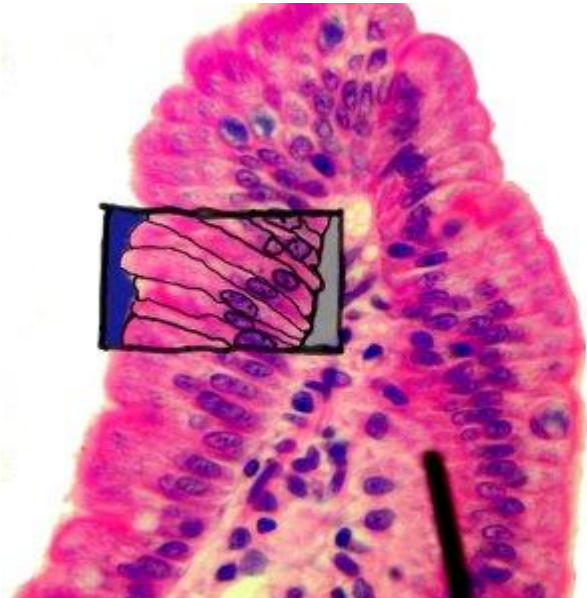


# MÉTODOS DE ESTUDO DAS CÉLULAS E DIFERENÇAS NA ARQUITETURA CELULAR

## Aula prática 2

LGN0114 – Biologia Celular

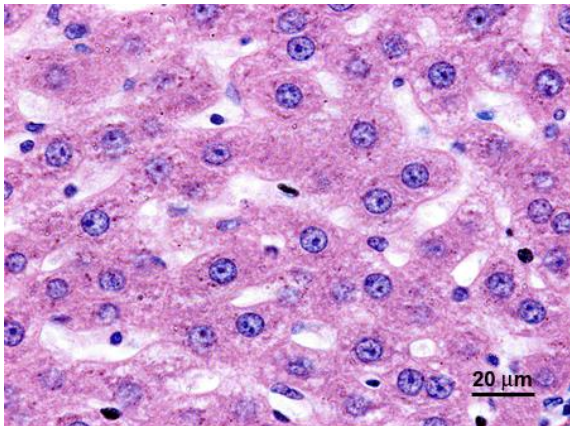


Ilara Budzinski  
Departamento de Genética  
ilara@usp.br

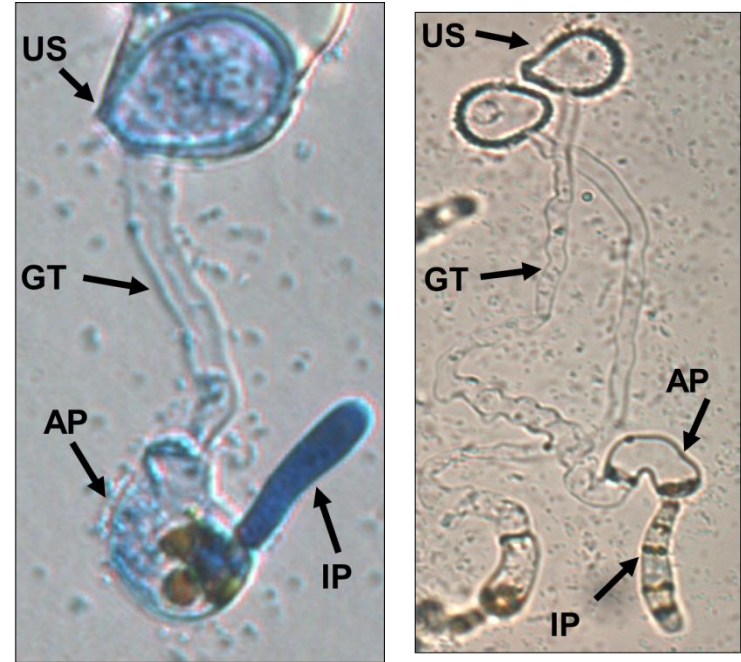
# CONCEITOS IMPORTANTES

**Fixação:** consiste no tratamento de células com soluções específicas que causam sua morte, conservando-se suas propriedades físicas e químicas.

**Coloração:** visa corar determinados componentes celulares, não corando os demais, possibilitando seu estudo pelo contraste de regiões “escuras” (coradas) e “claras” (não coradas).



Células de hepatócitos.



Uredosporos de *Puccinia psidii*, agente causal da ferrugem do eucalipto, durante o processo de diferenciação morfológica.

por A.P.B.

# POR QUE FIXAR AMOSTRAS?

- Evitar a autólise (degradação) das amostras;
- Conservar as estruturas por longo periodo;
- Impedir a contaminação por bactérias e fungos;
- Endurecer as células para o corte pelo micrótomo;
- Aumentar a afinidade dos componentes por corantes;  
Tratamento com:
  - **Microscopia óptica** -> formol e glutaraldeído
  - **Microscopia eletrônica** -> tetróxido de ósmio e glutaraldeído.

# TÉCNICAS DE COLORAÇÃO

- ✓ Melhor distinção de estruturas internas e contrastes em amostras celulares;
- ✓ Estudo de componentes específico dentro das células;
- ✓ **Técnicas de coloração** consistem em mergulhar a célula numa substância denominada **corante**, capaz de tingir diferencialmente uma ou mais partes celulares.

- ✓ Não existe uma técnica de coloração que evidencie todas as estruturas celulares;
- ✓ Afinidade depende de **carga elétrica** e **pH**;
- ✓ Podem matar ou não as células.

No **microscópio eletrônico** a coloração é feita com **sais de metais pesado**, por isso a imagem obtida é sempre em preto e branco.

