

Estudo comparativo com diversos fixadores para aplicação em microscopia eletrônica de transmissão

A comparative study on several fixatives applied in transmission electron microscopy procedure

RIALA6/1005

Daniel S. ABRAHÃO¹; Ana Rita TOLEDO PIZA¹; Marilena dos Anjos MARTINS¹; Jacinto C. SILVA NETO¹; Elaine C.J. FERREIRA¹; Ludmila Nakamura RAPADO¹; Tânia Matiko HOSODA¹; Raquel C.SILVA¹; Ana Carolina AZZUZ¹; Noemi Nosomi TANIWAKI²; Maria de Fátima Costa PIRES^{3*}

* Endereço para correspondência: Av. Dr. Arnaldo, 355 - São Paulo/SP - 01246-902 - Seção de Microscopia Eletrônica,

¹ Pós-graduandos da Disciplina Microscopia Eletrônica no Laboratório de Saúde Pública - Área de Concentração: Pesquisas Laboratoriais em Saúde Pública - PPG-CIP - SES/SP

² Pesquisador Científico Seção de Microscopia Eletrônica do Instituto Adolfo Lutz, SP.

³ Professora Responsável pela Disciplina - PLSP-PPG-CIP-SP

RESUMO

Um estudo comparativo sobre a ação de diversos fixadores utilizados em microscopia eletrônica de transmissão (MET) e microscopia de luz (ML) foi realizado, a fim de analisar a preservação de estruturas celulares ao microscópio eletrônico de transmissão (MET). Fragmentos de fígado de camundongo foram fixados em 5 diferentes fixadores: o fixador de Karnovsky, glutaraldeído e paraformaldeído utilizados no processamento para MET e o formaldeído comercial e líquido de Bouin utilizados no processamento para ML. Após a fixação, os fragmentos foram pós-fixados com tetróxido de ósmio e contrastados com acetato de uranila. A seguir foram desidratados e incluídos em resina Epon. Os cortes ultrafinos mostraram que os fragmentos fixados com Karnovsky e glutaraldeído apresentaram melhor preservação das estruturas celulares e menor extração. O paraformaldeído produziu alguns artefatos de má fixação e extração pelo fato de formar menos ligações cruzadas que o glutaraldeído. Os fixadores formaldeído comercial e o líquido de Bouin utilizados em microscopia de luz mostraram que não são adequados ao uso em MET, pois são considerados fixadores coagulantes e produzem extensa extração dos componentes celulares. Comparando-se as imagens obtidas com os fixadores utilizados, o fixador de Karnovsky e o glutaraldeído mostraram melhor preservação e maior similaridade na morfologia.

Palavras-Chave. fixador de Karnovsky, glutaraldeído, paraformaldeído, formaldeído, líquido de Bouin, microscopia eletrônica de transmissão.

ABSTRACT

A comparative study on several fixatives used for Electron Microscopy (EM) and light microscopy (LM) procedure was carried out in order to investigate the cellular structures preservation under Transmission Electron Microscopy. Mouse liver fragments were fixed with diverse fixatives, three of them regularly employed for EM procedure (Karnovsky, glutaraldehyde, and paraformaldehyde), and two other fixatives used for LM methodology (commercial solution of formaldehyde, and Bouin solution). After primary fixation, all tissue fragments were post-fixed with osmium tetroxide and uranyl acetate. Then, the fragments were dehydrated, and embedded in Epon resin. Ultra-thin sections from Karnovsky- and glutaraldehyde- fixed tissues showed better preservation of cell structures and reduced extraction of cellular components. The paraformaldehyde - fixed tissue presented poorer results than glutaraldehyde fixation due to the presence of less cross linking; however that fixative has been useful in electron cytochemical technique. Commercial formaldehyde solution and Bouin solution are the usual fixatives for LM but they are unsuitable for EM. Their contents present a feature of coagulating proteins and to cause an extensive extraction that induces a loss of cell constituents. Although all used fixatives rendered images with artifact, both fixatives Karnovsky and glutaraldehyde showed best cell morphology preservation and similar results.

Key Words. Karnovsky fixatives, glutaraldehyde, paraformaldehyde, Bouin solution, transmission electron microscopy.

INTRODUÇÃO

A partir de 1950, os procedimentos de preparação de amostras biológicas para microscopia eletrônica de transmissão (MET) começaram a ser padronizados com o desenvolvimento de fixadores adequados^{7,15,16}, agentes desidratantes compatíveis com o meio de inclusão e desenvolvimento de agentes de inclusão como as resinas epoxi^{4,9}, que permitiram a obtenção de cortes ultrafinos¹² que apresentaram boa estabilidade quando submetidos ao feixe de elétrons.

