONSECA BLOISE

Data: 19/02/2025 14:52:54-0300

Verifique em <https://validar.it.gov.br>

DRA. FLAVIA FONSECA BLOISE (DOUTORA – UFRJ)

(COORDENADORA DO CURSO DE MESTRADO PROFISSIONAL DE FORMAÇÃO PARA PESQUISA BIOMÉDICA)

Marlene Benchimol

DRA. MARLENE BENCHIMOL (DOUTORA – UNIGRANRIO) – ORIENTADORA

VÍDEOCONFERÊNCIA

DR. WANDERLEY DE SOUZA (DOUTOR – UFRJ) – 2ª ORIENTADOR

Eduardo José Lopes Torres

DR. EDUARDO JOSÉ LOPES TORRES (DOUTOR - UERJ)

Miriam Gomes Pereira

DRA. MIRIAM GOMES PEREIRA - (DOUTORA – UFRJ)

VÍDEOCONFERÊNCIA

DRA. REGINA CÉLIA BRESSAN QUEIROZ DE FIGUEIREDO (DOUTORA – FIOCRUZ)

Sônia Rozental

DRA. SONIA ROZENTAL (DOUTORA – UFRJ) - REVISORA

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Ultraestrutura Celular Hertha Meyer do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho da Universidade Federal do Rio de Janeiro, sob orientação da Professora Marlene Benchimol, segunda orientação do Professor Wanderley de Souza, na vigência dos auxílios concedidos pela Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal do Ensino Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ).

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, que me ensinaram a ver o mundo com clareza e curiosidade, guiando meus passos desde as primeiras descobertas. Por sua sabedoria, que iluminou meu caminho, e por inspirarem, mesmo nos menores detalhes, a paixão por enxergar além das superfícies — no mundo e sob o microscópio.

AGRADECIMENTOS

A conclusão deste trabalho reflete um esforço coletivo e o apoio indispensável de muitas pessoas, às quais expresso minha profunda gratidão.

Em primeiro lugar, agradeço aos meus pais, **Márcia das Neves Ortiz e Durvanir Ortiz Júnior**, por todo amor, paciência e encorajamento incondicional ao longo desta jornada. Estendo minha gratidão aos demais familiares, com destaque à minha irmã e ao meu sobrinho.

Aos professores do Laboratório de Ultraestrutura Celular Herta Meyer — **Cristina Motta, Fabiana Carneiro, Fábio Gomes, Kildare Miranda, Lúcio Ayres, Márcia Attias, Miria Gomes, Narcisa Leal da Cunha e Silva, Rossiane Vommaro e Sônia Rozental** —, meu sincero agradecimento por compartilharem seu conhecimento científico.

Ao meu grupo de pesquisa, composto pelos meus orientadores, pela professora **Ana Paula Gadelha** e suas alunas, **Dalila e Cassiane**, além de **Rosilaine Oliveira e Raphael Verdan**, sou imensamente grata pelas discussões científicas, colaborações e trocas de ideias, que fizeram do laboratório um espaço de aprendizado e crescimento mútuo.

Aos técnicos **Otávio, Verônica, Mayara e Maria Eduarda**, agradeço o apoio e atenção aos detalhes, essenciais para a realização deste trabalho. Também reconheço a contribuição dos tecnólogos do CENABIO — **Adélia, Carla e Daniel** — cujo suporte técnico foi fundamental para a obtenção das imagens, e para me tornar independente na operação do microscópio eletrônico.

Por fim, agradeço aos **amigos**, do ambiente acadêmico e fora dele, pelo incentivo, palavras de apoio e pela leveza com que tornaram mais fáceis os momentos desafiadores. **Um carinho especial às amigas que me acompanham desde o início e permanecem ao meu lado até hoje.**

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À Professora **Marlene Benchimol**, expresso sincera gratidão pela orientação excepcional e pela inspiração ao longo de toda esta jornada. Sua dedicação incansável, generosidade ao compartilhar conhecimento e sabedoria científica foram pilares indispensáveis para a concretização deste trabalho. A cada reunião, cada comentário e cada palavra de incentivo, senti-me desafiada a ir além. Sua paixão pela pesquisa e seu compromisso com a formação de novos pesquisadores são um exemplo inesquecível que continuará a me guiar. Por fim, concordo que somos um exemplo de reconhecimento de almas.

Ao Professor **Wanderley de Souza**, minha gratidão pela liderança e pelo apoio ao longo desta caminhada. A oportunidade de realizar este trabalho sob sua coordenação foi um privilégio que marcou profundamente minha formação científica. Sua trajetória brilhante e contribuições à ciência brasileira são fonte constante de inspiração.

À **Noêmia Rodrigues**, meu reconhecimento especial por ter me apresentado o caminho até aqui, oferecendo suporte científico e emocional desde o primeiro dia. Sua competência, atenção aos detalhes e prontidão em ajudar foram essenciais para o desenvolvimento deste trabalho. Sua dedicação e profissionalismo enriquecem o dia a dia do laboratório, e sou profundamente grata pela nossa amizade.

Por fim, agradeço às agências de fomento **FINEP, CAPES, CNPq** e **FAPERJ** pelo suporte financeiro, essencial para a realização deste estudo e para o avanço da ciência e da educação no Brasil.

SUMÁRIO

Resumo.....	13
<i>Abstract</i>	14
Lista de siglas e abreviaturas.....	15
Lista de figuras.....	16
Lista de tabelas.....	20
1. INTRODUÇÃO	21
1.1. Processamento de amostras: Microscopia Eletrônica de Transmissão 24	
1.2. Taninos	31
1.3. Ácido tânico.....	32
1.4. Ácido tânico na microscopia eletrônica de transmissão	35
1.5. Ácido tânico na contrastação de cortes ultrafinos	39
1.6. Processamento de amostras sem tetróxido de ósmio.....	41
1.7. Ácido tânico além da microscopia eletrônica de transmissão	43
1.8. Modelos biológicos utilizados para validação da metodologia	44
2. JUSTIFICATIVA	48
3. OBJETIVOS	48
3.1. Objetivo geral	48
3.2. Objetivos específicos	48

4. METODOLOGIA.....	49
4.1. Cultivo celular.....	49
4.1.1. <i>Giardia intestinalis</i>	49
4.1.2. <i>Trichomonas vaginalis</i>	49
4.2. Isolamento de citoesqueleto de <i>T. vaginalis</i>	50
4.3. Microscopia eletrônica de transmissão (MET)	50
4.4. Fixação com adição de ácido tânico ou ácido gálico e com pós- fixação	51
4.5. Fixação com adição de ácido tânico e sem pós-fixação	52
4.6. Contrastação de cortes ultrafinos com ácido tânico.....	54
4.7. Parâmetros para aquisição de imagens na análise de contraste	55
4.8. Medição do contraste no <i>Software Fiji</i>	56
4.9. Análise estatística	57
5. RESULTADOS	59
5.1. Fixação com adição de ácido tânico e com pós-fixação	59
5.2. Fixação com adição de ácido gálico e com pós-fixação	66
5.3. Fixação com adição de ácido tânico e sem pós-fixação	67
5.4. Contrastação de cortes ultrafinos com ácido tânico.....	75
5.5. Análise estatística do contraste.....	78
6. DISCUSSÃO	81

6.1. Adição de ácido tânico e com pós-fixação com OsO ₄	81
6.2. Adição de ácido tânico na solução fixadora e sem pós-fixação com OsO ₄ 84	
6.3. Contrastação de cortes ultrafinos com ácido tânico	86
6.4. Análise estatística do contraste	87
6.5. Valores dos reagentes e tempo de preparo.....	89
6.6. Processamento com Ácido Tânico e Seu Potencial Uso em Técnicas Avançadas de Microscopia.....	90
7. CONCLUSÕES	92
8. REFERÊNCIAS	93
9. ANEXO I.....	107

RESUMO

O processamento de amostras biológicas para microscopia eletrônica de transmissão é demorado e exige reagentes caros e tóxicos. Como padrão, a amostra deve ser bem fixada quimicamente para preservar as estruturas celulares, evitar autólise e garantir que as células resistam às etapas posteriores. Uma pós-fixação é necessária onde o tetróxido de ósmio preserva alguns lipídios impedindo a fragmentação de membranas biológicas, estabilizando a amostra e contrastando estruturas que contêm lipídeos das membranas e outras inclusões citoplasmáticas. A amostra é desidratada, infiltrada com uma resina, e contrastada com acetato de uranila, que reage com ácidos nucleicos e citrato de chumbo que confere contraste às membranas. O contraste permite que as imagens sejam geradas por transmissão parcial ou não transmissão de elétrons do microscópio eletrônico de transmissão. Os materiais biológicos têm caracteristicamente pouco contraste porque seus elementos de composição são de baixo número atômico, portanto, é importante encontrar meios de contraste eficientes e seguros. Este trabalho consiste em simplificar algumas etapas do processamento e melhorar o contraste de algumas estruturas celulares. Para tal, utilizamos o ácido tânico e outros reagentes em protocolos alternativos. Também tentamos a substituição do acetato de uranila e/ou citrato de chumbo por outros reagentes que proporcionem bom contraste sem os problemas que os reagentes usuais podem causar, como artefatos. Os modelos utilizados foram *Giardia intestinalis*, agente etiológico da giardíase e *Trichomonas vaginalis*, parasito causador da tricomoníase. Testamos o ácido tânico e o ácido gálico como prováveis substitutos visando diminuir o custo e toxicidade. Testamos em diferentes concentrações, seja (1) adicionado à solução fixadora padrão, como também (2) para suprimir a etapa de pós-fixação e, (3) como agente de contraste após o processamento, quando o material já está na grade. Resultados de testes com diferentes concentrações de ácido tânico, ácido gálico, permanganato de potássio e verde malaquita foram avaliados, incluindo análise estatística da área sob a curva e da distribuição dos pontos de um histograma gerado a partir das imagens obtidas. O protocolo com ácido tânico foi eficaz no aumento do contraste das estruturas celulares, permitindo a visualização detalhada de componentes específicos sem gerar artefatos. O desempenho do ácido foi equivalente ou superior ao acetato de uranila, destacando-se como uma alternativa mais segura e com menor impacto ambiental. Em contrapartida, o ácido gálico apresentou resultados limitados no contraste de membranas de organelas, e a necessidade de pós-fixação com OsO_4 foi confirmada para preservação adequada das membranas celulares.

ABSTRACT

Processing biological samples for transmission electron microscopy is time-consuming and requires expensive and toxic reagents. As a standard procedure, the sample must be chemically fixed to preserve cellular structures, prevent autolysis, and ensure that the cells withstand the subsequent steps. Post-fixation is necessary, where osmium tetroxide preserves certain lipids, preventing the fragmentation of biological membranes, stabilizing the sample, and contrasting lipid-containing structures of membranes and other cytoplasmic inclusions. The sample is dehydrated, infiltrated with resin, and contrasted with uranyl acetate, which reacts with nucleic acids, and lead citrate, which contrasts the membranes. The contrast allows micrographs to be generated by partial or non-transmission electron microscopy. Biological materials typically have low contrast due to their composition's low atomic number of elements, so it is important to find efficient and safe contrasting methods. This work aims to simplify some processing steps and improve the contrast of certain cellular structures. For this purpose, tannic acid and other reagents were used in alternative protocols. We also attempted to replace uranyl acetate and/or lead citrate with other reagents that provide good contrast without the issues typically caused by conventional reagents, such as artifacts. The models used were *Giardia intestinalis*, the etiological agent of giardiasis, and *Trichomonas vaginalis*, the parasite responsible for trichomoniasis. Tannic and gallic acids were tested as potential substitutes to reduce cost and toxicity. They were tested at different concentrations, either (1) added to the standard fixation solution, (2) to replace the post-fixation step, or (3) as contrast agents after processing, when the material is already on the grid. Results from tests with various concentrations of tannic acid, gallic acid, potassium permanganate, and malachite green were evaluated, including statistical analysis of the area under the curve and the distribution of points in a histogram generated from the obtained images. The protocol with tannic acid effectively increased the contrast of cellular structures, allowing detailed visualization of specific components without generating artifacts. Tannic acid's performance was comparable to or superior to uranyl acetate, standing out as a safer alternative with less environmental impact. In contrast, gallic acid showed limited results in contrasting organelle membranes, and the need for post-fixation with OsO_4 was confirmed for adequate preservation of cellular membranes.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AG – Ácido gálico

AT – Ácido tânico

BSA – Albumina sérica bovina

DNA - Ácido desoxirribonucleico

GA – Glutaraldeído

HIV – *Human Immunodeficiency Virus* (Vírus da Imunodeficiência Humana)

HPV – *Human Papillomavirus* (Vírus do Papiloma Humano)

MET – Microscopia/microscópio eletrônico de transmissão

PBS – Salina tamponada com fosfato de sódio

pH – Potencial hidrogeniônico

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Histórico da microscopia eletrônica. Em (a) Ruska e Knoll e o primeiro microscópio eletrônico, (b) primeira fotografia de microscopia eletrônica de transmissão de uma célula, registrada por Porter e em (c) o primeiro ultramicrotomo de Porter-Blum. **Fonte:** Adaptado de Max Planck Institute for Multidisciplinary Sciences (<https://www.nobel.mpg.de/en/ernst-ruska>), PORTER et al. (1945) e The Rockefeller University (<https://digitalcommons.rockefeller.edu/tools-for-discovery/44/> acesso em 17 dez. 2024).22

Figura 2. Esquema do funcionamento geral de um microscópio eletrônico de transmissão. **Fonte:** Adaptado de ANANTHAPADMANABAN, 2018.23

Figura 3. Exemplos de histogramas de contraste de uma imagem de microscopia eletrônica de transmissão, mostrando os pontos distribuídos entre o preto e o branco. Em (a) uma imagem com contraste baixo, e em (b) com contraste alto. **Fonte:** Adaptado de Evident Scientific (<https://evidentscientific.com/en/microscope-resource/knowledge-hub/digital-imaging/digitalimagebasics>) e The AI Learner (<https://theailearner.com/tag/high-contrast-image>) acesso em 17 dez. 2024).24

Figura 4. Esquema do processamento de amostras biológicas para MET. As amostras são fixadas, pós-fixadas, desidratadas, infiltradas em resina e incluídas para posterior obtenção de cortes ultrafinos. **Fonte:** Acervo próprio.25

Figura 5. Glutaraldeído, em (a) estrutura molecular 2D e (b) pictogramas de risco (corrosivo, toxicidade aguda, irritante e risco a saúde e ao meio ambiente). **Fonte:** National Center for Biotechnology Information, 2024.26

Figura 6. Tetróxido de ósmio, em (a) estrutura molecular 2D e (b) pictogramas de risco (corrosivo, toxicidade aguda). **Fonte:** National Center for Biotechnology Information, 2024.27

Figura 7. Molde de Incorporação em Micrótomo Escalonado. **Fonte:** Koch Electron Microscopy LTDA (<https://kochelectron.com.br/produto/molde-de-incorporacao-dykstra/>, acesso em 9 jan. 2025).29

Figura 8. Pictogramas de risco do citrato de chumbo, em ordem: irritante, apresenta perigo ambiental, perigo a saúde; e do acetato de uranila que além dos já citados, apresenta risco de intoxicação aguda. **Fonte:** National Center for Biotechnology Information.31

Figura 9. Fórmula estrutural 2D do ácido tânico. **Fonte:** National Center for Biotechnology Information.33

Figura 10. Pictogramas de risco do ácido tânico (irritante). **Fonte:** National Center for Biotechnology Information.33

Figura 11. *Quercus infectoria*, em detalhe sua noz-de-galha, uma das principais fontes de extração de ácido tânico. **Fonte:** Adaptado de Royal Botanic Gardens, Kew. *Plants of the World*. Disponível em: <https://powo.science.kew.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:296305-1>. Acesso em: 17 dez. 2024.....34

Figura 12. Imagem de um flagelo em corte transversal, obtida com o protocolo que utilizava o ácido tânico na solução fixadora (Mizuhira e Futaesaku, 1972)......36

Figura 13. Infográfico adaptado do artigo *The effect of tannic acid on electron images of capillary endothelial cell membranes* (Wagner et al., 1976), que exemplifica a espessura e densidade relativa quando realizada diferentes sequências de fixação-contrastação. Notar que as condições B e E têm resultados similares. Em uma escala crescente de densidade e espessura aparente: linha pontilhada, linha normal e linha em negrito. GA, glutaraldeído, TA, ácido tânico, Os, tetróxido de ósmio, UA, acetato de uranila, Pb, citrato de chumbo.....39

Figura 14. *G. intestinalis* por microscopia eletrônica de varredura (a) e por microscopia eletrônica de transmissão (b). F, flagelos; D, disco ventral; V, vesículas periféricas; A, axonema, N, núcleos. **Fonte:** GADELHA et al., 2022.45

Figura 15. *T. vaginalis* por microscopia eletrônica de varredura (a) e por microscopia eletrônica de transmissão (b). F, flagelos; Ax, axóstilo; H, hidrogenossomos; G, complexo de Golgi; C, costa; Pf, filamentos parabasais, S, filamento sigmóide, N, núcleo.46

Figura 16. Resumo da metodologia de obtenção dos dados do contraste das imagens no *Software Fiji*. (a) Opção do *software* que gera um histograma para cada imagem, e (b) exemplo de histograma com os dados que serão utilizados para a análise estatística.....57

Figura 17. *G. intestinalis* com fixação de 2,5% de glutaraldeído sem (a) e com ácido tânico (b, c, d). Ambos foram pós-fixados com OsO₄ e sem contrastaçoão posterior. Nota-se em (b, c, d) que houve aumento do contraste aparente da membrana plasmática, conteúdo citoplasmático e do envoltório nuclear. F, flagelo; N, núcleo; D, disco ventral.60

Figura 18. *T. vaginalis* fixadas com 2,5% de glutaraldeído sem (a), e com 1% de ácido tânico (b, c, d). Ambas pós-fixadas com OsO₄ e sem contrastaçoão posterior. Nota-se em (b, c, d) que a membrana plasmática, microtúbulos e filamentos associados ao citoesqueleto estão bem delimitados. N, núcleo; H, hidrogenossomos; F, flagelos; V, vacúolo; G, complexo de Golgi; Cb, corpúsculo basal; C, costa.61

Figura 19. *G. intestinalis* fixadas com 2,5% de glutaraldeído sem (a) e com 1% de ácido tânico (b, c, d). Ambas pós-fixadas com OsO₄ e contrastaçoão posterior completa. Notar que houve aumento de eletrondensidade da membrana plasmática (c, d). Setas pretas (d) apontam vesículas periféricas de diferentes diâmetros bem delimitadas. N, núcleo; Cb, corpúsculos basais; DV, disco ventral; F, flagelo.62

Figura 20. *T. vaginalis* fixadas com 2,5% de glutaraldeído sem (a) e com 1% de ácido tânico (b, c, d). Em (d) citoesqueleto isolado. Amostras pós-fixadas com OsO₄ e contração posterior completa. Notar que em (c) o contato de membrana-membrana está com maior eletrondensidade (seta preta,b) e em (d) aparecem estruturas ligadas aos flagelos (setas brancas). N, núcleo; H, hidrogenossomo; F, flagelo; G, complexo de Golgi.63

Figura 21. *G. intestinalis* fixadas com 2,5% de glutaraldeído sem (a) e com 1% de ácido tânico (b). Ambos receberam pós-fixação com OsO₄ e contração posterior apenas com acetato de uranila. Notar em (b) aumento discreto da eletrondensidade dos componentes citoplasmáticos. N, núcleo; Cb, corpúsculos basais.....64

Figura 22. Flagelos (F) de *T. vaginalis*. Em (a) fixadas com 2,5% de glutaraldeído e contraste posterior completo, e em (b) e fixadas com 1% de ácido tânico e contração dos cortes ultrafinos apenas com acetato de uranila. Notar em (b) o aumento da eletrondensidade aparente da membrana plasmática.65

Figura 23. *G. intestinalis* fixadas com 2,5% de glutaraldeído sem (a, c) e com adição de ácido tânico (b, d). As amostras receberam pós-fixação com OsO₄ e contração posterior apenas com citrato de chumbo. Notar em (d) aumento da eletrondensidade do envoltório nuclear. VP, vesículas periféricas; N, núcleo; F, flagelo.65

Figura 24. *T. vaginalis* fixadas com 2,5% glutaraldeído e 1% de ácido tânico (a, b), pós-fixação com OsO₄ e contração dos cortes ultrafinos apenas com citrato de chumbo. Notar boa delimitação da membrana plasmática. Cb, corpúsculos basais; Ax, axóstilo; F, flagelos.....66

Figura 25. *T. vaginalis* (a, b) e *G. intestinalis* (c, d) fixadas com 2,5% glutaraldeído e 1% de ácido gálico, com pós-fixação com OsO₄ e contração posterior completa. Notar bom contraste de todos os elementos citoplasmáticos. Cb, corpúsculos basais; H, hidrogenossomos; C, costa; F, flagelo; G, complexo de Golgi; N, núcleo.67

Figura 26. *G. intestinalis* (a, b) e *T. vaginalis* (c-f) fixadas com 2,5% de glutaraldeído e 1% de ácido tânico, sem pós-fixação com OsO₄ e contração posterior completa. Setas pretas apontam extração do conteúdo citoplasmático, onde se encontrava o glicogênio, como efeito da ausência do OsO₄. Setas brancas apontam complexo de Golgi com eletrondensidade proeminente na região central e distal. Notar em (b, d) que os componentes do citoesqueleto apresentam boa preservação e eletrondensidade. N, núcleo; DV, disco ventral; F, flagelo; H, hidrogenossomos; Cb, corpúsculo basal.68

Figura 27. *G. intestinalis* (a, b) e *T. vaginalis* (c, d) fixadas com 2,5% de glutaraldeído e 1% de ácido tânico, sem pós-fixação com OsO₄, com adição de acetato de uranila durante desidratação e sem contração posterior. As setas indicam a extração do conteúdo citoplasmático onde se encontrava o glicogênio. F, flagelo; N, núcleo; DV, disco ventral; Cb, corpúsculos basais; H, hidrogenossomo.....70

Figura 28. Elementos do citoesqueleto de *G. intestinalis* (a) e *T. vaginalis* (b) fixadas com 2,5% de glutaraldeído e 1% de ácido tânico, sem pós-fixação com OsO₄, com acetato de uranila durante a desidratação, e contração posterior completa. As setas indicam estruturas associadas aos corpúsculos basais (Cb). DV, disco ventral.

.....71

Figura 29. *G. intestinalis* fixadas com 2,5% de glutaraldeído e 1% de ácido tânico, sem pós-fixação com OsO₄, adição de ferrocianeto de potássio e acetato de uranila durante a desidratação, com contração posterior ausente (a, b) e completa (c, d). As setas indicam pontos eletrodensos na membrana plasmática. N, núcleo; F, flagelo; Cb, corpúsculo basal; DV, disco ventral.

.....72

Figura 30. *G. intestinalis* (a, b) e *T. vaginalis* (c, d) fixadas com 2,5% de glutaraldeído e 1% de ácido tânico, sem pós-fixação com OsO₄, adição de permanganato de potássio e acetato de uranila na etapa de desidratação, com contração posterior ausente (a, c) e completa (b, d). Notar em (a) os componentes celulares sem definição, e em (b), com contração completa já há definição (setas). F, flagelo; H, hidrogenossomo; V, vacúolo; N, núcleo; C, costa; G, complexo de Golgi.

.....74

Figura 31. *G. intestinalis* (a) e *T. vaginalis* (b) fixadas com 2,5% de glutaraldeído e 1% de ácido tânico, pós-fixação com verde malaquita e contração posterior completa. Notar que a qualidade geral da preservação foi pior em *T. vaginalis* (b). F, flagelo; H, hidrogenossomo; V, vacúolo; N, núcleo; C, costa.

.....75

Figura 32. *G. intestinalis* (a) e *T. vaginalis* (b) com contração posterior apenas por ácido tânico. Notar que a membrana plasmática e a membrana de organelas estão delimitadas. N, núcleo; Cb, corpúsculo basal; A, axonema; G, complexo de Golgi; F, flagelo.

.....76

Figura 33. *G. intestinalis* (a) e *T. vaginalis* (b) com contração posterior de ácido tânico e acetato de uranila. Notar que a membrana plasmática e demais componentes celulares com bom contraste. VP, vesículas periféricas; N, núcleo; DV, disco ventral; Cb, corpúsculo basal; F, flagelo.

.....77

Figura 34. *G. intestinalis* (a, b) e *T. vaginalis* (c, d) com contração posterior com ácido tânico e citrato de chumbo. A seta em (d) indica contato célula-célula. Notar que a contração foi satisfatória para todos os elementos celulares observados. N, núcleo; F, flagelo; G, complexo de Golgi.

.....78

Figura 35. Análise da área sob a curva normalizada pela porcentagem (%AUC), realizado teste t não pareado e paramétrico. Em (a, b, c) não houve diferença significativa entre os pontos de distribuição de intensidade. Notar que em (d) a presença do ácido tânico associado ao citrato de chumbo, intensificou o contraste de maneira significativa (*). Ctrl, processamento controle; AT, processamento com ácido tânico; ns, não significativo.

.....79

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Tabela com todas as combinações de metodologias que foram testadas neste trabalho com os protozoários *Giardia intestinalis* e *Trichomonas vaginalis*.55

Tabela 2. Resumo dos resultados obtidos a partir dos protocolos testados em *Giardia intestinalis* e *Trichomonas vaginalis*.....80

Tabela 3. Cotação dos valores dos reagentes em dezembro de 2024.89

1. INTRODUÇÃO

A microscopia eletrônica teve suas origens nos anos 1930, quando Ernst Ruska e Max Knoll na Alemanha, desenvolveram o primeiro protótipo de microscópio eletrônico (Fig. 1a). O microscópio eletrônico de transmissão (MET) foi concebido com base na capacidade dos elétrons de alcançar comprimentos de onda extremamente curtos, permitindo a visualização de detalhes em escala nanométrica. Em 1932, o primeiro MET funcional foi construído, marcando o início de uma revolução na análise de estruturas com resolução (KNOLL e RUSKA, 1932; HAWKES, 1985).

Inicialmente utilizado em aplicações físicas e materiais, o MET logo despertou interesse na biologia, especialmente para explorar as estruturas celulares em detalhes jamais vistos. Na década de 1940, cientistas como George Palade, Albert Claude e Keith Porter adaptaram o MET para o estudo de amostras biológicas, abrindo caminho para o entendimento da ultraestrutura celular (PALADE, 1952; CLAUDE, 1943; PORTER e BLUM, 1953). A primeira micrografia registrada de uma célula foi capturada sob circunstâncias pioneiras (Fig. 1b), usando métodos rudimentares de preparação de amostras (PORTER et al., 1945), com o crescimento direto sobre grade de ouro sem seccionar. Apenas em 1953, com a invenção do ultramicrotomo por Porter-Blum (Fig. 1c), foi possível realizar cortes ultrafinos de amostras biológicas, permitindo maior detalhamento das organelas celulares (PORTER e BLUM, 1953). Desde então, o processamento de amostras biológicas é amplamente executado em estudos de biologia celular utilizando técnicas de MET (BOZZOLA e RUSSEL, 1992; HADDAD et al. 2007).

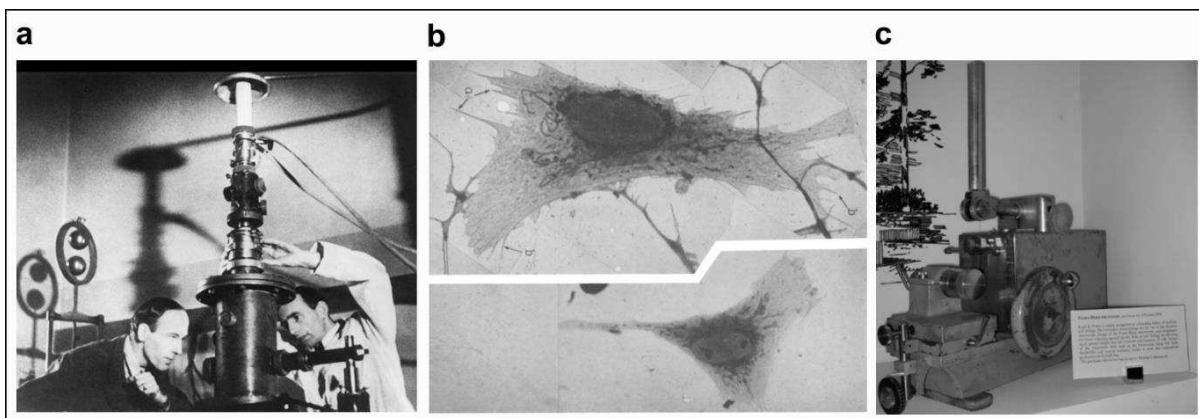


Figura 1. Histórico da microscopia eletrônica. Em (a) Ruska e Knoll e o primeiro microscópio eletrônico, (b) primeira fotografia de microscopia eletrônica de transmissão de uma célula, registrada por Porter e em (c) o primeiro ultramicrotomo de Porter-Blum. **Fonte:** Adaptado de Max Planck Institute for Multidisciplinary Sciences (<https://www.nobel.mpg.de/en/ernst-ruska>), PORTER et al. (1945) e The Rockefeller University (<https://digitalcommons.rockefeller.edu/tools-for-discovery/44/> acesso em 17 dez. 2024).

O MET (Fig. 2) utiliza um feixe de elétrons, para formar imagens. O feixe é gerado por uma fonte, geralmente um filamento de tungstênio e acelerado por um alto potencial elétrico. As lentes eletromagnéticas, que são campos magnéticos controlados, concentram o feixe de elétrons e controlam seu direcionamento ao longo do microscópio, permitindo o ajuste da imagem e a ampliação da amostra. Esse feixe de elétrons passa através de uma amostra ultrafina, interagindo com ela e sendo parcialmente absorvido ou transmitido. A imagem gerada no MET é formada a partir das diferentes intensidades dos elétrons transmitidos pela amostra, que variam conforme a densidade e a composição da amostra. As áreas mais densas absorvem mais elétrons, aparecendo mais escuras, enquanto as áreas menos densas transmitem mais elétrons, resultando em regiões mais claras.

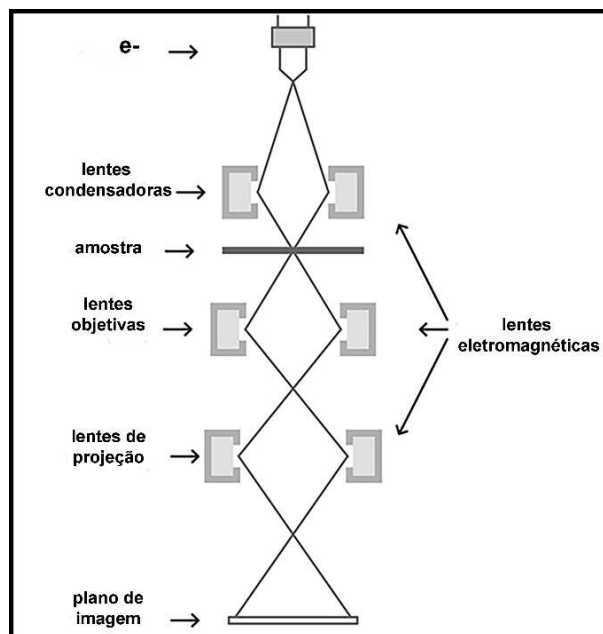


Figura 2. Esquema do funcionamento geral de um microscópio eletrônico de transmissão. **Fonte:** Adaptado de ANANTHAPADMANABAN, 2018.

O contraste em microscopia eletrônica é um elemento fundamental para a identificação e a interpretação de detalhes estruturais das amostras analisadas. Esse parâmetro refere-se à diferença de intensidade entre regiões claras e escuras de uma imagem, sendo influenciado não apenas pelos valores extremos de brilho (máximos e mínimos de cinza), mas também pela distribuição espacial dessas regiões. A análise quantitativa do contraste pode ser realizada por meio do histograma de valores de cinza, o qual reflete a frequência de ocorrência de cada nível de brilho na imagem. Imagens com alto contraste apresentam histogramas amplos, com uma maior dispersão dos valores ao longo da faixa dinâmica disponível e picos de menor altura, enquanto imagens de baixo contraste exibem histogramas mais estreitos e concentrados, caracterizados por picos mais altos decorrentes da predominância de tonalidades similares (Fig. 3) (OBERHOLZER et al., 1996).

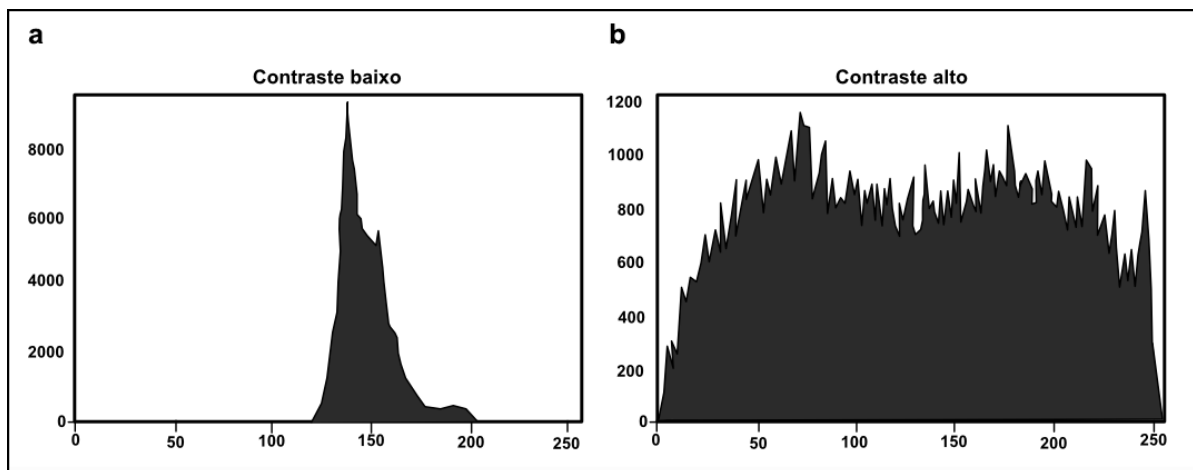


Figura 3. Exemplos de histogramas de contraste de uma imagem de microscopia eletrônica de transmissão, mostrando os pontos distribuídos entre o preto e o branco. Em (a) uma imagem com contraste baixo, e em (b) com contraste alto. **Fonte:** Adaptado de Evident Scientific (<https://evidentscientific.com/en/microscope-resource/knowledge-hub/digital-imaging/digitalimagebasics>) e The AI Learner (<https://theailearner.com/tag/high-contrast-image>) acesso em 17 dez. 2024).