## EXEMPLOS DE CORANTES

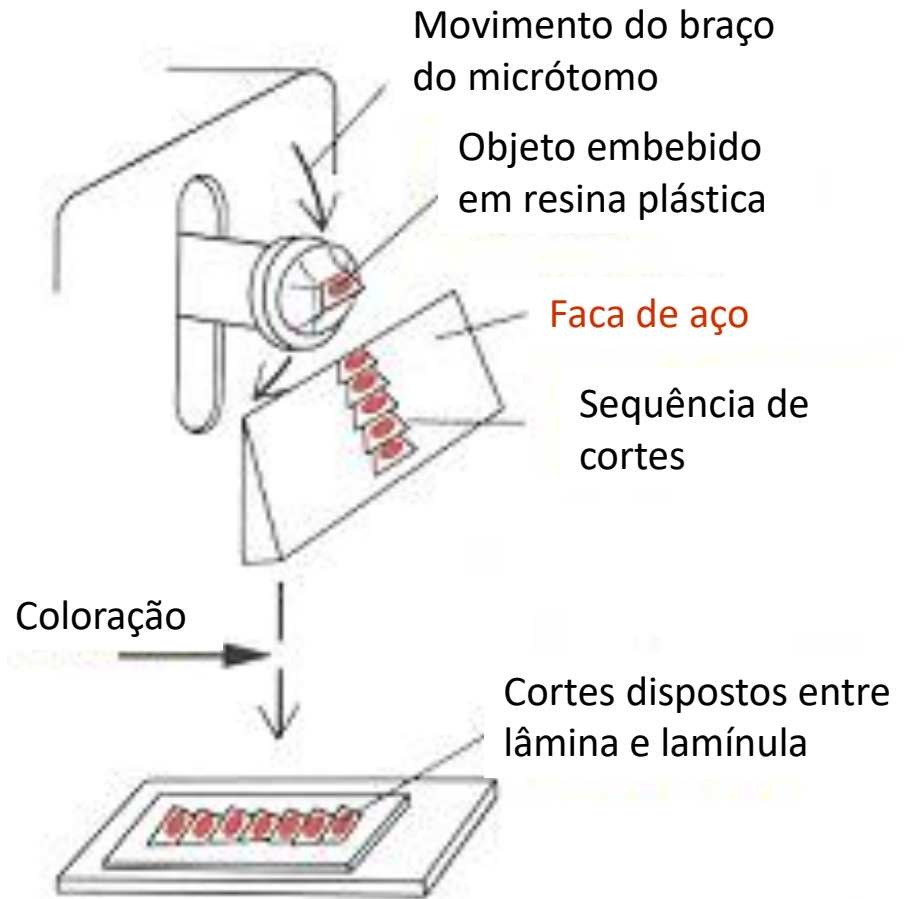
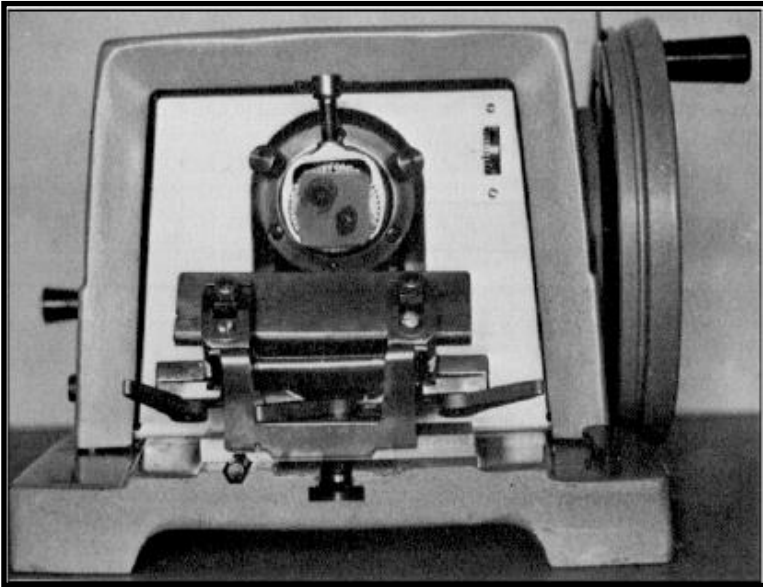
| <b>CORANTES BÁSICOS OU CATIÔNICOS<br/>(liga-se à moléculas carregadas<br/>negativamente)</b> | <b>ESTRUTURAS EVIDENCIADAS</b>  |
|--|---|
| Azul de metileno   | Cora o núcleo de azul (DNA e RNA)   |
| Giensa   | Cromossomos e células do sangue   |
| Vermelho neutro  | Acumula-se em vacúolos  |
| Azul de toluidina  | Fosfatos do DNA e RNA; carboxila e sulfato presentes nos polissacarídeos ácidos |
| Água iodada  | Cora o núcleo e amiloplastos  |
| Hematoxilina   | Cora o núcleo   |
| <b>CORANTES ÁCIDOS OU ANIÔNICOS<br/>(liga-se à moléculas carregadas<br/>positivamente)</b>   | <b>ESTRUTURAS EVIDENCIADAS</b>  |
| Eosina   | Citoplasma  |
| Fucsina básica   | Citoplasma  |
| Xilydine Ponceau   | Cora grupamentos ácidos de proteínas citoplasmáticas                            |
|  |   |

| CORANTES NEUTROS    | ESTRUTURAS EVIDENCIADAS                 |
|---------------------|---|
| Violeta de Genciana | Cromossomas de células vivas em divisão |
| Solução de Iugol    | Grãos de amido, paredes celulósicas     |

Os corantes também podem ser classificados como naturais ou sintéticos de acordo com a origem:

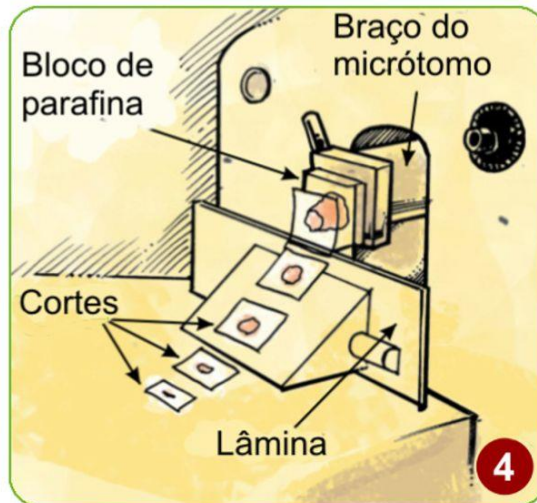
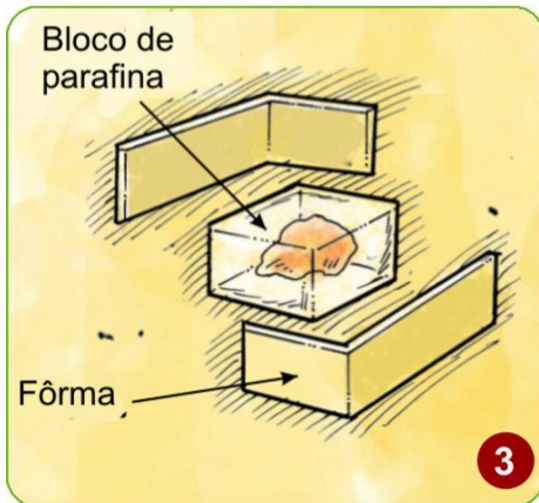
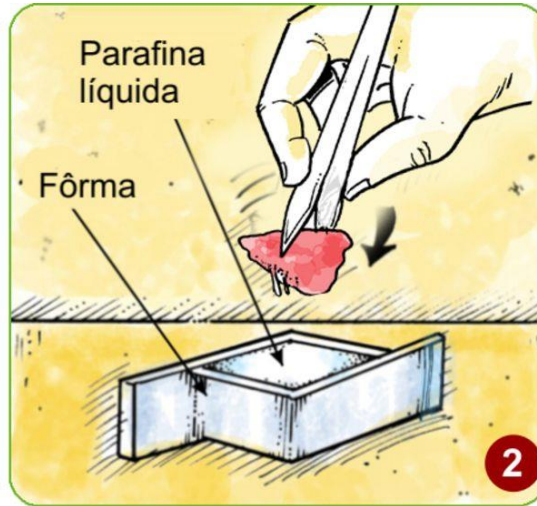
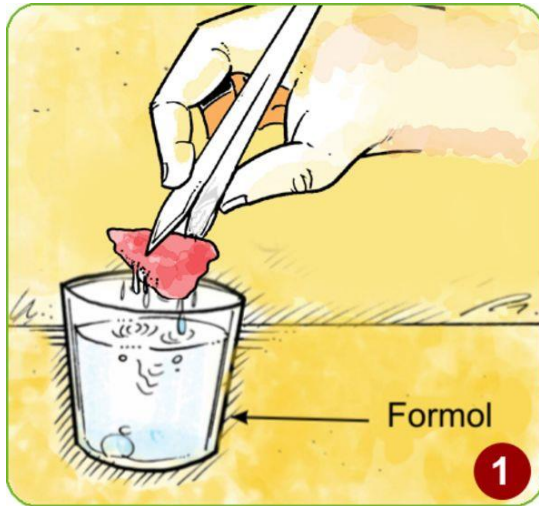
| CORANTE NATURAL | ORIGEM                            |
|-----------------|-----------------------------------|
| Carmim          | Ovários de um inseto - Cochonilha |
| Hematoxilina    | Leguminosa                        |
| Anil            | Anileira – papilionácea           |
| Orceína         | Líquen                            |
| Açafrão         | Estames de <i>Crocus sativus</i>  |