A fixação é a primeira etapa na preparação de amostras biológicas para exame de cortes ultrafinos ao ME e tem o propósito de estabilizar e preservar a organização celular mesmo após procedimentos subsequentes como a desidratação, embebição e exposição ao feixe de elétrons¹⁴. É inevitável que a morfologia celular seja alterada durante o processo de estabilização e modificações podem ocorrer mesmo com aqueles fixadores considerados ideais. Evidências experimentais indicam que quantidades variadas de carboidratos, proteínas, lipoproteínas e lipídeos são perdidas durante a fixação⁵. Dessa forma, é inerente que as imagens obtidas ao microscópio de luz e/ou eletrônico sejam artefatuais³.

O tetróxido de ósmio, um fixador utilizado em microscopia de luz desde o começo do século XX¹⁹ foi a base inicial de fixador desenvolvido para ME por Palade¹⁰ em 1952. O ósmio protege as lipoproteínas naturais dos tecidos evitando sua ruptura e coagulação, mas tem a desvantagem de penetrar e reagir tão vagarosamente que mudanças consideráveis na estrutura celular podem ocorrer antes que a fixação seja completa.

A mudança no processo de fixação surgiu com o trabalho de Sabatini et al.¹⁶ que introduziram o glutaraldeído. Eles procuravam por fixadores que permitissem reter a atividade enzimática, destruída ou inibida pelo ósmio, que era usado como fixador primário naquele tempo. Outros aldeídos foram utilizados anteriormente, mas o glutaraldeído apresentou uma excelente preservação em tecidos animais e vegetais, quando seguido por uma pós-fixação com ósmio. O glutaraldeído sendo um dialdeído, reage com proteínas estabilizando estruturas através de ligações cruzadas. No entanto, os lipídeos não são preservados pelo glutaraldeído, cerca de 95% podem ser extraídos durante a desidratação¹⁸, a menos que uma segunda fixação com ósmio seja utilizada.

A boa fixação do glutaraldeído levou os pesquisadores a reexaminarem outros aldeídos como fixadores primários, e encontraram no formaldeído, recém preparado a partir do paraformaldeído^{6,15} um fixador comparável ao glutaraldeído e com a vantagem adicional de ter uma penetração mais rápida nas amostras. No entanto, este fixador sendo um monoaldeído forma menos ligações cruzadas que o glutaraldeído, assim, deve-se tomar cuidado durante a lavagem porque sua fixação é reversível⁵. Este fixador difere do formaldeído comercial testado no início da microscopia eletrônica com resultado inferior ao do ósmio. Mesmo quando utilizado como fixador primário antes do ósmio, ocorre extensa extração e precipitação, devido à presença considerável

de metanol (11 a 16%) na solução comercial do formaldeído¹¹. Misturas de aldeídos também foram testadas, particularmente de paraformaldeído e glutaraldeído (fixador de Karnovsky)⁷ que provou ser superior à utilização de um aldeído único. O princípio deste fixador é que o formaldeído penetra no tecido mais rapidamente que o glutaraldeído e estabiliza temporariamente estruturas que serão subsequentemente fixadas mais permanentemente pelo glutaraldeído⁷.

Em anos subsequentes foi introduzido o acetato de uranila como um terceiro fixador, seguido do glutaraldeído e ósmio. Ele é descrito como contrastante em bloco⁸. Sob estas condições o acetato de uranila atua como um fixador para componentes lipídicos.

Este trabalho foi o resultado das aulas práticas realizadas com os alunos de Pós-Graduação da Disciplina "Microscopia Eletrônica no Laboratório de Saúde Pública" PPG-CIP-SES/SP e teve como objetivo comparar a ação dos diferentes fixadores utilizados na microscopia eletrônica de transmissão e na microscopia de luz analisando a preservação de estruturas celulares ao Microscópio Eletrônico de Transmissão.

MATERIAL E MÉTODOS

Camundongo Balb/c, fêmea de 4 meses de idade foi sacrificada e o fígado retirado foi dividido para os 5 grupos (G1 a G5). Cada grupo recebeu um fixador diferente para estudo.

Os fixadores utilizados neste experimento foram:

A. Para preparação em Microscopia Eletrônica de Transmissão:
Grupo 1 : Karnovsky (paraformaldeído (Merck) a 4% e glutaraldeído (Sigma) a 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,1M pH 7,2;

Grupo 2 : Glutaraldeído a 2,5% (Sigma) em tampão cacodilato de sódio 0,1M pH 7,2;

Grupo 3 : Paraformaldeído (Merck) a 4% em tampão cacodilato de sódio 0,1M pH 7,2

B. Para preparação em Microscopia de Luz:

Grupo 4 : Formaldeído (comercial) (Synth) a 10% aquosa pH 5,0;