A melhoria do contraste é frequentemente necessária em imagens obtidas por microscopia eletrônica para facilitar a interpretação dos dados. Técnicas como a expansão da escala de brilho permitem redistribuir os níveis de cinza, ampliando a faixa dinâmica utilizada e, conseqüentemente, destacando as diferenças de intensidade. Métodos mais sofisticados, como a equalização de histograma, promovem uma redistribuição não linear dos valores de cinza, visando maximizar o contraste perceptível ao realçar diferenças sutis entre regiões adjacentes.

1.1. Processamento de amostras: Microscopia Eletrônica de Transmissão

A preparação das amostras para a microscopia eletrônica é delicada e cada etapa do protocolo afeta a qualidade final das imagens obtidas, portanto, é necessário conhecer as características de cada tipo celular, para entender e melhorar a técnica. O objetivo do processamento de amostras para a microscopia eletrônica é fazer com que o material biológico que contém água e que naturalmente não apresenta contraste, devido seus elementos de baixo número atômico, seja bem fixado, próximo ao seu estado *in vivo* e observado ao microscópio eletrônico que opera em vácuo, preservando da forma mais fiel possível suas características originais.

O processamento de amostras para MET é dividida nas seguintes etapas: a) fixação, b) pós-fixação, c) desidratação, d) infiltração e inclusão em resina, que será polimerizada na estufa, f) ultramicrotomia e g) contrastação (Fig. 4).

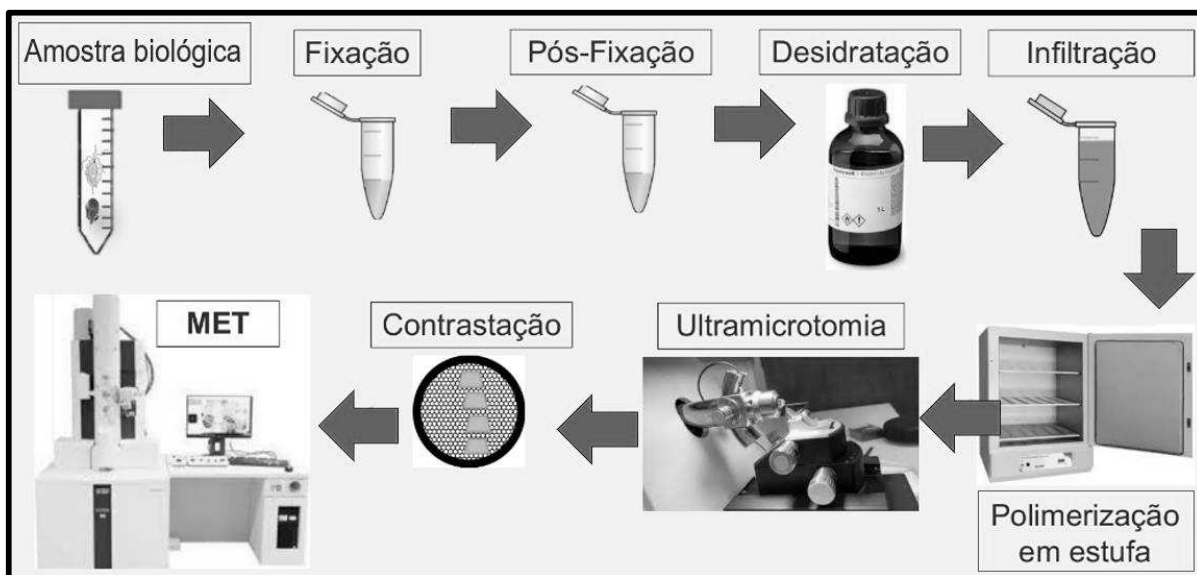


Figura 4. Esquema do processamento de amostras biológicas para MET. As amostras são fixadas, pós-fixadas, desidratadas, infiltradas em resina e incluídas para posterior obtenção de cortes ultrafinos. **Fonte:** Acervo próprio.

1.1.1. Fixação

O propósito da fixação é preservar a estrutura da célula sem que haja extração ou deformação dos componentes, ou mesmo autólise. Essa etapa pode ser por um método físico como a criofixação, no qual se faz o congelamento rápido ou ultrarrápido da amostra com auxílio ou não de crioprotetores, visando à vitrificação que é a passagem da água presente nas células do estado líquido direto para o estado sólido, sem formação de cristais que possam danificar as estruturas (DUBOCHET et al., 1988).

Por outro lado, no método de fixação química (que será o foco deste trabalho), são utilizados fixadores químicos para estabilizar as proteínas, lipídeos e açúcares sem que precipitem ou percam sua estrutura original, além de protegerem tais componentes celulares nas próximas etapas do processamento (como na desidratação por solvente orgânico). Utilizar glutaraldeído (GA) como fixador de proteínas e açúcares é comum na maioria dos laboratórios, desde a elaboração do protocolo por Sabatini et al. (1973). Apresenta ótimas propriedades como fixador

aditivo e não coagulante observadas quando não está na sua forma polimerizada. O GA é eficaz em uma ampla faixa de variação de pH e se mantém estável em ambiente alcalino. No entanto, em pH abaixo de 3,5 apresenta má ação fixadora (SESSO, 2011).

O glutaraldeído ($C_5H_8O_2$) (Fig. 5) é um dialdeído de baixo peso molecular, o que confere sua capacidade de fazer ligações cruzadas inter e intramoleculares com as proteínas (*National Center for Biotechnology Information*, 2024). Apresenta uma penetração em amostras de tecido de menos de 1 milímetro por hora, aproximadamente. Como um fixador aditivo, é incorporado irreversivelmente às estruturas da amostra, a concentração de GA na solução fixadora diminui com o tempo. O GA reage com o grupo amino (NH_2) das proteínas, principalmente da lisina, mas também com outras cadeias laterais das cadeias polipeptídicas, além de fixar açúcares, como os encontrados no glicocálice (BOZZOLA e RUSSEL, 1992; KIERNAN, 2000).

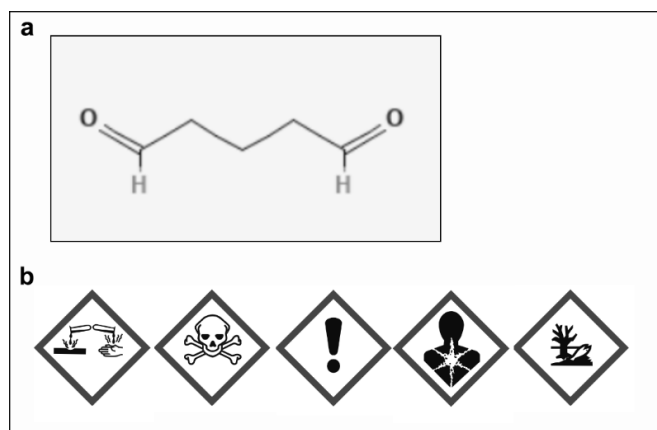


Figura 5. Glutaraldeído, em (a) estrutura molecular 2D e (b) pictogramas de risco (corrosivo, toxicidade aguda, irritante e risco a saúde e ao meio ambiente). **Fonte:** *National Center for Biotechnology Information*, 2024.

1.1.2. Pós-fixação

Na pós-fixação é usado o tetróxido de ósmio (OsO_4) que foi um dos primeiros fixadores utilizados para processamento de amostras biológicas (PALADE, 1952). Assim como o GA, sua concentração na solução fixadora diminui ao longo do tempo, pois se incorpora irreversivelmente às estruturas biológicas. Seu tempo de penetração é mais lento que o GA, porém, após 2 horas de exposição, o OsO_4 provoca extração proteica. O OsO_4 uma molécula simétrica apolar, com alto peso molecular (254,23

g/mol), o que impede coagulação e ruptura de lipoproteínas, conferindo contraste e eletrondensidade aos fosfolípidos que constituem a membrana plasmática, ligando-se aos ácidos graxos insaturados (HADDAD et al., 2007). É reconhecido também como um mordente, porém seu mecanismo químico geral de ação ainda não está completamente descrito (SESSO, 2011). Um mordente aumenta a afinidade entre um contrastante e o substrato, formando um complexo que facilita a ligação de proteínas à outras macromoléculas (KELLOG et al, 1986; AFZELIUS, 1992; BENLI, 2024).

O OsO_4 é comumente utilizado em conjunto com o ferrocianeto de potássio $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ pois a combinação ajuda a preservar as membranas e outras estruturas lipídicas. O $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ atua como um agente redutor, e participa na formação de complexos com lipídios insaturados, estabilizando as membranas e auxiliando à ação do OsO_4 em conferir contraste (WU et al., 2019).

Segundo a Ficha de Informações de Segurança de Produtos Químicos - FISPQ (de acordo com a NBR 14725-4:2014) (ABNT, 2014) o tetróxido de ósmio é nocivo se ingerido ou se inalado, tóxico e causa irritação em contato com a pele, provoca irritação ocular grave e pode causar morte dependendo da quantidade do reagente exposto ao contato (Fig. 6).

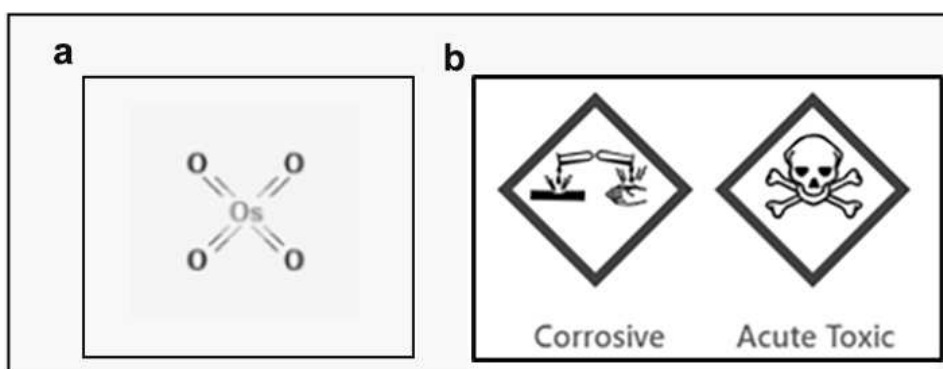


Figura 6. Tetróxido de ósmio, em (a) estrutura molecular 2D e (b) pictogramas de risco (corrosivo, toxicidade aguda). **Fonte:** National Center for Biotechnology Information, 2024.

O OsO_4 deve ser manuseado com extremo cuidado por ser tóxico e volátil e apresentar riscos para quem o manipula, ou para quem está exposto a seus vapores (HAYAT, 1981). Pode causar irritação e graves lesões nos olhos, boca, faringe e mucosas (AIHA, 1968; MCLAUGHLIN et al., 1946). Segundo o “*safety data sheet*” (Sigma-Aldrich, 2024), a estimativa de toxicidade aguda se ingerido é de 375 mg/kg,

para a inalação é no tempo de exposição de quatro horas de 1,27 mg/l e de contato dérmico 127,5 mg/kg.

Segundo a Norma Brasileira ABNT NBR 10004 (ABNT, 2004), que diz respeito a Classificação de Resíduos sólidos, o OsO_4 é uma substância que confere periculosidade aos resíduos. Soluções contendo OsO_4 podem se tornar mais seguras quando em contato com sulfito de sódio, etanol ou, uma opção mais simples, óleos vegetais, que permitem produzir dióxido de ósmio insolúvel. Os resíduos contendo ósmio devem ser colocados em um recipiente bem fechado, rotulado e manuseados de acordo com as diretrizes de descarte de resíduos da sua instituição (*National Research Council*, 1995).

Não há antídotos específicos para a intoxicação por OsO_4 . Em acidentes envolvendo pequenas quantidades desse composto, com contato ocular e dérmico, pode ocorrer ardência nas áreas afetadas e o aparecimento de manchas escurecidas, mesmo após a lavagem prolongada do local (FRIEDOVA et al., 2020). Em casos de absorção dérmica, a dosagem de ósmio na urina é um método utilizado para acompanhamento clínico. De acordo com Friedova et al. (2020), a concentração de ósmio na urina sofre decréscimo ao passar das horas, sugerindo que, embora haja absorção dérmica, o composto é rapidamente eliminado pelo organismo. Assim, o uso de equipamentos de proteção individual, como máscara, óculos, luvas e jaleco, bem como medidas de proteção coletiva, como o uso de capela de exaustão, é fundamental durante a manipulação do OsO_4 .

O OsO_4 foi considerado arma química em potencial por um grupo de pesquisa israelense (MAKAROVSKY et al., 2007). Seu possível uso foi reportado em Londres, onde uma associação terrorista foi interceptada e planejavam usar o OsO_4 em bombas caseiras, para possíveis ataques em diferentes pontos da cidade (MAKAROVSKY et al., 2007). Atualmente, o transporte de OsO_4 em aviões é proibido, portanto é transportado por navios.

1.1.3. Desidratação

O etanol ou a acetona são os solventes orgânicos usualmente usados nessa etapa de transição que visa a substituir gradualmente a água por um líquido miscível

na resina de inclusão, que é geralmente hidrofóbica (BENCHIMOL et al., 1996). As amostras são submetidas a concentrações crescentes de etanol ou acetona dissolvidos em água até a concentração do reagente absoluto.

1.1.4. Infiltração e Inclusão em resina

O feixe de elétrons do microscópio eletrônico de transmissão normalmente não seria capaz de atravessar células inteiras devido à sua espessura. Células menores e porções mais delgadas de células maiores podem ser visualizadas em determinadas circunstâncias como visto na primeira micrografia de microscopia eletrônica de uma célula, realizada por Porter e seu grupo, que mostrava o citoplasma às margens da membrana celular, região do córtex celular, de células semelhantes a fibroblastos e fibras nervosas de tecido embrionário de galinhas (PORTER et al., 1945).

Após a etapa de desidratação, as células são lentamente infiltradas em uma resina e, posteriormente, colocadas em um molde de silicone (Fig. 7), que é polimerizada respeitando o tempo e a temperatura adequados. A polimerização em resina confere rigidez à amostra, formando um pequeno bloco, permitindo a secção em cortes ultrafinos por um ultramicrotomo. A resina deve ser resistente à incidência dos elétrons do feixe. A resina mais comumente utilizada é do tipo epóxi e possui características hidrofóbicas (HADDAD et al., 2007).



Figura 7. Molde de Incorporação em Micrótomo Escalonado. **Fonte:** Koch Electron Microscopy LTDA (<https://kochelectron.com.br/produto/molde-de-incorporacao-dykstra/>, acesso em 9 jan. 2025).

1.1.5. Ultramicrotomia

O bloco polimerizado contendo as células processadas é levado ao ultramicrotomo que realiza os cortes ultrafinos com uma navalha de vidro ou de diamante. A espessura dos cortes é importante, pois vai determinar a interação com o feixe, o que influenciará na qualidade e resolução da imagem. A espessura para MET convencional idealmente está na faixa de 50-70 nanômetros (nm) e apresenta cor de interferência cinza-prateada (PEACHEY, 1958). A cor gerada está relacionada à espessura dos cortes, funcionando como uma medida visual. Seções com 50 nm de espessura aparecem prateadas, enquanto as de 100 nm ficam douradas, e as mais espessas apresentando uma variedade de cores, como azul e roxo (SAKAI, 1980).

1.1.6. Contrastação

Os cortes são posicionados em grades com 3 milímetros de diâmetro. Na rotina convencional, essas grades são geralmente de cobre, embora possam ser confeccionadas em níquel, especialmente para imunomarcação, ou em ouro e nylon, quando utilizadas para cultivo celular. Após essa etapa, os cortes devem ser contrastados. O contraste é realizado com acetato de uranila a 5% em água, por 20 minutos, seguido de citrato de chumbo a 1% por 3 minutos.

O acetato de uranila se liga aos grupos aminos livres das amostras, o que confere sua maior afinidade com ácidos nucleicos do que com proteínas, e grupos carboxilas (LOMBARDI et al., 1970), possibilitando o contraste positivo aos cortes ultrafinos. Se a grade não for cuidadosamente lavada e houver resquícios desse reagente, a amostra pode apresentar artefatos. A fim de evitar a precipitação, a contração deve ser realizada em câmara úmida. Cristais de acetato de uranila são eletrodensos e, portanto, incompatíveis com uma boa imagem. Esse reagente precipita na presença de fosfato, então não se deve usar PBS (solução salina tamponada com fosfato, do inglês *phosphate buffered saline*) antes ou após a contração. O acetato de uranila (Fig. 8) apresenta riscos à saúde, ao ambiente e pode causar toxicidade aguda quando em concentrações maiores (*National Center for Biotechnology Information*, 2024).

A solução de citrato de chumbo é feita na presença de nitrato de chumbo e citrato de sódio em água, e é relativamente estável, com pH 12. Em contato com CO₂, o chumbo pode precipitar, o que justifica o cuidado de armazenar a solução sempre

lacrada e, caso apareçam precipitados, deve-se descartá-la (REYNOLDS, 1963). O citrato de chumbo é usado para contrastar as membranas e glicogênio por, provavelmente, formar pontes de hidrogênio entre chumbo-polímeros de glicose. Em pH alcalino, é capaz de transferir o íon chumbo para locais da amostra onde contém cisteína (SILLEN e MARTELL, 1965). O citrato de chumbo é irritante, e apresenta perigo ambiental, perigo à saúde (Fig. 8), e pode causar doenças ocupacionais associadas à exposição ao composto (*National Center for Biotechnology Information*, 2024; FITZPATRICK, 2004).

A preparação da solução de citrato de chumbo pode levar algumas horas, pois seu protocolo envolve dissolver 0,665 g de nitrato de chumbo em 15 ml de água destilada recém fervida e resfriada e em 5 ml dissolver 0,88 g de citrato de sódio. As duas soluções são misturadas em um balão volumétrico de 50 ml, sob leve agitação por 30 min, até formar um líquido branco. Posteriormente, adicionar lentamente 4 ml de hidróxido de sódio a 1N até a solução ficar transparente, e por fim, avolumar para 50 ml com água destilada recém fervida e resfriada (HADDAD et al., 2007). O envase deve ser feito rapidamente em microtubos de no máximo 250 microlitros, e armazenados lacrados, para evitar o contato com CO₂.



Figura 8. Pictogramas de risco do citrato de chumbo, em ordem: irritante, apresenta perigo ambiental, perigo à saúde; e do acetato de uranila que além dos já citados, apresenta risco de intoxicação aguda. **Fonte:** *National Center for Biotechnology Information*.

1.2. Taninos

Taninos são compostos polifenólicos de origem vegetal, conferem gosto adstringente às frutas, e são usados tradicionalmente para tratar a pele de animais em curtumes para evitar o apodrecimento (FALCÃO e ARAÚJO, 2018). Interação com as fibras do colágeno e as estabilizam, preservando assim o couro, além de apresentarem características antibacterianas (COVINGTON, 2009). Os taninos têm

peso molecular entre 500 e 5000 Da (daltons) e podem ser classificados em taninos hidrolisáveis, que são ésteres, geralmente, contendo D-glucose, ácido gálico e seus derivados, e proantocianidinas condensadas. Sua principal característica é formar um complexo com proteínas, polissacarídeos e alcalóides (HASLAM, 1989).

As proantocianidinas são comumente responsáveis pela gama de reações geralmente atribuídas aos taninos em plantas, porém a maioria do conhecimento adquirido se deu através do estudo de uma série de ésteres biossinteticamente inter-relacionados de ácido gálico. Os taninos condensados ou proantocianidinas são mais homogêneos e diferem sistematicamente em seu conteúdo fenólico, tamanho molecular, solubilidade e conformação. São polímeros e oligômeros de catequinas (flavonóis) com capacidade de liberar antocianidinas após a clivagem das ligações entre flavonóis em condições ácidas e oxidativas (HASLAM, 1989).

Os taninos hidrolisáveis são divididos em dois grupos: a) galatoninas e b) elagitaninos. As galatoninas formam ácido gálico após hidrólise, são polímeros formados quando um monômero polifenólico esterifica e se liga ao grupo hidroxila de um carboidrato poliálcool, como a glicose. Elagitaninos formam ácido elágico após hidrólise, a partir da ligação oxidativa de grupos galóil em 1,2,3,4,6-pentagalóil glicose (WATRELOT e NORTON, 2020).

1.3. Ácido tânico

A fórmula molecular do ácido tânico (Fig. 9) é $C_{76}H_{52}O_{46}$ e seu peso molecular é 1.701,19 g/mol. Seu nome, segundo a União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC), é: [2,3-dihydroxy-5-[[[(2R,3R,4S,5R,6S)-3,4,5,6-tetrakis[[[3,4-dihydroxy-5-(3,4,5-trihydroxybenzoyl)oxybenzoyl]oxy]oxan-2-yl]methoxycarbonyl]phenyl]3,4,5-trihydroxybenzoate (National Center for Biotechnology Information, 2023). Quando sólido, o ácido tânico apresenta tom amarelo claro, até marrom claro, com leve odor e sabor adstringente. É solúvel em água, etanol e acetona. É insolúvel em éter, benzeno, clorofórmio e dissulfeto de carbono. Atinge ponto de fusão em 200 °C (National Center for Biotechnology Information, 2023).

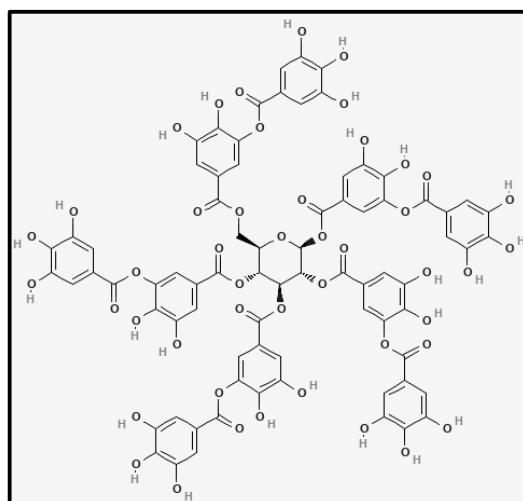


Figura 9. Fórmula estrutural 2D do ácido tânico. **Fonte:** *National Center for Biotechnology Information*.

O uso de galatoninas de baixo peso molecular, como o ácido tânico, em amostras que foram previamente fixadas com aldeídos e OsO_4 leva a uma melhora geral do contraste, delimitando estruturas intra e extracelulares, apresentando penetração satisfatória. Agem como um mordente entre as estruturas tratadas com OsO_4 , e com o citrato de chumbo. Estabilizam as estruturas contra a extração de componentes celulares durante as etapas de desidratação e inclusão em resina (SIMIONESCU e SIMIONESCU, 1976).

O ácido tânico é considerado irritante (Fig. 10) e, no caso de inalação, provoca irritação no nariz e na garganta, tosse e espirros. A ingestão pode causar distúrbios gástricos. O contato com os olhos provoca irritação. Esse ácido se decompõe a 210°C , formando dióxido de carbono e pirogalol, os quais podem gerar vapores irritantes. Apesar disso, não há evidências de ser um composto carcinogênico para humanos (*National Center for Biotechnology Information*, 2024; USCG, 1999).



Figura 10. Pictogramas de risco do ácido tânico (irritante). **Fonte:** *National Center for Biotechnology Information*.

O ácido tânico está presente em nozes, maçãs, uvas, diversas fontes vegetais e age como barreira natural contra insetos, patógenos e animais, por conta da sua capacidade de reagir com proteínas e ações antioxidantes. Carvalhos do gênero *Quercus spp* são a principal fonte de extração desse reagente. Por exemplo, *Quercus infectoria* (Fig. 11) de origem turca ou chinesa, em decorrência do contato com algum parasito, como danos causados pelo inseto *Cynips gallae tinctoriae*, produz protuberâncias esféricas no tecido vegetal, denominada noz-de-galha ou *nutgall* em inglês. Podem variar em tamanho, forma e composição, dependendo do agente causador. Essas excrecências patológicas são esverdeadas ou acastanhadas, amargas, adstringentes, rígidas e compactas, podem ser formadas nos ramos ou folhas. Essas nozes são constituídas de 40 – 70% de galatoninas e são matérias-primas para obter o ácido tânico (HOWES, 1953).

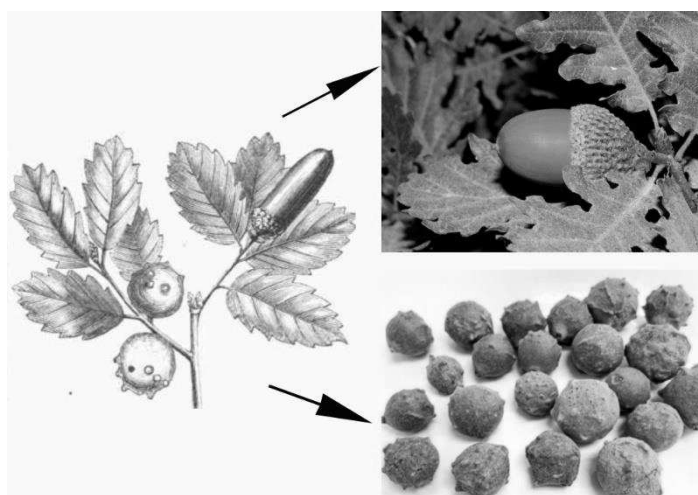


Figura 11. *Quercus infectoria*, em detalhe sua noz-de-galha, uma das principais fontes de extração de ácido tânico. Fonte: Adaptado de Royal Botanic Gardens, Kew. *Plants of the World*. Disponível em: <https://powo.science.kew.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:296305-1>. Acesso em: 17 dez. 2024.

O ácido tânico apresenta capacidade de reagir com íons de metais, interferir em processos biológicos e apresentar citotoxicidade ao nível celular, pelo fato de que precipitam proteínas, impedem interações entre ligantes e receptores, bloqueando efeitos enzimáticos (BROWN e SHELLY, 2011). Proteínas ricas em prolina interagem de maneira mais efetiva com as galatoninas (BAXTER et al., 1997). O ácido tânico causa desequilíbrio da microbiota gastrointestinal em ratos (SAMANTA et al, 2004). O consumo diário médio de ácido tânico em humanos deve ser de 1500 - 2500 mg e se

esse limite for ultrapassado pode ocasionar danos à saúde (RAO e PRABHAVATHI, 1982).

Tradicionalmente, o ácido tânico é empregado no processamento do couro com o intuito de suprimir o odor e conferir maior maleabilidade, facilitando assim a produção de calçados, bolsas e outros artigos (SHAFIQ et al., 2021). É usado como fixador-mordente em microscopia e foi estudado sua interação com diversos microrganismos (BALDWIN e BOOTH, 2022). Apresenta característica antiviral e antifúngica por conta da sua capacidade de formar pontes de hidrogênio (ligação entre o hidrogênio e átomos de elementos altamente eletronegativos como oxigênio e nitrogênio) com os receptores que reconhecem tais microrganismos, dificultando a ligação, a penetração e a contaminação célula-célula. Porém, não impede a replicação viral, indicando que o ácido tânico age ao nível de membrana plasmática (BALDWIN e BOOTH, 2022).

O ácido tânico também é considerado uma matéria prima promissora para biomateriais. É como um bloco de construção natural, devido à sua capacidade de realizar ligações supramoleculares, covalentes e não covalentes. Garante a elaboração de redes poliméricas funcionais e versáteis para diversas aplicações, como materiais para regeneração óssea, adesivos para pele, curativos e veículo para quimioterápicos (CHEN et al., 2022).

1.4. Ácido tânico na microscopia eletrônica de transmissão

O ácido tânico foi introduzido como um mordente na microscopia eletrônica por Mizuhira e Futaesaku (1972) que demonstraram que esse ácido apresenta alta afinidade pelo colágeno (MIZUHIRA et al., 1976). Adicionado ao glutaraldeído e seguido pelo OsO₄ precipita proteínas, polipeptídios (que contenham mais de 9 aminoácidos), alcaloides e cátions metálicos. Os autores publicaram uma imagem de corte transversal de flagelo (Fig. 12), onde era possível identificar cada protofilamento dos microtúbulos, com um aspecto de contrastação negativa (Mizuhira e Futaesaku, 1972). O protocolo sugerido pelos autores consistia em usar uma solução fixadora contendo 2% ácido tânico, 2,5% glutaraldeído, 1,7% sulfato de sódio em tampão Veronal acetato, por 90 minutos. Em seguida, lavagens no mesmo tampão na presença de sacarose 8% (Mizuhira e Futaesaku, 1972).

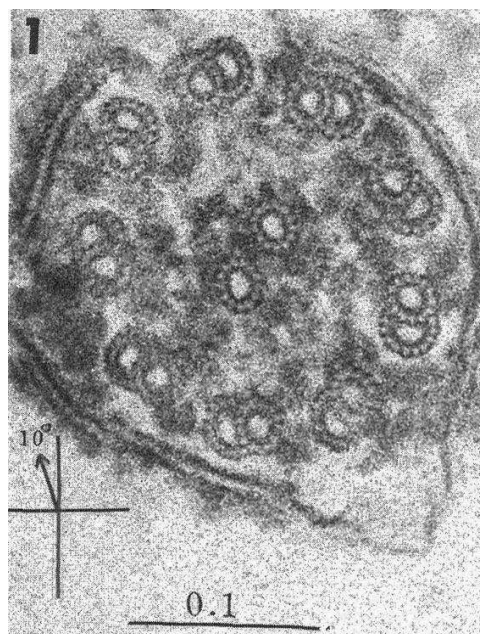


Figura 12. Imagem de um flagelo em corte transversal, obtida com o protocolo que utilizava o ácido tânico na solução fixadora (Mizuhira e Futaesaku, 1972).

Desde então o método utilizando ácido tânico como mordente no fixador foi amplamente utilizado em diversos tipos celulares. Diversas amostras biológicas, como sarcolema, túbulos-T e cavéolas subsarcolemais (LEESON, 1978), aparelho mitótico (FUGE, 1981), blastóporos de *Candida albicans* (PERSI e BURNHAM, 1981), junções isoladas de músculo esquelético (BRUNSCHWIG et al, 1982), periplasma de bactérias gram-negativas (BAL e RAMASWAMY, 1987), entre outras; foram analisadas com o referido método, demonstrando a versatilidade do reagente em materiais biológicos com diferentes características.

Utilizando o protocolo de Mizuhira e Futaesaku (1972), um grupo de pesquisadores evidenciou os 13 protofilamentos que constituem os microtúbulos (TILNEY et al., 1973). Os autores utilizaram sete tipos celulares diferentes, tais como axonemas de heliozoários (protistas), aparelho mitótico, axóstilo contrátil, microtúbulos repolimerizados de cérebro de galinha, par central de microtúbulos de flagelo e corpúsculo basal (TILNEY et al., 1973). Os protofilamentos seriam fixados pelo glutaraldeído, produzindo efeito de contrastação negativa. Adicionalmente, reportaram que as subunidades seriam visualizadas em cortes mais finos se usassem 8% de ácido tânico na solução fixadora, mas caso utilizassem 1% de ácido tânico, seria necessário cortes um pouco mais espessos para distinguir claramente as subunidades (TILNEY et al., 1973).

Utilizando o protocolo de Tilney et al. (1973) seguiram-se artigos onde puderam ser observados os 13 protofilamentos dos microtúbulos sub-peliculares de epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* e promastigotas de *Herpetomonas samuelpeessoai* (SOARES e DE SOUZA, 1977). Além disso, membranas internas, como de mitocôndrias, retículo endoplasmático, complexo de Golgi etc., se apresentaram com contrastação negativa oferecendo o mesmo aspecto visto nas células fixadas com glutaraldeído sem a etapa de pós-fixação com OsO₄. Os autores relataram que a face externa da membrana plasmática e regiões de contato entre células se apresentaram com eletrondensidade pronunciada (SOARES e DE SOUZA, 1977).

Quando *Tritrichomonas foetus* foi fixada em glutaraldeído contendo ácido tânico, detalhes do complexo de Golgi foram revelados, tais como a presença de pontes discretas entre as cisternas estreitamente apostas (DÍAZ et al., 1996), corroborando com resultados prévios, obtidos por congelamento rápido seguido de criofratura com *deep-etching* por Benchimol et al. (1982), que observou pontes no lúmen das cisternas do Golgi deste protozoário, conectando as duas faces das cisternas em células intactas. A combinação de ácido tânico-glutaraldeído-formaldeído-tetróxido de ósmio foi utilizada para intensificar a contrastação-fixação em *Trichomonas vaginalis* (WEXLER-COHEN, 2013).

Diversos pesquisadores utilizaram o ácido tânico no processamento de *Giardia intestinalis* para MET. Na solução fixadora de glutaraldeído na presença de 8% de ácido tânico, Holberton (1981) observou com clareza o arranjo de microfita do disco ventral, estrutura composta por microtúbulos, localizada da região anterior desse protozoário. Peattie (1990) utilizou preparados de citoesqueleto de *G. intestinalis*, contendo disco ventral e flagelos, após tratamento com detergentes e fixou com glutaraldeído na presença de 1% de ácido tânico, para visualizar detalhes mais finos destas estruturas. Com a finalidade de melhor visualizar os axonemas dos flagelos caudais e microtúbulos da região posterior desse protozoário, o autor adicionou 1% de ácido tânico em PBS (CARVALHO e MONTEIRO-LEAL, 2004).

Para verificar a eficácia do ácido tânico em gerar contraste e como ele se comportaria na presença e ausência de outros reagentes usados no processamento

de amostras biológicas para MET, Wagner et al. (1976) testaram protocolos variados em células endoteliais e analisaram o aspecto das membranas de organelas e da membrana plasmática. A fixação foi feita na presença de 2,5% glutaraldeído e, quando realizada a pós-fixação, o OsO_4 foi utilizado como de rotina, na concentração de 1%.

O protocolo no qual o ácido tânico foi usado como um terceiro fixador, após o OsO_4 , e os cortes receberam o esquema de contrastação padrão, na presença de acetato de uranila e citrato de chumbo, houve aumento aparente na espessura e eletrondensidade das membranas internas, tais como: do retículo endoplasmático, do envelope nuclear, de mitocôndrias e dos dois folhetos da membrana plasmática (Fig. 12) (WAGNER et al., 1976).