# MICRÓTOMO



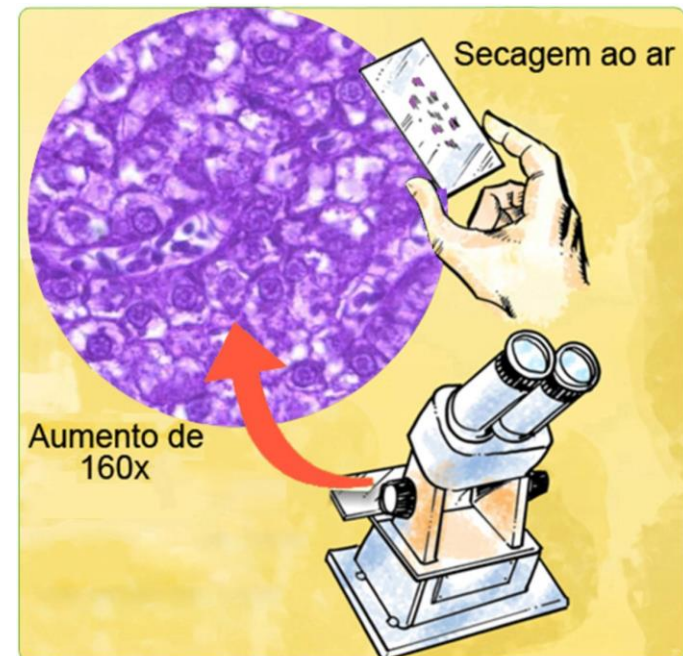
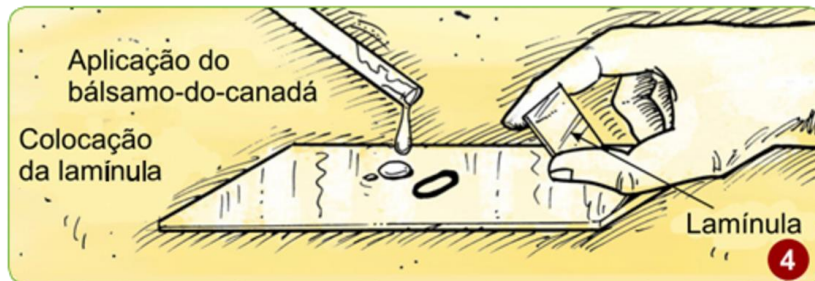
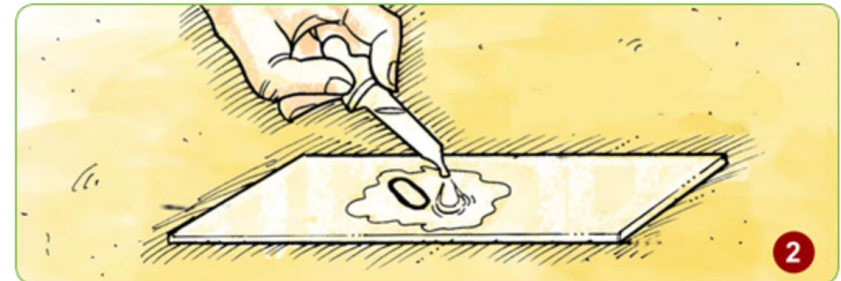
Cortes histológicos para observação em microscópio óptico

# PREPARO DO MATERIAL PAR CORTE





# PREPARO DO MATERIAL PAR CORTE

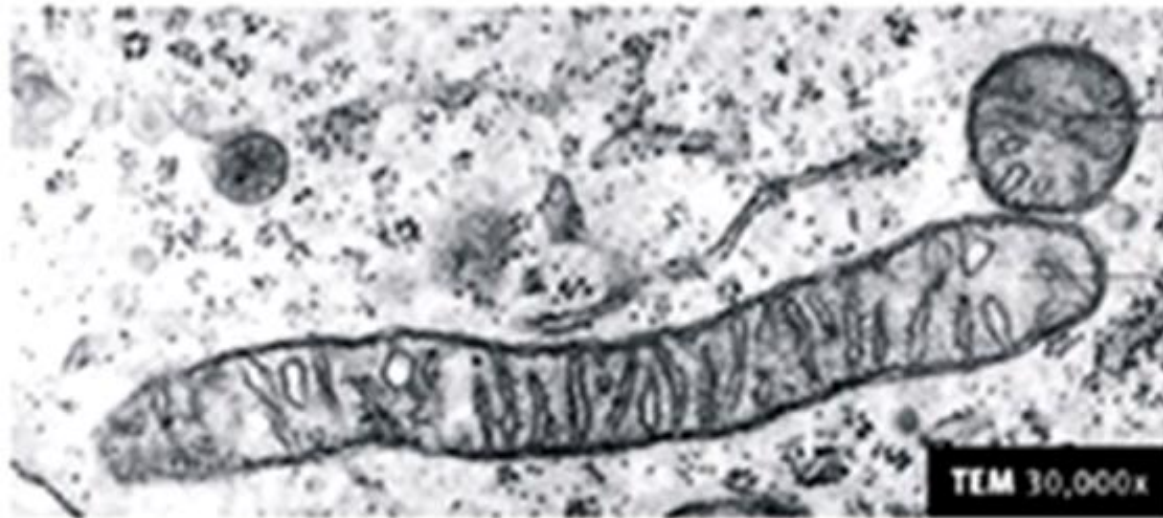
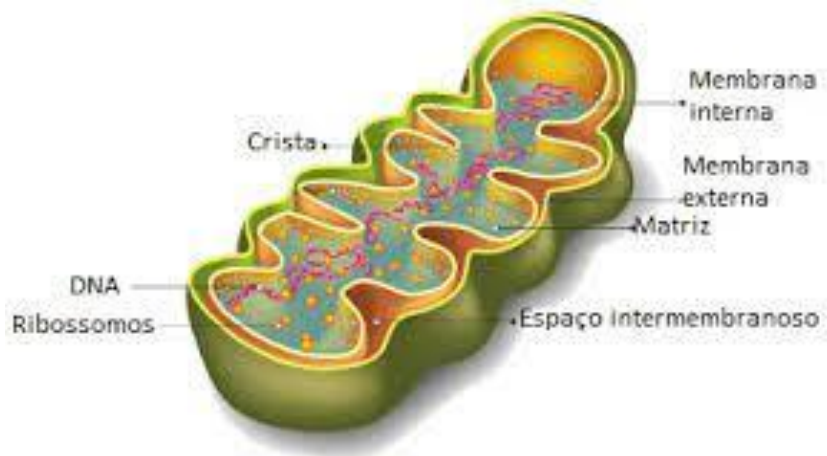


## Preparação de material para análise ao microscópio



# DESVENDANDO O INTERIOR DAS CÉLULAS...

- Corte em fatias finas pelo **MICRÓTOMO**;
  - Amostra incluída e protegida por matriz ou resina (facilitar o corte e proteger tecido);
  - **Microscopia óptica**: parafina ou resina plástica:
    - espessura 1 a 6 micrômetros ( $\mu\text{m}$ )
    - micrótomo com **navalha de aço**
  - **Microscopia eletrônica**: resina dura tipo Epóxi :
    - espessura 0,02 a 0,1 micrômetros ( $\mu\text{m}$ )
    - micrótomo com **navalha de vidro ou diamante**