Grupo 5 : Líquido de Bouin, pH 2,5

Os fragmentos foram fixados por 2 horas a temperatura ambiente e após este período, todas as amostras seguiram o mesmo procedimento. Os fragmentos foram lavados em solução de lavagem (sacarose 7,3%, cloreto de sódio 0,6%) e posteriormente pós-fixados em tetróxido de ósmio a 1% por 1 hora a 4°C. Logo após, os fragmentos foram lavados novamente em solução de lavagem e contrastados em bloco em solução de acetato de uranila a 0,5% por 2 horas. Foram então desidratados em concentrações crescentes de acetona 50, 70, 90, 95% por dez minutos em cada etapa e dois banhos de acetona pura por 15 minutos cada. Após a desidratação, os fragmentos foram embebidos em uma mistura de resina Epon : acetona na proporção de 1:1 por 1 hora e a seguir em resina pura por 12 horas. O material incluído foi colocado em estufa a 60°C por 72

horas para polimerização. Cortes semi finos foram corados com azul de toluidina e observados ao microscópio de luz para seleção de áreas a serem estudadas. Cortes ultrafinos foram colhidos em telas de cobre revestidos com formvar e corados com acetato de uranila e citrato de chumbo¹³. Após contrastação foram examinados e fotografados ao Microscópio Eletrônico de Transmissão Philips 400 T.

RESULTADOS

Os cortes de fígado fixados com os fixadores utilizados em MET apresentaram uma boa preservação. Tanto o tecido fixado com o fixador de Karnovsky como aqueles fixados com o glutaraldeído e paraformaldeído apresentaram resultados similares.

Cortes de fígado fixados com o Karnovsky mostraram uma célula bastante íntegra. O citoplasma apresentou retículo endoplasmático rugoso (RER) formando cisternas estreitas, mitocôndrias, retículo endoplasmático liso (REL) e grânulos de glicogênio levemente extraídos. Os espaços estavam preenchidos por um material homogêneo, finamente granular. O núcleo mostrou cromatina com alguns pontos mais densos e nucléolo. (Figura 1A). O retículo endoplasmático rugoso muitas vezes envolvia as mitocôndrias que apresentavam cristas mitocondriais e grânulos de cálcio em seu interior (Figura 1B). Observou-se também a presença do complexo de Golgi (Figura 1C).

O material fixado com o glutaraldeído também apresentou célula íntegra. Podia-se observar a presença de um grande número de mitocôndrias; retículo endoplasmático rugoso e liso também estavam presentes. Havia regiões apresentando um material amorfo com alguns grânulos de glicogênio. O núcleo mostrou grumos de cromatina elétrons densos (Figura 2A). As mitocôndrias apresentavam cristas e grânulos de cálcio (Figura 2B).

O material fixado com o paraformaldeído mostrou retículo endoplasmático rugoso e mitocôndrias envolvidas pelo RER. Havia regiões vazias no citoplasma, provavelmente anteriormente ocupadas pelo glicogênio. O núcleo mostrava cromatina homogênea e nucléolo evidente (Figura 2C). Algumas mitocôndrias apresentavam cristas mitocondriais preservadas, enquanto outras apresentavam mitocôndrias degeneradas ou sem cristas contendo um material amorfo elétron denso (Figura 2C e 2D).

Cortes de tecidos fixados com fixadores utilizados em microscopia de luz apresentaram má preservação e extração de vários componentes celulares. Cortes de fígado fixado com formaldeído comercial mostrou o citoplasma de um hepatócito com aspecto “rendilhado” devido à presença de numerosos vacúolos de diferentes tamanhos, de formato não homogêneo e vazios. O núcleo apresentava cromatina finamente granular e nucléolo. (Figura 3A). A membrana do retículo endoplasmático rugoso mostrava algumas regiões descontínuas e fragmentadas; em outras regiões havia ausência de ribossomos aderidos à membrana do retículo. As mitocôndrias pareciam dilatadas e a membrana de algumas delas estavam degeneradas;

era possível observar resquícios de cristas mitocondriais e a presença de um material granular elétron denso (Figura 3B). Exceto pelas organelas mais facilmente distinguíveis, era difícil identificar outras organelas citoplasmáticas.

Os cortes de tecidos fixados com o líquido de Bouin mostraram que o citoplasma de um hepatócito apresentava sinais de extração. O núcleo apresentou regiões com grumos de cromatina elétrons densas. Havia grandes regiões vazias. O retículo endoplasmático granular apresentou membranas formando grumos e material elétron denso aderido às mesmas, provavelmente como resultado de uma reação com algum componente do fixador com os ribossomos (Figura 3C); as mitocôndrias não apresentavam cristas nem grânulos de cálcio, mas apareciam como estruturas granulares e elétrons densas (Figura 3D). Não foi possível identificar outras estruturas citoplasmáticas.