Outro fato relevante consistiu na observação de que, em duas condições diferentes, as membranas de organelas e a membrana plasmática exibiram aspectos semelhantes (Fig. 13, condição B e E). O folheto externo da membrana plasmática com aparente aumento em espessura e em eletrondensidade, e as membranas do retículo endoplasmático, envoltório nuclear e mitocôndrias apresentando contraste semelhante ao processamento padrão para MET. Ambas as condições utilizaram o ácido tânico juntamente com o glutaraldeído na etapa de fixação e os cortes receberam a contrastação de rotina, e somente em uma dessas condições foi realizada a pós-fixação com o OsO_4 , o que levou a discussão da possível substituição desse reagente, o que o nosso grupo tem grande interesse em investigar melhor. É importante ressaltar que ao fixar as amostras na presença de ácido tânico e suprimir as etapas de pós-fixação com OsO_4 e contrastação dos cortes, ocorreu redução da eletrondensidade e da espessura das estruturas presentes na amostra (Fig. 13, condição G) (WAGNER et al., 1976).

	Sequência de fixação-contrastação					Espessura e Densidade relativa dos folhetos	
	1	2	3	4	5	membrana plasmática e vesículas aderidas	membranas intracelulares
A	GA	Os	–	UA	Pb		
B	TA GA	Os	–	UA	Pb		
C	GA	Os	TA	UA	Pb		
D	GA	Os	TA	–	–		
E	TA GA	–	–	UA	Pb		
F	TA GA	Os	–	–	–		
G	TA GA	–	–	–	–		

Figura 13. Infográfico adaptado do artigo *The effect of tannic acid on electron images of capillary endothelial cell membranes* (Wagner et al., 1976), que exemplifica a espessura e densidade relativa quando realizada diferentes sequências de fixação-contrastação. Notar que as condições B e E têm resultados similares. Em uma escala crescente de densidade e espessura aparente: linha pontilhada, linha normal e linha em negrito. GA, glutaraldeído, TA, ácido tânico, Os, tetróxido de ósmio, UA, acetato de uranila, Pb, citrato de chumbo.

1.5. Ácido tânico na contrastação de cortes ultrafinos

Como mencionado anteriormente, além de ser usado como contrastante *in bloc*, contribuindo para uma visualização geral aprimorada de detalhes ultraestruturais e melhorar a preservação da membrana, o ácido tânico pode ser usado como contrastante dos cortes, em conjunto com o acetato de uranila (KAJIKAWA et al., 1975).

O protocolo desenvolvido por Kajikawa et al. em 1975 mostrou-se útil para uma contrastação seletiva para elastina. Os autores utilizaram fragmentos de artéria carótida de coelhos com arteriosclerose induzida, aorta de embriões de galinha e pulmão de camundongos. O protocolo consistia em fixar os tecidos com glutaraldeído e contrastar os cortes com uma solução recém preparada de 5% de acetato de uranila e 0,5% de ácido tânico em água destilada e, posteriormente, com citrato de chumbo.

O método apresentou contraste intenso nas fibras elásticas em todos os tecidos testados, porém microfibrilas periféricas às fibras elásticas e outros componentes extracelulares, como fibras colágenas e lâmina basal, não apresentaram bom contraste com este método (KAJIKAWA et al., 1975).

Haidar et al. (1992) processaram fragmentos de aorta e pulmão de rato e fragmentos de pulmão e rim de feto humano, conforme o protocolo descrito por Kajikawa et al. (1975), e realizaram uma comparação das imagens resultantes com o método de fixação com glutaraldeído na presença de ácido tânico. O uso de ácido tânico-acetato de uranila na contrastação dos cortes forneceu resultados altamente específicos na localização de agregados de elastina e fibras elásticas em todos os tecidos examinados enquanto a técnica de fixar com glutaraldeído na presença do ácido tânico não apresentou essa especificidade, com inconsistências na localização. Desse modo, os autores sugeriram que o ácido tânico não apresentaria alta taxa de penetração (HAIDAR et al., 1992).

Em outro trabalho, amostras de fígado de rato e de hamster, rim de camundongo, músculo de hamster, sêmen humano, espermatozoides de *Sialis lutaria*, *Turritella gemmata* e tecido de um pinheiro (*Pinus siluestris*) foram fixados com 2,5% de glutaraldeído e pós-fixados com 1% de OsO₄, e os cortes resultantes receberam diversas combinações de mordentes e contrastantes. Foi demonstrado que, dos reagentes testados, apenas o ácido tânico obteve sucesso em agir como mordente, e das estruturas analisadas os ribossomos não apresentaram contraste (AFZELIUS, 1992). O autor traz algumas considerações sobre o reagente, tais como: a) o ácido tânico como contrastante de cortes apresentou certa especificidade pelo glicogênio e fibras de colágeno, diferentemente do que é observado quando usado no fixador; b) aumentou a afinidade desses componentes pelo acetato de uranila, porém parece diminuir o contraste dos demais componentes citoplasmáticos, o que contrasta com o que relataram Uphoff et al. (1984), que descreveram que o ácido tânico confere aumento geral no contraste; e c) a especificidade se daria pelo mordente e não pelo subsequente contrastante (foram testados acetato de uranila, molibdato de amônio, permanganato de bário e tetróxido de ósmio) e todos apresentaram resultados semelhantes (AFZELIUS, 1992). Na literatura existem observações que nem todos os compostos com átomos de alto peso molecular podem ser usados como

contrastantes de cortes ultrafinos após o ácido tânico agir como mordente, como o citrato de chumbo, por exemplo (AFZELIUS, 1992).

1.6. Processamento de amostras sem tetróxido de ósmio

Phend et al. (1995) introduziu o uso do ácido tânico em conjunto com o p- Fenilenodiamina (PPD) em um processamento para MET, sem utilizar o OsO_4 , com finalidade de usar o material para posterior imunomarcção. PPD pode ser usado tanto como fixador, como contrastante quando o OsO_4 não é compatível. Os autores observaram boa preservação, resolução e eletrondensidade na ausência de OsO_4 , na condição da fixação com glutaraldeído e ácido tânico, e contrastação dos cortes com acetato de uranila (PHEND et al., 1995).

O protocolo sugerido por Phend et al., (1995) indicou o uso de uma solução fixadora contendo 2,5% glutaraldeído, 1% formaldeído e 0,1% ácido pícrico em tampão fosfato, pH 7,3. Para a etapa de pós-fixação as amostras foram incubadas com 1% de ácido tânico, posteriormente com 1% de acetato de uranila no escuro, seguidos de 0,5% de cloreto de platina, todos em tampão Tris-maleato de sódio, pH 6,0. Na etapa da desidratação com o etanol 70%, foi adicionado 1% de PPD, e o restante do processamento foi realizado como no protocolo padrão para MET, com a infiltração na resina e consequente polimerização em estufa (PHEND et al., 1995).

Esse protocolo foi replicado por Zhong et al. (2013) em amostras de tecido neural de ratos, para estudar proteínas sinápticas por imunomarcção. Os autores demonstraram que esse método de processamento, com supressão do OsO_4 , forneceu uma melhoria na combinação geral de imunorreatividade e preservação estrutural (ZHONG et al., 2013).

1.6.1. Permanganato de Potássio

Johnson (1966) investigou células fixadas com permanganato de potássio (KMnO_4) tanto na ausência quanto na presença de OsO_4 . Em consonância com a literatura anterior, concluiu que o KMnO_4 confere eletrondensidade, embora não atue efetivamente como um fixador. O KMnO_4 , em combinação com o acetato de uranila, quando misturado à baixa temperatura, pode substituir o OsO_4 em protocolos de

“freeze-substitution” (substituição a frio) (SCHAUFLINGER et al., 2022). Nas leveduras, o KMnO_4 é utilizado como substituto do OsO_4 na etapa de pós-fixação durante o processamento para MET, proporcionando boa visualização de membranas (LUM e WRIGHT, 1995; WRIGHT, 2000). No entanto, os componentes citoplasmáticos são extraídos devido à incubação com o KMnO_4 , tornando-o inadequado para a análise de estruturas como ribossomos e microtúbulos ou microfilamentos (WRIGHT, 2000).

Quando aplicado antes da desidratação, o KMnO_4 frequentemente forma precipitados, comprometendo a preservação das características mais finas das amostras; entretanto, quando utilizado como contrastante dos cortes confere eletrondensidade apreciável (JOHNSON, 1966; LAWN; 1960). Com o tempo, identificou-se que o KMnO_4 poderia formar precipitados em alguns tipos celulares, e algumas alterações na metodologia poderiam ser realizadas para contornar esse problema (SUTTON, 1967).

Zannino et al. (2023) relataram que os precipitados formados na presença do KMnO_4 não eram artefatos, mas sim um conjunto de proteínas básicas, como proteínas de cromatina intimamente associadas ao DNA e as partículas ribossômicas, que são intensamente contrastadas. Isso resulta em um contraste marcante dos núcleos, em particular nas áreas de heterocromatina, nucléolos e do retículo endoplasmático rugoso, que são ricos nesses complexos proteicos (ZANNINO et al., 2023).

O KMnO_4 em soluções diluídas (geralmente 1 em 10.000), possui propriedades desinfetantes e adstringentes, que eram usadas para tratar condições dermatológicas, como úlceras nas pernas e dermatite (REYNOLDS, 1989). O KMnO_4 é oxidante, irritante e apresenta risco à saúde e ao meio ambiente, contudo não é carcinogênico (*National Center for Biotechnology Information*, 2024.) A ingestão de cristais de KMnO_4 , pode ser fatal caso a dose for acima de 100 mg/kg (YOUNG et al., 1996).

1.6.2. Verde malaquita

O reagente verde malaquita ($\text{C}_{23}\text{H}_{25}\text{ClN}_2$) é usado para conferir contraste e preservar estruturas lipídicas que, normalmente, são rompidas durante procedimentos

de fixação padrão. Ele é empregado como pós-fixador em conjunto com o OsO_4 , e estes reagentes aumentam a afinidade do acetato de uranila e citrato de chumbo por alguns componentes celulares, conferindo maior eletrondensidade, como membranas de mitocôndrias (TEICHMAN et al., 1974; POURCHO et al., 1978). Um estudo com *Caenorhabditis elegans* demonstrou que o verde malaquita é imprescindível na identificação de componentes lipídicos da cutícula em algumas linhagens (SCHULTZ et al., 2012). Na literatura há escassez de trabalhos que explorem o verde malaquita como fixador, na ausência de OsO_4 .

O verde malaquita é um reagente corrosivo, irritante e apresenta risco à saúde e ao meio ambiente quando exposto de maneira prolongada e em altas concentrações (*National Center for Biotechnology Information*, 2024). Foi utilizado como corante têxtil, fungicida e antibiótico em peixes; no entanto, devido à possibilidade de deixar resquícios e eventualmente causar diarreia e dor abdominal, foi proibido em diversos países, por autoridades especializadas em piscicultura (SUDOVA et al., 2007; BILANDŽIĆ et al., 2012; GAVRILENKO et al., 2019).

1.7. Ácido tânico além da microscopia eletrônica de transmissão

Murakami (1978) publicou um relato de amostras biológicas fixadas com ósmio-ácido tânico para observação ao microscópio eletrônico de varredura (MEV) sem receber nenhum tipo de cobertura adicional. O autor utilizou amostras de rim de rato fixados com glutaraldeído, pós-fixados com 2% de ácido tânico, 2% de hidrocloreto de guanidina, 2% de hidrocloreto de arginina e 2% glicina, todos em água destilada. Após uma segunda pós-fixação em OsO_4 por 8 horas, seguiu-se o padrão de desidratação em concentrações crescentes de etanol e secagem pelo método do ponto crítico. Detalhes finos da superfície celular foram claramente visíveis sem nenhuma cobertura metálica, sem nenhum tipo de descarga com o microscópio operando a 25 kV (MURAKAMI, 1978).

Usando um protocolo similar ao citado acima, Sweney e Shapiro (1977) obtiveram bons resultados em processamento de tecidos para MEV, no qual ratos foram perfundidos em uma solução fixadora contendo ácido tânico. Neste caso, também não ocorreu nenhum tipo de descarga com o microscópio operando a 20 kV. Adicionalmente, os autores observaram que no protocolo utilizado em células de

cultura de tecidos que são cultivadas em substratos não condutores foi vantajoso o uso de 3% de ácido tânico, porém em células em suspensão não foi observado nenhum ganho quando comparado com o processamento padrão que utiliza cobertura metálica (SWENEY e SHAPIRO, 1977).

Como descrito nessa seção, desde as primeiras publicações contendo informações sobre os benefícios de utilizar o ácido tânico como mordente-fixador em rotinas de microscopia eletrônica, vários grupos adaptaram protocolos, variaram concentrações, etapas de adição e supressão de reagentes em diferentes amostras biológicas, o que colaborou para esclarecer detalhes ultraestruturais de diversas células.

1.8. Modelos biológicos utilizados para validação da metodologia

Análises de MET são essenciais para explorar a ultraestrutura celular, proporcionando uma compreensão mais aprofundada dos componentes e funções celulares. Essa metodologia é valiosa para a observação de detalhes críticos da organização celular e de seu comportamento em diferentes momentos, sendo fundamental em pesquisas básicas e aplicadas para estudar, por exemplo, doenças e visualizar alterações celulares associadas a condições patológicas (WINEY et al., 2014).

Neste trabalho, utilizamos dois protozoários, como modelos biológicos, a fim de validar a metodologia proposta neste estudo em tipos celulares com características distintas. Foram incluídos neste estudo trofozoítos dos protozoários *Giardia intestinalis* e *Trichomonas vaginalis*.

G. intestinalis (Fig. 14) é um parasito extracelular que coloniza e prolifera no intestino delgado do hospedeiro, resultando na doença diarreica conhecida como Giardíase. A infecção ocorre quando se ingere cistos, presentes em água ou alimentos contaminados. O pH ácido do estômago e a ação de proteases intestinais desencadeiam o processo de excistamento, resultando na emergência de dois trofozoítos a partir de um único cisto. Esses trofozoítos aderem às células epiteliais intestinais no duodeno e na porção inicial do jejuno. Através da fissão binária, eles se multiplicam e estabelecem a colonização parasitária no intestino. O encistamento

ocorre quando os trofozoítos atravessam o lúmen intestinal e alcançam o intestino grosso. Durante a diferenciação de trofozoíto para cisto, várias mudanças ocorrem, incluindo a síntese de uma parede cística. Por fim, cistos maduros são excretados nas fezes, sendo capazes de infectar novos hospedeiros e reiniciar o ciclo (DIXON, 2021).

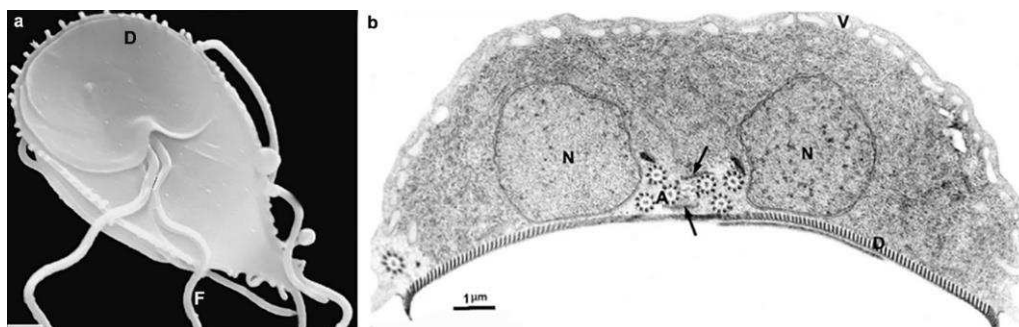


Figura 14. *G. intestinalis* por microscopia eletrônica de varredura (a) e por microscopia eletrônica de transmissão (b). F, flagelos; D, disco ventral; V, vesículas periféricas; A, axonema, N, núcleos. **Fonte:** GADELHA et al., 2022.

A Giardíase foi incorporada na Iniciativa de Doenças Negligenciadas da Organização Mundial da Saúde em 2004 (CACCIÒ e RYAN, 2008; ESCOBEDO et al., 2010). Esse protozoário apresenta características distintivas, como ausência de mitocôndrias, lisossomos canônicos e complexo de Golgi. *G. intestinalis* possui um sistema complexo de endomembranas. Entre as particularidades desse parasito estão os dois núcleos e organelas atípicas, como mitossomos e vesículas periféricas (LANFREDI-RANGEL et al., 1998; MIDDLEJ et al., 2016; 2019). O citoesqueleto, com suas estruturas microtubulares, abrange o disco ventral, o corpo mediano, o funis e quatro pares de flagelos. Esses componentes são essenciais para funções biológicas como motilidade, adesão, divisão celular e diferenciação (HOLBERTON, 1973; HOUSE et al., 2011; GADELHA et al., 2015, 2022; BENCHIMOL et al., 2022; VERDAN et al., 2024). Apesar de sua importância, a organização e a composição do citoesqueleto ainda não estão totalmente esclarecidas. Algumas organelas da *Giardia* ainda têm sua ultraestrutura celular não completamente desvendada.

Trichomonas vaginalis (Fig. 15) é o parasito causador da tricomoniase humana, a infecção sexualmente transmissível não viral mais prevalente no planeta, afetando aproximadamente 278 milhões de pessoas em todo o mundo (KREISEL et al., 2021; WHO, 2024). Em mulheres podem ocorrer abortos espontâneos frequentes, odor vaginal e corrimento, o que pode levar à infertilidade (LI et al., 2020; ZHANG, 2022).

Em homens é frequentemente assintomática, pode causar desconforto uretral e em outros casos, aumentar os riscos de câncer de próstata (LANGSTON et al., 2019; ZHANG et al., 2023). Adicionalmente, a tricomoníase está ligada ao aumento do risco de HIV (vírus da imunodeficiência humana) e HPV (papilomavírus humano) (MASHA et al., 2019).

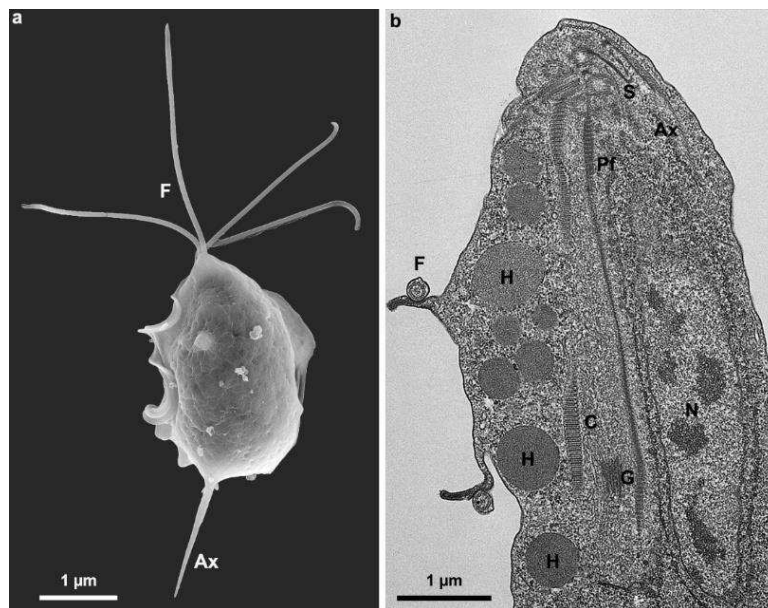


Figura 15. *T. vaginalis* por microscopia eletrônica de varredura (a) e por microscopia eletrônica de transmissão (b). F, flagelos; Ax, axóstilo; H, hidrogenossomos; G, complexo de Golgi; C, costa; Pf, filamentos parabasais, S, filamento sigmóide, N, núcleo.

Esse protozoário possui organelas típicas de eucariotos, como núcleo e retículo endoplasmático, mas é amitocondrial, e apresenta hidrogenossomos que produzem hidrogênio molecular e ATP. Depende da glicólise para energia durante a endocitose e demais atividades metabólicas, essencial para a absorção de nutrientes e defesa imunológica (LEHKER et al., 1990; RENDÓN-MALDONADO et al., 1998, 2003; BENCHIMOL, 2004, 2009; PEREIRA-NEVES e BENCHIMOL, 2007; TACHEZY et al., 2022). Seu citoesqueleto inclui o sistema mastigonte, que consiste em quatro flagelos anteriores, um flagelo recorrente, e estruturas baseadas em microtúbulos como o axóstilo e a pelta. Este sistema também possui estruturas estriadas, o filamento chamado costa que é associada aos hidrogenossomos e ao flagelo recorrente, e quatro filamentos parabasais distintos entre si e que se relacionam com o complexo de Golgi (HONIGBERG et al., 1971; BENCHIMOL, 2004; DE ANDRADE ROSA et al., 2017; LORENZO-BENITO et al., 2022; FIAMA DAS NEVES ORTIZ, 2024). Apesar

dos problemas envolvidos com essa patologia, *T. vaginalis* continua sendo um organismo com diversas estruturas pouco estudadas, como diversos apêndices ligados aos corpúsculos basais, fibra x e filamento sigmoide (ORTIZ et al., 2024).

O aprimoramento contínuo das técnicas de processamento para MET é crucial para aprofundar a compreensão da morfologia e ultraestrutura de modelos biológicos. Isso permite avanços significativos na biologia celular e na pesquisa de doenças. Esse progresso é fundamental para o desenvolvimento de estratégias mais eficazes para controle e diagnóstico de infecções. Com o refinamento dessas técnicas, não apenas será possível avançar no conhecimento da sua biologia, além de promover melhorias contínuas na compreensão dos mecanismos da interação parasita-hospedeiro.

2. JUSTIFICATIVA

A microscopia eletrônica de transmissão (MET) é uma ferramenta essencial para a caracterização ultraestrutural de células, consolidando o entendimento biológico de diversos tipos celulares. No entanto, o processamento das amostras para MET ainda apresenta desafios significativos, principalmente em relação à complexidade, tempo e custos envolvidos, além dos riscos associados à exposição do pesquisador a materiais potencialmente tóxicos. Nesse contexto, é fundamental buscar alternativas que simplifiquem esse processo, tornando-o mais rápido, acessível e seguro, sem comprometer a qualidade das imagens obtidas.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Elaborar um protocolo de processamento de amostras biológicas para MET com ácido tânico, em associação com outros reagentes, que forneça bom contraste às membranas de organelas, membrana plasmática e demais estruturas celulares, que o torne mais rápido, seguro, barato, e sem a presença de artefatos.

3.2. Objetivos específicos

- Estabelecer um protocolo de processamento de amostras para MET mais barato, rápido e que utilize reagentes menos tóxicos.
- Validar um método de análise do aumento do contraste para verificar se as amostras biológicas resultantes do protocolo modificado para MET com ácido tânico é igual, superior ou inferior ao encontrado nos procedimentos de rotina.
- Investigar se ocorrem artefatos com o protocolo sugerido.
- Comparar o aspecto, preservação estrutural e contraste da membrana plasmática, de membranas das organelas e citoesqueleto entre o protocolo modificado com o protocolo padrão.
- Estabelecer um protocolo com a tentativa de suprimir o uso de tetróxido de ósmio e/ou de acetato de uranila e/ou de citrato de chumbo, testando o ácido tânico em associação com outros reagente, como verde malaquita e permanganato de potássio.

4. METODOLOGIA

4.1. Cultivo celular

4.1.1. *Giardia intestinalis*

Trofozoítos de *G. intestinalis* da cepa WB (*American Type Culture Collection*, ATCC 30957, EUA) foram cultivados em tubos Falcon® de 15 ml, contendo o meio TYI-S-33, pH 7,1, suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Gibco, ThermoFisher, América do Sul) e mantidos em estufas a 37°C por 48 a 72 horas. Durante o período de cultivo, as células foram acompanhadas quanto à sua morfologia, por meio da microscopia óptica de contraste de fase no microscópio óptico invertido Zeiss Axio Vert.A1.

Os componentes do meio TYI-S-33 são: 2% triptona (Sigma-Aldrich, EUA), 1% extraído de levedura (BD, França), 1% glicose (Vetec, Brasil), 0,02% ácido ascórbico (Sigma-Aldrich, EUA), 0,06% fosfato de potássio monobásico (Vetec, Brasil), 0,12% fosfato de potássio dibásico (Vetec, Brasil), 0,2% L-cisteína (Sigma-Aldrich, EUA), 0,1% bile bovina (Sigma-Aldrich, EUA), 0,2% cloreto de sódio (Vetec, Brasil).

4.1.2. *Trichomonas vaginalis*

Os trofozoítos de *T. vaginalis* da cepa JT foram cultivados em tubos Falcon® de 15 ml, contendo meio TYM, pH 6,2, suplementado com 10% de SFB (Gibco, ThermoFisher, América do Sul) e mantidos em estufas a 37°C por 24 – 48 horas. A cepa JT foi isolada de uma paciente no Hospital Universitário Clementino Fraga Filho da Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil, e foi mantida em cultura desde 1980. Durante o período de cultivo, as células foram acompanhadas quanto à sua morfologia por meio da microscopia óptica de contraste de fase no microscópio óptico invertido Zeiss Axio Vert.A1.

Os componentes do meio TYM são: 22 mg/ml de triptona, 11 mg/ml de extrato de levedura, 5,6 mg/ml de maltose, 1 mg/ml de L-cisteína, 0,2 mg/ml de ácido ascórbico, 0,9 mg/ml de fosfato de potássio monobásico e 0,9 mg/ml de fosfato de potássio dibásico.

4.2. Isolamento de citoesqueleto de *T. vaginalis*

Os trofozoítos provenientes de uma cultura confluenta foram soltos da parede do tubo ao serem colocados em gelo por 15 minutos, seguidos de centrifugação a 1000 x g, por 5 minutos. As células foram lavadas duas vezes com solução salina tamponada com fosfato (PBS) a pH 7,2, em temperatura ambiente, e centrifugadas. Para a extração do citoesqueleto, as células foram ressuspensas em 2 ml de uma solução para extração, a 4°C contendo: tampão PHEM (60 mM PIPES, 25 mM HEPES, 10 mM EGTA e 4 mM $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), 30% de glicerol (Sigma Aldrich, EUA), 2% de Triton X-100 (Sigma Aldrich, EUA), 2% de Igepal (Sigma Aldrich, EUA) e coquetel de inibidores de protease (Sigma-Aldrich, EUA). A solução de extração foi incubada em gelo por 2 minutos, seguida de agitação vigorosa, a máxima velocidade ao vórtex, por 2 minutos, repetido duas vezes. Em seguida, a fração enriquecida com citoesqueleto foi lavada com 1 ml de PBS pH 7,2 e centrifugada a 17.000 x g por 5 minutos a 4 °C. O sucesso da extração foi verificado por microscopia de luz. A amostra foi fixada em uma solução contendo 2,5% de glutaraldeído e 1% de ácido tânico, em tampão cacodilato de sódio (0,1M), pH 7.2, por 2 horas.

4.3. Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

Para os processamentos descritos como “controle”, os trofozoítos de *G. intestinalis* e *T. vaginalis* foram cultivados conforme detalhado anteriormente. Posteriormente, foram lavados em tampão fosfato-salino (PBS) a 37°C, pH 7.2, e fixados quimicamente por 2 horas em uma solução contendo 2.5% de glutaraldeído (*Electron Microscopy Sciences*, EUA) em tampão cacodilato de sódio (0,1M), pH 7.2.

Após a fixação, as amostras foram centrifugadas a 1.000x g por 5 minutos, o sobrenadante foi removido e as células foram lavadas com tampão cacodilato de sódio (0,1M) pH 7.2. As amostras foram então pós-fixadas em uma solução contendo 1% de OsO_4 e 0,8% de ferrocianeto de potássio em tampão cacodilato de sódio 0,1 M por 30 minutos, na ausência de luz. Em seguida, as amostras foram lavadas em PBS pH 7.2 e desidratadas em soluções com concentração crescente de acetona (Merck, Alemanha) (50%, 70%, 90%, e 3 trocas na acetona 100%), por 15 minutos em cada etapa.

As amostras foram infiltradas em resina epóxi (PolyBed 812, Electron Microscopy Sciences, EUA) gradualmente, usando misturas de acetona:epon nas proporções 2:1 por um período de 4 horas, 1:1 por 8 horas, 1:2 por 8 horas e resina pura por 12 horas. Os blocos foram então colocados na estufa a 60°C por 72 horas para polimerização. Após a polimerização, os blocos foram limados, seccionados com uma faca de diamante (Drukker, Reino Unido) para obtenção de cortes ultrafinos no ultramicrotomo Leica ULTRACUT UC7 (Alemanha) e coletados em grades de cobre de 300 “mesh”. Os cortes foram contrastados com 5% de acetato de uranila em água por 20 minutos e em 1% de citrato de chumbo por 3 minutos, sendo, em seguida, visualizados sempre no microscópio eletrônico de transmissão HITACHI HT 7800 utilizando a abertura 2 da objetiva. Para a padronização das condições, todos os cortes ultrafinos que foram observados apresentavam 70 nm de espessura, com cor de interferência prateada, e foram visualizados no microscópio eletrônico de transmissão com 100 kV, no Centro Nacional de Biologia Estrutural e Bioimagem (CENABIO, Universidade Federal do Rio de Janeiro).

Diversas modificações do protocolo foram implementadas, abrangendo ajustes nas fases de fixação, pós-fixação, contrastação *in bloc* (MIRANDA et al., 2015) e contrastação dos cortes ultrafinos. Todas as combinações testadas neste estudo estão sumarizadas na Tabela 1, ao final da seção de metodologia.

4.4. Fixação com adição de ácido tânico ou ácido gálico e com pós-fixação

Na variação do protocolo, à solução fixadora descrita acima (composta de 2.5% de glutaraldeído em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7.2), adicionou-se 0,8%, 1% ou 2% de ácido tânico (Polysciences Inc., EUA). A amostra foi mantida na solução fixadora por 2 horas e posteriormente foram realizadas as etapas descritas no item de processamento para MET mencionado anteriormente. Após a determinação da melhor concentração de ácido tânico no fixador, que apresentava bons resultados, a mesma concentração de ácido gálico (Sigma-Aldrich, EUA) foi testada para verificar se estes reagentes se comportavam de maneira semelhante. As amostras foram pós-fixadas com 1% de OsO₄ e 0,8% de ferrocianeto de potássio em tampão cacodilato de sódio 0,1 M por 30 minutos, na ausência de luz. Em seguida, as amostras foram lavadas, desidratadas, infiltradas e incluídas em resina, como no processamento convencional.

Na etapa de contrastação posterior das amostras processadas com ácido tânico, foram feitas variações para comparação, conforme a descrição a seguir: a) sem nenhuma contrastação posterior, b) contrastação posterior completa, com acetato de uranila e citrato de chumbo, c) contrastação apenas com 5% de acetato de uranila em água por 20 minutos, d) contrastação apenas com 1% de citrato de chumbo por 3 - 5 minutos.

4.5. Fixação com adição de ácido tânico e sem pós-fixação

4.5.1. Ácido tânico e omissão de OsO₄

As amostras foram fixadas em uma solução de 2.5% de glutaraldeído em tampão cacodilato de sódio (0,1 M) pH 7.2, com a adição de 1% de ácido tânico (Polysciences Inc, EUA), por 2 horas. Posteriormente, as células foram lavadas e submetidas à desidratação em soluções progressivas de acetona até a conclusão do processamento, conforme descrito acima, com a supressão da etapa de pós-fixação com OsO₄. Os cortes ultrafinos foram contrastados com acetato de uranila e citrato de chumbo.

4.5.2. Ácido tânico, omissão de OsO₄ e coloração “*in bloc*” (acetato de uranila 2% em acetona 70%)

As amostras foram fixadas em uma solução de 2.5% de glutaraldeído em tampão cacodilato de sódio (0,1 M) pH 7.2, com a adição de 1% de ácido tânico (Polysciences Inc, EUA) por duas horas, e seguindo uma abordagem que excluiu a etapa de pós-fixação com OsO₄. Posteriormente, as amostras foram desidratadas e na etapa que utiliza acetona 70%, foi adicionado 2% de acetato de uranila e deixadas durante a noite. Essa abordagem pode ser chamada de contrastação/coloração “*in bloc*”. A desidratação foi concluída em etapas de concentrações crescentes de acetona (90% e três vezes na 100%). O restante do processamento foi conduzido conforme a rotina padrão, incluindo a reserva de uma grade de controle sem contrastação para comparação.

4.5.3. Ácido tânico, omissão de OsO₄, uso de ferrocianeto de potássio 1.6% e coloração “*in bloc*”

As amostras foram fixadas em uma solução de 2.5% de glutaraldeído em tampão cacodilato de sódio (0,1 M) pH 7.2, com a adição de 1% de ácido tânico (Polysciences Inc, EUA) por duas horas e exclusão da etapa de pós-fixação com OsO₄. Em seguida, as amostras foram desidratadas em soluções de acetona 30% e 50% por 15 minutos cada, e na etapa da acetona 70%, adicionou-se 1,6% de ferrocianeto de potássio e 2% de acetato de uranila, e as amostras incubaram durante 18 horas, na geladeira. Posteriormente, a etapa da desidratação foi concluída com incubações das amostras em acetona 90% e três vezes na acetona 100%, sendo 15 min em cada etapa. As etapas subsequentes foram realizadas conforme o protocolo padrão, descrito na seção 4.3, incluindo a reserva de uma grade de controle sem contrastação posterior para avaliação comparativa.

4.5.4. Adição de ácido tânico, omissão do OsO₄ e uso de permanganato de potássio (PK)

Para investigar a possível substituição do OsO₄ pelo PK, preparou-se uma solução de 1,2% de PK em água destilada a 4° C. Essa solução foi armazenada a 4°C por 24 horas em um recipiente hermético de vidro a fim de evitar a reação do PK com o oxigênio do ar. Durante a manipulação da solução precauções foram tomadas para evitar a ressuspensão do precipitado decantado e a camada superficial, quando presente, foi removida com o auxílio de uma lâmina.

As amostras foram fixadas em uma solução de 2,5% de glutaraldeído em tampão cacodilato de sódio (0,1 M) pH 7.2, com a adição de 1% de ácido tânico (Polysciences Inc, EUA) por duas horas, em temperatura ambiente, seguido por uma rotina que excluiu a etapa de pós-fixação com OsO₄. Em seguida, realizou-se uma nova fixação em 1,2% de PK em tampão cacodilato de sódio 0,1 M a 4° C, atingindo concentração final de 0.6%. Essa etapa foi conduzida na geladeira durante 2 horas. Duas lavagens com PBS a 4 °C foram realizadas. As amostras foram desidratadas em soluções de acetona 30 % e 50% por 15 minutos cada, e durante a etapa da acetona 70%, adicionaram-se 2% de acetato de uranila e deixou-se durante a noite, na geladeira. Posteriormente, prosseguiu-se com a desidratação em acetona 90% e três vezes na acetona 100%, por 15 minutos em cada etapa. A infiltração, polimerização em resina e contrastação foi realizada conforme descrito para o processamento

controle, descrito na seção 4.3. Foi incluído a realização de uma grade de controle sem contrastação para referência.

