

Resumo da apresentação sobre microscopia óptica e eletrônica (08/04/2024)

Grupo 2

Nome do aluno	N. USP
Júlia Dezanetti da Silva	14584342
Isabella Correia Quiqueto	14579944
Lígia Akemi Mizuyama	14589330
Mariana Suzuki Fujisawa	14656832
Mariane Tamy Kuniosh	14596954

Apresentação

A capacidade de visualizar estruturas e fenômenos em uma escala tão pequena quanto a das células é de fundamental importância para entendermos seus mecanismos de funcionamento, possibilitando, assim, o estudo mais aprofundado de sistemas maiores formados por elas, sejam eles animais, plantas ou qualquer outro ser vivo. A microscopia é uma prática que visa sanar justamente essa necessidade de tornar visível ao olho humano esse mundo microscópico, seja através de um conjunto de lentes e uma fonte de luz ou tecnologias mais refinadas que substituem a luz por feixes de elétrons. Em nossa apresentação vamos abordar os seguintes aspectos da microscopia:

- Um breve histórico e impacto na biologia;
- Princípios de funcionamento da microscopia óptica: aumento, resolução, contraste e iluminação;
- Explicação de algumas técnicas utilizadas em aulas anteriores no laboratório de microscopia;
- Técnicas de preparo de amostras, incluindo coloração, fixação e desidratação;
- Princípios da microscopia de campo claro e campo escuro;
- Princípios da microscopia de contraste de fase;
- Princípios da microscopia de contraste interferencial;
- Técnicas para distinguir estruturas celulares em amostras vivas;
- Princípios de funcionamento da microscopia eletrônica;
- Tipos de microscopia eletrônica (Varredura e Transmissão);
- Técnicas de preparo de amostras para microscopia eletrônica.
- Extra: Cryo-ET.

1. História da microscopia

O arquiteto e cientista inglês Robert Hooke construiu o primeiro microscópio composto, utilizando um conjunto de 2 lentes e uma fonte de luz. Hooke publicou *Micrographia* em 1665, contendo suas observações feitas com o microscópio. Entre os materiais analisados por ele está a cortiça, a qual ele descreveu a imagem observada como “células”, criando o termo utilizado até hoje.

Cerca de uma década depois, Anton van Leeuwenhoek construiu um microscópio de lente única biconvexa com capacidades de aumento muito maiores que as disponíveis anteriormente, que eram de apenas cerca de 30 vezes. Produzindo lentes que chegavam a aumentos de 266 vezes, Leeuwenhoek observou uma enorme variedade de materiais: sementes, ossos, sangue, nervos, fibras musculares, esperma humano, entre muitos outros, chegando a ter submetido cerca de 200 papers à Royal Society of London e ser eleito membro dela. Entre seus estudos, foi o primeiro a observar bactérias e leveduras, podendo ser considerado o pioneiro de diversas áreas de pesquisa da biologia.

2. Princípios de funcionamento da microscopia óptica

A microscopia tem o objetivo de proporcionar a observação de objetos não visíveis a olho nu, de forma que, em microscópios ópticos, lentes convergentes são utilizadas para uma ampliação de 40x até 1000x utilizando o óleo de imersão.

2.1 Aumento

O aumento em um microscópio óptico é alcançado através da combinação de duas séries de lentes: as objetivas e as oculares. As oculares possuem um aumento fixo de 10x e permitem a visualização da amostra, enquanto as objetivas tem sua ampliação variável, entre 4x, 10x, 40x e 100x. Ambas são convergentes. A primeira forma uma imagem real do objeto, e a ocular faz a ampliação da imagem real, formando uma imagem virtual e maior, sendo que ela também atua como lente de aumento, permitindo observar a imagem com mais detalhes. A imagem final é invertida e maior (Leal, L.H.M., 2000).

O óleo de imersão é utilizado para aumentar a resolução das imagens observadas no microscópio, com a objetiva de 100x, uma vez que traz às imagens nitidez e brilho, assim substituindo o ar entre a objetiva e a amostra por um meio de alto índice de refração. Isso reduz a refração da luz e aumenta a qualidade da imagem (Leal, L.H.M., 2000).

2.2 Resolução

A resolução em microscopia óptica refere-se à capacidade do microscópio de distinguir detalhes finos e separados na amostra. Ela é determinada pela abertura numérica das lentes e pelo comprimento de onda da luz utilizada na observação, no qual o limite de resolução determina a ampliação máxima visível do microscópio, correspondente à menor distância entre dois pontos que ainda podem ser observados nitidamente.

Para auxiliar na identificação da resolução, foi criada a Equação de Abbe (baseada no número de Abbe), que determina a resolução lateral máxima de um sistema óptico. O valor ABBE é a medida da dispersão cromática da luz através das lentes. Essa dispersão é a separação das cores da luz branca quando ela é refletida em uma superfície transparente, uma vez que a luz branca é composta por vários comprimentos de onda (λ) diferentes. Dessa forma, a equação determina a abertura necessária para se obter uma imagem nítida, sem distorções nas refrações dos feixes de luz (Vieira, 2008).

$$R = \frac{\lambda}{2NA} \quad R = \frac{\lambda}{2n \sin\theta}$$

R: Resolução ("resolving power");

NA: Abertura numérica da lente objetiva;

n: Índice de refração do meio

2.3 Iluminação e contraste

Uma iluminação ideal é essencial para obter uma imagem nítida no microscópio, sendo mais utilizada em campo claro, onde a luz passa diretamente pela amostra e é capturada pela objetiva.