DISCUSSÃO

Ao iniciarmos um estudo morfológico de um material desconhecido normalmente é recomendado a utilização de 2 ou mais fixadores diferentes para que os resultados sejam comparados.

Ao propormos um experimento aos alunos de pós-graduação, utilizando diferentes fixadores, tínhamos este propósito, no entanto, para que a percepção deste conceito fosse aguçado nos alunos e as diferenças pudessem ser facilmente observadas ao analisar as eletromicrografias, utilizamos também fixadores usados em microscopia de luz (formaldeído comercial e o líquido de Bouin).

Os resultados apresentados pela fixação com o glutaraldeído e com Karnovsky foram semelhantes, pois ambos apresentaram ótima preservação de estruturas. Organelas como o RER, complexo de Golgi, mitocôndrias, REL foram facilmente identificados. O núcleo também mostrou estruturas distintas com nucléolo evidente.

O paraformaldeído embora utilizado em ME apresentou uma preservação menos eficiente que o glutaraldeído e o Karnovsky. Foi possível observar que algumas mitocôndrias sofreram degeneração. Este fixador não é tão eficaz quanto o glutaraldeído para a morfologia celular, embora tenha como característica a penetração rápida nos tecidos. No entanto, as ligações cruzadas são mais lentas que o glutaraldeído, inclusive, algumas podem ser revertidas durante incubações com tampão^{3,5}. Devido à estas características é muito utilizado na citoquímica em Microscopia Eletrônica de Transmissão¹⁷. Como este fixador não reage com a maioria dos polissacarídeos, observou-se extensa extração de glicogênio no material fixado com o paraformaldeído².

Embora o glutaraldeído, o paraformaldeído ou a combinação dos dois (Karnovsky) seja uma escolha universal de fixador¹, eles não são adequados se usados isoladamente, porque os aldeídos não tem ação sobre alguns componentes