4.5.5. Adição de ácido tânico, omissão do OsO₄ e uso de verde malaquita

As amostras foram fixadas em uma solução composta por 2,5% de glutaraldeído diluído em tampão cacodilato de sódio a 0,1 M e pH 7,2, com a adição de 1% de ácido tânico (Polysciences Inc., EUA). Este processo de fixação foi mantido por duas horas e se excluiu a etapa de pós-fixação com OsO₄. Como substituto do OsO₄, as amostras foram incubadas com 2% de verde malaquita em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, por uma hora. O restante do processamento (desidratação, infiltração, polimerização, ultramicrotomia e contrastação) foi realizado conforme descrito na seção 4.3.

4.6. Contrastação de cortes ultrafinos com ácido tânico

As amostras que foram utilizadas para essa seção foram processadas de maneira convencional, utilizando uma solução fixadora composta de 2,5% de glutaraldeído em tampão cacodilato de sódio 0,1 M pH 7,2, com pós-fixação por OsO₄, desidratação em acetona, infiltração e inclusão em resina, como descreve o item 4.3.

A solução de ácido tânico foi preparada a 5% em água, solubilizada, guardada na ausência de luz e em temperatura ambiente, e utilizada 24 horas depois, para garantir a ausência de partículas em suspensão. Na etapa da contrastação posterior dos cortes ultrafinos, foram realizadas variações conforme a descrição a seguir: a) apenas com 5% de ácido tânico por 20 minutos, b) 5% de ácido tânico por 20 minutos seguido de 5% de acetato de uranila por 20 minutos e c) 5% de ácido tânico seguido de 1% de citrato de chumbo por 3 - 5 minutos. Essas combinações foram utilizadas para avaliar a interação e o efeito dos reagentes nas amostras.

Tabela 1. Tabela com todas as combinações de metodologias que foram testadas neste trabalho com os protozoários *Giardia intestinalis* e *Trichomonas vaginalis*

Amostra biológica	Etapas do Processamento					
	Fixação	Pós-Fixação	Desidratação	Contrastação		
				AU 5%	CC 1%	AT 5%
<i>Giardia intestinalis</i> e <i>Trichomonas vaginalis</i> ;	GA 2,5%	OsO ₄ + K ₄ [Fe(CN) ₆	Acetona	✓	✓	✓
				✓	✓	✗
		✗		✓	✓	✗
	GA 2,5% + AT 1%	✗	Acetona	✓	✓	✗
		OsO ₄ + K ₄ [Fe(CN) ₆	Acetona	✓	✓	✗
				✗	✗	✗
		✗	Acetona	✓	✓	✗
			Acetona + AU 2%	✓	✓	✗
				✗	✗	✗
		Verde malaquita	Acetona	✓	✓	✗
		PK 0,6% K ₄ [Fe(CN) ₆	Acetona + AU 2%	✓	✓	✗
				✗	✗	✗
	GA 2,5% + AT 0,8 ou 2%	OsO ₄ + K ₄ [Fe(CN) ₆	Acetona	✓	✓	✗
		✗		✗	✗	✗
	GA 2,5% + AG 1%	OsO ₄ + K ₄ [Fe(CN) ₆	Acetona	✓	✓	✗

GA, glutaraldeído; AT, ácido tânico; AG, ácido gálico; OsO₄, tetróxido de ósmio K₄[Fe(CN)₆, ferrocianeto de potássio; PK, permanganato de potássio, AU, acetato de uranila; CC, citrato de chumbo. ✓ = foi utilizado. ✗ = não foi utilizado.

4.7. Parâmetros para aquisição de imagens na análise de contraste

O primeiro parâmetro utilizado para a aquisição das imagens foi desativar a função "LUT" do *software* do microscópio, e o histograma foi ajustado manualmente para o limite máximo, em ambas as direções. A função "LUT", que significa "*Look-Up Table*" (Tabela de Pesquisa), é uma ferramenta que mapeia valores de intensidade de

pixels em uma imagem para cores ou tons específicos. A tabela de pesquisa é uma referência que o *software* do microscópio utiliza para associar valores numéricos a cores ou tons que serão exibidos na imagem. No contexto de um microscópio eletrônico de transmissão, a função LUT pode ser usada para ajustar o contraste e a escala de cinza da imagem. Isso permite realçar diferentes detalhes e estruturas nas amostras observadas, tornando mais fácil a análise e interpretação das imagens capturadas

Ao desativar o “auto LUT”, como mencionado nos parâmetros fornecidos anteriormente, o usuário tem mais controle sobre a representação visual da imagem, podendo ajustar manualmente o histograma e otimizar a visualização de acordo com as características específicas da amostra. Essa abordagem manual pode ser preferível em situações em que é necessário um controle mais preciso sobre a aparência da imagem obtida.

Os demais parâmetros determinados para as imagens que foram utilizadas na medição do contraste, foram: voltagem do microscópio eletrônico foi configurada para 100 kV, com um número de abertura de 2. O tempo de exposição foi fixado em 1 segundo, o “*spot number*” foi definido como 3 e as configurações da câmera foram ajustadas com um ganho (*Gain*) de 21 e o parâmetro de captura foi definido como “Set 3”. Para as demais imagens, que não foram usadas para a medição do contraste, os parâmetros determinados foram os mesmos, apenas a ativação da função “AUTO LUT” foi realizada.

4.8. Medição do contraste no *Software Fiji*

As imagens foram capturadas em vários aumentos, considerando que o modelo celular possui dimensões e detalhes específicos. Foram registradas imagens abrangendo células inteiras, além de ampliações em regiões mais delicadas para avaliar a eficácia geral da fixação e contraste.

Para garantir a padronização e realizar cálculos referentes à intensidade do contraste, estabeleceu-se um padrão, no modelo celular *G. intestinalis*: aumentos entre 10 e 25 mil vezes, destacando detalhes do núcleo, com regiões similares em

cada imagem e aproximadamente a mesma quantidade de elementos citoplasmáticos. Esse procedimento visa alcançar a maior padronização possível na comparação.

Os cortes ultrafinos obtidos a partir dos processamentos, tanto na ausência quanto na presença de ácido tânico, foram analisados sob as seguintes condições: a) contrastação posterior ausente, b) contrastação posterior completa, c) apenas com acetato de uranila, d) apenas com citrato de chumbo, seguindo os parâmetros determinados da sessão anterior.

Para a medição do contraste, foi utilizado o *software* Fiji, uma plataforma de código aberto para análise de imagens biológicas (SCHINDELIN et al., 2012). O fluxo de trabalho (Fig. 16) consistiu em: 1) abrir as imagens originais em .tiff no Fiji; 2) Na aba “Analyze” escolher a opção “Histogram”, para o *software* gerar um gráfico de distribuição de intensidade da imagem e ir em “List”, que gera uma tabela com os dados do histograma, que foram exportados para o Microsoft Excel.

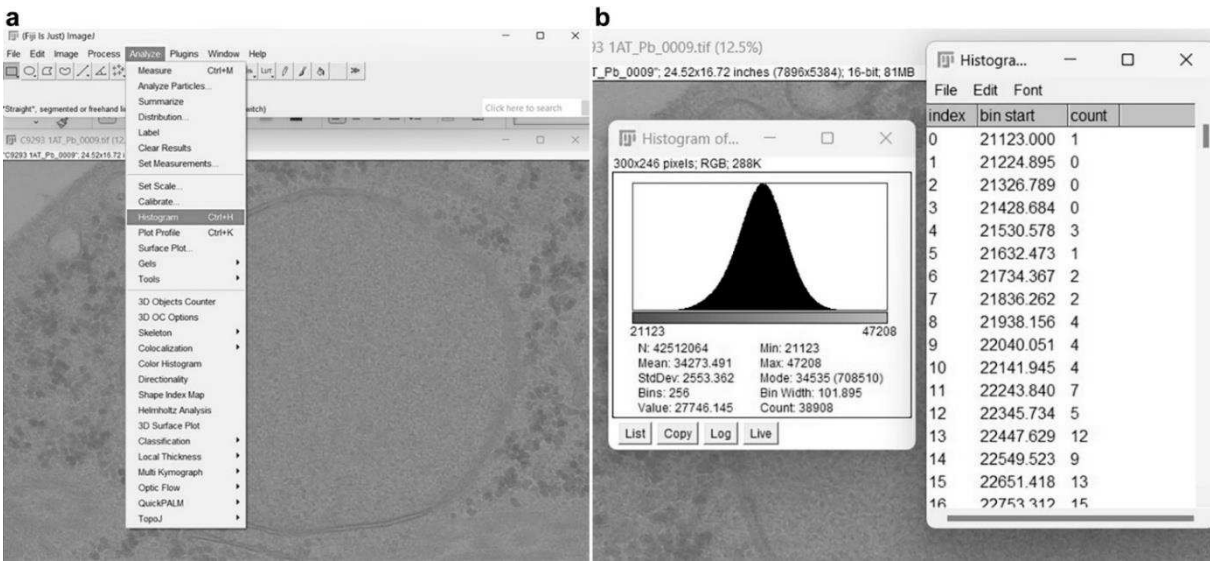


Figura 16. Resumo da metodologia de obtenção dos dados do contraste das imagens no *Software* Fiji. (a) Opção do *software* que gera um histograma para cada imagem, e (b) exemplo de histograma com os dados que serão utilizados para a análise estatística.

4.9. Análise estatística

As análises foram realizadas utilizando o *software* GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, Boston, Massachusetts, EUA) a fim de calcular a Área Sob a Curva (em inglês, *area under curve*, AUC) dos histogramas representativos, gerados conforme descrito na seção anterior, permitindo uma quantificação das diferenças

entre os grupos. Os grupos comparados entre si foram “Controle” que são as amostras processadas como de rotina, sem o ácido tânico, e “AT” as amostras que foram processadas com 1% de ácido tânico na solução fixadora. As condições analisadas foram: a) contrastação posterior completa, b) sem contrastação posterior, c) contrastação utilizando apenas 5% de acetato de uranila em água por 20 minutos e d) contrastação utilizando apenas 1% de citrato de chumbo por 3 - 5 minutos, com o intuito de verificar o impacto do ácido tânico, sobre o contraste em conjunto com os reagentes usados na contrastação posterior dos cortes.

Subsequentemente, optou-se pela normalização dos dados. Para isso, utilizou-se a função "Analyze" do GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, Boston, Massachusetts, EUA), onde os resultados foram normalizados em relação ao maior valor do eixo Y, estabelecendo este valor como 100% para cada grupo. Essa normalização permitiu uma comparação mais direta entre os grupos, facilitando a interpretação dos resultados obtidos.

Com os resultados normalizados, foi elaborado um gráfico de barras, para cada condição de contrastação posterior, utilizando a opção "Plot: mean with SEM" (média com erro padrão da média). Para avaliar a significância estatística entre os grupos, foi aplicado o teste t não pareado e paramétrico, considerando o valor de $p < 0,05$. Essa abordagem possibilita a identificação de diferenças estatisticamente significativas entre os grupos analisados.

5. RESULTADOS

Ao empregar o ácido tânico no processamento para MET, observamos resultados promissores, os quais serão detalhados a seguir. As seções subsequentes organizam as observações de acordo com as diferentes condições de fixação, pós-fixação, desidratação e contrastação dos cortes ultrafinos. Além disso, é importante ressaltar que "contrastação posterior completa" é equivalente ao uso de acetato de uranila e citrato de chumbo para a contrastação dos cortes e "contrastação posterior ausente" indica que os cortes foram analisados sem qualquer tratamento com esses ou outros reagentes. Os resultados estão resumidos ao final desta seção, na Tabela 2.

É importante ressaltar que todas as imagens foram capturadas sob as mesmas condições do microscópio a fim de garantir que diferentes parâmetros influenciassem os resultados. As imagens não utilizadas na medição de contraste passaram por ajustes mínimos no *software* Adobe Photoshop, como remoção de fundo e correção de marcas da faca de diamante.

5.1. Fixação com adição de ácido tânico e com pós-fixação

A concentração ideal de ácido tânico foi determinada com base na menor concentração que apresentou resultados significativos. Entre as concentrações de 0,8%, 1% e 2%, a concentração de 1% de ácido tânico foi a mais adequada. Assim, optar por uma menor quantidade de reagente é preferível, tanto do ponto de vista econômico quanto ambiental.

Os cortes ultrafinos obtidos a partir do processamento das amostras biológicas fixadas com 2,5% de glutaraldeído na presença de 1% de ácido tânico exibiram contraste e eletrondensidade proeminentes em comparação com amostras fixadas com 2,5% de glutaraldeído na ausência deste ácido, corroborando os resultados descritos na literatura. As amostras receberam pós-fixação com OsO₄.

5.1.1. Contrastação posterior ausente

Os trofozoítos do protozoário *G. intestinalis* quando fixados na presença de 1% ácido tânico, e adicionalmente pós-fixação com OsO₄ quando comparados com o

controle (Fig. 17a), apresentaram bom contraste da membrana plasmática (Fig. 17b, c) com delimitação bem definida, evidenciando espessamento do glicocálix quando presente nas imagens (Fig. 17b) e do envoltório nuclear (Fig. 17d).

Adicionalmente, também apresentaram bom contraste de estruturas compostas por microtúbulos e outros componentes do citoesqueleto, mesmo na ausência de contrastação dos cortes com acetato de uranila e/ou citrato de chumbo (Fig. 17b, c).

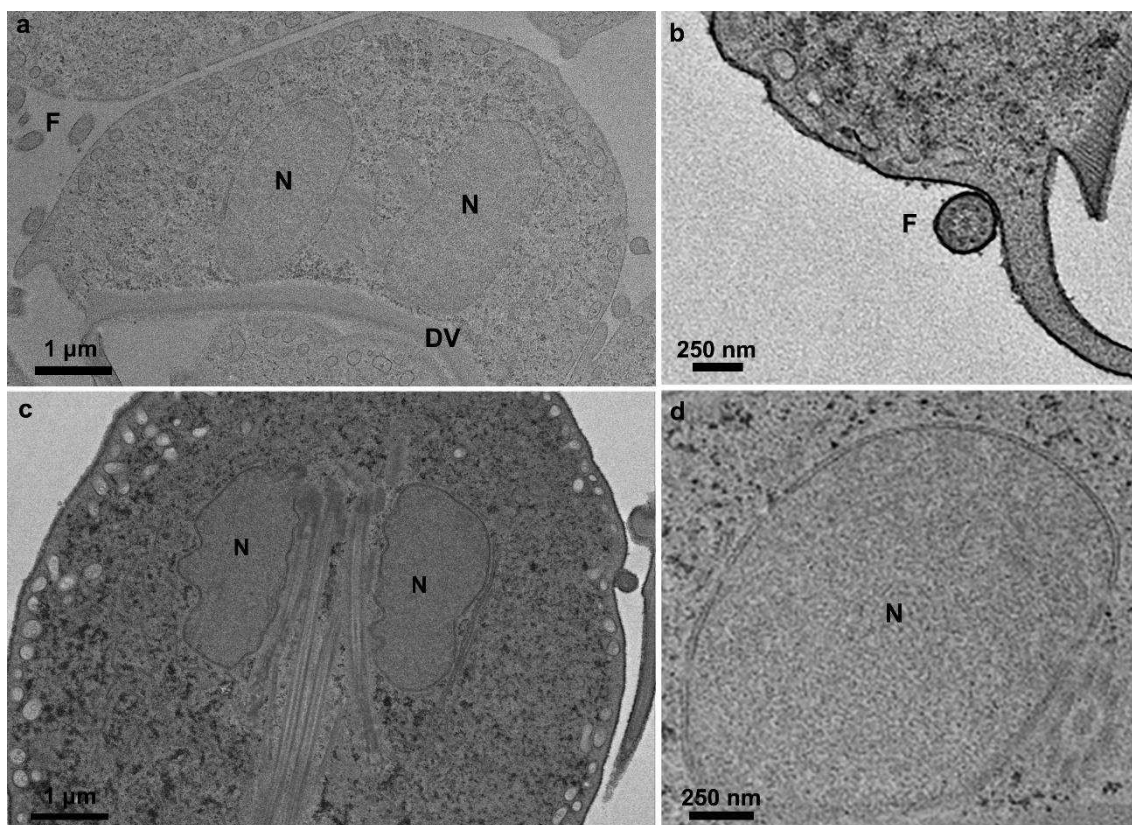


Figura 17. *G. intestinalis* com fixação de 2,5% de glutaraldeído sem (a) e com ácido tânico (b, c, d). Ambos foram pós-fixados com OsO₄ e sem contrastação posterior. Nota-se em (b, c, d) que houve aumento do contraste aparente da membrana plasmática, conteúdo citoplasmático e do envoltório nuclear. F, flagelo; N, núcleo; D, disco ventral.

O mesmo protocolo citado acima quando realizado com trofozoítos de *T. vaginalis* e comparados com o controle (Fig. 18a), apresentaram contraste apreciável após o uso do ácido tânico no fixador mesmo na ausência da etapa de contrastação dos cortes ultrafinos com o acetato de uranila ou citrato de chumbo (Figs. 18 b-d).

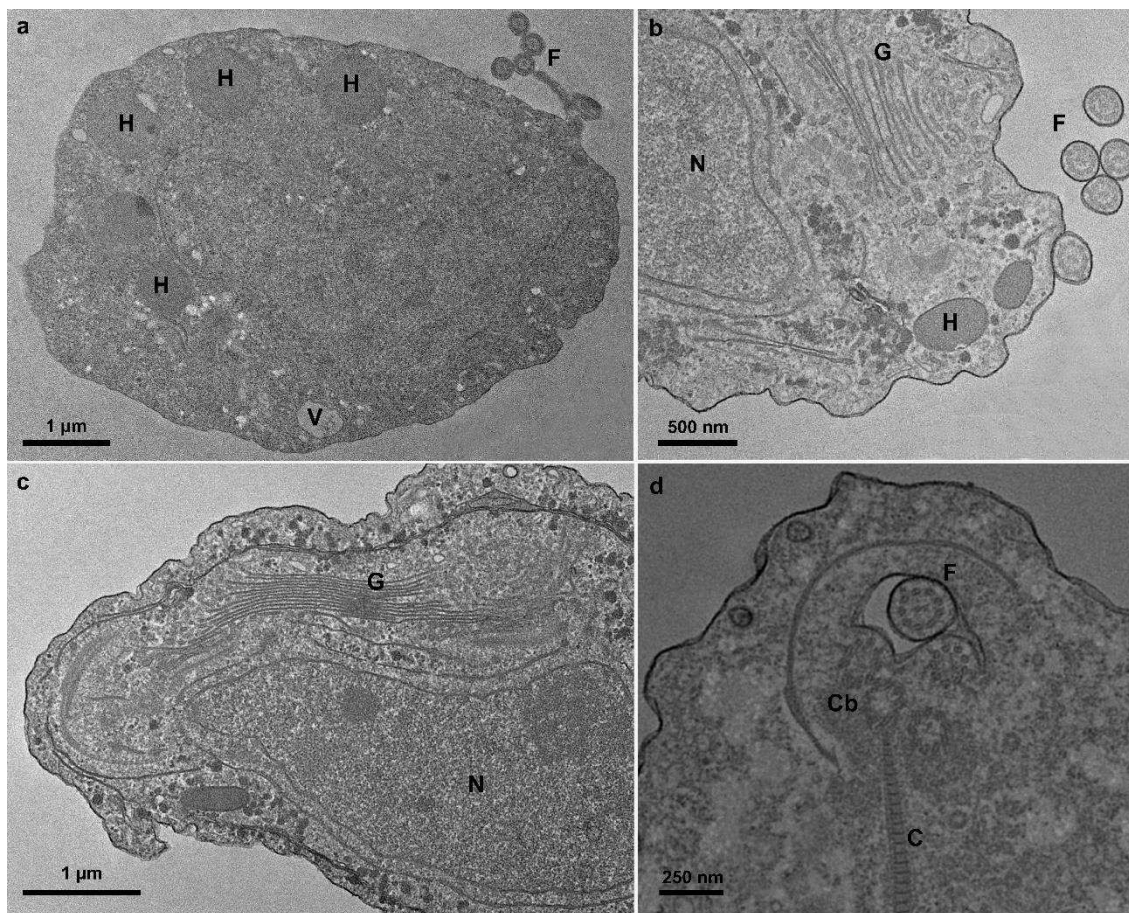


Figura 18. *T. vaginalis* fixadas com 2,5% de glutaraldeído sem (a), e com 1% de ácido tânico (b, c, d). Ambas pós-fixadas com OsO₄ e sem contrastação posterior. Nota-se em (b, c, d) que a membrana plasmática, microtúbulos e filamentos associados ao citoesqueleto estão bem delimitados. N, núcleo; H, hidrogenossomos; F, flagelos; V, vacúolo; G, complexo de Golgi; Cb, corpúsculo basal; C, costa.

5.1.2. Contrastação posterior completa

Ao comparar cortes ultrafinos de amostras fixadas com 2,5% de glutaraldeído e pós-fixadas com OsO₄, tanto na ausência (Fig. 11a), quanto na presença de ácido tânico (Fig. 11b-d), e contrastadas com acetato de uranila e citrato de chumbo, observou-se um aumento significativo no contraste aparente devido à ação mordente do ácido tânico.

Em amostras contendo o ácido tânico na solução fixadora, houve melhoria na visualização do glicocálix da membrana plasmática e membranas de organelas de *G. intestinalis*, tornando-as mais evidentes (Figs. 19b-d). O conteúdo citoplasmático também obteve aumento de contraste e de eletrondensidade aparente (Fig. 19b). Além disso, os microtúbulos dos flagelos (Fig. 19c) e os microtúbulos do disco ventral (DV) (Fig. 19b), componentes essenciais do citoesqueleto, foram preservados e se

apresentaram de forma clara, corroborando as informações disponíveis na literatura. Adicionalmente, vesículas periféricas de diferentes diâmetros (Fig. 19d) exibiram ótima delimitação, facilitando sua identificação e potencialmente aprimorando o estudo dessas estruturas.

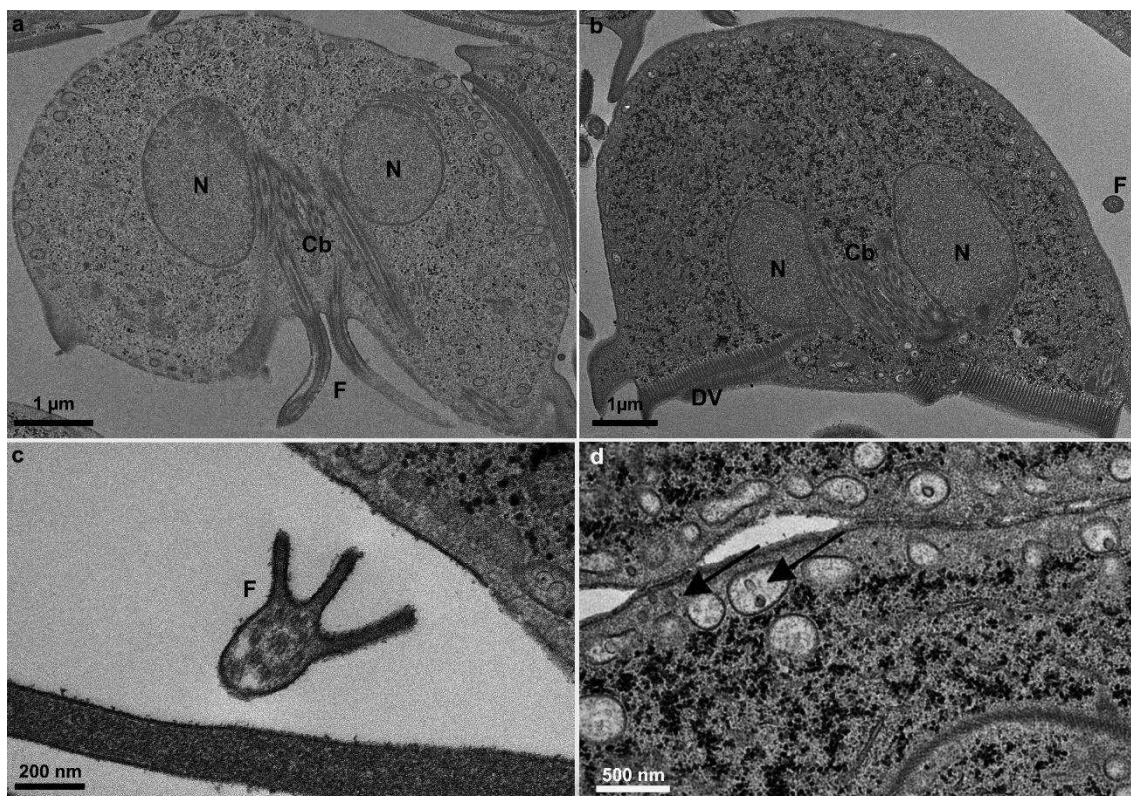


Figura 19. *G. intestinalis* fixadas com 2,5% de glutaraldeído sem (a) e com 1% de ácido tânico (b, c, d). Ambas pós-fixadas com OsO₄ e contrastação posterior completa. Notar que houve aumento de eletrondensidade da membrana plasmática (c, d). Setas pretas (d) apontam vesículas periféricas de diferentes diâmetros bem delimitadas. N, núcleo; Cb, corpúsculos basais; DV, disco ventral; F, flagelo.

Trofozoítos de *T. vaginalis* quando fixados com 2,5% de glutaraldeído, na presença de 1% de ácido tânico e pós-fixadas com OsO₄, com os cortes ultrafinos contrastados com acetato de uranila e citrato de chumbo, apresentaram aumento de contraste e eletrondensidade aparente da membrana plasmática (Fig. 20b, c), quando comparado ao controle. A região de contato de membrana-membrana ficou evidenciado (Fig. 20c) e em citoesqueletos isolados, permitiu melhor visualização de estruturas ligadas aos flagelos (Fig. 20d).

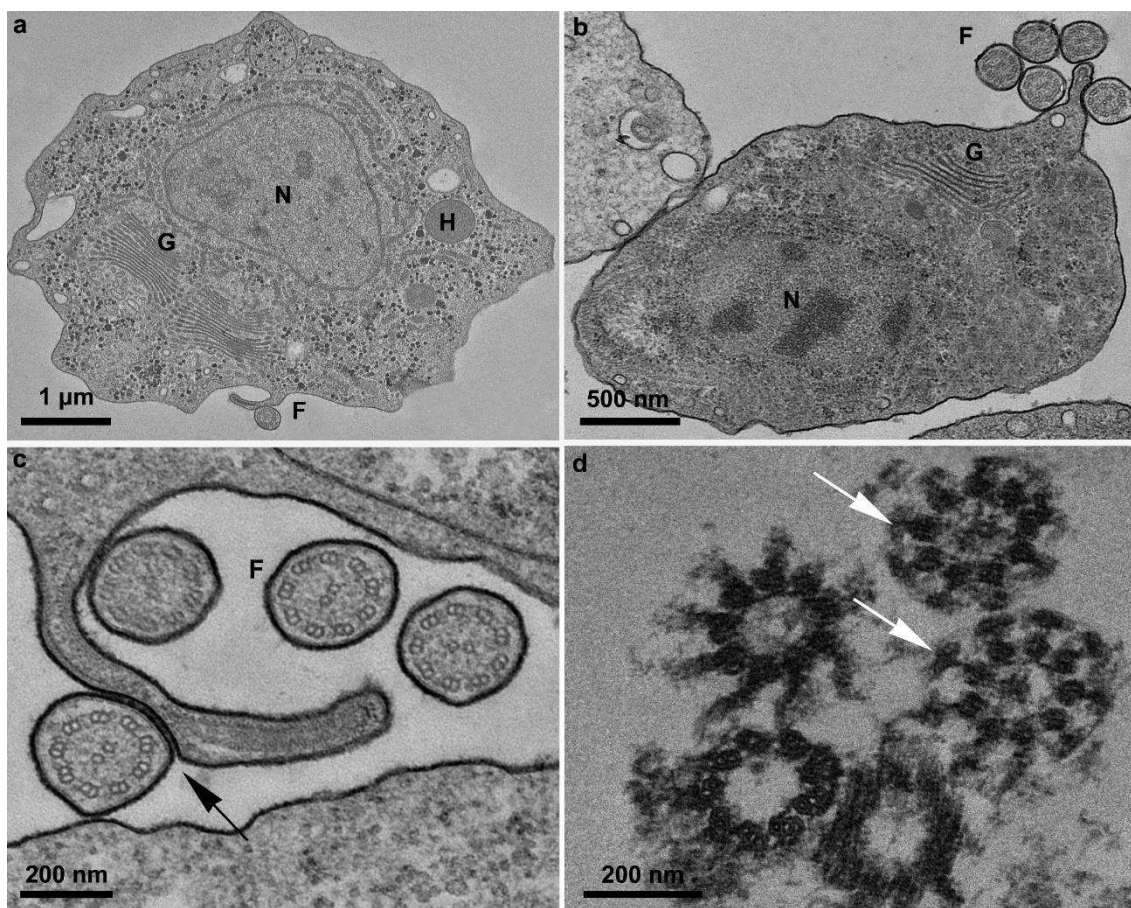


Figura 20. *T. vaginalis* fixadas com 2,5% de glutaraldeído sem (a) e com 1% de ácido tânico (b, c, d). Em (d) citoesqueleto isolado. Amostras pós-fixadas com OsO₄ e contração posterior completa. Notar que em (c) o contato de membrana-membrana está com maior eletrondensidade (seta preta,b) e em (d) aparecem estruturas ligadas aos flagelos (setas brancas). N, núcleo; H, hidrogenossomo; F, flagelo; G, complexo de Golgi.

5.1.3. Contratação posterior apenas com acetato de uranila

Os trofozoítos de *G. intestinalis*, quando fixados na presença de 1% de ácido tânico, pós-fixados com OsO₄ e contrastados apenas com acetato de uranila (Fig. 21a), em comparação os processados na ausência de ácido tânico (Fig. 21b) obtiveram contraste aparente aumentado do conteúdo citoplasmático e maior delimitação da membrana plasmática e do envoltório nuclear (Fig. 21b). Adicionalmente, os microtúbulos constituintes do citoesqueleto apresentaram boa delimitação (Fig. 21b).

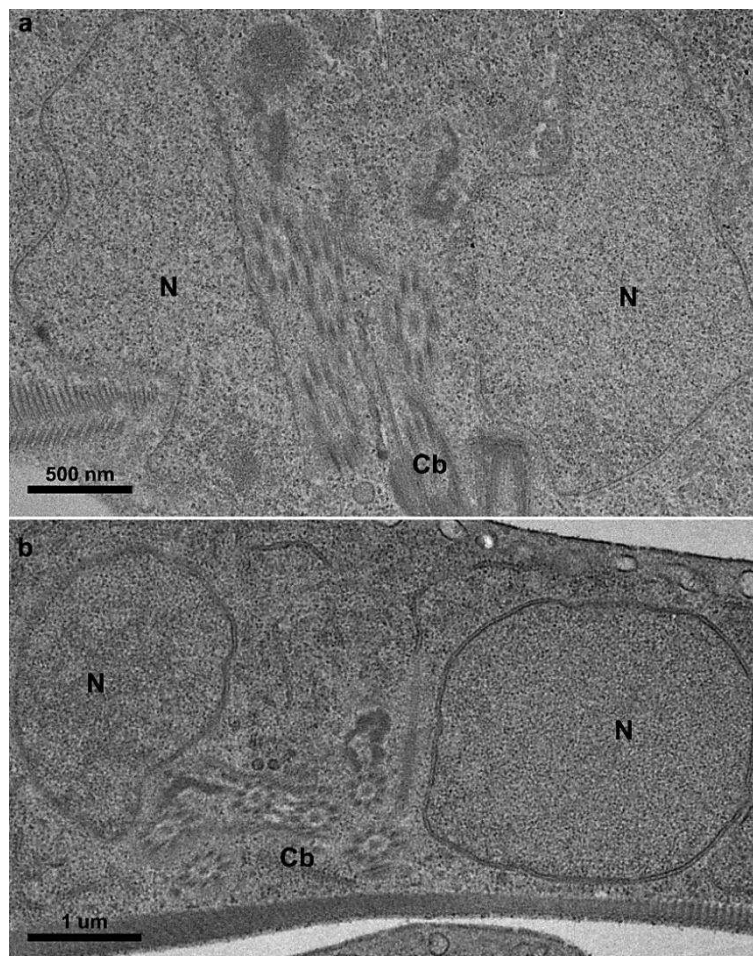


Figura 21. *G. intestinalis* fixadas com 2,5% de glutaraldeído sem (a) e com 1% de ácido tânico (b). Ambos receberam pós-fixação com OsO₄ e contrastação posterior apenas com acetato de uranila. Notar em (b) aumento discreto da eletrondensidade dos componentes citoplasmáticos. N, núcleo; Cb, corpúsculos basais.

Trofozoítos de *T. vaginalis* processados e contrastados conforme descrito acima, com ácido tânico no fixador, apresentaram maior eletrondensidade da membrana plasmática (Fig. 22b). Isso ocorreu mesmo quando os cortes foram submetidos apenas à contrastação com acetato de uranila. Além disso, o contraste aparente das amostras processadas com ácido tânico, que foram contrastadas apenas com acetato de uranila, foi semelhante ao das amostras fixadas sem ácido tânico e que receberam contrastação completa (Fig. 22a).