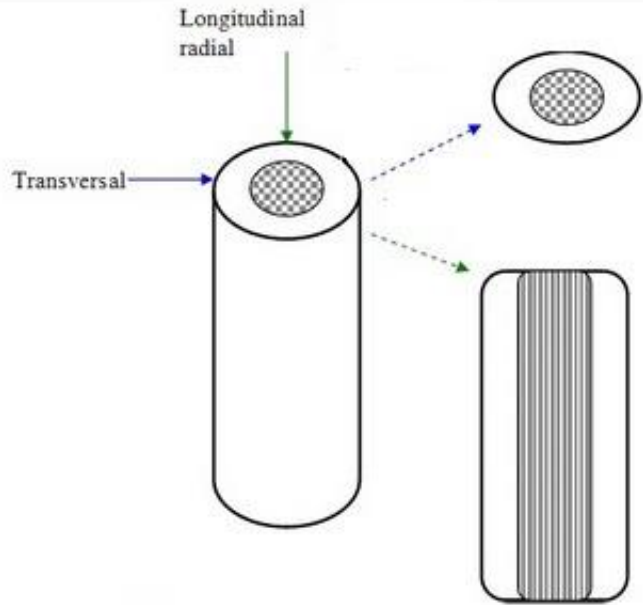


corte transversal

corte longitudinal

**A imagem depende do plano de corte!**

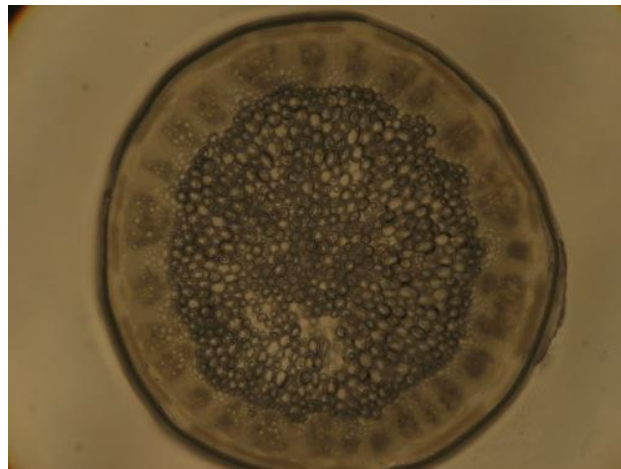
# PLANO DO CORTE



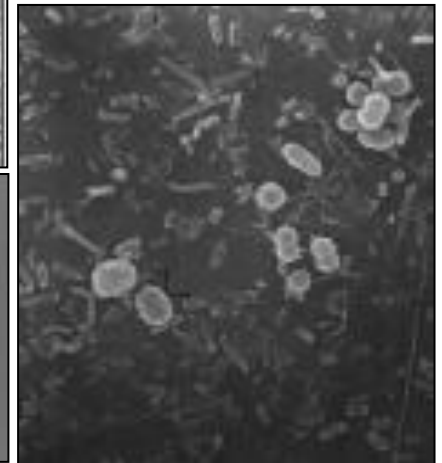
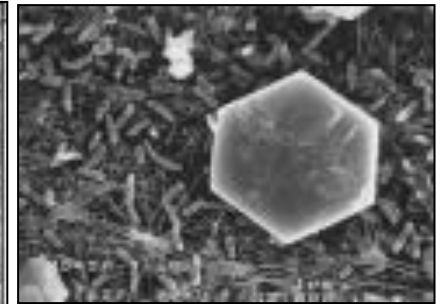
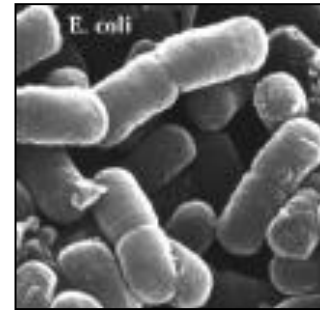
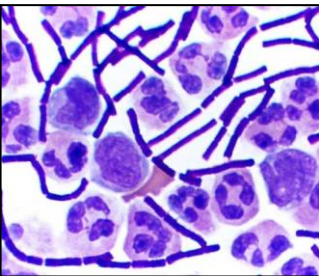
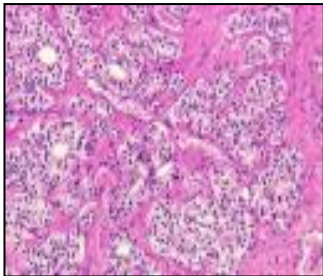
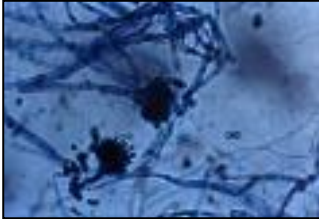
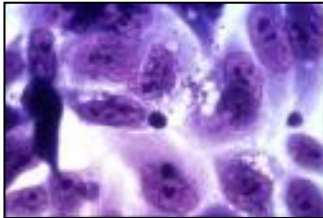
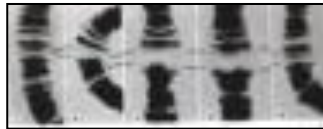
Corte longitudinal



Corte transversal



# MICROSCOPIA ÓPTICA (MO) X MICROSCOPIA ELETRÔNICA (ME)



# MICROSCOPIA DE LUZ (ÓPTICA) X MICROSCOPIA ELETRÔNICA

✓ **MO** = utiliza a **luz visível** para iluminar o espécime.

✓ **ME** = utiliza **feixes de elétrons**, em vez de fótons, para a visualização de células ou estruturas celulares.



Microscópio de luz: C.O. =  $\sim 500$  nm (as menores células e as maiores organelas)

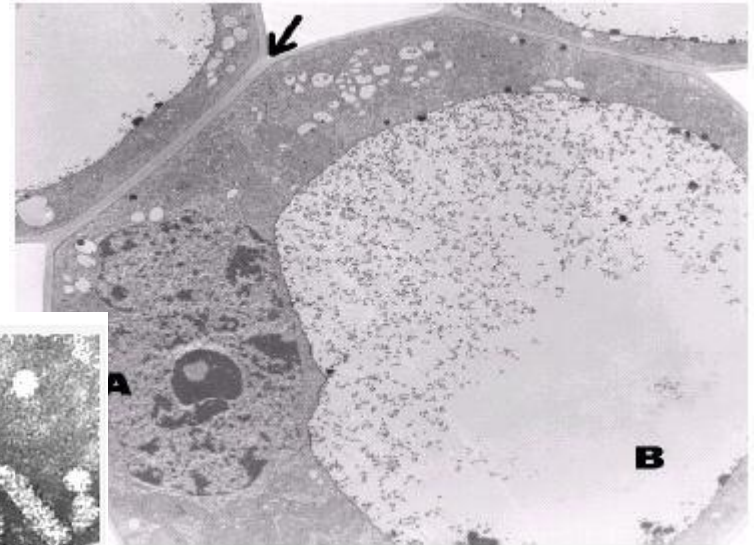


Microscópio eletrônico: C.O. =  $\sim 0,005$  nm (ultraestruturas – 0,2 nm)

# MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO - MET

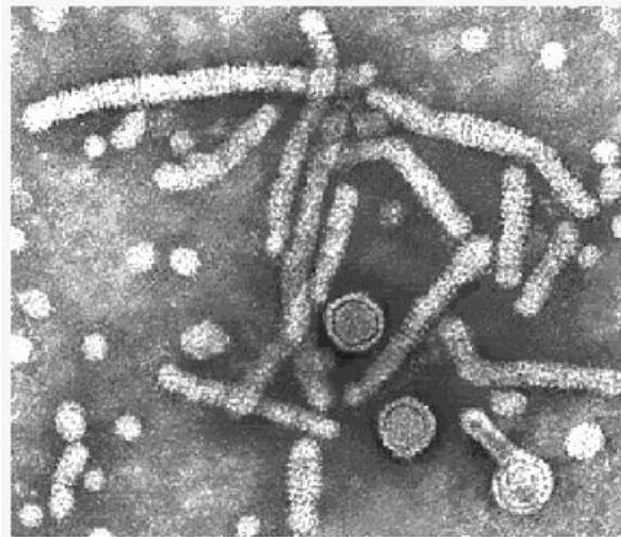
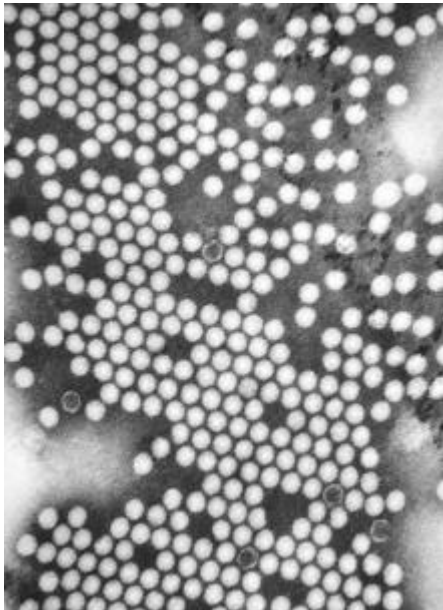