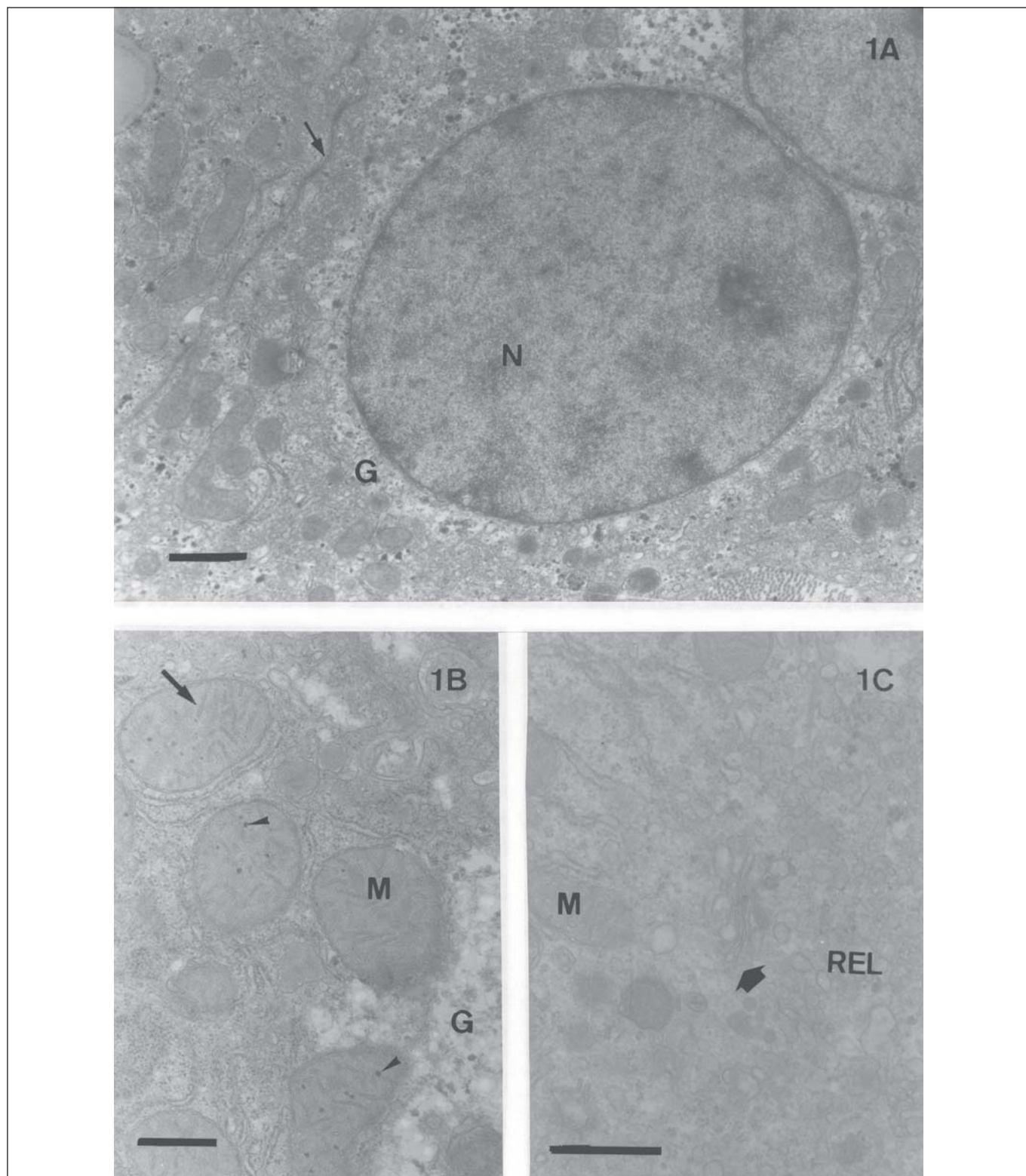


Figura 1A. Corte de fígado de camundongo fixado com o fixador de Karnovsky. Os hepatócitos mostram-se bem preservados. As organelas citoplasmáticas apresentam-se homogeneamente dispersas, grânulos de glicogênio (G) mostram-se levemente extraídos. As membranas dos hepatócitos (seta) encontram-se justapostas. N- núcleo. Barra: 1,0 μm . **Figura 1B.** Eletromicrografia do mesmo material mostra mitocôndrias (M) com cristas mitocondriais (seta) e grânulos de cálcio (cabeça de seta) em seu interior. O retículo endoplasmático rugoso disperso entre as mitocôndrias e alguns grânulos de glicogênio (G). Barra: 0,5 μm . **Figura 1C.** Eletromicrografia de outra região do citoplasma do hepatócito fixado com Karnovsky mostrando o complexo de Golgi (seta grossa), o retículo endoplasmático liso (REL) e mitocôndrias (M) bem preservados. Barra: 0,5 μm .