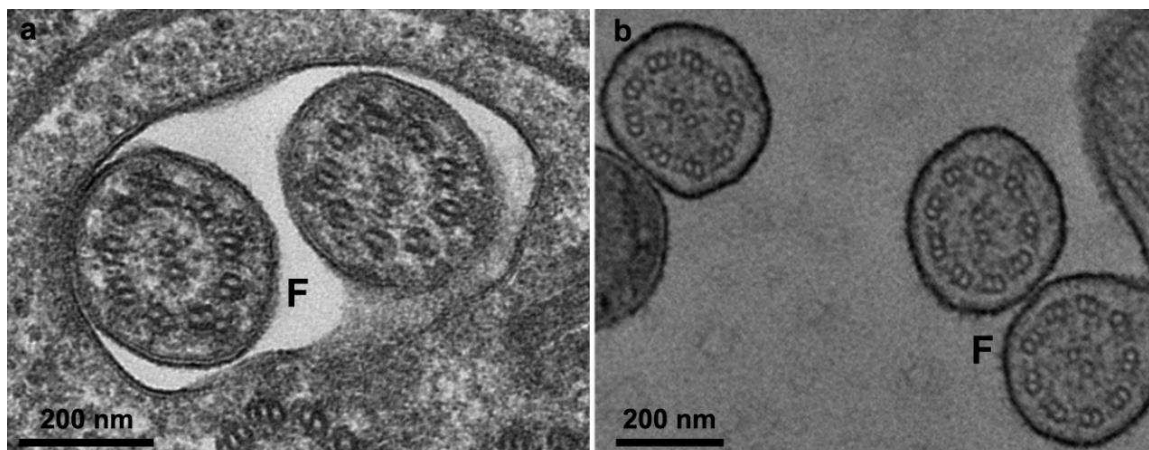


Figura 22. Flagelos (F) de *T. vaginalis*. Em (a) fixadas com 2,5% de glutaraldeído e contraste posterior completo, e em (b) e fixadas com 1% de ácido tânico e contrastação dos cortes ultrafinos apenas com acetato de uranila. Notar em (b) o aumento da eletrondensidade aparente da membrana plasmática.

5.1.4. Contrastação posterior apenas com citrato de chumbo

Os trofozoítos de *G. intestinalis* e *T. vaginalis*, quando fixados na presença de 1% de ácido tânico, pós-fixados com OsO₄ e contrastados apenas com citrato de chumbo apresentaram leve aumento do contraste aparente da membrana plasmática e envoltório nuclear (Figs. 23b, d e 24). Em *G. intestinalis* também ocorreu o mesmo em membranas de vesículas periféricas (Fig. 23d).

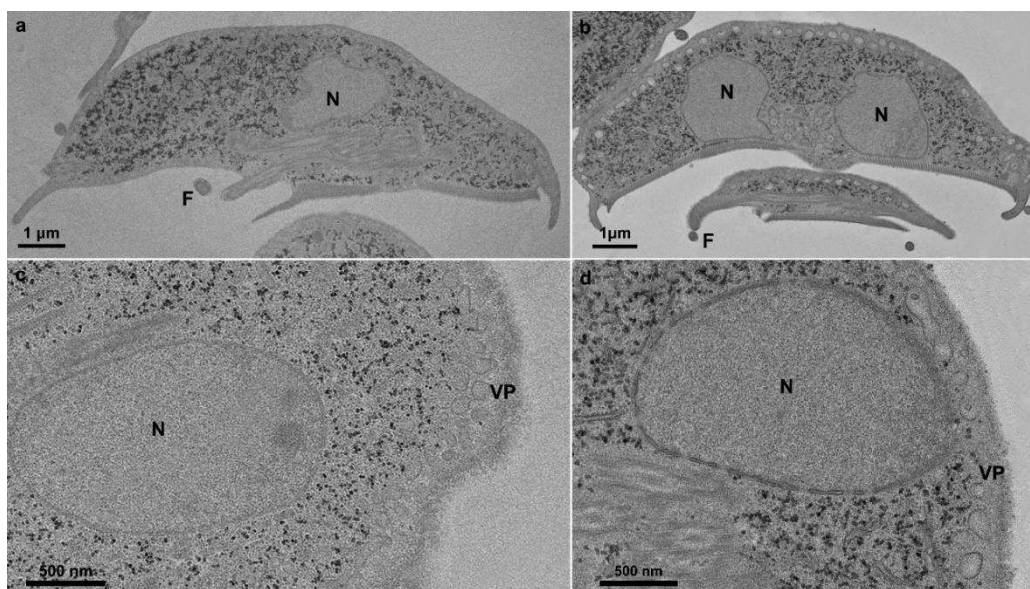


Figura 23. *G. intestinalis* fixadas com 2,5% de glutaraldeído sem (a, c) e com adição de ácido tânico (b, d). As amostras receberam pós-fixação com OsO₄ e contrastação posterior apenas com citrato de chumbo. Notar em (d) aumento da eletrondensidade do envoltório nuclear. VP, vesículas periféricas; N, núcleo; F, flagelo.

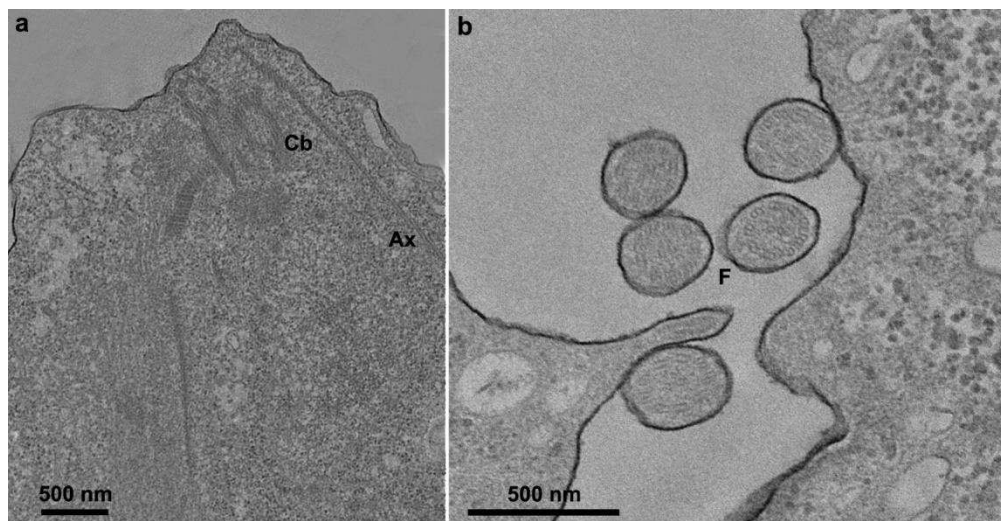


Figura 24. *T. vaginalis* fixadas com 2,5% glutaraldeído e 1% de ácido tânico (a, b), pós-fixação com OsO₄ e contrastação dos cortes ultrafinos apenas com citrato de chumbo. Notar boa delimitação da membrana plasmática. Cb, corpúsculos basais; Ax, axóstilo; F, flagelos.

5.2. Fixação com adição de ácido gálico e com pós-fixação

Os cortes ultrafinos, obtidos a partir do processamento das amostras biológicas fixadas em 2,5% de glutaraldeído com 1% de ácido gálico (Fig. 25) apresentaram contraste proeminente em relação às amostras fixadas com 2,5% de glutaraldeído, sem a adição deste ácido (Fig. 19a e 20a). As amostras foram pós-fixadas com OsO₄ e receberam a contrastação posterior completa.

Os trofozoítos *T. vaginalis* (Fig. 23a, b) e *G. intestinalis* (Fig. 25c, d) processados na presença de ácido gálico durante a fixação, mostraram boa preservação e contraste de todos os elementos citoplasmáticos. Contudo, a eletrondensidade observada foi inferior àquela verificada na presença de ácido tânico. Por exemplo, a membrana plasmática não exibiu eletrondensidade proeminente (Fig. 25), semelhante àquela conferida pelo ácido tânico (Figs. 17b, c, 18b-d, 19c, d, 20b, c, 22b e 24b).

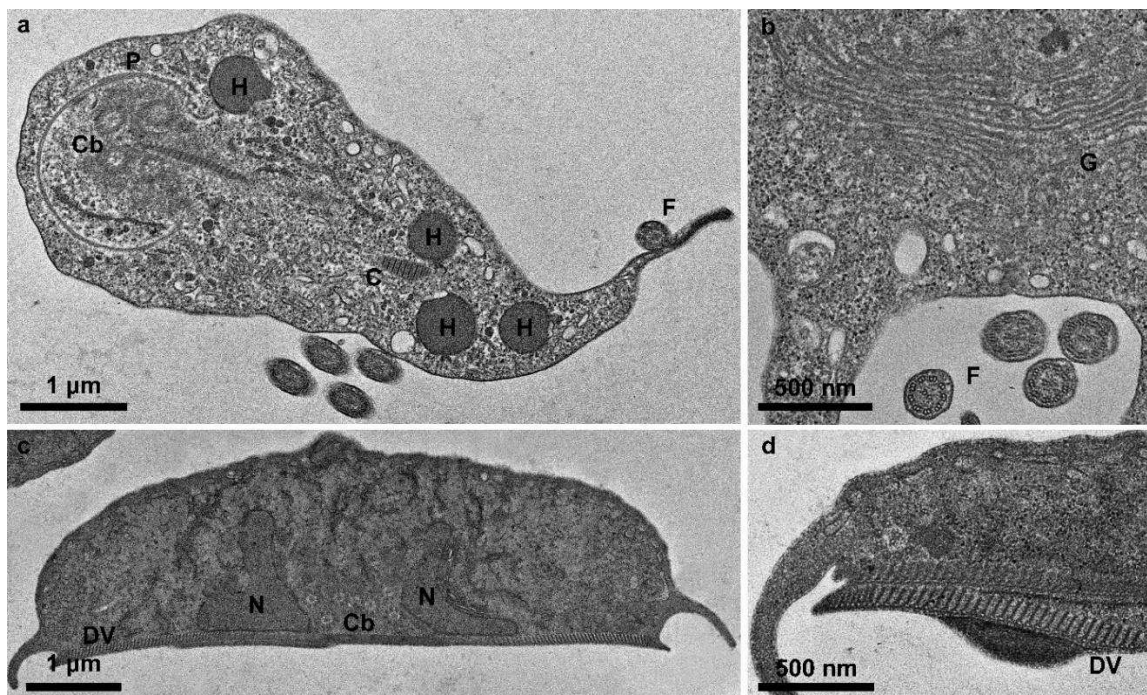


Figura 25. *T. vaginalis* (a, b) e *G. intestinalis* (c, d) fixadas com 2,5% glutaraldeído e 1% de ácido gálico, com pós-fixação com OsO_4 e contrastação posterior completa. Notar bom contraste de todos os elementos citoplasmáticos. Cb, corpúsculos basais; H, hidrogenossomos; C, costa; F, flagelo; G, complexo de Golgi; N, núcleo.

5.3. Fixação com adição de ácido tânico e sem pós-fixação

Nesta seção, as amostras foram fixadas em uma solução de 2,5% de glutaraldeído, com a adição de 1% de ácido tânico, por 2 horas, omitindo-se a etapa de pós-fixação com OsO_4 . A seguir, apresentam-se as modificações e combinações de técnicas utilizadas para avaliar a substituição do OsO_4 .

Os trofozoítos de *G. intestinalis* e *T. vaginalis*, processados sem OsO_4 , sofreram extração parcial de conteúdo citoplasmático (Fig. 26a, c), provavelmente de componentes lipídicos. No entanto, não houve comprometimento dos elementos do citoesqueleto (Fig. 26b, d).

5.3.1. Fixação com ácido tânico, omissão de OsO_4 e contrastação posterior completa

Conforme detalhado anteriormente, as amostras foram fixadas em glutaraldeído e ácido tânico, omitindo-se o OsO_4 e analisadas com contrastação posterior completa. Essa abordagem visou investigar os efeitos do ácido tânico na amostra.

Giardia intestinalis apresentaram boa contrastação e eletronsidade aparente do citoesqueleto evidenciando os microtúbulos do disco ventral (Fig. 26a) e dos corpúsculos basais (Fig. 26b).

Trichomonas vaginalis também apresentaram boa contrastação e eletronsidade aparente do núcleo, hidrogenossomos (Fig. 26c) e do citoesqueleto, evidenciando microtúbulos que constituem os corpúsculos basais, o axóstilo e a pelta (Fig. 26d).

Além disso, a análise do complexo de Golgi em *T. vaginalis* processadas nas condições descritas nesta seção, revelou uma aparência distinta quando comparada com o processamento convencional (Fig. 26e, f), que não inclui a adição de ácido tânico na solução fixadora e que é feita a pós-fixação com OsO₄. Nesta organela, observou-se uma eletrodensidade proeminente tanto na região central (Fig. 26e), quanto nas áreas distais das cisternas (Fig. 26f).

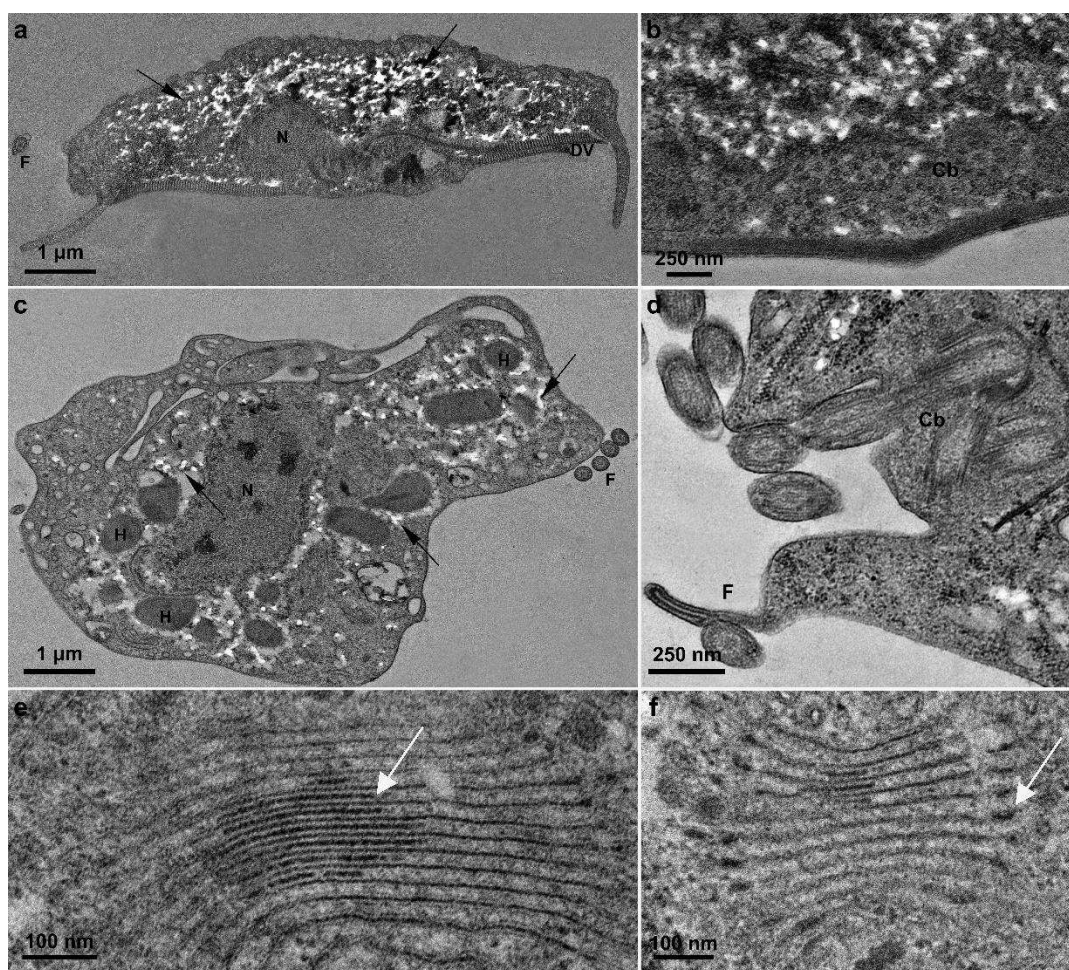


Figura 26. *G. intestinalis* (a, b) e *T. vaginalis* (c-f) fixadas com 2,5% de glutaraldeído e 1% de ácido tânico, sem pós-fixação com OsO₄ e contrastação posterior completa. Setas pretas apontam extração do conteúdo citoplasmático, onde se encontrava o glicogênio, como efeito da ausência do OsO₄. Setas brancas apontam complexo de Golgi com eletrondensidade proeminente na região central e distal.

Notar em (b, d) que os componentes do citoesqueleto apresentam boa preservação e eletrondensidade. N, núcleo; DV, disco ventral; F, flagelo; H, hidrogenossomos; Cb, corpúsculo basal.

5.3.2. Ácido tânico, omissão do OsO₄ e coloração “*in bloc*” (2% de acetato de uranila em acetona 70%)

Nesta seção, as amostras foram fixadas em uma solução de 2,5% de glutaraldeído, com a adição de 1% de ácido tânico, por 2 horas. A etapa de pós-fixação com OsO₄ foi omitida. Na etapa de desidratação, foi realizada a adição de 2% de acetato de uranila na acetona 70% e incubação durante a noite. A seguir, são apresentados os resultados desse processamento onde os cortes foram visualizados sem contrastação e com contrastação com acetato de uranila e citrato de chumbo.

Os trofozoítos de *G. intestinalis* (Fig. 27a, b) e *T. vaginalis* (Fig. 27c, d), processados conforme detalhado anteriormente, apresentaram extração moderada do conteúdo citoplasmático (Fig. 27a, c).

5.3.2.1. Contrastação posterior ausente

Os trofozoítos de *G. intestinalis* (Fig. 27a, b) e *T. vaginalis* (Fig. 27c, d) processados conforme detalhado acima, apresentaram baixo contraste dos elementos celulares. O acetato de uranila utilizado na etapa da desidratação conferiu pouco contraste dos elementos celulares, em um aspecto de contrastação negativa no envoltório nuclear (Fig. 27b). As estruturas que compõem o citoesqueleto se apresentaram de maneira delimitada, porém pouco eletrondensas (Fig. 27b, d).

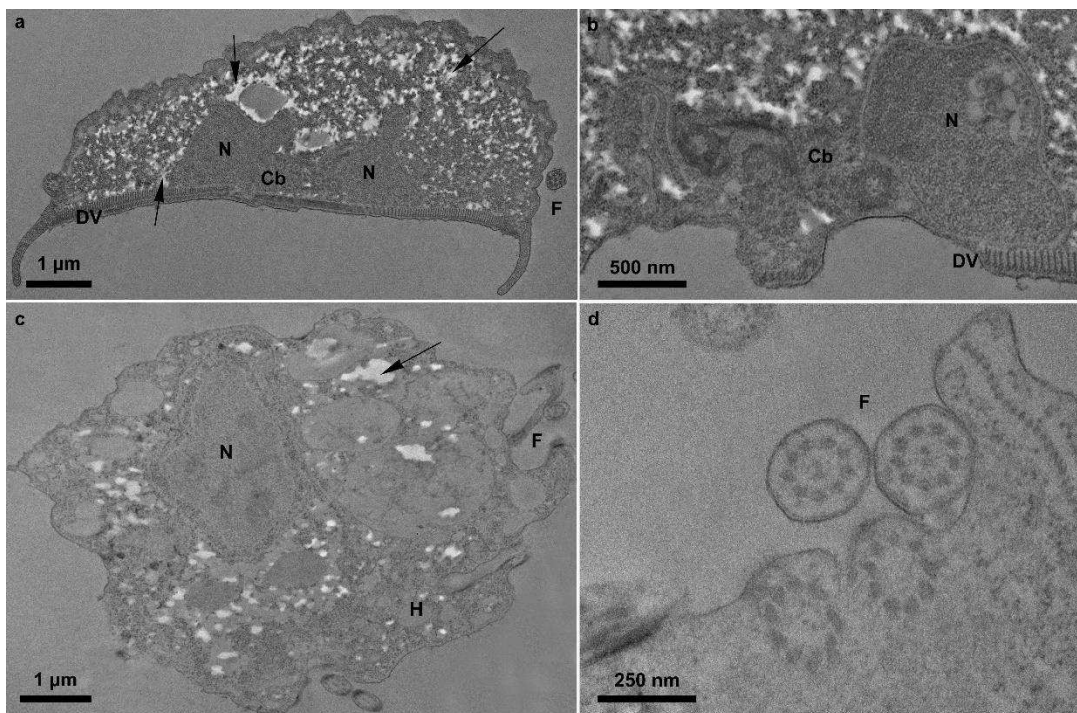


Figura 27. *G. intestinalis* (a, b) e *T. vaginalis* (c, d) fixadas com 2,5% de glutaraldeído e 1% de ácido tânico, sem pós-fixação com OsO₄, com adição de acetato de uranila durante desidratação e sem contrastação posterior. As setas indicam a extração do conteúdo citoplasmático onde se encontrava o glicogênio. F, flagelo; N, núcleo; DV, disco ventral; Cb, corpúsculos basais; H, hidrogenossomo.

5.3.2.2. Contrastação posterior completa

Os trofozoítos de *G. intestinalis* (Fig. 28a) e *T. vaginalis* (Fig. 28b), processados conforme descrito anteriormente, com a omissão do OsO₄ e a adição de 2% de acetato de uranila na desidratação, apresentaram melhor visualização ao serem analisados com contrastação posterior completa (Fig. 28), em comparação àqueles que não passaram por essa última etapa (Fig. 27).

Para analisar componentes do citoesqueleto se mostrou uma abordagem vantajosa, porque permitiu visualização sem que haja a extração da membrana plasmática por ação de detergentes, em *G. intestinalis* (Fig. 28a) e *T. vaginalis* (Fig. 28b). Muitos componentes proteicos associados aos corpúsculos basais são exemplos de componentes do citoesqueleto que ainda não foram totalmente resolvidos em ambos os protozoários.

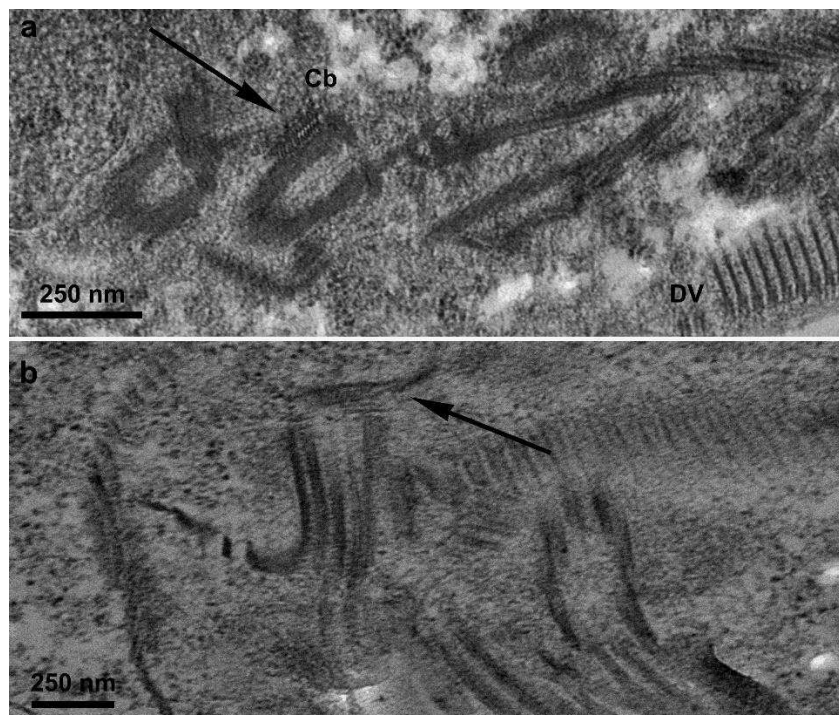


Figura 28. Elementos do citoesqueleto de *G. intestinalis* (a) e *T. vaginalis* (b) fixadas com 2,5% de glutaraldeído e 1% de ácido tânico, sem pós-fixação com OsO_4 , com acetato de uranila durante a desidratação, e contrastação posterior completa. As setas indicam estruturas associadas aos corpúsculos basais (Cb). DV, disco ventral.

5.3.3. Ácido tânico, omissão de OsO_4 , uso de ferrocianeto de potássio 1.6% e coloração “*in bloc*”

As amostras desta seção foram fixadas em uma solução de 2,5% de glutaraldeído com a adição de 1% de ácido tânico, seguindo uma abordagem que dispensou a etapa de pós-fixação com OsO_4 . Durante a desidratação com acetona 70%, foi adicionado 1,6% de ferrocianeto de potássio e 2% de acetato de uranila. Este processamento foi realizado exclusivamente com trofozoítos de *G. intestinalis*. As amostras foram visualizadas sem contrastação posterior e com contrastação posterior completa. Esse processamento resultou em extração do conteúdo citoplasmático (Fig. 29).

5.3.3.1. Contrastação posterior ausente

Os trofozoítos de *G. intestinalis*, processados conforme descrito acima e analisados sem contrastação posterior, apresentaram contraste insatisfatório (Fig. 29a, b). Embora a membrana plasmática se destacasse levemente em relação aos demais elementos celulares com pequenos pontos eletrondensos (Fig. 29b). Além

disso, as membranas das organelas e os componentes do citoesqueleto também não mostraram um contraste adequado (Fig. 29a).

5.3.3.2. Contrastação posterior completa

Os trofozoítos de *G. intestinalis*, processados conforme descrito anteriormente e submetidos a uma contrastação posterior completa, apresentaram boa contrastação mesmo na ausência do OsO₄ (Fig. 29c, d). Os componentes do citoesqueleto, incluindo os corpúsculos basais e suas estruturas acessórios, se apresentaram claramente delimitados, assim como a membrana plasmática e o envoltório nuclear (Fig. 29c, d). A ação mordente do ácido tânico no fixador, juntamente com o ferrocianeto de potássio e o acetato de uranila durante a desidratação e a contrastação posterior completa, resultou em uma qualidade geral satisfatória de contrastação (Fig. 29c).

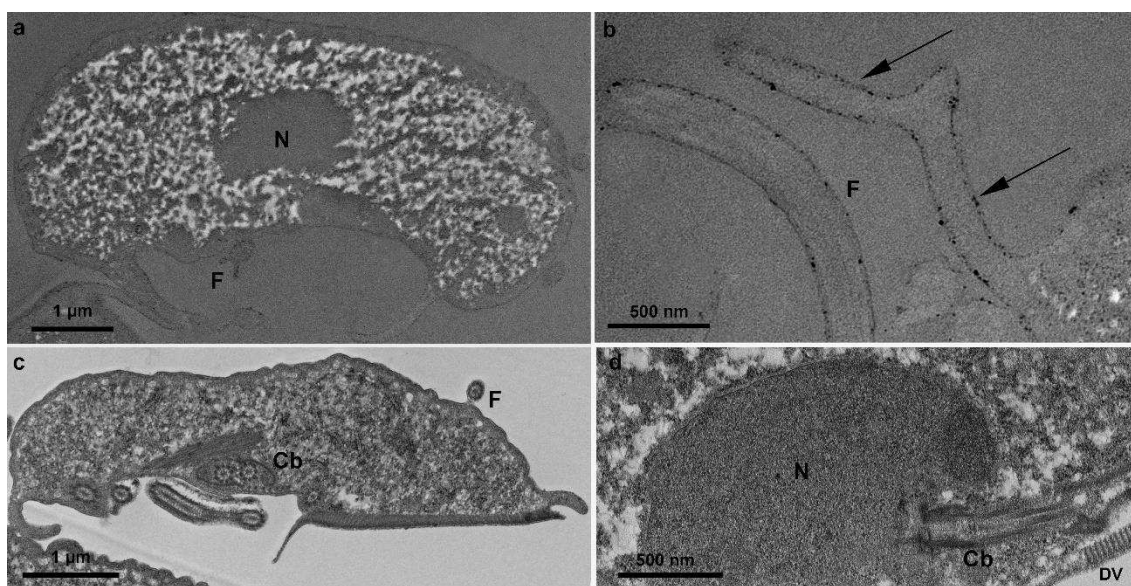


Figura 29. *G. intestinalis* fixadas com 2,5% de glutaraldeído e 1% de ácido tânico, sem pós-fixação com OsO₄, adição de ferrocianeto de potássio e acetato de uranila durante a desidratação, com contrastação posterior ausente (a, b) e completa (c, d). As setas indicam pontos eletrodensos na membrana plasmática. N, núcleo; F, flagelo; Cb, corpúsculo basal; DV, disco ventral.

5.3.4. Ácido tânico, omissão do OsO₄ e uso de permanganato de potássio (PK)

Os trofozoítos de *T. vaginalis* e *G. intestinalis* foram fixados na presença de 1% de ácido tânico, omitindo a etapa de pós-fixação com OsO₄. Em seguida, foram

incubados em PK a 0,6% e, durante a desidratação, receberam a adição de 2% de acetato de uranila na acetona a 70%.

As amostras apresentaram leve extração do conteúdo citoplasmático (Fig. 30) e membrana plasmática com delimitação (Fig. 30c). A seguir, são apresentados os resultados desse processamento onde os cortes foram visualizados sem contrastação posterior e com contrastação posterior completa.

5.3.4.1. Contrastação posterior ausente

Os trofozoítos de *G. intestinalis*, processados conforme descrito, sem receber a contrastação posterior, resultou em uma contrastação insatisfatória, o que dificultou a distinção de alguns elementos citoplasmáticos (Fig. 30a). Além disso, os microtúbulos do flagelo não foram evidenciados (Fig. 30a).

Os trofozoítos de *T. vaginalis*, processados conforme descrito acima com contrastação posterior ausente, exibiram sutil delimitação do envoltório nuclear, membrana plasmática e membrana de vacúolos, e de organelas como hidrogenossomos e complexo de Golgi (Fig. 30c). No entanto, assim como observado nos trofozoítos de *G. intestinalis*, a visualização dos microtúbulos dos flagelos não foi satisfatória.

5.3.4.2. Contrastação posterior completa

Os trofozoítos de *G. intestinalis*, processados conforme descrito e submetidos a contrastação posterior completa, apresentaram uma contrastação satisfatória dos componentes do citoesqueleto (Fig. 30b). A adição do acetato de uranila e citrato de chumbo nos cortes possibilitou a visualização de microtúbulos, tanto dos flagelos quanto de outros componentes citoplasmáticos (Fig. 30b).

Os trofozoítos de *T. vaginalis*, processados conforme descrito anteriormente e submetidos a uma contrastação posterior completa, exibiram contrastação dos componentes do citoesqueleto (Fig. 30d).

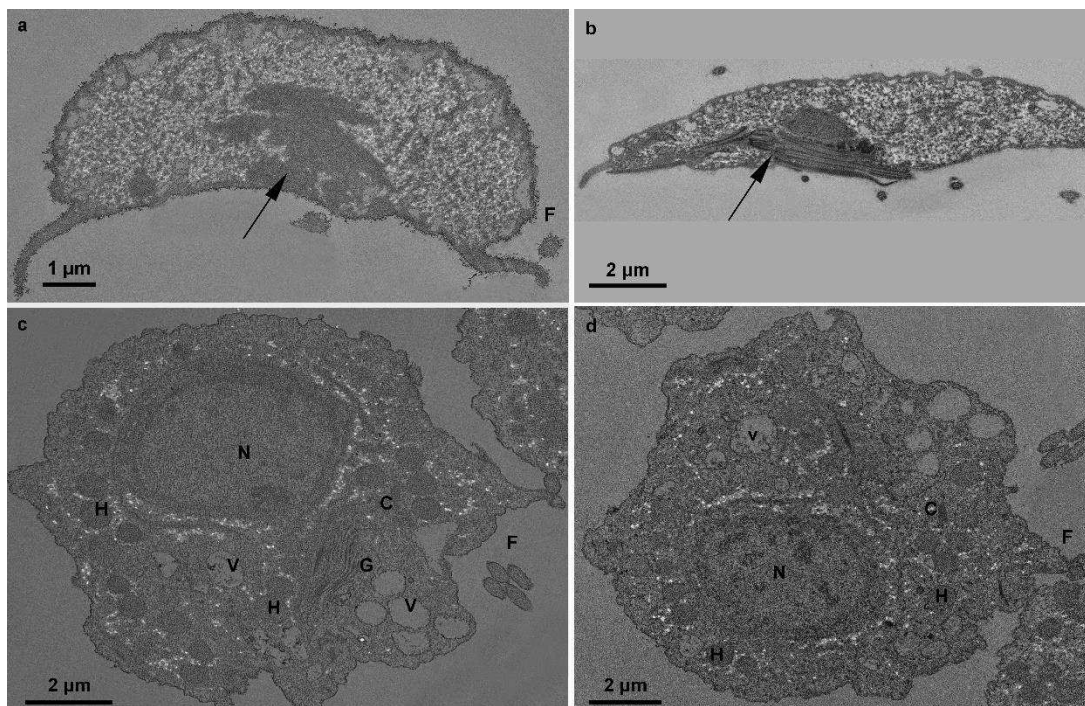


Figura 30. *G. intestinalis* (a, b) e *T. vaginalis* (c, d) fixadas com 2,5% de glutaraldeído e 1% de ácido tânico, sem pós-fixação com OsO_4 , adição de permanganato de potássio e acetato de uranila na etapa de desidratação, com contrastação posterior ausente (a, c) e completa (b, d). Notar em (a) os componentes celulares sem definição, e em (b), com contrastação completa já há definição (setas). F, flagelo; H, hidrogenossomo; V, vacúolo; N, núcleo; C, costa; G, complexo de Golgi.

5.3.5. Adição de ácido tânico, omissão do OsO_4 e uso de verde malaquita

Os trofozoítos de *G. intestinalis*, fixados na presença de ácido tânico e utilizando verde malaquita a 2% por uma hora com o intuito de substituir o OsO_4 na etapa de pós-fixação, apresentaram extração de conteúdo citoplasmático e pouca preservação da forma das vesículas periféricas e da membrana plasmática, embora esta última tenha demonstrado boa contrastação e eletrondensidade (Fig. 31a).

Os trofozoítos de *T. vaginalis* processadas conforme descrito também apresentaram uma maior extração do conteúdo citoplasmático (Fig. 31b), e a preservação dos elementos celulares foram piores que os efeitos de *G. intestinalis*. As membranas de organelas apresentaram pouca delimitação (Fig. 31b).

5.3.5.1. Contrastação posterior completa

G. intestinalis, processadas conforme protocolo descrito, e após receber uma contrastação posterior completa, apresentaram contrastação satisfatória dos componentes celulares. O envoltório nuclear exibiu um aspecto de contrastação

negativa (Fig. 31a), enquanto as estruturas do citoesqueleto apresentaram contração satisfatória, incluindo os microtúbulos constituintes do disco ventral (Fig. 31a).

T. vaginalis, processadas conforme protocolo descrito e após receber uma contração posterior completa, apresentaram eletrondensidade da membrana plasmática (Fig. 31b) e dos componentes do citoesqueleto (Fig. 31b). No entanto, ao contrário do observado em *G. intestinalis*, não houve boa delimitação do envoltório nuclear e membranas de organelas, como hidrogenossomos (Fig. 31b).