mitocôndria



citoplasma

vírus



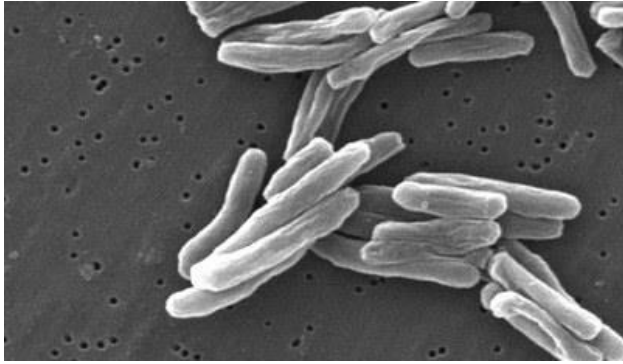


## MICROSCOPIA DE TRANSMISSÃO (MET):

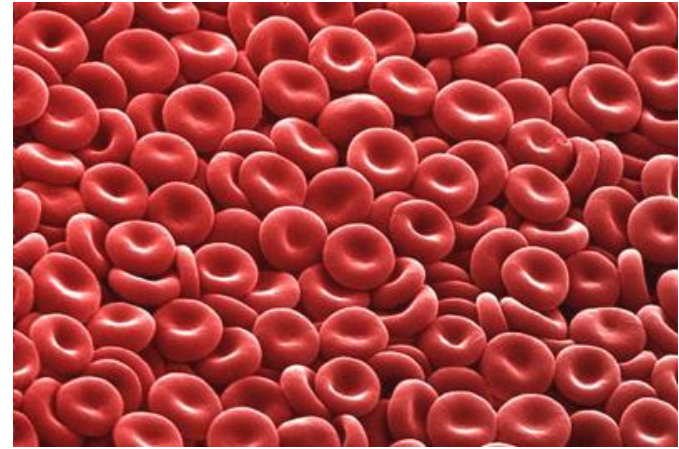
- ✓ Não se pode examinar células vivas, apenas fixadas e completamente secas;
- ✓ Os cortes histológicos precisam ser realmente finos, sendo necessária a utilização de micrótomos com navalha de vidro fraturado ou diamante;
- ✓ Os estudos de microscopia eletrônica transmissão são feitos principalmente em ampliações em papel fotográfico, mais do que diretamente no microscópio.

MET: seções ultrafinas do espécime são necessárias para que o feixe de elétrons **atravesse a amostra** e uma imagem seja formada.

# MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA - MEV



bactéria



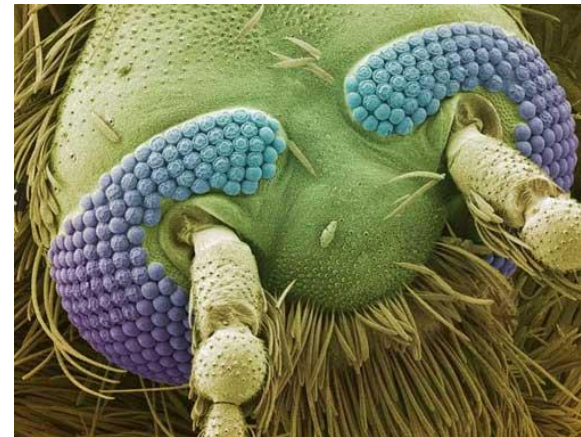
hemácias



fecundação



estômato



inseto

# MICROSCOPIA DE VARREDURA

- ✓ Emprega feixes de elétrons;
- ✓ Complementar à microscopia de transmissão (transmissão tem maior poder de resolução, varredura tem a vantagem de fornecer **imagens tridimensionais**);
- ✓ O trajeto do feixe de elétrons é modificado fazendo com que percorra a superfície do espécime, ponto por ponto, e ao longo de linhas paralelas (varredura);
- ✓ Os **espécimes não precisam ser cortados** para serem examinados (objetos de 1 cm ou mais podem ser examinados);
- ✓ O material deve ser fixado, dessecado, e **recoberto por uma delgada camada condutora de eletricidade**, em geral **ouro** ou **platina** depositados à vácuo.

MEV: amostras grossas podem ser utilizadas.

Neste caso, amostras fixadas quimicamente são desidratadas, secas no aparelho de ponto crítico de secagem e cobertas como um metal condutor (Ex: ouro).

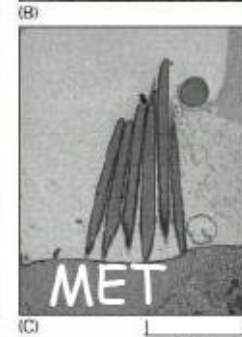
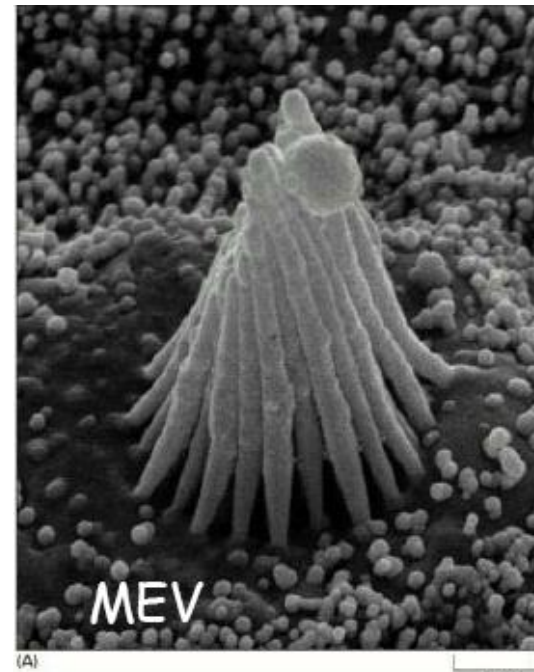
# MICROSCOPIA ELETRÔNICA (ME)



Microscópio eletrônico de varredura (UniFeSP)



Microscópio eletrônico de transmissão (UniFeSP)