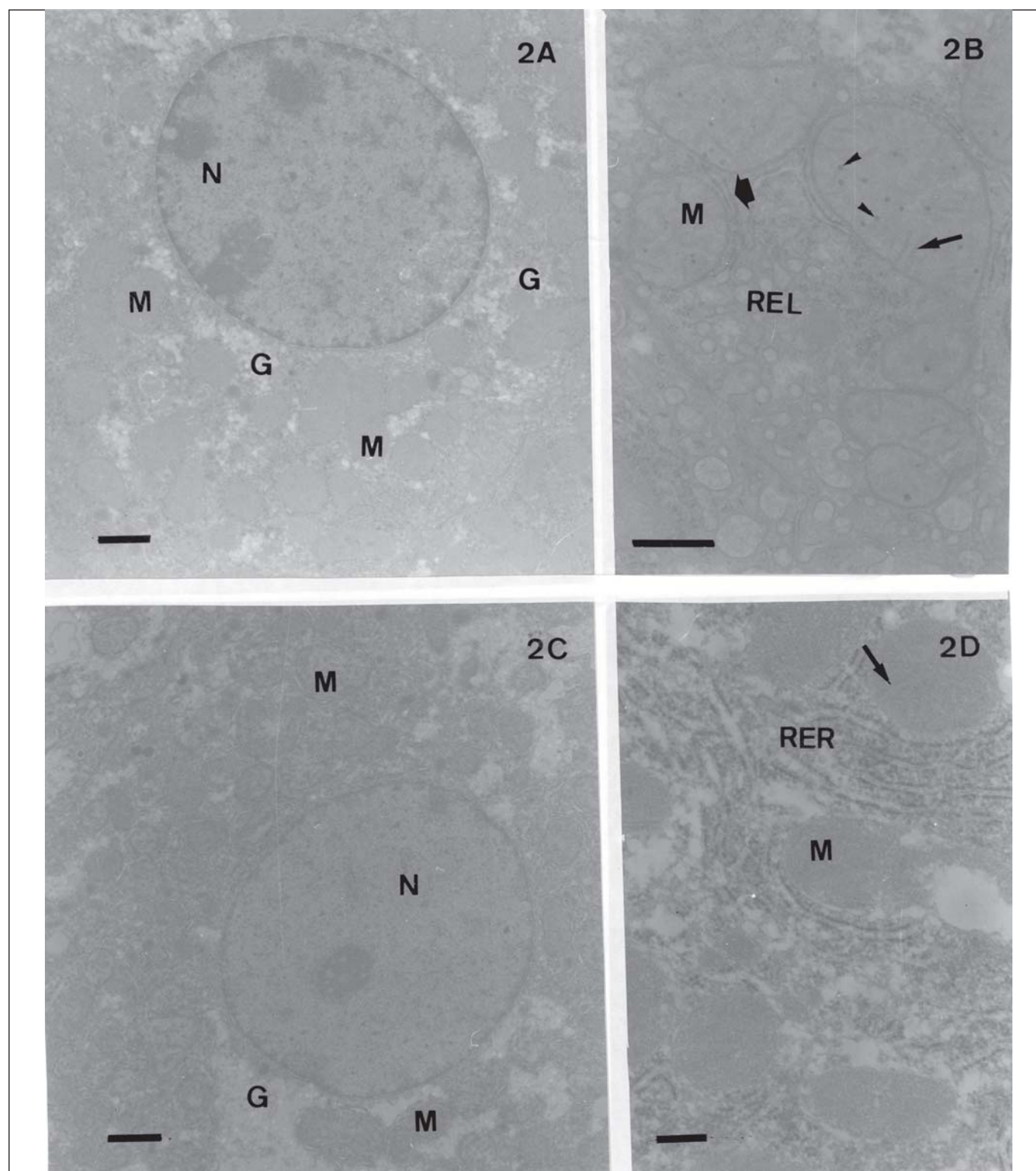


Figura 2A. Fígado de camundongo fixado com glutaraldeído apresenta numerosas mitocôndrias (M) e regiões com grânulos de glicogênio mais extraídos (G). N- núcleo. Barra: 1,2 μ m. **Figura 2B.** Eletromicrografia em maior aumento do mesmo material mostra mitocôndrias (M) com presença de cristas (seta) e grânulos de cálcio (cabeça de seta). Observa-se retículo endoplasmático liso (REL) e retículo endoplasmático rugoso (seta grossa) envolvendo as mitocôndrias. Barra: 0,5 μ m. **Figura 2C.** Corte de fígado de camundongo fixado com paraformaldeído mostra mitocôndrias (M) preservadas e outras degeneradas no citoplasma do hepatócito. Observa-se regiões com extração de glicogênio (G). N - núcleo. Barra: 1,2 μ m. **Figura 2D.** Eletromicrografia em maior aumento do material fixado com paraformaldeído mostra RER em grande quantidade e mitocôndrias com ausência de cristas e grânulos; no canto superior direito, uma mitocôndria apresenta traços de cristas (seta). Barra: 1,0 μ m.