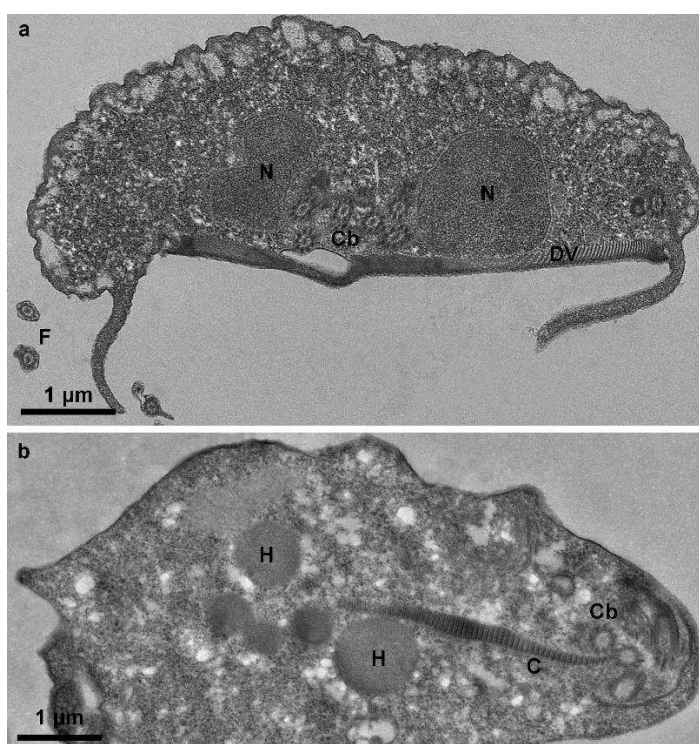


Figura 31. *G. intestinalis* (a) e *T. vaginalis* (b) fixadas com 2,5% de glutaraldeído e 1% de ácido tânico, pós-fixação com verde malaquita e contração posterior completa. Notar que a qualidade geral da preservação foi pior em *T. vaginalis* (b). F, flagelo; H, hidrogenossomo; V, vacúolo; N, núcleo; C, costa.

5.4. Contrastação de cortes ultrafinos com ácido tânico

Os trofozoítos de *G. intestinalis* (Fig. 32a) e *T. vaginalis* (Fig. 32b) foram fixados com 2,5% de glutaraldeído, sem a adição de ácido tânico. O processo incluiu a pós-fixação com OsO_4 , seguida de desidratação, infiltração e inclusão convencionais. Durante a etapa de contração posterior dos cortes ultrafinos, foram realizadas as seguintes combinações: a) apenas com ácido tânico, b) ácido tânico seguido de acetato de uranila e c) ácido tânico seguido de citrato de chumbo.

5.3.6. Ácido tânico

Os trofozoítos de *G. intestinalis* (Fig. 32a) e *T. vaginalis* (Fig. 32b), que receberam a contrastação posterior apenas com ácido tânico apresentaram contraste moderado, permitindo a definição de todos os componentes celulares, sem apresentar artefatos. Não foi observada afinidade maior do ácido tânico por nenhuma estrutura específica.

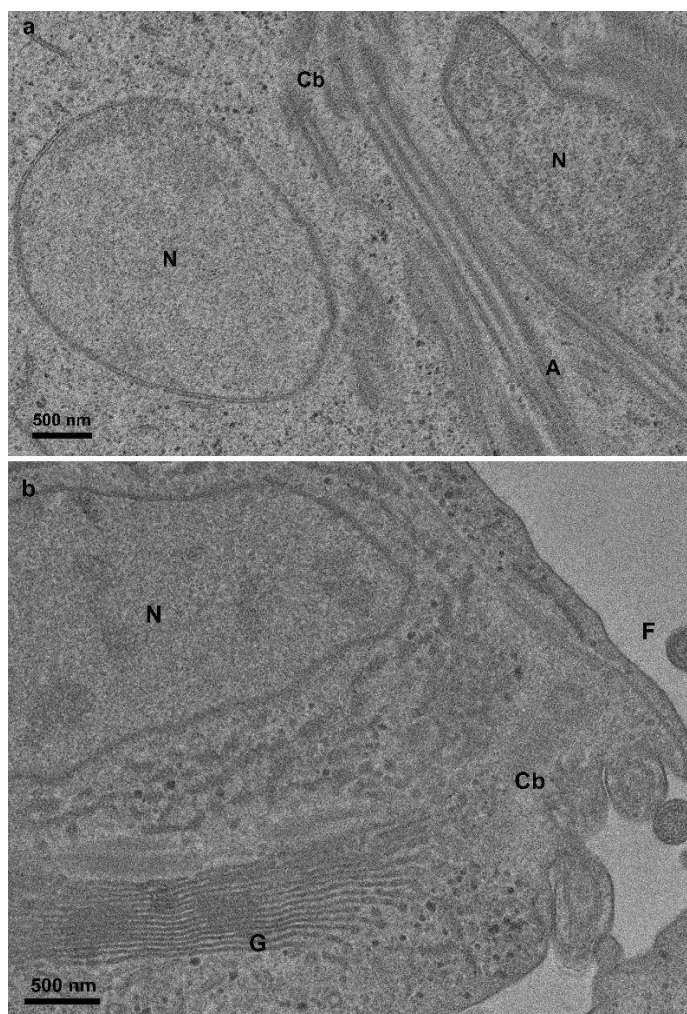


Figura 32. *G. intestinalis* (a) e *T. vaginalis* (b) com contrastação posterior apenas por ácido tânico. Notar que a membrana plasmática e a membrana de organelas estão delimitadas. N, núcleo; Cb, corpúsculo basal; A, axonema; G, complexo de Golgi; F, flagelo.

5.3.7. Ácido tânico e acetato de uranila

Os trofozoítos de *G. intestinalis* (Fig. 33a) e *T. vaginalis* (Fig. 33b), que receberam a contrastação posterior com ácido tânico e, posteriormente, com acetato de uranila, apresentaram contraste moderado, permitindo a visualização de todos os

componentes celulares. Não houve uma diferença significativa de contraste entre as imagens obtidas com contrastação apenas de ácido tânico e aquelas que receberam ácido tânico seguido de acetato de uranila, ambas com 20 minutos de incubação. Não foram encontrados artefatos.

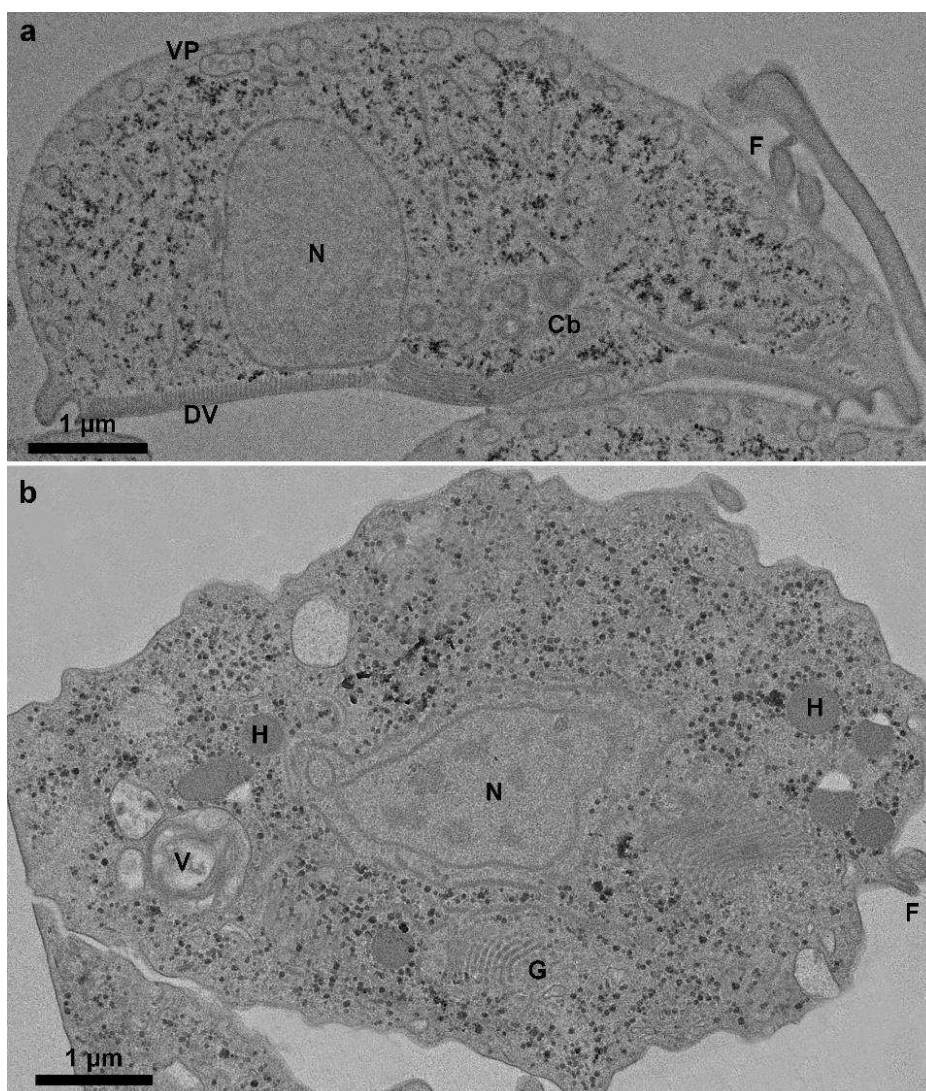


Figura 33. *G. intestinalis* (a) e *T. vaginalis* (b) com contrastação posterior de ácido tânico e acetato de uranila. Notar que a membrana plasmática e demais componentes celulares com bom contraste. VP, vesículas periféricas; N, núcleo; DV, disco ventral; Cb, corpúsculo basal; F, flagelo.

5.3.8. Ácido tânico e citrato de chumbo

Os trofozoítos de *G. intestinalis* (Figs. 34a, b) e *T. vaginalis* (Figs. 34c, d), que receberam a contrastação posterior com ácido tânico e, posteriormente, com citrato de chumbo, apresentaram bom contraste e eletrondensidade de todas as estruturas celulares. A associação do ácido tânico ao citrato de chumbo permitiu uma melhor

delimitação de estruturas compostas por microtúbulos (Fig. 34b) e a área de contato célula-célula foi bem delimitada (Fig. 34d), em comparação às demais combinações de contrastantes realizadas na presença do ácido tânico. Não foram encontrados artefatos.



Figura 34. *G. intestinalis* (a, b) e *T. vaginalis* (c, d) com contrastação posterior com ácido tânico e citrato de chumbo. A seta em (d) indica contato célula-célula. Notar que a contrastação foi satisfatória para todos os elementos celulares observados. N, núcleo; F, flagelo; G, complexo de Golgi.

5.5. Análise estatística do contraste

Para avaliação do aumento ou diminuição de contraste do protocolo sugerido, foram gerados histogramas e gráficos representativos da distribuição de intensidade das imagens das amostras biológicas fixadas na presença de 1% de ácido tânico e, adicionalmente, pós-fixadas com OsO_4 (AT). Esses gráficos foram comparados com aqueles das amostras biológicas fixadas na ausência de ácido tânico e, adicionalmente, pós-fixadas com OsO_4 (Ctrl), nas condições de contrastação dos cortes ultrafinos: contraste completo (Fig. 35a), sem contraste (Fig. 35b), apenas acetato de uranila (Fig. 35c) e apenas citrato de chumbo (Fig. 35d).

Foi realizada a análise de área sob a curva (AUC) que visou avaliar a acumulação dos dados ao longo de uma variável contínua (Fig. 35).

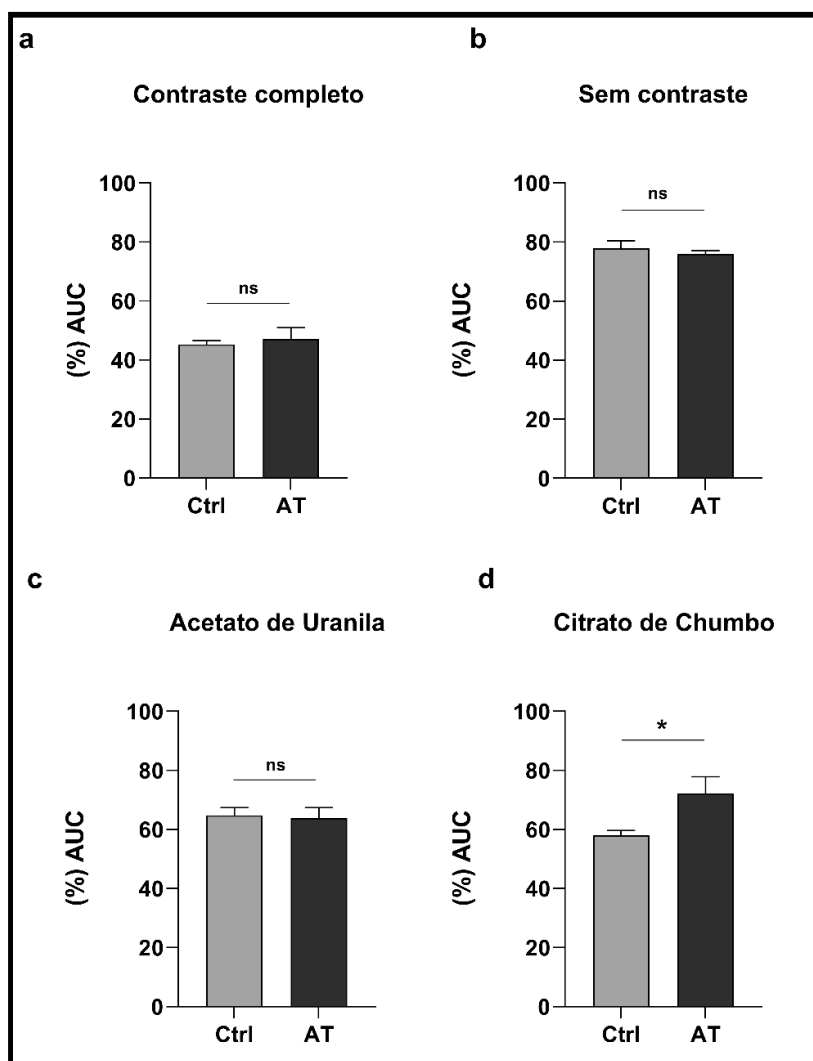


Figura 35. Análise da área sob a curva normalizada pela porcentagem (%AUC), realizado teste t não pareado e paramétrico. Em (a, b, c) não houve diferença significativa entre os pontos de distribuição de intensidade. Notar que em (d) a presença do ácido tânico associado ao citrato de chumbo, intensificou o contraste de maneira significativa (*). Ctrl, processamento controle; AT, processamento com ácido tânico; ns, não significativo.

Tabela 2. Resumo dos resultados obtidos a partir dos protocolos testados em *Giardia intestinalis* e *Trichomonas vaginalis*

Etapas do Processamento					Vantagens	Desvantagens
Fixação	Pós-fixação	Contrastação posterior				
		AT	AU	CC		
2,5% GA + 1% AT	OsO ₄	✗	✓	✓	<ul style="list-style-type: none">• Aumento de contraste aparente de todos os elementos celulares• Aumento da eletrondensidade aparente da membrana plasmática• Pode ajudar a revelar estruturas proteicas de baixo peso molecular• Bom desempenho para estudar citoesqueleto isolado• Não apresenta artefatos	<ul style="list-style-type: none">• Adição de mais um reagente no processamento para MET• Não reduz tempo ou custo
		✗	✓	✗	<ul style="list-style-type: none">• Dispensa o uso do citrato de chumbo• Tempo de preparo menor	✗
2,5% GA + 1% AT	✗	✗	✓	✓	<ul style="list-style-type: none">• Manutenção estrutural apenas dos componentes do citoesqueleto	<ul style="list-style-type: none">• Extração do conteúdo citoplasmático
2,5% GA + 1% AG	OsO ₄	✗	✓	✓	<ul style="list-style-type: none">• Aumento do contraste aparente de todos os elementos celulares	<ul style="list-style-type: none">• Adição de mais um reagente no processamento para MET;• Desempenho inferior ao do AT
2,5% GA + 1% AT	VM	✗	✓	✓	<ul style="list-style-type: none">• Manutenção estrutural apenas dos componentes do citoesqueleto	<ul style="list-style-type: none">• Extração do conteúdo citoplasmático• Não substitui o uso do OsO₄
2,5% GA + 1% AT	PK	✗	✓	✓	<ul style="list-style-type: none">• Manutenção estrutural apenas dos componentes do citoesqueleto	<ul style="list-style-type: none">• Extração do conteúdo citoplasmático• Não substitui o uso do OsO₄
2,5% GA	OsO ₄	✓	✗	✓	<ul style="list-style-type: none">• Ótima visualização de todos os elementos celulares• Dispensa o uso do acetato de uranila• Não apresenta artefatos• Preço de 1g de AT é mais barato que 1g de AU	✗

GA, glutaraldeído; AT, ácido tânico; AG, ácido gálico; OsO₄, tetróxido de ósmio; VM, verde malaquita; PK, permanganato de potássio, AU, acetato de uranila; CC, citrato de chumbo. ✓ = foi utilizado. ✗ = não foi utilizado ou não apresentou.

6. DISCUSSÃO

O aprimoramento contínuo das técnicas de processamento para MET é essencial para aprofundar a compreensão da morfologia e ultraestrutura de modelos biológicos, como parasitas anaeróbios, possibilitando avanços significativos na biologia celular e na pesquisa de doenças associadas. Baseado em nossos resultados, esta seção discute os principais achados deste estudo e visa interpretar os resultados à luz das implicações teóricas e práticas, bem como identificar possíveis limitações e direções futuras.

6.1. Adição de ácido tânico e com pós-fixação com OsO₄

A análise realizada revelou que, ao processar *G. intestinalis* e *T. vaginalis* com ácido tânico na etapa de fixação, com pós-fixação de OsO₄, e contração posterior completa, resultou em maior espessura e eletrondensidade da membrana plasmática. Isso sugere que o método proposto poderia ser uma estratégia adequada para estudar interações célula-célula ou contato direto entre as membranas plasmáticas de células vizinhas. Essa abordagem poderia ser utilizada para visualizar outros fenômenos celulares, como o momento de invasão de parasitos intracelulares, verificar especializações da membrana plasmática, como interdigitações e outras áreas juncionais, ou esclarecer dúvidas sobre a fusão de membranas como ocorre na interação de parasitos com células hospedeiras.

Protocolos de citoquímica são empregados para visualizar componentes específicos da membrana plasmática e aumentar a eletrondensidade. O método descrito por Thiéry (1967), por exemplo, visa evidenciar carboidratos e localizar glicoproteínas associadas à membrana plasmática. Utiliza diversos reagentes, como ácido periódico, ácido acético, tiosemicarbazida e proteinato de prata e requer mais de 24h para ser realizado, sem fazer distinção entre os vários tipos de carboidratos (THIÉRY, 1947). A abordagem sugerida nesta dissertação, com a adição do ácido tânico na solução fixadora e contração posterior completa dos cortes, pode servir como uma alternativa mais simples e rápida para investigar interações membrana-membrana, uma das utilizações do protocolo de Thiéry (1967).

Nossos resultados indicaram maior eletrondensidade da membrana plasmática e de componentes citoplasmáticos, corroborando os resultados iniciais de Mizuhira e

Futuesaku (1972), que observaram o efeito do ácido tânico como mordente. Mizuhira et al. (1976) relataram alta afinidade do ácido tânico por colágeno e Tachibana et al. (1977) discutiram brevemente sua eficácia em revelar proteínas de baixo peso molecular e complexos de lipoproteínas. Brunschwig et al., (1982) exploraram o uso do ácido tânico para estudar especializações da membrana plasmática, como junções que foram isoladas de músculo esquelético. Embora não tenhamos verificado afinidade maior do ácido tânico por componentes específicos em *G. intestinalis* e *T. vaginalis*, notamos que essa abordagem é vantajosa para o estudo do citoesqueleto isolado devido à observação de estruturas ligadas aos corpúsculos basais, como filamentos em faixa associados aos colares em banda em *G. intestinalis* e estruturas proteicas ligadas aos axonemas em *T. vaginalis*.

Na visualização da membrana plasmática, nossos resultados que utilizaram ácido tânico na solução fixadora e com pós-fixação pelo OsO₄, se alinham à literatura que reporta eletrondensidade proeminente em protozoários processados com ácido tânico, abrangendo membranas internas, como as de mitocôndrias e retículo endoplasmático, em protozoários como *T. cruzi* e *H. samuelpessoai* (SOARES e DE SOUZA, 1977), além do complexo de Golgi, com detalhes das cisternas de *T. foetus* (DÍAZ et al., 1996). A análise de amostras biológicas processadas com ácido tânico pode permitir a identificação de características ultraestruturais não evidentes com o processamento convencional.

Tilney et al. (1973), ao utilizarem o protocolo de Mizuhira e Futuesaku (1972), lograram evidenciar microtúbulos e a quantidade de protofilamentos, que apresentaram efeito de contrastação negativa, com belas imagens permitindo a visualização mais evidente e detalhada dessa estrutura. Para essa finalidade, Burton et al. (1975) observaram que a maioria das estruturas apresentava 13 protofilamentos, conforme relatado por Tilney et al. (1975). No entanto, foram identificadas exceções de estruturas com 12 e 15 protofilamentos, o que foi possível devido ao processamento com ácido tânico (BURTON et al., 1975). Em protozoários, esse mesmo protocolo foi utilizado e adaptado para analisar microtúbulos sub-películas em *T. cruzi* e *H. samuelpessoai* (SOARES e DE SOUZA, 1977). Em nosso trabalho, o uso de ácido tânico e ácido gálico na solução fixadora possibilitou a visualização eficaz das estruturas compostas por tubulinas do citoesqueleto de *G. intestinalis* e *T. vaginalis*. Esses protozoários apresentam diversas estruturas microtubulares como o

disco, funis e corpos medianos em *G. intestinalis* e axóstilo e pelta em *T. vaginalis*. Com uma investigação mais direcionada, os resultados obtidos ofereceram novas perspectivas em comparação às publicações de Holberton (1981), Peattie (1990) e Carvalho e Monteiro-Leal (2004) utilizando *G. intestinalis*, e de Wexler-Cohen (2013) em *T. vaginalis*. Como por exemplo, as estruturas ligadas aos corpúsculos basais de *G. intestinalis* ficaram evidentes, permitindo visualizar estruturas com proteínas provavelmente de baixo peso molecular, que ajudem a compreender o funcionamento do citoesqueleto e suas relações com as funções celulares. E por fim, em *T. vaginalis* o uso do ácido tânico permitiu visualização de estruturas ligadas aos axonemas, como estruturas da zona de transição, possibilitando futuros estudos sobre motilidade celular e demais funções associadas.

Observou-se que o processamento com adição de ácido tânico no fixador, utilizando apenas acetato de uranila como contraste posterior, não apresentou diferenças significativas em relação ao processamento padrão e à contrastação posterior completa. Este resultado sugere que a utilização de citrato de chumbo pode ser dispensável, contribuindo para a simplificação do protocolo e a redução de custos, além de mitigar riscos associados ao manuseio de reagentes tóxicos, formação de artefatos e depósitos cristalinos. O citrato de chumbo pode formar precipitados insolúveis se reagir com CO₂, portanto deve ser armazenado em alíquotas pequenas, e em recipientes cheios e lacrados.

Embora o ácido gálico seja considerado um mordente, sua eficácia é inferior à do ácido tânico. Seu peso molecular menor pode ter contribuído para a menor eletrondensidade aparente nas amostras em comparação com o ácido tânico. Sua ação, quando adicionado à solução fixadora, e em conjunto com a pós-fixação pelo OsO₄, foi evidente na preservação e no aumento do contraste aparente das estruturas celulares. No entanto, não se observou sua influência no espessamento aparente e no aumento da eletrondensidade da membrana plasmática de *T. vaginalis* e *G. intestinalis*.

6.2. Adição de ácido tânico na solução fixadora e sem pós-fixação com OsO₄

O OsO₄ é uma molécula de alto peso molecular que impede coagulação, ruptura e coagulação de lipoproteínas, essencial para a fixação de fosfolípidos da membrana plasmática, além de conferir contraste (HADDAD et al., 2007; SESSO, 2011). O OsO₄ reage bem a complexos proteicos com manoses, porém substâncias como glicose, manose ou glucosamina sozinhos, não reagem com OsO₄ e não são contrastados por ele (SARMIENTO et al., 2021). O OsO₄ reage com diversos aminoácidos (DEETZ e BEHRMAN, 1981), e com lipídios, tem o poder de realizar a oxidação em ligações insaturadas de ácidos graxos, adiciona eletrondensidade, o que dá contraste, e permeabiliza as células instantaneamente (WHITE et al., 1981; HÖÖG et al., 2010). Embora seu tempo de penetração seja mais lento que o do glutaraldeído, exposições superiores a duas horas resulta em extração proteica.

Embora a extração proteica represente uma desvantagem para o uso do OsO₄ em processamentos para MET em tempos longos, essa característica pode ser explorada em outros tipos de processamento. Fukudome e Tanaka (1986) desenvolveram um protocolo de clivagem e maceração de células livres, utilizando células fixadas e embebidas em gelatina e congeladas, que foram clivadas fisicamente e maceradas pela exposição prolongada ao OsO₄. Este protocolo, em conjunto com o ácido tânico, que atua como mordente, retira conteúdo proteico para expor vacúolos, organelas e sistemas internos de membranas (FUKUDOME e TANAKA, 1986). O método foi amplamente adaptado para diversos organismos (GUALTIERI et al., 1990; LEA et al., 1992; ADNET et al., 2003; KOGA et al., 2012, 2024).

Wagner et al. (1976) destacaram que a adição de ácido tânico à solução fixadora, seguida de um processo de contrastação completa, resultou em aumento da eletrondensidade e da espessura aparente da membrana plasmática, tanto em condições em que o OsO₄ foi utilizado na pós-fixação quanto naquelas em que não foi empregado. No entanto, não houve discussão sobre o aspecto e a integridade dos demais componentes citoplasmáticos processados na ausência do OsO₄. Este tema foi abordado nesta dissertação, onde se observou que, em todos os protocolos realizados sem o OsO₄, ocorreu algum nível de extração do conteúdo citoplasmático, provavelmente de estruturas lipídicas, que não foram estabilizadas de maneira

eficiente e possivelmente foram extraídas em etapas subsequentes, como a desidratação com acetona e a inclusão em resina.

O presente trabalho realizou processamentos para MET com ácido tânico na solução fixadora, omitindo o uso do OsO_4 para analisar o aspecto das células sem este reagente, e na tentativa de substituí-lo. Essa abordagem incluiu a contrastação *in bloc* pelo acetato de uranila na etapa da desidratação, além do acetato de uranila em conjunto com o de ferrocianeto de potássio. O permanganato de potássio e verde malaquita foram testados como substitutos do OsO_4 na pós-fixação. Todos estes processamentos resultaram na extração do conteúdo citoplasmático, provavelmente pela extração e má fixação de lipoproteínas.

No processamento que foi utilizado o ácido tânico na solução fixadora e omitida a pós-fixação pelo OsO_4 , apesar da extração do conteúdo citoplasmático, o complexo de Golgi de *T. vaginalis* apresentou eletrondensidade proeminente nas regiões medial e periférica das cisternas, o que pode estar relacionado à estabilidade do conteúdo dessa organela. A ação mordente do ácido tânico na solução fixadora pode ter potencializado a ação do acetato de uranila, resultando no aumento aparente da eletrondensidade da organela. Possivelmente, a ação do OsO_4 durante o processamento convencional confere um aspecto visual com eletrondensidade menos proeminente.

A investigação nesta dissertação sobre o uso do permanganato de potássio (KMnO_4) como substituto do OsO_4 corroborou a literatura existente, pois as amostras processadas sem OsO_4 , com ácido tânico e com o KMnO_4 também resultaram na extração do conteúdo citoplasmático. Observou-se pouca delimitação dos componentes do citoesqueleto, conforme descrito anteriormente por Wright (2000). Este autor constatou que o uso do KMnO_4 , como pós-fixador foi satisfatório apenas para analisar perfis de membrana de leveduras, mas não para os demais componentes celulares (LUM e WRIGHT, 1995).

O verde malaquita é comumente empregado como fixador de lipídeos em conjunto com o OsO_4 . Essa combinação resulta em aumento da afinidade dos contrastantes, conferindo maior eletrondensidade às membranas e componentes lipídicos (TEICHMAN et al., 1974; POURCHO et al., 1978; SCHULTZ et al., 2012). Na literatura não há uma variedade de estudos sobre o uso do verde malaquita como

fixador de lipídeos sem a ação conjunta com o OsO₄. Este trabalho visou analisar sua capacidade de fixar lipídeos em *G. intestinalis* e *T. vaginalis* na ausência de OsO₄. Em combinação com o ácido tânico e acetato de uranila, observou-se a extração do conteúdo celular e pouca definição e eletrondensidade das membranas de organelas, como hidrogenossomos em *T. vaginalis*, mesmo com a contrastação posterior completa. As vesículas periféricas de *G. intestinalis* sofreram deformação, apesar de suas membranas estarem bem delimitadas. Apenas o citoesqueleto aparentemente não sofreu deformações, possivelmente devido à sua natureza majoritariamente proteica. Assim, o verde malaquita não se mostrou um substituto viável ao OsO₄ para o processamento de amostras biológicas para MET.

Em relação ao citoesqueleto de *T. vaginalis* e *G. intestinalis*, os processamentos para MET realizados sem a participação do OsO₄ mostraram boa preservação dessas estruturas. Tal fato sugere uma abordagem de estudo para visualização do citoesqueleto que é menos invasiva do que a feita com extração da membrana plasmática por ação de detergentes. As estruturas do citoesqueleto, como corpúsculos basais, filamento sigmóide, pelta, costa e filamentos parabasais em *T. vaginalis*, assim como disco ventral, corpúsculos basais e filamentos associados em *G. intestinalis*, mantiveram-se em suas localizações conhecidas, mesmo com alguma extração do conteúdo ao seu redor. É importante ressaltar que a visualização do citoplasma, como um todo, ficou comprometida devido à extração de conteúdo lipídico.

A busca por alternativas eficientes ao ósmio é essencial, considerando as limitações deste estudo e a impossibilidade de eliminar completamente esse componente no processamento de amostras biológicas para análise da célula inteira. É fundamental continuar a explorar opções que reduzam tanto a toxicidade quanto o impacto ambiental e os problemas de descarte.

6.3. Contrastação de cortes ultrafinos com ácido tânico

A substituição do acetato de uranila pelo ácido tânico destaca-se por suas implicações na segurança e viabilidade econômica. O ácido tânico, por ser menos tóxico e poluente, representaria uma alternativa viável aos reagentes tradicionais, que apresentam maiores riscos à saúde dos operadores e ao meio ambiente.

Em nossos experimentos, cortes ultrafinos incubados em 5% de ácido tânico por 20 minutos e 1% de citrato de chumbo por 3 a 5 minutos, apresentaram contraste satisfatório de todos os componentes celulares em *G. intestinalis* e *T. vaginalis*. O uso do ácido tânico em cortes ultrafinos foi sugerido por Kajikawa et al. (1975), em conjunto com o acetato de uranila, para a contrastação seletiva de elastina, uma proteína presente em fibras elásticas e constituída por polímeros insolúveis (VINDIN et al., 2019). Adicionalmente, foi relatado que o ácido tânico, quando utilizado como contrastante posterior, conferiu pouco contraste às fibras colágenas, ao contrário do que ocorreu quando foi utilizado na etapa da fixação, em que apresentou alta afinidade pelo colágeno (KAJUKAWA et al., 1975).

Afzelius (1992) afirmou que o ácido tânico, como contrastante de cortes, apresentou certa especificidade pelo glicogênio, aumentando a afinidade desses componentes pelo acetato de uranila. No entanto, ao contrário dos resultados encontrados neste trabalho, Afzelius (1992) relatou que o citrato de chumbo não agiu de maneira satisfatória após o uso do ácido tânico.

Esses resultados não apenas validam a proposta inicial, mas também abrem caminho para futuras investigações e aplicações do protocolo desenvolvido, alinhando-se às necessidades contemporâneas por métodos mais seguros e eficientes no processamento de amostras biológicas para microscopia eletrônica de transmissão.

6.4. Análise estatística do contraste

A análise do contraste em amostras biológicas que foram fixadas com ácido tânico em conjunto com o glutaraldeído buscou responder à questão inicial sobre a eficácia desse agente na melhoria da visualização celular em comparação aos métodos tradicionais. A problemática central envolve a busca por alternativas mais seguras e ambientalmente sustentáveis, que não comprometessem a qualidade dos dados morfológicos obtidos através da microscopia eletrônica de transmissão (MET).

Em imagens de MET, a imagem é resultado da distribuição de intensidade de um feixe de elétrons que se apresenta homogêneo em relação à direção e velocidade após passar pelo objeto. Quando os elétrons incidem na amostra, interagem com os átomos presentes, resultando em efeitos como a dispersão elástica e inelástica. Esses

efeitos determinam a quantidade de elétrons que são transmitidos ou desviados (ZEITLER e BAHR, 1957). O contraste na imagem decorre da variação na densidade e na composição da amostra. Regiões mais densas ou contendo elementos com maior número atômico dispersam mais elétrons, resultando em áreas mais escuras na imagem. Em contraste, regiões menos densas ou com elementos leves permitem a passagem de mais elétrons, aparecendo mais claras (ZEITLER e BAHR, 1957; WILLIAMS e CARTER, 2009; KOHL e REIMER, 2008).

Os resultados obtidos demonstraram que, nas condições de contraste completo, sem contraste e apenas acetato de uranila, não houve diferenças estatisticamente significativas entre as amostras processadas com ácido tânico no fixador e as amostras controle, sem o ácido tânico. Em contrapartida, a condição que utilizou apenas citrato de chumbo revelou um aumento no contraste em amostras tratadas com ácido tânico, sugerindo um efeito positivo do agente sobre a visualização de determinados componentes celulares. Contudo, é importante considerar que o efeito positivo do ácido tânico pode ser limitado a determinados contextos ou compostos celulares, o que requer uma investigação mais aprofundada.