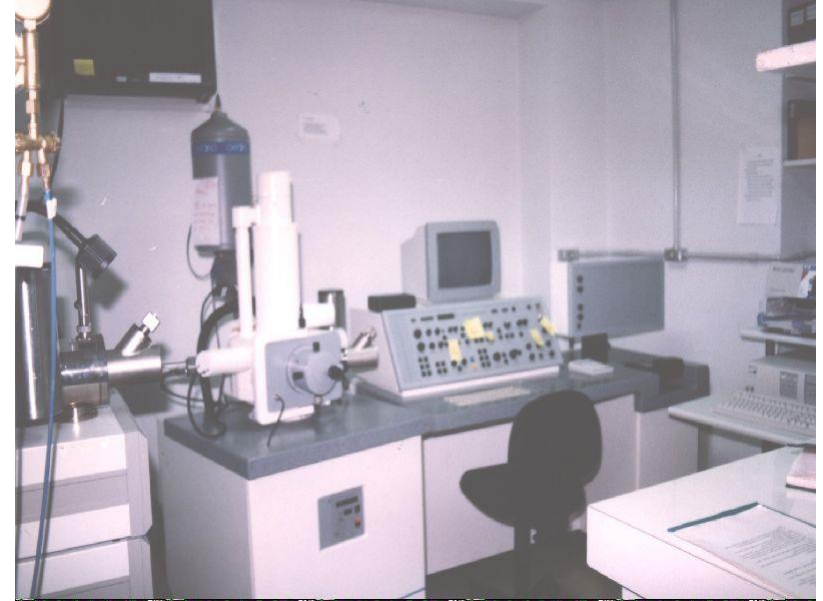


**Núcleo de Apoio à Pesquisa/  
Microscopia Eletrônica Aplicada à Pesquisa Agropecuária**



<http://www.esalq.usp.br/napmepa/>

Prof. Dr. Elliot Watanabe Kitajima



**MEV**

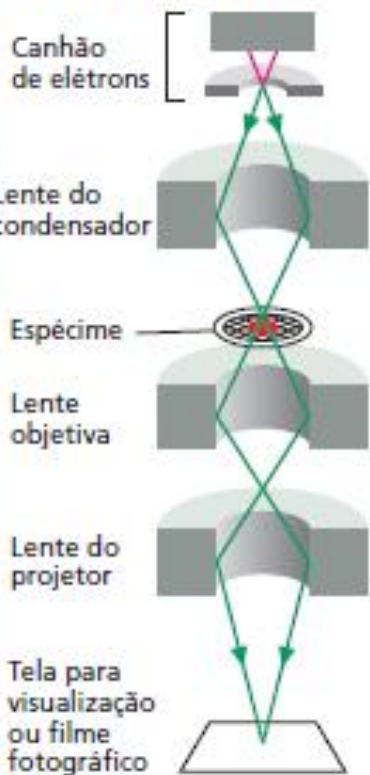
**Microscopia Eletrônica de Varredura**



**MET**

**Microscopia Eletrônica de Transmissão**

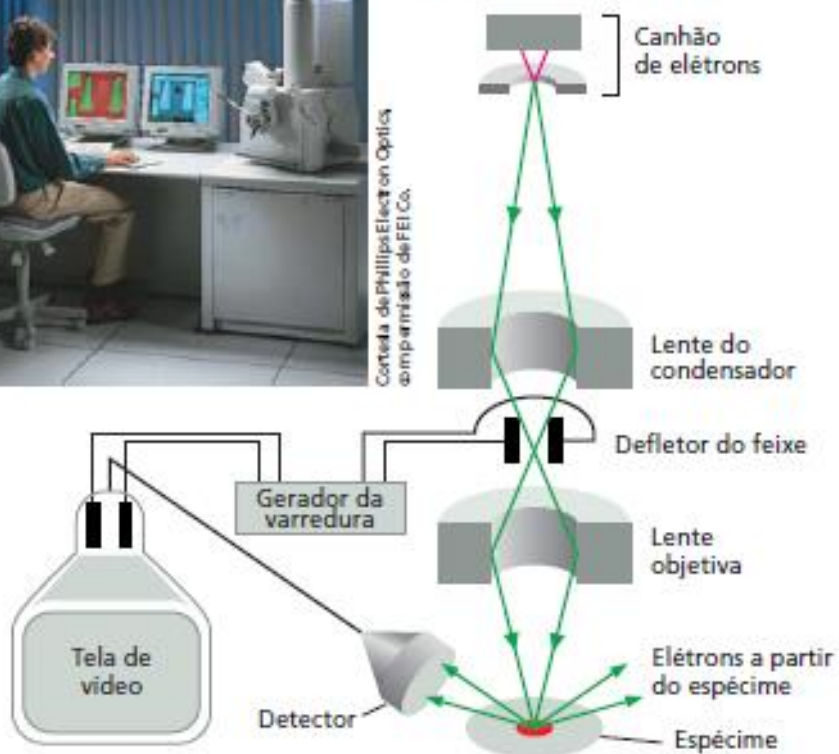
# MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO



Cortesia de Philips Electron Optics, com permissão de FEI Co.

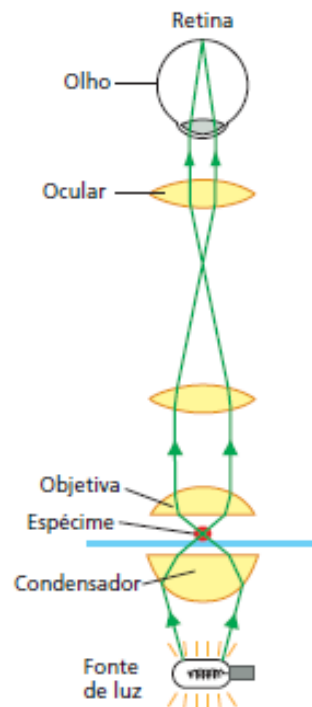


# MICROSCOPIA ELETRÔN DE VARREDURA



Cortesia de Philips Electron Optics, com permissão de FEI Co.

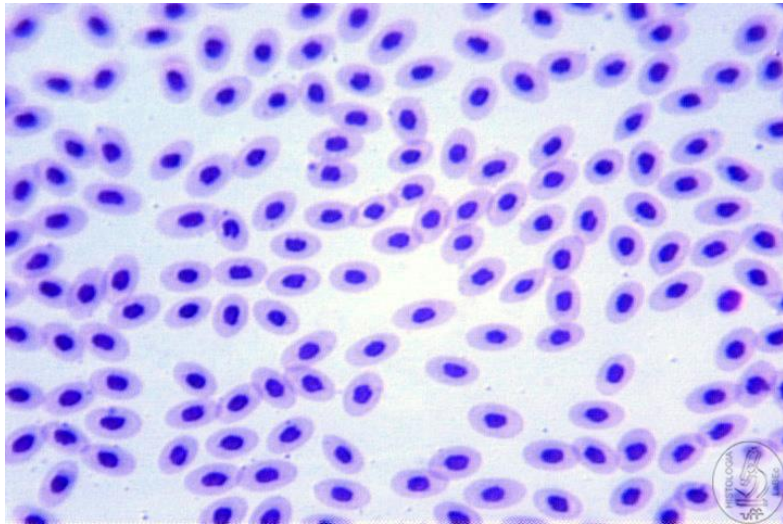
# O MICROSCÓPIO ÓPTICO



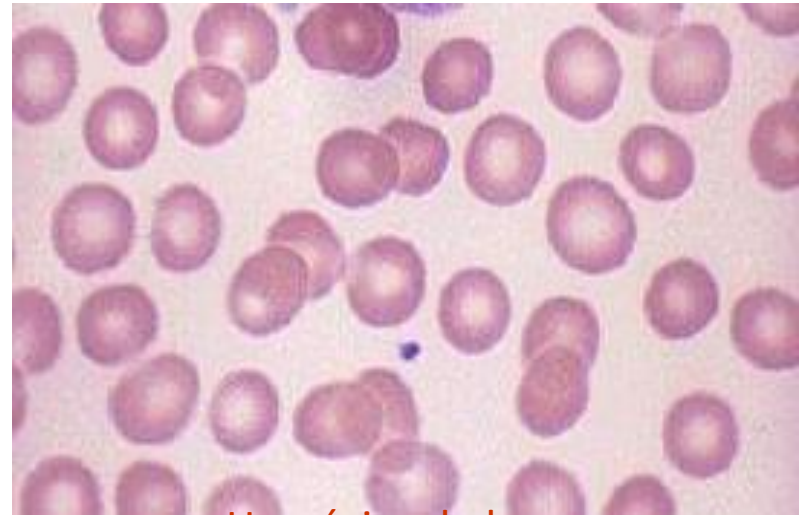
O caminho da luz em um microscópio óptico

## EXERCÍCIO 1.1

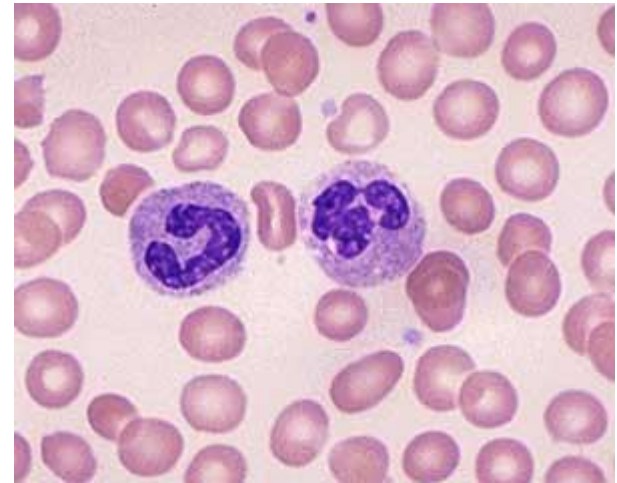
b) Observar células fixadas do sangue humano e de galinhas



Hemácias de galinha  
(com núcleo)



Hemácias de humano  
(sem núcleo)