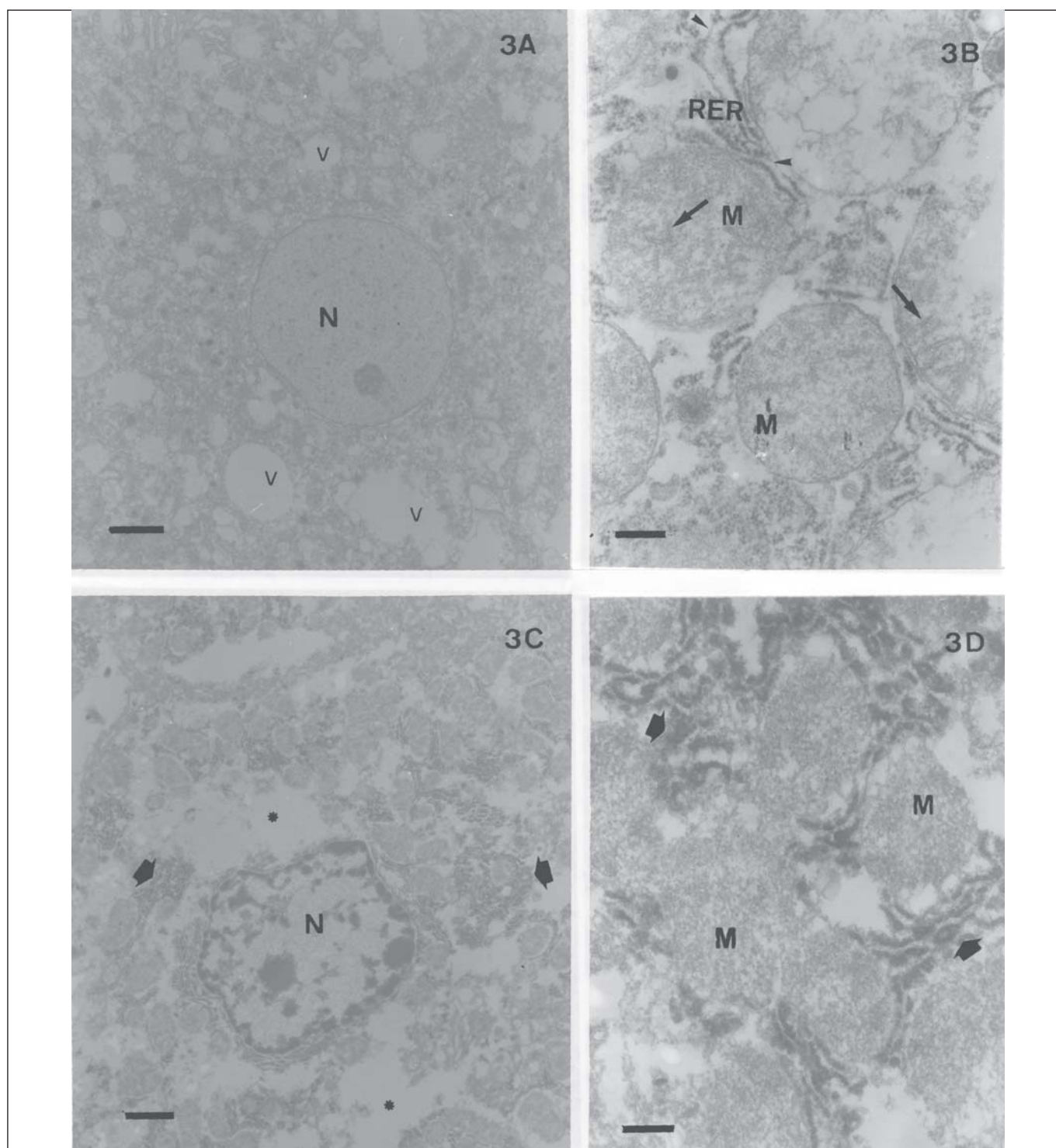


Figura 3A. Corte de fígado de camundongo fixado com formaldeído comercial mostra um grande número de vacúolos citoplasmáticos (v) de diferentes tamanhos e formatos. É difícil distinguir as organelas devido a grande extração sofrida pela célula. N- núcleo. Barra: 1,2 μ m. **Figura 3B.** Eletromicrografia em maior aumento de material fixado com formaldeído mostra mitocôndrias (M) dilatadas e algumas degeneradas, mas pode-se observar a presença de resquícios de cristas mitocondriais (seta). O RER apresenta-se fragmentado em algumas regiões e em outras regiões há ausência de ribossomos na membrana do retículo (cabeça de seta). Barra: 0,5 μ m. **Figura 3C.** Em fígado de camundongo fixado com o líquido de Bouin observa-se grandes regiões vazias (*) e agregados de organelas que lembram mitocôndrias e retículo endoplasmático rugoso (seta grossa). N - núcleo. Barra: 1,2 μ m. **Figura 3D.** Observação em maior aumento do mesmo material mostra que as mitocôndrias (M) não estão envolvidas por membrana e em seu interior há um material granular. Observa-se também grumos de membranas elétrons densas (seta grossa) provavelmente originado da reação de algum componente do fixador com o RER. Barra: 1,0 μ m.

celulares, como os lipídeos, assim, no caso de uma fixação primária, os lipídeos seriam extraídos durante a desidratação^{3,5}. Para eliminar este problema uma segunda fixação com o tetróxido de ósmio se faz necessário⁵.

O tecido fixado com formaldeído comercial, normalmente utilizado em microscopia de luz mostrou intensa extração e a formação de vacúolos de diferentes formatos, tamanhos e de aspecto vazio. Sabe-se que espaços vazios não são compatíveis com a vida². Regiões elétrons transparentes de qualquer tamanho nas eletromicrografias são indicativos de extração artefactual do material celular e a fixação é a causa provável deste problema, porque o fixador ideal deve imobilizar e insolubilizar o material celular². A presença de metanol na formulação do formaldeído torna-o um fixador coagulante sobre as proteínas, precipitando as mesmas permanentemente e alterando sua configuração⁵. As interrupções na continuidade da membrana do retículo endoplasmático rugoso e a ausência de ribossomos aderidos à membrana em algumas regiões são provavelmente artefatos originados pela fixação parcial das células.

O líquido de Bouin é conhecido como fixador para microscopia de luz, mas não há relatos de sua utilização em microscopia eletrônica. Devido à mistura de diferentes compostos em sua constituição torna-se inadequado para uso em MET. O ácido pícrico quando decomposto precipita e aglutina as proteínas formando picratos de proteínas. Por outro lado, o ácido acético precipita proteínas nucleares, mas não as citoplasmáticas e o formaldeído altera a estrutura das proteínas. Além disso, o líquido de Bouin destrói o complexo de Golgi e lipídeos¹¹. As eletromicrografias mostraram grumos de membranas de RER e precipitados elétrons densos aderidos a essas membranas, provavelmente originados dos ribossomos. Não foi possível observar outras estruturas citoplasmáticas devido à grande extração sofrida no citoplasma. O núcleo apresentou grumos de cromatina bastante elétrons densa.