A análise quantitativa do contraste não foi condizente com a qualitativa, pois na condição de contrastação posterior completa, foi evidente o aumento do contraste de diversos elementos celulares. As limitações desta abordagem incluem a possibilidade do “n” de 111 imagens ao total das condições experimentais, ser relativamente pequeno, o que pode ter influenciado a significância estatística dos resultados. Além disso, é possível que as diferenças observadas sejam apenas aparentes, uma vez que a eletrondensidade e a espessura aparente das estruturas escolhidas para a análise podem não refletir variações significativas nos pontos de distribuição dos histogramas gerados. A variabilidade nos resultados sugere a necessidade de abordagens complementares. Estudos futuros devem explorar diferentes regiões de células conhecidas, para maximizar a eficácia na visualização celular.

6.5. Valores dos reagentes e tempo de preparo

Ao avaliar os resultados dos processamentos alternativos para amostras biológicas com ácido tânico (AT), realizamos uma comparação entre os valores cotados (Tab. 3) e os tempos de preparo, visando incorporar uma abordagem prática.

- O uso de tetróxido de ósmio (OsO_4) revelou-se dispensável apenas para a análise do citoesqueleto. Nesse contexto, seria possível eliminar este reagente, cujo custo de 1 g ultrapassa mil reais.
- A adição de AT à solução fixadora eliminou a necessidade do citrato de chumbo como contrastante posterior. O preparo do fixador contendo 1% de AT demandou, em média, 15 minutos. Em contraste, a preparação do citrato de chumbo requer mais de uma hora e é suscetível à formação de precipitados insolúveis devido ao contato com o CO_2 atmosférico, o que pode prejudicar a visualização no microscópio eletrônico de transmissão. Não foram observados precipitados ao utilizar o uso do AT.
- A utilização de AT como contrastante para cortes ultrafinos tornou dispensável o uso do acetato de uranila (AU). Em termos comparativos, 1 g de AT é cerca de 150 vezes mais econômico do que 1 g de AU, dependendo da marca do reagente.

Tabela 3. Cotação dos valores dos reagentes em dezembro de 2024

Reagente/marca	Preço por grama em R\$ (sem frete)
Acetato de uranila (Êxodo Científica, São Paulo, Brasil)	291,20
Acetato de uranila (ACS Científica, São Paulo, Brasil)	238,80
Citrato de sódio (Sigma-Aldrich, EUA)	8,64
Citrato de sódio (Supelco, Sigma-Aldrich, EUA)	415,00
Nitrato De Chumbo (Êxodo Científica, São Paulo, Brasil)	0,30
Nitrato De Chumbo (Merck, EUA)	2,55
Ácido tânico (Êxodo Científica, São Paulo, Brasil)	0,42
Ácido tânico (Synth, São Paulo, Brasil)	0,50
Ácido tânico (Sigma-Aldrich, EUA)	3,32
Tetróxido de ósmio (EMS, EUA)	999,00
Tetróxido de ósmio (Sigma-Aldrich, EUA)	4320,00

6.6. Processamento com Ácido Tânico e Seu Potencial Uso em Técnicas Avançadas de Microscopia

O aumento do contraste diretamente no bloco pode melhorar a qualidade das imagens obtidas por meio de técnicas avançadas de microscopia, como a Microscopia Eletrônica de Fenda de Íons (FIB-SEM) e a Microscopia de Superfície de Bloco Serial (SBF-SEM), que têm se consolidado como ferramentas de ponta na análise tridimensional de amostras biológicas (Kizilyaprak et al., 2014; 2019; Courson et al., 2021; Oi et al., 2017). A FIB-SEM utiliza um feixe de íons para realizar cortes ultra-finos em amostras tridimensionais, possibilitando a observação de estruturas celulares com altíssima resolução. O contraste das amostras é uma variável crítica nesse processo, e um contraste *in bloc* adequado pode aprimorar a resolução e a definição das imagens obtidas (Kizilyaprak et al., 2014). De forma análoga, o SBF-SEM envolve o corte de camadas finas da amostra diretamente no bloco para reconstrução tridimensional, beneficiando-se de um aumento de contraste *in bloc*, o que facilita a visualização de estruturas celulares complexas sem a introdução de artefatos induzidos pelos contrastantes aplicados após o corte (Courson et al., 2021). As imagens para tomografia por FIB-SEM exigem contraste suficiente entre todos os elementos de interesse para garantir uma segmentação confiável antes da reconstrução 3D. Quanto maior o contraste, menor a necessidade de múltiplas varreduras de uma mesma fatia com parâmetros diferentes, o que elimina a deriva da amostra e reduz consideravelmente o tempo total de aquisição das imagens tomográficas. Esse processo facilita um aumento substancial do volume analisado e aprimora a relevância dos parâmetros materiais extraídos (Meffert et al., 2020).

Em estudos com protozoários, essas ferramentas de microscopia de alta resolução têm sido exploradas para resolver estruturas celulares que auxiliam na compreensão da morfologia e fisiologia dos parasitas, por meio de imagens seriadas de cortes ultrafinos, com espessuras que variam de 10 a 100 nm, cobrindo volumes de dezenas de micrômetros (Martins-Duarte et al., 2016; de Souza e Attias, 2018; Miranda et al., 2014; Lemgruber et al., 2011).

O acetato de uranila é amplamente utilizado na maioria dos procedimentos de contração de amostras antes da realização do SBF-SEM. No entanto, sua obtenção tem se tornado progressivamente mais difícil devido às regulamentações mais rigorosas sobre substâncias radioativas, o que torna a busca por substitutos para a coloração *in bloc* uma necessidade crescente (Wanner et al., 2016). A literatura relata a utilização de contrastantes *in bloc* à base de lantanídeos, que proporcionam excelente contraste e reduzem eficientemente a carga da amostra, quando em comparação com as amostras que foram processadas com acetato de uranila (Odriozola et al., 2017). Os lantanídeos são conhecidos como metais de transição interna (*National Center for Biotechnology Information*, 2025).

A introdução de novos agentes de contraste, como o ácido tânico, utilizado na solução fixadora neste estudo, pode ser promissora no aumento do contraste *in bloc* das amostras. Além disso, o protocolo demonstrou potencial para melhorar a visibilidade de componentes celulares específicos, como a membrana plasmática, as membranas de organelas e componentes do citoesqueleto, sem a formação de artefatos. Esse avanço pode contribuir significativamente para os estudos ultraestruturais de amostras biológicas.

7. CONCLUSÕES

A abordagem adotada neste estudo, visando otimizar o protocolo de processamento de amostras biológicas para microscopia eletrônica de transmissão com ácido tânico (AT) e ácido gálico (AG), resultou em contribuições para a visualização de estruturas celulares de *T. vaginalis* e *G. intestinalis*. As principais conclusões são as seguintes:

- O protocolo proposto com AT mostrou-se simples, rápido e eficiente em comparação aos protocolos tradicionais. Ele eliminou a necessidade de reagentes como citrato de chumbo, que são mais difíceis de preparar e apresentam riscos de gerar artefatos, tornando o processo mais prático. O AT é um reagente irritante, porém como é de origem vegetal, não apresenta problemas no descarte, como o acetato de uranila e citrato de chumbo.
- O AT foi eficaz no aumento do contraste de estruturas celulares, incluindo a membrana plasmática, organelas e o citoesqueleto de *T. vaginalis* e *G. intestinalis*. Isso permitiu a visualização detalhada de componentes específicos, sendo equivalente ou superior em alguns casos, especialmente em relação às proteínas de baixo peso molecular.
- O protocolo proposto contribuiu para uma visualização mais detalhada e precisa das estruturas celulares, confirmando sua estabilidade e confiabilidade.
- Embora o protocolo modificado tenha demonstrado resultados robustos, há a necessidade de pós-fixação com OsO_4 para preservar membranas celulares, pois são estruturas ricas em lipídeos. O uso de ácido gálico AG como alternativa mostrou eficácia limitada, particularmente no aumento da eletrondensidade de membranas de organelas.
- O AT como contrastante posterior apresentou resultados comparáveis ao uso do acetato de uranila, sugerindo que o citrato de chumbo pode ser dispensável num processamento de rotina.

8. REFERÊNCIAS

Associação Brasileira De Normas Técnicas. NBR 10004:2004: Resíduos sólidos—Classificação. Rio de Janeiro: ABNT, 2004. Disponível em: https://gestaoderesiduos.ufsc.br/files/2014/09/NBR-10004_04_Classifica%C3%A7%C3%A3o-de-Res%C3%ADduos.pdf. Acesso em: 9 jan. 2025.

Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR 14725-4:2014: Fichas de informações de segurança de produtos químicos (FISPQ) – Apresentação de informações. Rio de Janeiro: ABNT, 2014. Disponível em: https://ww3.icb.usp.br/wp-content/uploads/2019/11/Parte4_NBR_14725-4-2009.pdf. Acesso em: 9 jan. 2025.

Adnet, F. A., Gonçalves, J. P., de Souza, W., & Attias, M. (2013). A simple and efficient method to observe internal structures of helminths by scanning electron microscopy. **Microscopical Society of Canada**, 19(6), 1470–1474. <https://doi.org/10.1017/S1431927613013706>

Afzelius, B.A. (1992). Section staining for electron microscopy using tannic acid as a mordant: A simple method for visualization of glycogen and collagen. **Microscopy Research and Technique**, 21: 65-72. <https://doi.org/10.1002/jemt.1070210110>

Aiha (1968). Osmium and its compounds. In: Hygienic guide series. **American Industrial Hygiene Association Journal**, 29:621-623.

Alderete, J. F., Garza, G. E. (1988): Identification and properties of *Trichomonas vaginalis* proteins involved in cytoadherence. **Infection and Immunity**. 56, 28 ± 33. DOI: 10.1128/iai.56.1.28-33.1988

Ananthapadmanaban, D. (2018). Summary of some selected characterization methods of geopolymers. **Geopolymers and Other Geosynthetics**. IntechOpen. DOI: 10.5772/intechopen.82208

Bal, A. K., & Ramaswamy, P. (1987). Use of tannic acid for the ultrastructural visualization of periplasm in gram-negative bacteria. **Stain Technology**, 62(2), 67–71. <https://doi.org/10.3109/10520298709107970>

Baldwin, A., Booth, B. W. (2022). Biomedical applications of tannic acid. **Journal of Biomaterials Applications**, 36(8), 1503–1523. <https://doi.org/10.1177/08853282211058099>

Baxter, N. J., Lilley, T. H., Haslam, E., & Williamson, M. P. (1997). Multiple interactions between polyphenols and a salivary proline-rich protein repeat result in complexation and precipitation. **Biochemistry**, 36(18), 5566–5577. <https://doi.org/10.1021/bi9700328>

Benchimol, M. (2001). Structure and division of the Golgi complex in *Trichomonas vaginalis* and *Tritrichomonas foetus*. **European Journal of Cell Biology**, 80(9), 593-607. DOI: 10.1078/0171-9335-00191

Benchimol, M. (2004). Trichomonads under microscopy. **Microscopy and Microanalysis**, 10(5), 528–550. <https://doi.org/10.1017/S1431927604040905>

Benchimol, M. (2009). Hydrogenosome under microscopy. **Tissue & Cell**, 41(3), 151–168. <https://doi.org/10.1016/j.tice.2009.01.001>

Benchimol, M., Elias, C. A., & de Souza, W. (1982). *Tritrichomonas foetus*: fine structure of freeze-fractured membranes. **The Journal of Protozoology**, 29(3), 348–353. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1982.tb05413.x>

Benchimol, M., Gadelha, A. P. R., & de Souza, W. (2022). Cell biology of the life cycle of *Giardia intestinalis*. **Microbiology Monographs**, vol. 35. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-030-80682-8_11

Bozzola, J.J., Russel L.D. (1992). Electron microscopy: principles and techniques for biologists. **Jones and Bartlett Publishers**, Inc., p. 50–56.

Bilandžić, N., Varenina, I., Kolanović, B. S., Oraić, D., & Zrnčić, S. (2012). Malachite green residues in farmed fish in Croatia. **Food Control**, 26(2), 393-396. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.02.001>

Brown E. M., Shelly D. C. (2011). Molecular modeling approach to vegetable tanning: preliminary results for gallotannin interactions with the collagen microfibril. **Journal of the American Leather Chemists Association**. 106(5): 145–152.

Brunschwig, J. P., Brandt, N., Caswell, A. H., & Lukeman, D. S. (1982). Ultrastructural observations of isolated intact and fragmented junctions of skeletal muscle by use of tannic acid mordanting. **The Journal of Cell Biology**, 93(3), 533–542. <https://doi.org/10.1083/jcb.93.3.533>

Cacciò, S. M., Ryan, U. (2008). Molecular epidemiology of giardiasis. **Molecular and Biochemical Parasitology**, 160(2), 75–80. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2008.04.006>

Carvalho, K. P., & Monteiro-Leal, L. H. (2004). The caudal complex of *Giardia lamblia* and its relation to motility. **Experimental Parasitology**, 108(3-4), 154–162. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2004.08.007>

Chen, C., Yang, H., Yang, X., & Ma, Q. (2022). Tannic acid: A crosslinker leading to versatile functional polymeric networks: A review. **RSC Advances**, 12(13), 7689-7711. DOI: 10.1039/d1ra07657d

Claude, A. (1943). The constitution of protoplasm. **Science**, 97(2521), 451-456. DOI: 10.1126/science.97.2525.451

Covington, A.D. (2009). Tanning Chemistry: The Science of Leather. **Royal Society of Chemistry**, p. 281–313.

Crouch, M. L., Benchimol, M., & Alderete, J. F. (2001). Binding of fibronectin by *Trichomonas vaginalis* is influenced by iron and calcium. **Microbial Pathogenesis**, 31(3), 131–144. <https://doi.org/10.1006/mpat.2001.0455>

Courson, J. A., Landry, P. T., Do, T., Spehlmann, E., Lafontant, P. J., Patel, N., Rumbaut, R. E., & Burns, A. R. (2021). Serial Block-Face Scanning Electron Microscopy (SBF-SEM) of Biological Tissue Samples. **Journal of Visualized Experiments : JoVE**, (169), 10.3791/62045. <https://doi.org/10.3791/62045>

de Andrade Rosa, I., Caruso, M. B., de Oliveira Santos, E., Gonzaga, L., Zingali, R. B., de Vasconcelos, A. T. R., de Souza, W., & Benchimol, M. (2017). The costa of trichomonads: A complex macromolecular cytoskeleton structure made of uncommon proteins. **Biology of the Cell**, 109(6), 238–253. <https://doi.org/10.1111/boc.201600050>

Deetz, J. S., & Behrman, E. J. (1981). Reaction Of Osmium Reagents With Amino Acids And Proteins: Reactivity of Amino Acid Residues and Peptide Bond Cleavage. **International Journal of Peptide and Protein Research**, 17(4), 495-500. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3011.1981.tb02019.x>

de Souza, W., & Attias, M. (2018). New advances in scanning microscopy and its application to study parasitic protozoa. **Experimental Parasitology**, 190, 10-33. DOI: 10.1016/j.exppara.2018.04.018

Díaz, J. A., Monteiro-Leal, L. H. and De Souza, W. (1996). *Tritrichomonas foetus*: isolation and characterization of the Golgi complex. **Experimental Parasitology**, 83, 174–183. <https://doi.org/10.1006/expr.1996.0064>

Dixon, B. R. (2021). *Giardia duodenalis* in humans and animals – Transmission and disease. **Research in Veterinary Science**, 135, 283-289. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2020.09.034>

Dubochet, J., Adrian, M., Chang, J. J., Homo, J. C., Lepault, J., McDowell, A. W., Schultz, P. (1988). Cryo-electron microscopy of vitrified specimens. **Quarterly Reviews of Biophysics**, 21(2), 129–228. <https://doi.org/10.1017/s0033583500004297>

Escobedo, A. A., Almirall, P., Robertson, L. J., Franco, R. M., Hanevik, K., Mørch, K., & Cimerman, S. (2010). Giardiasis: the ever-present threat of a neglected disease. **Infectious Disorders Drug Targets**, 10(5), 329–348. <https://doi.org/10.2174/187152610793180821>

Falcão, L.; Araújo, M.E.M. (2018). Vegetable Tannins Used in the Manufacture of Historic Leathers. **Molecules**, 23, 1081. <https://doi.org/10.3390/molecules23051081>

Fiana das Neves Ortiz, S., Verdan, R., Rocha, G. M., Miranda, K., & Benchimol, M. (2024). The parabasal filaments of *Trichomonas vaginalis*: A new filament and observations using 0.8 nm-resolution scanning electron microscopy. **Journal of**

Fitzpatrick, R. B. (2004). Haz-Map: Information on Hazardous Chemicals and Occupational Diseases. **Medical Reference Services Quarterly**, 23(2), 49–56. https://doi.org/10.1300/J115v23n02_05.

Friedova, N., Pelclova, D., Obertova, N., Lach, K., Kesslerova, K., & Kohout, P. (2020). Osmium absorption after osmium tetroxide skin and eye exposure. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, 127(5), 429–433. <https://doi.org/10.1111/bcpt.13450>

Fuge H. (1981). Tannic acid mordanting of a meiotic spindle: no evidence for a microfilament system. **European Journal of Cell Biology**, 25(1), 90–94.

Fukudome, H., & Tanaka, K. (1986). A method for observing intracellular structures of free cells by scanning electron microscopy. **Journal of Microscopy**, 141(Pt 2), 171–178. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2818.1986.tb02713.x>

Gadelha, A., Benchimol, M., Souza, W. (2015). Helium ion microscopy and ultra-high- resolution scanning electron microscopy analysis of membrane-extracted cells reveals novel characteristics of the cytoskeleton of *Giardia intestinalis*. **Journal of Structural Biology**. 190, 271- 278. doi: 10.1016/j.jsb.2015.04.017.

Gadelha, A.P.R., Benchimol, M., de Souza, W. (2022). Nanoarchitecture of the ventral disc of *Giardia intestinalis* as revealed by high-resolution scanning electron microscopy and helium ion microscopy. **Histochemistry and Cell Biology**. 157, 251-265. doi: 10.1007/s00418-021-02060-2.

Gavrilenko, N. A., Volgina, T. N., Pugachev, E. V., & Gavrilenko, M. A. (2019). Visual determination of malachite green in sea fish samples. **Food Chemistry**, 274, 242–245. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.08.139>

Gualtieri, P., Passarelli, V., Verni, F., & Rosati, G. (1990). A look into the reservoir of *Euglena gracilis*: SEM investigations of the flagellar apparatus. **Micron and Microscopic Acta**, 21(3), 131-138. [https://doi.org/10.1016/0739-6260\(90\)90015-8](https://doi.org/10.1016/0739-6260(90)90015-8)

Haddad, A., Sesso, A., Attias, M., Farina, M., Meirelles, M. de N., Silveira, M., et al. (2007). Técnicas básicas de microscopia eletrônica aplicadas às ciências biológicas. 3ª Edição. Rio de Janeiro: **Sociedade Brasileira de Microscopia**.

Haidar, A., Ryder, T. A., Mobberley, M. A., & Wigglesworth, J. S. (1992). Two techniques for electron opaque staining of elastic fibres using tannic acid in fresh and formalin fixed tissue. **Journal of Clinical Pathology**, 45(7), 633–635. <https://doi.org/10.1136/jcp.45.7.633>

Haslam, E. (1989). Plant Polyphenols-Vegetable Tannins Revisited. **Cambridge University Press**, Cambridge, UK, p. 9–13.

Hawkes, P. W. (1985). The Beginnings of Electron Microscopy. **Journal of Microscopy**, 139(1), 1-38. <https://doi.org/10.1016/C2013-0-13281-3>

Hayat, M.A. (1981) Fixation for electron microscopy. **Academic Press, Inc.** New York, USA, p. 148–180.

Höög, J. L., Gluenz, E., Vaughan, S., & Gull, K. (2010). Chapter 8-Ultrastructural Investigation Methods for *Trypanosoma brucei*. **Methods in Cell Biology**; Müller-Reichert, T., Ed.; Academic Press: Cambridge, MA, USA, 96, 175-196. [https://doi.org/10.1016/S0091-679X\(10\)96008-1](https://doi.org/10.1016/S0091-679X(10)96008-1)

Holberton D. V. (1981). Arrangement of subunits in microribbons from *Giardia*. **Journal of Cell Science**, 47, 167–185. <https://doi.org/10.1242/jcs.47.1.167>

Holberton, D.V. (1973). Fine structure of the ventral disc apparatus and the mechanism of attachment in the flagellate *Giardia muris*. **Journal of Cell Science**.13, 11-41. doi: 10.1242/jcs.13.1.11.

Honigberg, B. M., Mattern, C. F., & Daniel, W. A. (1971). Fine structure of the mastigont system in *Tritrichomonas foetus*. **Journal of Protozoology**, 18, 183–198. doi:10.1111/j.1550-7408.1971.tb03306.x

House, S.A., Richter, D.J., Pham, J.K., Dawson, S.C. (2011). Giardia flagellar motility is not directly required to maintain attachment to surfaces. **PLoS Pathogens** 7, e1002167. doi: 10.1371/journal.ppat.1002167.

Howes, F.N. (1953). Vegetable Tanning Materials. **Butterworths Scientific Publications**. London, UK, p. 258–260.

Johnson, R. P. (1966). Potassium permanganate fixative and the electron microscopy of sieve tube contents. **Planta**, 68(1), 36–43. <https://doi.org/10.1007/BF00385369>

Kajikawa K., Yamaguchi T., Katsuda S., Miwa A. (1975). An Improved Electron Stain for Elastic Fibers Using Tannic Acid. **Journal of Electron Microscopy**. 24 (4), 287–289. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jmicro.a049983>

Kellogg, A., McAuliffe, W. G., Schrodt, G. R. (1986). A modification of the tannic acid-phosphomolybdic acid-dye stain for demonstrating myoepithelial cells in formalin fixed tissue. **Stain Technology**. 61(4), 219–225. <https://doi.org/10.3109/10520298609109940>

Kiernan, J. (2000). Formaldehyde, Formalin, Paraformaldehyde and Glutaraldehyde: what they are and what they do. **Microscopy Today**, 8(1), 8-13. doi:10.1017/S1551929500057060

Kizilyaprak, C., Daraspe, J., & Humbel, B. M. (2014). Focused ion beam scanning electron microscopy in biology. **Journal of Microscopy**, 254(3), 109–114. <https://doi.org/10.1111/jmi.12127>.

Kizilyaprak, C., Stierhof, Y. D., & Humbel, B. M. (2019). Volume microscopy in biology: FIB-SEM tomography. **Tissue and Cell**, 57, 123-128. DOI: 10.1016/j.tice.2018.09.006

Knoll, M., Ruska, E. (1932) Das Elektronenmikroskop. **Physik** 78, 318–339. <https://doi.org/10.1007/BF01342199>

Koga, D., Nakajima, M., & Ushiki, T. (2012). A useful method for observing intracellular structures of free and cultured cells by scanning electron microscopy. **Journal of Electron Microscopy**, 61(2), 105–111. <https://doi.org/10.1093/jmicro/df098>

Koga, D., Kusumi, S., Yagi, H., & Kato, K. (2024). Three-dimensional analysis of the intracellular architecture by scanning electron microscopy. **Microscopy**, 73(3), 215-225. <https://doi.org/10.1093/jmicro/dfad050>

Kreisel, K. M., Spicknall, I. H., Gargano, J. W., Lewis, F. M., Lewis, R. M., Markowitz, L. E., ... & Weinstock, H. S. (2021). Sexually transmitted infections among US women and men: prevalence and incidence estimates, 2018. **Sexually Transmitted Diseases**, 48(4), 208. DOI: 10.1097/OLQ.0000000000001355

Lanfredi-Rangel, A., Attias, M., Carvalho, T.M.U., Kattenbach, W.M., de Souza, W. (1998). The peripheral vesicles of trophozoites of the primitive protozoan *Giardia lamblia* may correspond to early and late endosomes and to lysosomes. **Journal of Structural Biology**. 123, 225-235. doi: 10.1006/jsbi.1998.4035.

Langston, M. E., Bhalla, A., Alderete, J. F., Nevin, R. L., Pakpahan, R., Hansen, J., Elliott, D., De Marzo, A. M., Gaydos, C. A., Isaacs, W. B., Nelson, W. G., Sokoll, L. J., Zenilman, J. M., Platz, E. A., & Sutcliffe, S. (2019). *Trichomonas vaginalis* infection and prostate-specific antigen concentration: Insights into prostate involvement and prostate disease risk. **The Prostate**, 79(14), 1622–1628. <https://doi.org/10.1002/pros.23886>

Lawn, A. M. (1960). The use of potassium permanganate as an electron-dense stain for sections of tissue embedded in epoxy resin. **The Journal of Biophysical and Biochemical Cytology**, 7(1), 197–198. <https://doi.org/10.1083/jcb.7.1.197>

Lea, P. J., Hollenberg, M. J., Temkin, R. J., & Khan, P. A. (1992). Chemical extraction of the cytosol using osmium tetroxide for high resolution scanning electron microscopy. **Microscopy Research and Technique**, 22(2), 185–193. <https://doi.org/10.1002/jemt.1070220207>

Leeson T. S. (1978). Sarcolemma, T-tubules, and subsarcolemmal caveolae. Interrelationships and continuity demonstrated by tannic acid mordanting. **Canadian Journal of Zoology**, 56(3), 391–397. <https://doi.org/10.1139/z78-057>

Lehker, M. W., Chang, T. H., Dailey, D. C., & Alderete, J. F. (1990). Specific erythrocyte binding is an additional nutrient acquisition system for *Trichomonas vaginalis*. **Journal of Experimental Medicine**, 171(6), 2165–2170. doi:10.1084/jem.171.6.2165

Lemgruber, L., Lupetti, P., Martins-Duarte, E. S., De Souza, W., & Vommaro, R. C. (2011). The organization of the wall filaments and characterization of the matrix structures of *Toxoplasma gondii* cyst form. **Cellular Microbiology**, 13(12), 1920-1932. DOI: 10.1111/j.1462-5822.2011.01681.x

Li, Y., Wang, S., Li, H., Song, X., Zhang, H., Duan, Y., Luo, C., Wang, B., Ji, S., Xie, Q., & Zhang, Z. (2020). Development of a convenient detection method for *Trichomonas vaginalis* based on loop-mediated isothermal amplification targeting adhesion protein 65. **BMC Infectious Diseases**, 20(1), 319. <https://doi.org/10.1186/s12879-020-05048-w>

Lombardi L, Prenna G, Okolicsanyi L, Gautier A. (1971). Electron staining with uranyl acetate possible role of free amino groups. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**. 19(3):161-168. doi:10.1177/19.3.161

Lorenzo-Benito, S., Rivera-Rivas, L. A., Sánchez-Ayala, L., Ortega-López, J., Montes-Flores, O., Talamás-Lara, D., & Arroyo, R. (2022). Omics Analyses of *Trichomonas vaginalis* actin and tubulin and their participation in intercellular interactions and cytokinesis. **Genes**, 13, 1067. <https://doi.org/10.3390/genes13061067>

Lum, P. Y., & Wright, R. (1995). Degradation of HMG-CoA reductase-induced membranes in the fission yeast, *Schizosaccharomyces pombe*. **The Journal of Cell Biology**, 131(1), 81–94. <https://doi.org/10.1083/jcb.131.1.81>

Makarovsky, I., Markel, G., Hoffman, A., Schein, O., Finkelstien, A., Brosh-Nissimov, T., Tashma, Z., Dushnitsky, T., & Eisenkraft, A. (2007). Osmium tetroxide: a new kind of weapon. **The Israel Medical Association Journal**, 9(10), 750–752. PMID: 17987767

Martins-Duarte, É. S., Carias, M., Vommaro, R., Surolia, N., & de Souza, W. (2016). Apicoplast fatty acid synthesis is essential for pellicle formation at the end of cytokinesis in *Toxoplasma gondii*. **Journal of Cell Science**, 129(17), 3320–3331. <https://doi.org/10.1242/jcs.185223>

Masha, S. C., Cools, P., Sanders, E. J., Vaneechoutte, M., & Crucitti, T. (2019). *Trichomonas vaginalis* and HIV infection acquisition: a systematic review and meta-analysis. **Sexually Transmitted Infections**, 95(1), 36–42. <https://doi.org/10.1136/sextrans-2018-053713>

McLaughlin, A.I.G., Milton, R., Perry, K.M.A. (1946). Toxic manifestations of osmium tetroxide. **British Journal of Industrial Medicine**, 3:183-186.

Meffert, M., Wankmüller, F., Störmer, H., Weber, A., Lupetin, P., Ivers-Tiffée, E., & Gerthsen, D. (2020). Optimization of material contrast for efficient FIB-SEM tomography of solid oxide fuel cells. **Fuel Cells**, 20(5), 580-591. <https://doi.org/10.1002/fuce.202000080>

Midlej, V., Penha, L., Silva, R., de Souza, W., & Benchimol, M. (2016). Mitosomal chaperone modulation during the life cycle of the pathogenic protist *Giardia*

intestinalis. **European Journal of Cell Biology**, 95(12), 531–542. <https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2016.08.005>

Midlej, V., de Souza, W., Benchimol, M. (2019). The peripheral vesicles gather multivesicular bodies with different behavior during the *Giardia intestinalis* life cycle. **Journal of Structural Biology**, 207, 301–311. doi: 10.1016/j.ejcb.2016.08.005

Miranda, K., Girard-Dias, W., & de Souza, W. (2014). Application of analytical electron tomography to the study of pathogenic protozoa. **Microscopy and Microanalysis**, 20(S3), 1314–1315. <https://doi.org/10.1017/S1431927614008307>

Miranda, K., Girard-Dias, W., Attias, M., de Souza, W., e Ramos, I. (2015). Three-dimensional reconstruction by electron microscopy in the life sciences: An introduction for cell and tissue biologists. **Molecular Reproduction and Development**, 82(7-8), 530–547. <https://doi.org/10.1002/mrd.22455>

Mizuhira V, Futaesaku Y, Nakamura H. (1976). Fine structure of the elastic fibers and the elastin crystalloids by means of tannic acid fixation method. **Electron Microscopy Society of America**, 34: 318–319.

Mizuhira, V. and Futaesaku, Y. (1972). New fixation for biological membranes using tannic acid. **Acta Histochemica et Cytochemica**, 5, 233–235. <https://doi.org/10.1267/ahc.5.233>

Murakami, T. (1978). Tannin-osmium conductive staining of biological specimens for non-coated scanning electron microscopy. **Scanning**, 1: 127–129. <https://doi.org/10.1002/sca.4950010206>

National Center for Biotechnology Information (2024). **PubChem Compound** Summary for CID 16129778, Gallotannin. Retrieved January 19, 2024, from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Gallotannin>.

National Center for Biotechnology Information (2024). **PubChem Compound** Summary for CID 3485, Glutaral. Retrieved December 9, 2024, from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Glutaral>.

National Center for Biotechnology Information (2024). **PubChem Compound** Summary for CID 159739, Lead citrate. Retrieved August 23, 2024, from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Lead-citrate>.

National Center for Biotechnology Information (2025). **PubChem Compound** Summary for CID 121522021, Gadolinium acetate hexahydrate. Retrieved March 14, 2025, from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Gadolinium-acetate-hexahydrate>.

National Center for Biotechnology Information (2024). **PubChem Compound** Summary for CID 11294, Malachite Green. Retrieved October 27, 2024, from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Malachite-Green>.

National Center for Biotechnology Information (2024). **PubChem Compound** Summary for CID 30318, Osmium tetroxide. Retrieved August 23, 2024, from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Osmium-tetroxide>.

National Center for Biotechnology Information. (2024). **PubChem Compound** Summary for CID 516875, Potassium Permanganate. Retrieved December 11, 2024, from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Potassium-Permanganate>.

National Center for Biotechnology Information (2024). **PubChem Compound** Summary for CID 10915, Uranyl acetate. Retrieved August 23, 2024, from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Uranyl-acetate>.

National Research Council. Prudent Practices in the Laboratory: Handling and Disposal of Chemicals (1995). Washington, DC: **The National Academies Press**. <https://doi.org/10.17226/4911>.

Oberholzer, M., Östreicher, M., Christen, H., e Brühlmann, M. (1996). Methods in quantitative image analysis. **Histochemistry and Cell Biology**, 105, 333-355. <https://doi.org/10.1007/BF01463655>

Odriozola, A., Llodrá, J., Radecke, J., Ruegsegger, C., Tschanz, S., Saxena, S., & Zuber, B. (2017). High contrast staining for serial block face scanning electron microscopy without uranyl acetate. **BioRxiv**, 207472. doi: <https://doi.org/10.1101/207472>

Oi, T., Enomoto, S., Nakao, T., Arai, S., Yamane, K., & Taniguchi, M. (2017). Three-dimensional intracellular structure of a whole rice mesophyll cell observed with FIB-SEM. **Annals of Botany**, 120(1), 21–28. <https://doi.org/10.1093/aob/mcx036>

Ortiz, S., Verdan, R., & Benchimol, M. (2024). Three-dimensional cellular architecture of the sigmoid filament in *Trichomonas vaginalis*. **Journal of Structural Biology**, 216(4), 108127. Advance online publication. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2024.108127>

Palade, G. E. (1952). A study of fixation for electron microscopy. **The Journal of Experimental Medicine**, 95(3), 285–298.

Peachey L. D. (1958). Thin sections. I. A study of section thickness and physical distortion produced during microtomy. **The Journal of Biophysical and Biochemical Cytology**, 4(3), 233–242. <https://doi.org/10.1083/jcb.4.3.233>

Peattie D. A. (1990). The giardins of *Giardia lamblia*: genes and proteins with promise. **Parasitology Today**, 6(2), 52–56. [https://doi.org/10.1016/0169-4758\(90\)90070-k](https://doi.org/10.1016/0169-4758(90)90070-k)

Pereira-Neves, A., & Benchimol, M. (2007). Phagocytosis by *Trichomonas vaginalis*: new insights. **Biology of the Cell**, 99(2), 87–101. doi: 10.1042/BC20060084

Persi, M. A., & Burnham, J. C. (1981). Use of tannic acid as a fixative-mordant to improve the ultrastructural appearance of *Candida albicans* blastospores. **Sabouraudia**, 19(1), 1–8. <https://doi.org/10.1080/00362178185380021>

Phend, K. D., Rustioni, A., & Weinberg, R. J. (1995). An osmium-free method of epon embedment that preserves both ultrastructure and antigenicity for post-embedding immunocytochemistry. **The Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, 43(3), 283–292. <https://doi.org/10.1177/43.3.7532656>

Porter, K. R., & Blum, J. (1953). A study in microtomy for electron microscopy. **The Anatomical record**, 117(4), 685–710. <https://doi.org/10.1002/ar.1091170403>

Porter, K. R., Claude, A., & Fullam, E. F. (1945). A study of tissue culture cells by electron microscopy: methods and preliminary observations. **The Journal of Experimental Medicine**, 81(3), 233–246. <https://doi.org/10.1084/jem.81.3.233>

Pourcho, R. G., Bernstein, M. H., & Gould, S. F. (1978). Malachite green: applications in electron microscopy. **Stain Technology**, 53(1), 29–35. <https://doi.org/10.3109/10520297809111440> [https://doi.org/10.1016/s0021-9673\(00\)83178-7](https://doi.org/10.1016/s0021-9673(00)83178-7)

Pozzan, T., Rosario, R., Volpe, P., Meldolesi, J. (1994): Molecular and cellular physiology of intracellular calcium stores. **Physiological Reviews**, 74, 595 ± 635. DOI: 10.1152/physrev.1994.74.3.595

Rao B. S. N., Prabhavathi T. (1982). Tannin content of some Indian foods and feeds. **Journal of the Science of Food and Agriculture**; 33: 89–94.