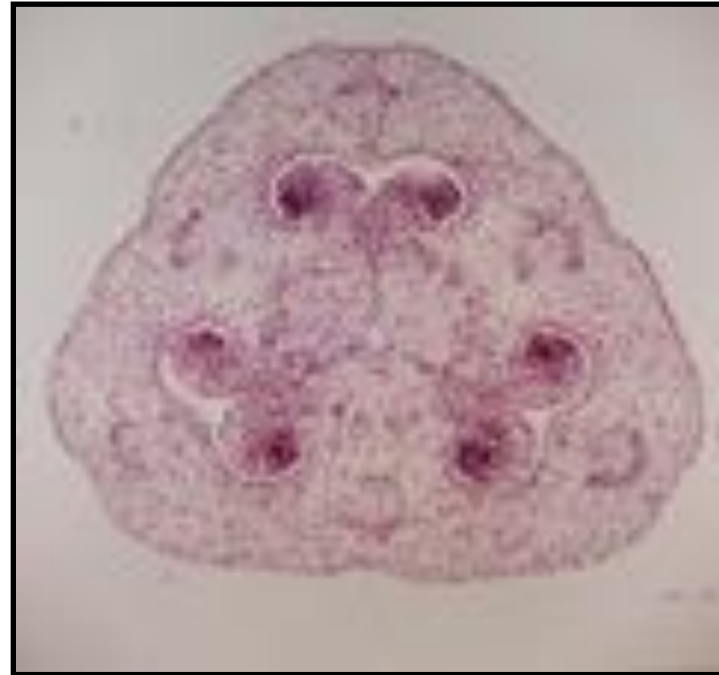
Leucócitos neutrófilos

**Colocar o aumento utilizado!**

## EXERCÍCIOS 1.2.

- Observar cortes transversais feito por micrótono

**Monocotiledônea ou  
dicotiledônea?**



Corte transversal do  
ovário de lírio

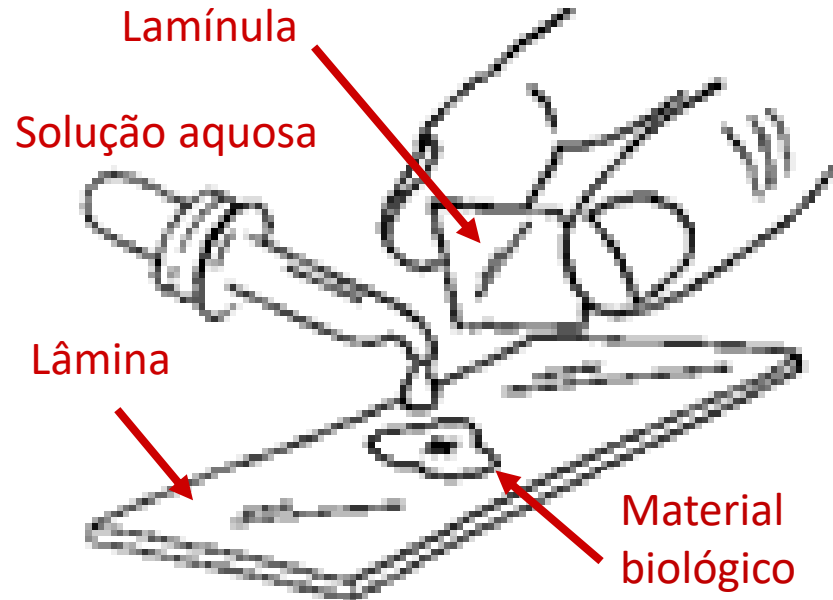


# EXERCÍCIO 2a

a) Observar células da mucosa bucal.

✓ Entre a lâmina e a lamínula:

- lâmina sem riscos e sem gordura;
- solução aquosa (água, soro fisiológico, tampões);
- material biológico;
- lamínula.



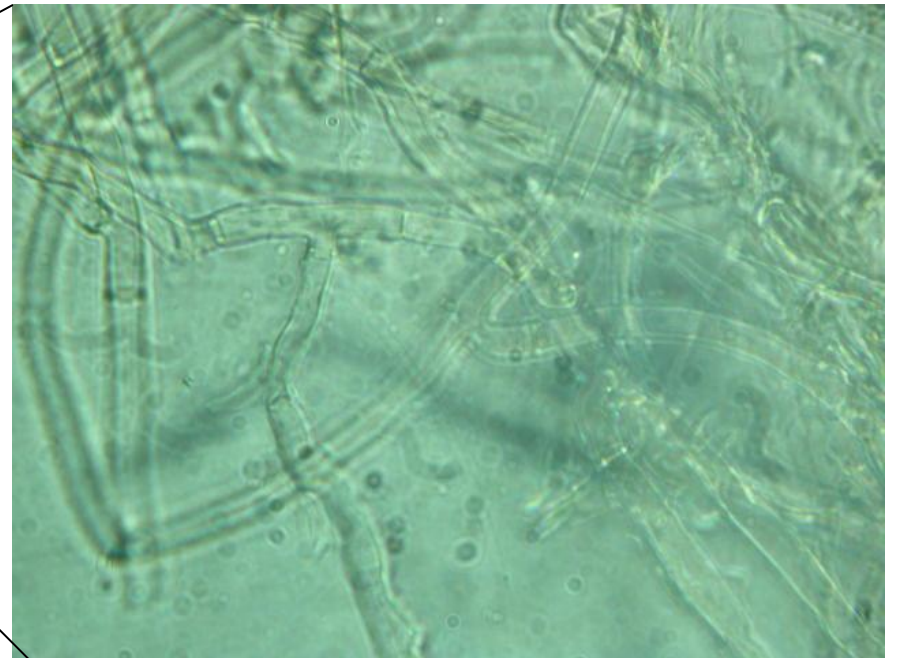
**Células da mucosa bucal**



**Colocar o aumento utilizado!**

## EXERCÍCIO 2b

### a) Observação de fungo



Placa de Petri com hifas de fungo

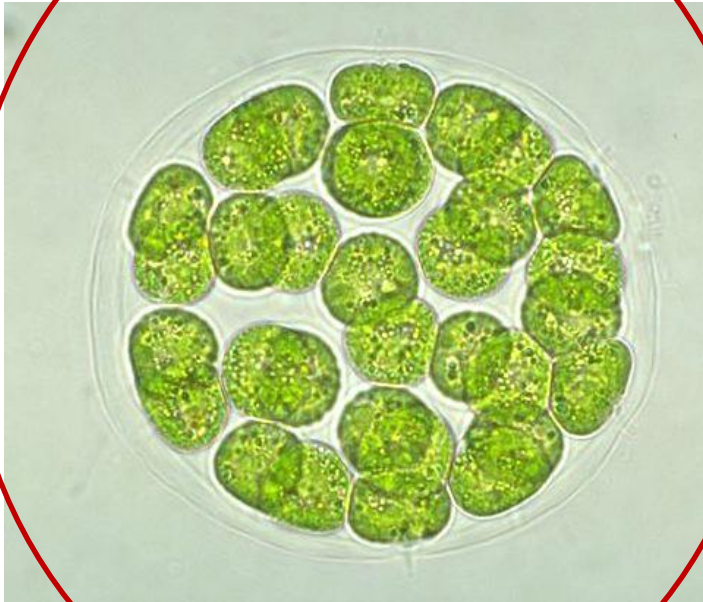
Visualização por microscopia

**Colocar o aumento utilizado!**

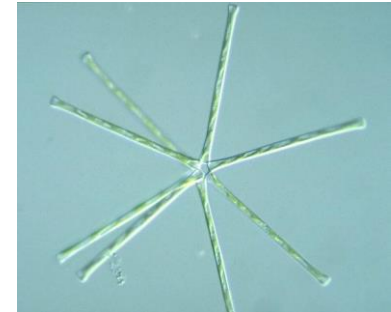
# EXERCÍCIOS 3b

➤ Observar células de protistas

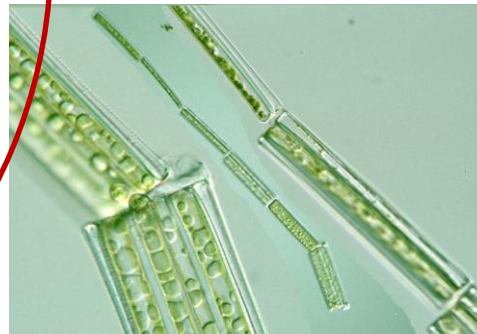
Colônia de *Eudorina*



*Meridion* sp.



*Asterionella* sp.



*Tabellaria* sp.