Além da má fixação e grande extração provocada pelo formaldeído e pelo líquido de Bouin, estes fixadores não foram tamponados e seus pHs eram bastante diferentes do pH fisiológico do tecido (formaldeído pH 5,0 e Bouin pH 2,5). Geralmente os tecidos apresentam um pH fisiológico na ordem de 6,8 a 7,4, pequenas mudanças no pH do fixador podem trazer grandes mudanças dentro da célula, relacionadas à consistência, seletividade da membrana e atividade enzimática celular. Dessa forma, tamponando a solução fixadora a provável acidificação pode ser neutralizada, minimizando os danos aos tecidos^{3,5}. Wrigglesworth e Packer²⁰ demonstraram que ocorrem mudanças conformacionais de proteínas dependentes de pH na membrana mitocondrial podendo levar a alterações reversíveis na ultraestrutura da membrana. Como as proteínas são responsáveis pela estrutura característica de uma célula e o peso molecular de proteínas é fortemente dependente de pH, a importância do mesmo no fixador é óbvia.

O experimento proposto demonstrando a atuação de diferentes fixadores no fígado de camundongo alcançou os objetivos desejados. Os alunos puderam perceber as variações

na morfologia e a preservação ou extração de material celular dependendo do fixador utilizado. Este experimento mostrou que os fixadores glutaraldeído e o Karnovsky são os melhores fixadores primários e os fixadores comumente utilizados em microscopia de luz ocasionam grandes artefatos às células quando examinadas ao Microscópio Eletrônico de Transmissão.

REFERÊNCIAS

1. Baker JR The fine structure produced in cells by fixatives. **JIR Microsc Soc**, 84: 115, 1965.
2. Bowers B, Maser M. Artifacts in fixation for transmission electron microscopy. In: RFE Crang and KL Klomparens. **Artifacts in Biological Electron Microscopy**. Plenum Press, New York., P 13-42, 1988.
3. Glauert AM **Practical methods in Electron microscopy - Fixation, dehydration and embedding of biological specimens**. Strangeways Research Laboratory, Cambridge. North-Holland Publishing Company, Amsterdam, Oxford; 1975.
4. Glauert AM, Rogers GE, Glauert RH. A new embedding medium for electron microscopy. **Nature, London**, 178: 803, 1956.
5. Hayat MA. **Principles and techniques of electron microscopy: Biological applications**. Van Nostrand Reinhold, New York; 1970.
6. Holt SJ, Hicks RM. Studies on formalin fixation for electron microscopy and cytochemical staining purposes. **J Biophys Biochem Cytol** , 11: 31, 1961.
7. Karnovsky MJ. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. **J Cell Biol** , 27: 137 A, 1965.
8. Lewis PR, Knight DP, Williams MA. Staining methods for thin sections, in : AM Glauert, ed. **Practical methods in electron microscopy**. North-Holland, Amsterdam; 1974.
9. Luft JH. Improvements in epoxy resin embedding methods. **J. Biophys Biochem. Cytol.** , 9: 409, 1961.
10. Palade GE. A study of fixation for electron microscopy. **J. Exp Med**, 95:285, 1952.
11. Pease DC. **Histological technique for electron microscopy**. 2nd edition. Academic Press, New York and London; 1964.
12. Porter KR; Blum J. A study of microtomy for electron microscopy. **Anat Rec**, 117: 685, 1953.
13. Reynolds ES. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. **J. Cell. Biol.** , 17:208, 1963.
14. Riemersma JC. Osmium tetroxide fixation of lipids for electron microscopy. A possible reaction mechanism. **Biochim. Biophys Acta**, 152: 718, 1968.
15. Robertson JD, Bodenheimer TS, Stage DE The ultrastructure of Maunther cell synapses and nodes in goldfish brain. **J. Cell. Biol.** , 19: 159, 1963.
16. Sabatini DD, Bensch K, Barnett RJ. Cytochemistry and electron microscopy. The preservation of cellular ultrastructure and enzymatic activity by aldehyde fixation. **J. Cell. Biol.**, 17: 19, 1963.
17. Souto Padron T Imunocitoquímica : Técnicas Pré e Pós-Inclusão. In: Haddad A et al., editor W. de Souza. **Técnicas Básicas de Microscopia Eletrônica Aplicadas às Ciências Biológicas**. Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Microscopia, P 116-25, 1998.
18. Stein O, Stein Y. Light and electron microscopy radioautography of lipids: techniques and biological applications. **Adv. Lipid. Res.** , 9:1, 1971.
19. Strangeways TSP, Canti RG. The living cell in vitro as shown by darkground illumination and the changes induced in such cells by fixing reagents. **Q. JI microsc. Sci.**, 71: 1, 1927.
20. Wrigglesworth JM, Packer L. pH-dependent conformational change in submitochondrial particles. **Arch. Biochem. Biophys.**, 133: 194, 1969.