Recommendations for the treatment of *Trichomonas vaginalis*, *Mycoplasma genitalium*, *Candida albicans*, bacterial vaginosis and human papillomavirus (anogenital warts). (2024). **World Health Organization**. PMID: 39116264

Rendón-Maldonado, J. G., Espinosa-Cantellano, M., González-Robles, A., & Martínez-Palomo, A. (1998). *Trichomonas vaginalis*: in vitro phagocytosis of lactobacilli, vaginal epithelial cells, leukocytes, and erythrocytes. **Experimental Parasitology**, 89(2), 241–250. <https://doi.org/10.1006/expr.1998.4297>

Rendón-Maldonado, J., Espinosa-Cantellano, M., Soler, C., Torres, J. V., & Martínez-Palomo, A. (2003). *Trichomonas vaginalis*: in vitro attachment and internalisation of HIV-1 and HIV-1-infected lymphocytes. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, 50(1), 43–48. doi: 10.1111/j.1550-7408.2003.tb00104.x

Reynolds E. S. (1963). The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. **The Journal of Cell Biology**, 17(1), 208–212. <https://doi.org/10.1083/jcb.17.1.208>

Reynolds, J.E.F., Parfitt, K., Parsons, A.V., & Sweetman, S.C. Martindale: The Extra Pharmacopoeia. London, **The Pharmaceutical Press**, 1989.

Sabatini, D. D., Bensch, K., Barnett, R. J. (1963). Cytochemistry and electron microscopy. The preservation of cellular ultrastructure and enzymatic activity by aldehyde fixation. **The Journal of Cell Biology**, 17(1), 19–58. <https://doi.org/10.1083/jcb.17.1.19>

Samanta, S., Giri, S., Parua, S., Nandi, D. K., Pati, B. R., Mondal, K. C. (2004). Impact of tannic acid on the gastrointestinal microflora. **Microbial Ecology in Health and Disease**, 16(1), 32–34. <https://doi.org/10.1080/08910600310026158>

Sakai, T. (1980). Relation between Thickness and Interference Colors of Biological Ultrathin Section. **Journal of Electron Microscopy**, 29 (4), 369–375. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jmicro.a050254>

Schauflinger, M., Bergner, T., Neusser, G., Kranz, C., & Read, C. (2022). Potassium permanganate is an excellent alternative to osmium tetroxide in freeze-substitution. **Histochemistry and Cell Biology**, 157(4), 481–489. <https://doi.org/10.1007/s00418-021-02070-0>

Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Cardona, A. (2012). Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. **Nature Methods**, 9(7), 676–682. doi:10.1038/nmeth.2019

Schultz, R.D., Ellis, E.A., Gumienny, T.L. (2012) Two novel staining protocols resolve *Caenorhabditis elegans* structures for confocal and transmission electron microscopy. **Microscopy and Microanalysis**, 18(Suppl. 2):100–101. <https://doi.org/10.1017/S1431927612002358>

Sesso, A. (2011). Fixação de Sistemas Biológicos. Em: Técnicas de Microscopia Eletrônica Aplicadas às Ciências Biológicas. (3 Ed). Rio de Janeiro: **Sociedade Brasileira de Microscopia e Microanálise**, p. 11–30.

Shafiq, F., Siddique, A., Pervez, M. N., Hassan, M. M., Naddeo, V., Cai, Y., Hou, A., Xie, K., Khan, M. Q., Kim, I. S. (2021). Extraction of Natural Dye from Aerial Parts of Argy Wormwood Based on Optimized Taguchi Approach and Functional Finishing of Cotton Fabric. **Materials**, 14(19), 5850. <https://doi.org/10.3390/ma14195850>

Sigma-Aldrich. (2024). *Osmium tetroxide solution*: **Safety data sheet** (Product number: 75633, CAS number: 20816–12–0). Recuperado de <https://www.sigmaaldrich.com/GB/en/sds/sigma/75633>

Sillen, L. G.; Martell, A. E. (1965) Stability constants of metal-ion complexes. **Journal of Chemical Education**, v.42, n.9, p.521. <https://doi.org/10.1021/ed042p521.1>

Simionescu, N., & Simionescu, M. (1976). Galloylglucoses of low molecular weight as mordant in electron microscopy. Procedure, and evidence for mordanting effect. **The Journal of Cell Biology**, 70(3), 608–621. <https://doi.org/10.1083/jcb.70.3.608>

Soares, T. C., & de Souza, W. (1977). Fixation of trypanosomatids for electron microscopy with the glutaraldehyde-tannic acid method. **Zeitschrift für Parasitenkunde**, 53(2), 149–154. <https://doi.org/10.1007/BF00380459>

Sutton, J. S. (1967). Potassium permanganate staining of ultrathin sections for electron microscopy. **Journal of Ultrastructure Research**, 21(5), 424–429. [https://doi.org/10.1016/s0022-5320\(67\)80150-3](https://doi.org/10.1016/s0022-5320(67)80150-3)

Sweney, L. R., & Shapiro, B. L. (1977). Rapid preparation of uncoated biological specimens for scanning electron microscopy. **Stain Technology**, 52(4), 221–227. <https://doi.org/10.3109/10520297709116779>

Tachezy, J., Makki, A., & Hrdý, I. (2022). The hydrogenosome of *Trichomonas vaginalis*. **The Journal of Eukaryotic Microbiology**, 69(6), e12922. <https://doi.org/10.1111/jeu.12922>

Tachibana, T., Mizuhira, V., Futaesaku, Y., & Watanabe, K. (1977). A structural and developmental study of adepidermal granules in the anuran tadpole using tannic acid fixation. **Journal of Anatomy**, 124(Pt 1), 71–82. PMID: 914706

Teichman, R. J., Takei, G. H., & Cummins, J. M. (1974). Detection of fatty acids, fatty aldehydes, phospholipids, glycolipids and cholesterol on thin-layer chromatograms stained with malachite green. **Journal of Chromatography**, 88(2), 425–427. DOI: 10.1016/s0021-9673(00)83178-7

Thiery, J.P. Mise en evidence des polysaccharides sur coupes fines en microscopie electronique. **Journal of Microscopy (Paris)**. 1967, 6, 987–1018.

Tilney, L. G., Bryan, J., Bush, D. J., Fujiwara, K., Mooseker, M. S., Murphy, D. B., Snyder, D. H. (1973). Microtubules: evidence for 13 protofilaments. **The Journal of Cell Biology**, 59, 267–275. <https://doi.org/10.1083/jcb.59.2.267>

U.S. Coast Guard. (1999). Sistema de Informações de Resposta a Riscos Químicos (CHRIS) - **Dados de Substâncias Químicas Perigosas**. Instrução do Comandante 16465.12C. Washington, D.C.: U.S. Government Printing Office.

Uphoff, C., Raber, B.T., and Cole, T.B., Jr. (1984) Tannic acid in routine staining of thin sections. **Journal of Electron Microscopy Technique**, 1:419–420. <https://doi.org/10.1002/jemt.1060010412>

Verdan, R., Patricio, B., Weismuller, G., Miranda, K., de Souza, W., Benchimol, M., & Gadelha, A. P. (2024). Characterization of a new extra-axonemal structure in the *Giardia intestinalis* flagella. **Journal of Structural Biology**, 216(1), 108064. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2024.108064>

Vindin, H., Mithieux, S. M., & Weiss, A. S. (2019). Elastin architecture. **Matrix biology: Journal of the International Society for Matrix Biology**, 84, 4–16. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2019.07.005>

Wagner R. C. (1976). The effect of tannic acid on electron images of capillary endothelial cell membranes. **Journal of Ultrastructure Research**, 57(2), 132–139. [https://doi.org/10.1016/s0022-5320\(76\)80103-7](https://doi.org/10.1016/s0022-5320(76)80103-7)

Wanner, A. A., Kirschmann, M. A., & Genoud, C. (2015). Challenges of microtome-based serial block-face scanning electron microscopy in neuroscience. **Journal of Microscopy**, 259(2), 137–142. DOI: 10.1111/jmi.12244

Watrelot, A. A., & Norton, E. L. (2020). Chemistry and Reactivity of Tannins in *Vitis* spp.: A Review. **Molecules**, 25(9), 2110. <https://doi.org/10.3390/molecules25092110>

Wexler-Cohen, Y., Stevens, G. C., Barnoy, E., van der Bliek, A. M., & Johnson, P. J. (2014). A dynamin-related protein contributes to *Trichomonas vaginalis* hydrogenosomal fission. **Federation of American Societies for Experimental Biology**, 28(3), 1113–1121. <https://doi.org/10.1096/fj.13-235473>

White, D. L., Mazurkiewicz, J. E., & Barnett, R. J. (1979). A chemical mechanism for tissue staining by osmium tetroxide-ferrocyanide mixtures. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, 27(7), 1084–1091. <https://doi.org/10.1177/27.7.89155>

Winey, M., Meehl, J. B., O'Toole, E. T., & Giddings, T. H., Jr (2014). Conventional transmission electron microscopy. **Molecular Biology of the Cell**, 25(3), 319–323. <https://doi.org/10.1091/mbc.E12-12-0863>

Wright, R. (2000). Transmission electron microscopy of yeast. **Microscopy Research and Technique**, 51(6), 496–510. [https://doi.org/10.1002/1097-0029\(20001215\)51:6<496::AID-JEMT2>3.0.CO;2-9](https://doi.org/10.1002/1097-0029(20001215)51:6<496::AID-JEMT2>3.0.CO;2-9)

Wu, X., Ivanchenko, M. V., Al Jandal, H., Cicconet, M., Indzhukulian, A. A., and Corey, D. P. (2019). PKHD1L1 is a coat protein of hair-cell stereocilia and is required for normal hearing. **Nature Communications**, 10:3801. doi: 10.1038/s41467-019-11712-w

Young, R. J., Critchley, J. A., Young, K. K., Freebairn, R. C., Reynolds, A. P., & Lolin, Y. I. (1996). Fatal acute hepatorenal failure following potassium permanganate ingestion. **Human & Experimental Toxicology**, 15(3), 259–261. <https://doi.org/10.1177/096032719601500313>


Zannino, L., Casali, C., & Biggiogera, M. (2023). Rediscover Potassium Permanganate as a Stain for Basic Proteins on Ultrathin Sections at Transmission Electron Microscopy. **Methods in Molecular Biology** (Clifton, N.J.), 2566, 159–171. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-2675-7_13

Zhang, Z., Li, D., Li, Y., Zhang, R., Xie, X., Yao, Y., ... & Mei, X. (2023). The correlation between *Trichomonas vaginalis* infection and reproductive system cancer: a systematic review and meta-analysis. **Infectious Agents and Cancer**, 18(1), 15. <https://doi.org/10.1186/s13027-023-00490-2>

Zhang, Z., Li, Y., Lu, H., Li, D., Zhang, R., Xie, X., Guo, L., Hao, L., Tian, X., Yang, Z., Wang, S., & Mei, X. (2022). A systematic review of the correlation between *Trichomonas vaginalis* infection and infertility. **Acta Tropica**, 236, 106693. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2022.106693>

Zhong, L., Brown, J. C., Wells, C., & Gerges, N. Z. (2013). Post-embedding Immunogold labeling of synaptic proteins in hippocampal slice cultures. **Journal of Visualized Experiments**. (74), 50273. <https://doi.org/10.3791/50273>


9. ANEXO I

		Universidade Federal do Rio de Janeiro Procedimento Operacional Padrão (POP)	
Nome do Processo:			
Métodos Alternativos para Processamento para Microscopia Eletrônica de Transmissão de Protozoários Patogênicos: Manutenção Estrutural e Realce de Contraste			
Objetivo Estratégico:			
Descrever dois protocolos alternativos de processamento de amostras biológicas para microscopia eletrônica de transmissão com ácido tânico, sem artefatos e mais rápido. Com o objetivo aumentar o contraste e a eletron densidade da membrana plasmática e das organelas, por meio da substituição do acetato de uranila e/ou do citrato de chumbo.			
Campo de aplicação:			
Microscopia Eletrônica de Transmissão			
Unidade responsável:		Versão:	Número de páginas:
Laboratório de Ultraestrutura Celular Hertha Meyer, Centro de Pesquisa em Medicina de Precisão – CPMP, IBCCF, UFRJ		1	11

Sumário

I. Palavras-chave	2
II. Dicionário de termos e siglas	2
III. Documentos de referência	3
IV. Parâmetros para medição do desempenho do processo	4
V. Procedimentos	5
VI. Condições de biossegurança	10
VII. Fluxograma	10
VIII. Controle das alterações	11
IX. Controle de aprovações para uso	11

Elaborado por:	Aprovado por:	Data aprovação:
Sharmila Fiama das Neves Ortiz		

 UFRJ	Universidade Federal do Rio de Janeiro Procedimento Operacional Padrão (POP)	
Nome do Processo:		
Métodos Alternativos para Processamento para Microscopia Eletrônica de Transmissão de Protozoários Patogênicos: Manutenção Estrutural e Realce de Contraste		
Objetivo Estratégico:		
Descrever dois protocolos alternativos de processamento de amostras biológicas para microscopia eletrônica de transmissão com ácido tânico, sem artefatos e mais rápido. Com o objetivo aumentar o contraste e a eletrondensidade da membrana plasmática e das organelas, por meio da substituição do acetato de uranila e/ou do citrato de chumbo.		
Campo de aplicação:		
Microscopia Eletrônica de Transmissão		
Unidade responsável:	Versão:	Número de páginas:
Laboratório de Ultraestrutura Celular Hertha Meyer, Centro de Pesquisa em Medicina de Precisão – CPMP, IBCCF, UFRJ	1	11


I. Palavras-chave

Microscopia eletrônica de transmissão; ácido tânico; contraste;

II. Dicionário de termos e siglas

Termo/Sigla	Significado
(x) g	Aceleração da gravidade
μl	microlitros
AT	Ácido tânico
g	gramas
GA	Glutaraldeído
MET	Microscopia eletrônica de transmissão
OsO ₄	Tetróxido de ósmio
PBS	Tampão fosfato-salino
pH	Potencial hidrogeniônico


Elaborado por:	Aprovado por:	Data aprovação:
Sharmila Fiana das Neves Ortiz		

		Universidade Federal do Rio de Janeiro Procedimento Operacional Padrão (POP)	
Nome do Processo:			
Métodos Alternativos para Processamento para Microscopia Eletrônica de Transmissão de Protozoários Patogênicos: Manutenção Estrutural e Realce de Contraste			
Objetivo Estratégico:			
Descrever dois protocolos alternativos de processamento de amostras biológicas para microscopia eletrônica de transmissão com ácido tânico, sem artefatos e mais rápido. Com o objetivo aumentar o contraste e a eletrondensidade da membrana plasmática e das organelas, por meio da substituição do acetato de uranila e/ou do citrato de chumbo.			
Campo de aplicação:			
Microscopia Eletrônica de Transmissão			
Unidade responsável:		Versão:	Número de páginas:
Laboratório de Ultraestrutura Celular Hertha Meyer, Centro de Pesquisa em Medicina de Precisão – CPMP, IBCCF, UFRJ		1	11

III. Documentos de referência

Referência	Descrição
Mizuhira, V. and Futaesaku, Y. (1972). New fixation for biological membranes using tannic acid. Acta Histochemica et Cytochemica 5, 233–235. https://doi.org/10.1267/ahc.5.233	Artigo que reporta a introdução de ácido tânico na solução fixadora.
Mizuhira V, Futaesaku Y, Nakamura H. (1976). Fine structure of the elastic fibers and the elastin crystalloids by means of tannic acid fixation method. Electron Microscopy Society of America , 34: 318–319.	Publicação que descreve a afinidade do ácido tânico por fibras elásticas.
Wexler-Cohen, Y., Stevens, G. C., Barnoy, E., van der Bliek, A. M., & Johnson, P. J. (2014). A dynamin-related protein contributes to <i>Trichomonas vaginalis</i> hydrogenosomal fission. Federation of American Societies for Experimental Biology , 28(3), 1113–1121. https://doi.org/10.1096/fj.13-235473	Artigo que utiliza o ácido tânico na solução fixadora no protozoário <i>T. vaginalis</i> .
Carvalho, K. P., & Monteiro-Leal, L. H. (2004). The caudal complex of <i>Giardia lamblia</i> and its relation to motility. Experimental Parasitology , 108(3-4), 154–162. https://doi.org/10.1016/j.exppara.2004.08.007	Artigo que utiliza o ácido tânico na solução fixadora no protozoário <i>G. intestinalis</i> .


Elaborado por:	Aprovado por:	Data aprovação:
Sharmila Fiana das Neves Ortiz		

		Universidade Federal do Rio de Janeiro Procedimento Operacional Padrão (POP)	
Nome do Processo:			
Métodos Alternativos para Processamento para Microscopia Eletrônica de Transmissão de Protozoários Patogênicos: Manutenção Estrutural e Realce de Contraste			
Objetivo Estratégico:			
Descrever dois protocolos alternativos de processamento de amostras biológicas para microscopia eletrônica de transmissão com ácido tânico, sem artefatos e mais rápido. Com o objetivo aumentar o contraste e a eletrondensidade da membrana plasmática e das organelas, por meio da substituição do acetato de uranila e/ou do citrato de chumbo.			
Campo de aplicação:			
Microscopia Eletrônica de Transmissão			
Unidade responsável:		Versão:	Número de páginas:
Laboratório de Ultraestrutura Celular Hertha Meyer, Centro de Pesquisa em Medicina de Precisão – CPMP, IBCCF, UFRJ		1	11

IV. Parâmetros para medição do desempenho do processo

- Qualidade da imagem (contraste e eletrondensidade):** a adição de AT à solução fixadora eliminou a necessidade de citrato de chumbo na contrastação posterior, e todos os elementos celulares ficam bem contrastados, em especial, a membrana plasmática, que se apresenta bem delimitada e com eletrondensidade proeminente. Adicionalmente, o uso do AT como contrastante posterior, em conjunto com o citrato de chumbo, eliminou nessa condição o uso do acetato de uranila e garante excelente contraste a todos os elementos celulares.
- Tempo total de processamento:** a preparação do fixador contendo 1% de AT leva, em média, 15 minutos, enquanto a preparação do citrato de chumbo requer mais de uma hora, e este reagente tem maior suscetibilidade à formação de precipitados insolúveis em contato com o CO₂ atmosférico.
- Ausência de artefatos:** não foram observados artefatos como precipitados insolúveis ao utilizar AT na solução fixadora ou como contrastante para cortes ultrafinos, melhorando a confiabilidade do processo.
- Custos dos reagentes e insumos:** a utilização de AT na solução fixadora, é significativamente mais econômica, pois 1 g deste reagente chega a ser 150 vezes mais barato do que o acetato de uranila.

Elaborado por:	Aprovado por:	Data aprovação:
Sharmila Fiana das Neves Ortiz		


		Universidade Federal do Rio de Janeiro Procedimento Operacional Padrão (POP)	
Nome do Processo:			
Métodos Alternativos para Processamento para Microscopia Eletrônica de Transmissão de Protozoários Patogênicos: Manutenção Estrutural e Realce de Contraste			
Objetivo Estratégico:			
Descrever dois protocolos alternativos de processamento de amostras biológicas para microscopia eletrônica de transmissão com ácido tânico, sem artefatos e mais rápido. Com o objetivo aumentar o contraste e a eletrondensidade da membrana plasmática e das organelas, por meio da substituição do acetato de uranila e/ou do citrato de chumbo.			
Campo de aplicação:			
Microscopia Eletrônica de Transmissão			
Unidade responsável:		Versão:	Número de páginas:
Laboratório de Ultraestrutura Celular Hertha Meyer, Centro de Pesquisa em Medicina de Precisão – CPMP, IBCCF, UFRJ		1	11

- **Segurança e impacto ambiental:** o ácido tânico diluído em água pode ser classificado como resíduo químico classe II (não inerte) ou classe I (perigoso), dependendo da concentração e do volume. Soluções de ácido tânico com baixa concentração (em torno de 1%) geralmente são consideradas menos críticas, mas ainda não podem ser descartadas diretamente na rede de esgoto.
- **Descarte:** segundo a resolução que dispõe sobre o Inventário Nacional de Resíduos Sólidos Industriais (NBR 10004/2004 da ABNT, CONAMA nº 313/2002), a destinação final de soluções aquosas de AT é encaminhar o resíduo para empresas licenciadas de manejo de resíduos químicos, que darão a destinação final adequada que pode ser oxidação química para decompor o ácido tânico em subprodutos inertes, tratamento biológico em estações de tratamento especializadas, onde microrganismos degradam compostos orgânicos como o ácido tânico ou incineração controlada se a concentração ou o volume forem elevados.

V. Procedimentos


Protocolo 1) Para realizar um processamento de amostras biológicas para MET que apresente **maior contraste** de todos os elementos celulares e **maior eletrondensidade aparente da membrana plasmática**, e sem o uso de citrato de chumbo, seguir o seguinte protocolo:

Elaborado por:	Aprovado por:	Data aprovação:
Sharmila Fiama das Neves Ortiz		

 UFRJ	Universidade Federal do Rio de Janeiro Procedimento Operacional Padrão (POP)	
Nome do Processo:		
Métodos Alternativos para Processamento para Microscopia Eletrônica de Transmissão de Protozoários Patogênicos: Manutenção Estrutural e Realce de Contraste		
Objetivo Estratégico:		
Descrever dois protocolos alternativos de processamento de amostras biológicas para microscopia eletrônica de transmissão com ácido tânico, sem artefatos e mais rápido. Com o objetivo aumentar o contraste e a eletrondensidade da membrana plasmática e das organelas, por meio da substituição do acetato de uranila e/ou do citrato de chumbo.		
Campo de aplicação:		
Microscopia Eletrônica de Transmissão		
Unidade responsável:	Versão:	Número de páginas:
Laboratório de Ultraestrutura Celular Hertha Meyer, Centro de Pesquisa em Medicina de Precisão – CPMP, IBCCF, UFRJ	1	11

- Lavar as células três vezes com PBS a 37 °C, pH 7.2, para retirar o meio de cultura.
- Centrifugar as células a 1000 x g por 5 minutos.
- Fixar por 2 horas em uma solução contendo 2,5% de GA e 1% de AT em tampão cacodilato de sódio (0,1 M), pH 7.2. Para preparar 5 ml de solução fixadora: 2500 µl de tampão cacodilato de sódio (0,2 M), 500 µl de GA (25%), 0,05 g de ácido tânico, e avolumar com água ultrapura (Milli-Q, por exemplo) até o volume de 5000 µl. Homogeneizar por 2 minutos, ou até a completa dissolução do pó. Essa solução apresenta uma cor âmbar.
- Lavar três vezes as amostras com tampão cacodilato de sódio (0,1 M) pH 7.2.
- Pós-fixar com 1% de OsO₄ e 0,8% de ferricianeto de potássio em tampão cacodilato de sódio 0,1 M por 30 minutos, na ausência de luz.
- Lavar três vezes as amostras em tampão cacodilato de sódio (0,1 M) pH 7.2.
- Desidratar as amostras em soluções de acetona: 50%, 70%, 90%, e 3 trocas na acetona 100%, por 15 minutos em cada etapa.
- Infiltrar gradualmente as amostras em resina epóxi, usando misturas de acetona:epon nas proporções de: 2:1 por um período de 4 horas, 1:1 por 8 horas, 1:2 por 8 horas e resina pura por 12 horas, ou *overnight*.

Elaborado por:	Aprovado por:	Data aprovação:
Sharmila Fiama das Neves Ortiz		


		Universidade Federal do Rio de Janeiro Procedimento Operacional Padrão (POP)	
Nome do Processo:			
Métodos Alternativos para Processamento para Microscopia Eletrônica de Transmissão de Protozoários Patogênicos: Manutenção Estrutural e Realce de Contraste			
Objetivo Estratégico:			
Descrever dois protocolos alternativos de processamento de amostras biológicas para microscopia eletrônica de transmissão com ácido tânico, sem artefatos e mais rápido. Com o objetivo aumentar o contraste e a eletrondensidade da membrana plasmática e das organelas, por meio da substituição do acetato de uranila e/ou do citrato de chumbo.			
Campo de aplicação:			
Microscopia Eletrônica de Transmissão			
Unidade responsável:		Versão:	Número de páginas:
Laboratório de Ultraestrutura Celular Hertha Meyer, Centro de Pesquisa em Medicina de Precisão – CPMP, IBCCF, UFRJ		1	11

- Colocar as amostras no suporte de silicone, na estufa a 60 °C por 72 horas para polimerização.
- Cortar os blocos na espessura de 70 nm e coletar em grades de cobre de 300 “mesh”.
- Para a contrastação posterior dos cortes: Em um pedaço de Parafilm, dispor 30 µl de 5% de acetato de uranila em água e colocar as grades com os cortes virados para o líquido. Abrigar as grades da luz.
- Lavar três vezes com água ultrapura, e deixar secar em temperatura ambiente. Para lavar, dispor 3 gotas de água ultrapura de 50 µl cada, em um pedaço de Parafilm e deixar as grades por 5 minutos em cada gota.

Protocolo 2) Para realizar a contrastação posterior de cortes ultrafinos usando ácido tânico e citrato de chumbo, sem a necessidade de acetato de uranila, de amostras biológicas que foram processadas de maneira convencional (descrito ao final dessa seção), seguir o protocolo:

- Cortar os blocos na espessura de 70 nm e coletar em grades de cobre de 300 “mesh”.

Elaborado por:	Aprovado por:	Data aprovação:
Sharmila Fiana das Neves Ortiz		

		Universidade Federal do Rio de Janeiro Procedimento Operacional Padrão (POP)	
Nome do Processo:			
Métodos Alternativos para Processamento para Microscopia Eletrônica de Transmissão de Protozoários Patogênicos: Manutenção Estrutural e Realce de Contraste			
Objetivo Estratégico:			
Descrever dois protocolos alternativos de processamento de amostras biológicas para microscopia eletrônica de transmissão com ácido tânico, sem artefatos e mais rápido. Com o objetivo aumentar o contraste e a eletrondensidade da membrana plasmática e das organelas, por meio da substituição do acetato de uranila e/ou do citrato de chumbo.			
Campo de aplicação:			
Microscopia Eletrônica de Transmissão			
Unidade responsável:		Versão:	Número de páginas:
Laboratório de Ultraestrutura Celular Hertha Meyer, Centro de Pesquisa em Medicina de Precisão – CPMP, IBCCF, UFRJ		1	11


- Para a contrastação posterior dos cortes: Em um pedaço de Parafilm, dispor 30 µl de 5% de ácido tânico em água e colocar as grades com os cortes virados para o líquido. Abrigar as grades da luz.
- Lavar três vezes com água ultrapura, e deixar secar em temperatura ambiente. Para lavar, dispor 3 gotas de água ultrapura de 50 µl cada, em um pedaço de Parafilm e deixar as grades por 5 minutos em cada gota.
- Contrastar os cortes com 1% de citrato de chumbo em água por 3- 5 minutos.
- Lavar as grades três vezes com água ultrapura e secar em temperatura ambiente.

ATENÇÃO: É importante que as grades sejam bem lavadas e que estejam completamente secas para serem usadas ao microscópio eletrônico de transmissão.

Processamento convencional de amostras biológicas para MET:

- Lavar as células três vezes com PBS a 37°C, pH 7.2
- Fixar quimicamente por 2 horas em uma solução contendo 2,5% de GA em tampão cacodilato de sódio (0,1M), pH 7.2. Para preparar 5 ml de solução


Elaborado por:	Aprovado por:	Data aprovação:
Sharmila Fiama das Neves Ortiz		

 UFRJ	Universidade Federal do Rio de Janeiro Procedimento Operacional Padrão (POP)	
Nome do Processo:		
Métodos Alternativos para Processamento para Microscopia Eletrônica de Transmissão de Protozoários Patogênicos: Manutenção Estrutural e Realce de Contraste		
Objetivo Estratégico:		
Descrever dois protocolos alternativos de processamento de amostras biológicas para microscopia eletrônica de transmissão com ácido tânico, sem artefatos e mais rápido. Com o objetivo aumentar o contraste e a eletrondensidade da membrana plasmática e das organelas, por meio da substituição do acetato de uranila e/ou do citrato de chumbo.		
Campo de aplicação:		
Microscopia Eletrônica de Transmissão		
Unidade responsável:	Versão:	Número de páginas:
Laboratório de Ultraestrutura Celular Hertha Meyer, Centro de Pesquisa em Medicina de Precisão – CPMP, IBCCF, UFRJ	1	11

fixadora: 2500 µl de tampão cacodilato de sódio (0,2 M), 500 µl de GA (25%), 2000 µl de água ultrapura.

- Após a fixação, centrifugar as amostras a 1.000 x g por 5 minutos, e remover o sobrenadante, para lavar as células por três vezes com tampão cacodilato de sódio (0,1M) pH 7.2.
- Pós-fixar com 1% de OsO₄ e 0,8% de ferricianeto de potássio em tampão cacodilato de sódio 0,1 M por 30 minutos, na ausência de luz.
- Lavar três vezes as amostras em tampão cacodilato de sódio (0,1 M) pH 7.2.
- Desidratar as amostras em soluções de acetona: 50%, 70%, 90%, e 3 trocas na acetona 100%, por 15 minutos em cada etapa.
- Infiltrar gradualmente as amostras em resina epóxi, usando misturas de acetona:epon nas proporções de: 2:1 por um período de 4 horas, 1:1 por 8 horas, 1:2 por 8 horas e resina pura por 12 horas, ou overnight.
- Colocar as amostras no suporte de silicone, na estufa a 60 °C por 72 horas para polimerização.
- Cortar os blocos na espessura de 70 nm e coletar em grades de cobre de 300 “mesh”.

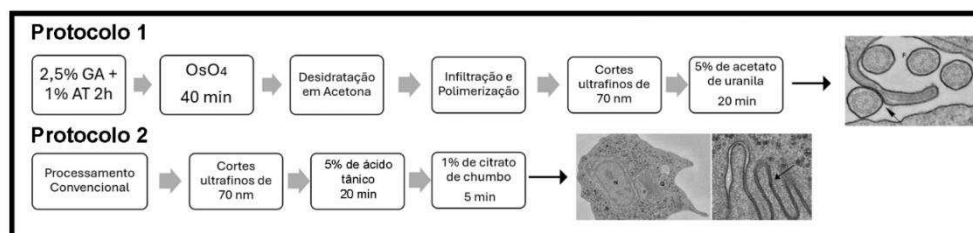
Elaborado por:	Aprovado por:	Data aprovação:
Sharmila Fiana das Neves Ortiz		

 UFRJ	Universidade Federal do Rio de Janeiro Procedimento Operacional Padrão (POP)	
Nome do Processo:		
Métodos Alternativos para Processamento para Microscopia Eletrônica de Transmissão de Protozoários Patogênicos: Manutenção Estrutural e Realce de Contraste		
Objetivo Estratégico:		
Descrever dois protocolos alternativos de processamento de amostras biológicas para microscopia eletrônica de transmissão com ácido tânico, sem artefatos e mais rápido. Com o objetivo aumentar o contraste e a eletrondensidade da membrana plasmática e das organelas, por meio da substituição do acetato de uranila e/ou do citrato de chumbo.		
Campo de aplicação:		
Microscopia Eletrônica de Transmissão		
Unidade responsável:	Versão:	Número de páginas:
Laboratório de Ultraestrutura Celular Hertha Meyer, Centro de Pesquisa em Medicina de Precisão – CPMP, IBCCF, UFRJ	1	11


VI. Condições de biossegurança

- Utilizar equipamentos de proteção individual (jaleco, luvas, máscara e óculos de proteção) durante todo o processamento para MET, principalmente ao manusear os seguintes reagentes: tampão cacodilato de sódio, glutaraldeído, OsO_4 , ácido tânico, acetato de uranila, citrato de chumbo, acetona e resina epóxy.
- Realizar o processamento para MET na capeta de exaustão como medida de proteção coletiva.
- Descartar soluções contendo OsO_4 em areia, ou em óleo vegetal até a total desativação dele.
- Descartar fixadores em recipiente apropriado e identificado, para descarte de produtos químicos realizado pelo setor especializado.

VII. Fluxograma



Elaborado por:	Aprovado por:	Data aprovação:
Sharmila Fiana das Neves Ortiz		

	Universidade Federal do Rio de Janeiro Procedimento Operacional Padrão (POP)	
Nome do Processo:		
Métodos Alternativos para Processamento para Microscopia Eletrônica de Transmissão de Protozoários Patogênicos: Manutenção Estrutural e Realce de Contraste		
Objetivo Estratégico:		
Descrever dois protocolos alternativos de processamento de amostras biológicas para microscopia eletrônica de transmissão com ácido tânico, sem artefatos e mais rápido. Com o objetivo aumentar o contraste e a eletrondensidade da membrana plasmática e das organelas, por meio da substituição do acetato de uranila e/ou do citrato de chumbo.		
Campo de aplicação:		
Microscopia Eletrônica de Transmissão		
Unidade responsável:	Versão:	Número de páginas:
Laboratório de Ultraestrutura Celular Hertha Meyer, Centro de Pesquisa em Medicina de Precisão – CPMP, IBCCF, UFRJ	1	11

VIII. Controle das alterações

Nº da versão	Data	Tipo de alteração	Itens revisados	Responsável pela revisão

IX. Controle de aprovações para uso

Data da aprovação	Nome do responsável pela aprovação	Unidade/subunidade aprovadora:

Elaborado por:	Aprovado por:	Data aprovação:
Sharmila Fiana das Neves Ortiz		