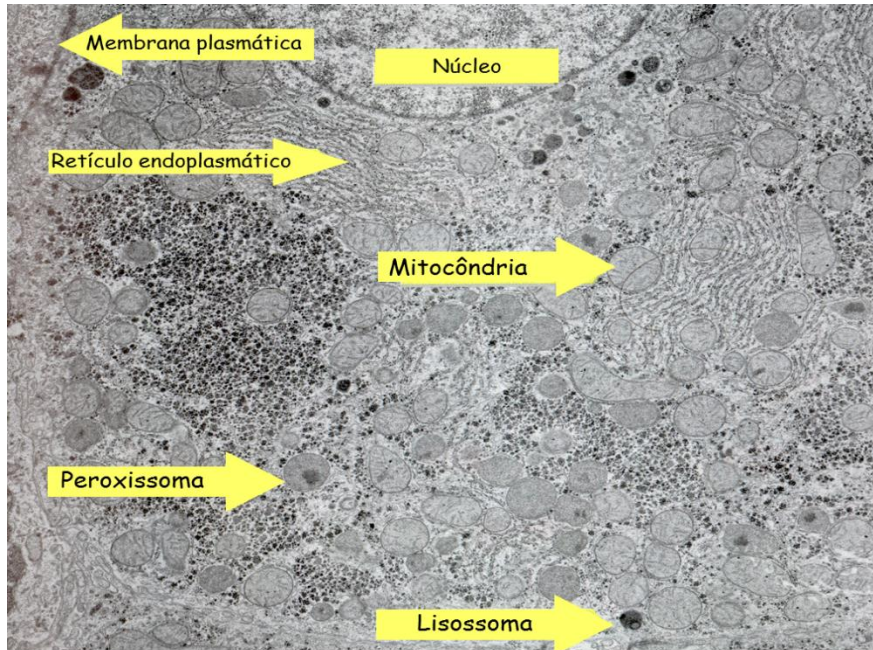
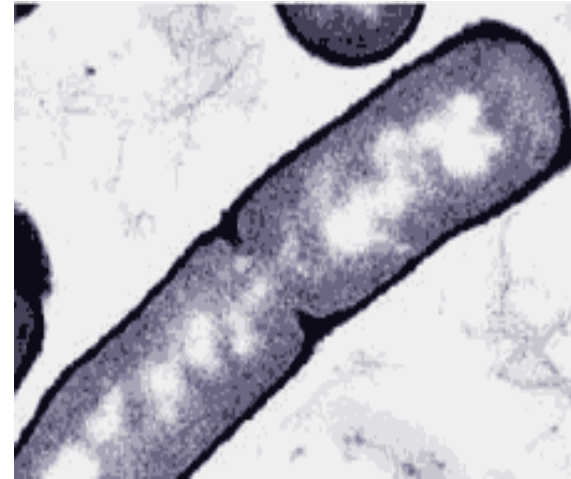


*Diatoma vulgaris*

**Colocar o aumento utilizado!**

# EXERCÍCIO EXTRA - Imagens de MET

Célula procariótica

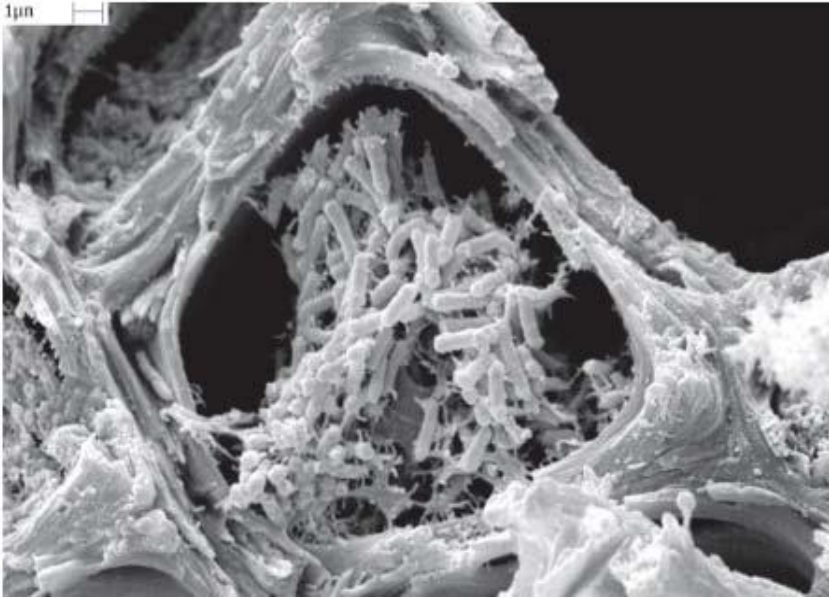


Célula eucariótica

Célula infectada com vírus

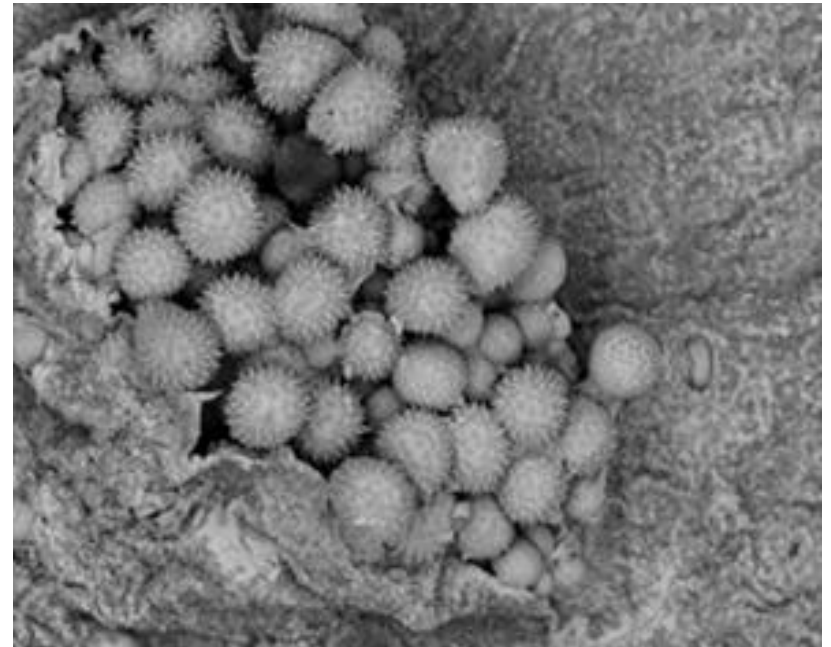


## EXERCÍCIO EXTRA - Imagens de MEV



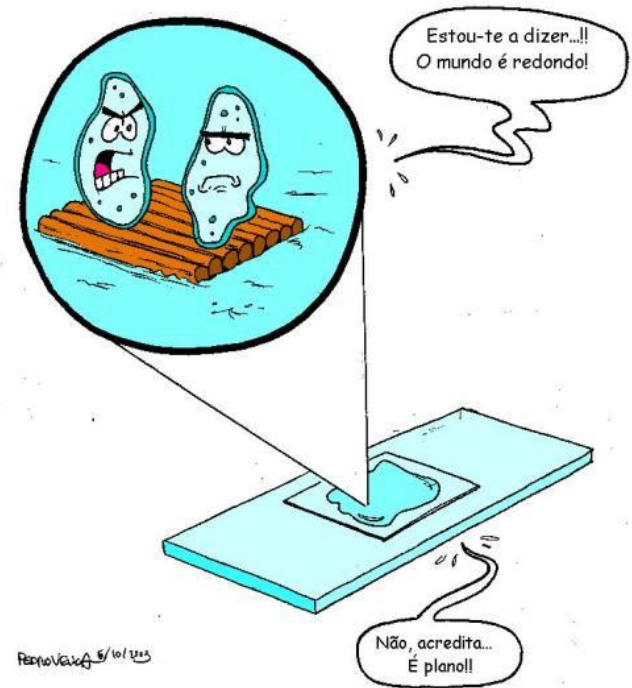
Corte transversal de vasos xilemáticos infectados por *Xylella fastidiosa*, agente causal da CVC (gentilmente cedida por Lacava, P.T.)

Esporos do fungo causador da ferrugem em Eucalipto (Crédito Tiago Falda Leite)



# ESTUDO DIRIGIDO

1. Técnicas de preparação citológica;
2. Planos de corte;
3. Diferenças entre o preparo de amostras para observação via microscopia óptica (MO) e microscopia eletrônica (ME);
4. Diferenças entre MET e MEV.
5. Reconhecimento de microfotografias de MET e MEV.



**Bom trabalho!!!**

# EXERCÍCIO EXTRA 1

**Entregar na próxima Aula Prática:**

1. Os exercícios respondidos das páginas 14 a 16.

**Sugestão de leitura:**

**Capítulo 1 – Célula**

**De Robertis, E.M.F.; Hib, J. 2014. *Biologia Celular e Molecular*. 16ª Edição.**

**Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro.**