No microscópio óptico, há três principais partes que são responsáveis pela iluminação: a lâmpada de led, o condensador e o diafragma. O condensador é utilizado no direcionamento da luz emitida pelas lâmpadas led, enquanto o diafragma controla a quantidade de luz que chegará à amostra, fator essencial para realizar o contraste do material observado e visualizar melhor os contornos, sendo essencial em situações nas quais não é possível realizar coloração (Vieira, 2008).

3. Explicação de técnicas utilizadas em aulas anteriores no laboratório de microscopia

3.1 Microscopia óptica

3.1.1 Fixação

A fixação de uma amostra consiste em uma técnica de microscopia que gera poucas distorções na imagem da amostra quando comparadas a seus estados naturais, e é fundamental para que a amostra não seja lavada da lâmina durante a etapa de coloração. Essa técnica não possibilita a visualização de processos biológicos, pois mata os organismos (Tortora; Funke; Case, 2017).

A fixação pode ser feita passando a lâmina algumas vezes sobre uma chama, para que ela seque; ou recobrando a lâmina com álcool metílico por um minuto.

3.1.2 Coloração

Existem dois tipos de corantes usados para colorir as amostras e enfatizar suas estruturas para a visualização: os corantes básicos e os corantes ácidos, os quais possuem a cor presente em seus íons positivos e negativos, respectivamente. O primeiro grupo é mais utilizado para bactérias, uma vez que possui uma carga levemente negativa, o que permite que os íons positivos que possuem a coloração do corante sejam melhor fixados (Tortora; Funke; Case, 2017). Já os corantes ácidos são úteis para a coloração negativa, na qual o substrato adquire cor, mas não o material sendo analisado. Esse tipo de coloração pode ser útil para o estudo das formas externas de células, bactérias e vírus, por exemplo.

3.1.3 Coloração de Gram

Para realizar essa coloração é preciso corar a amostra com um corante básico roxo, o Cristal Violeta, lavá-la e cobri-la com iodo, que, por sua vez, é lavado com álcool e água. Então, é necessário corar a amostra com um corante vermelho básico, a Safranina, e, por fim, lavá-la novamente.

Esse procedimento permitirá, devido a características das paredes celulares de cada grupo de bactérias, que dois grupos sejam diferenciados: as bactérias gram-positivas adquirem a coloração roxa e as gram-negativas, a vermelha (Tortora; Funke; Case, 2017).

4. Microscopia Óptica de Campo Claro

A microscopia de campo claro consiste no microscópio comum, no qual a luz, ao passar pela amostra, passa pelas lentes condensadoras, objetiva e ocular e chega aos olhos do observador sem que haja redirecionamento da luz (Lopez, M. A. P. A, 2012).

5. Microscopia Óptica de Campo Escuro

Em microscópios ópticos de campo escuro, a luz da fonte luminosa é filtrada por um anteparo circular, redirecionando a luz até a amostra através de um cone de luz. Devido a propriedades ópticas, como refração e difração, a amostra permite que parte da luz continue o trajeto sem alterações e outra parte espalhe a iluminação, que será direcionada para o observador (Lopez, M. A. P. A, 2012).

6. Contraste de Fase

O índice de refração e a espessura de um material biológico criam diferenças de fase quando a luz passa por eles. Essas diferenças de fase são invisíveis a olho nu, mas podem ser exploradas pelo microscópio de fase. O microscópio permite que as diferenças de fase sejam convertidas em diferenças de intensidade da luz (Bancroft, J. D.; Floyd, A, 2013). Uma vez que humanos são capazes de perceber mudanças de intensidade, a amostra se torna visível.

Essa técnica é um grande avanço nos estudos microscópicos, pois dispensa o uso de coloração e de fixação. Isso permite que a amostra estudada permaneça viva durante as análises, possibilitando a visualização de processos biológicos em tempo real (Bancroft, J. D.; Floyd, A, 2013).

7. Contraste Interferencial

Essa técnica, assim como o Contraste de Fases, também permite a visualização de imagens em tempo real de células vivas. Sua vantagem consiste em uma melhora na qualidade de imagem.

Microscópios de contraste interferencial funcionam a partir de dois prismas de Nomarski. Esses prismas guiam a luz, de forma que duas imagens do material analisado se sobreponham, fornecendo uma qualidade melhorada de contraste e resoluções axial e lateral aprimoradas (Wang, G.; Fang, N, 2012). Essas resoluções se referem à capacidade de distinção entre estruturas alinhadas longitudinal e lateralmente, respectivamente.

8. Microscopia Eletrônica

O microscópio eletrônico permite visualizar objetos menores que $0,2\mu\text{m}$ (Allen, 2015), e sua melhor resolução se deve aos comprimentos de onda mais curtos dos elétrons, cerca de 100 mil vezes menores que os comprimentos de onda da luz visível. No lugar de feixe de luz e lentes de vidro, um microscópio eletrônico usa um feixe de elétrons e lentes eletromagnéticas, podendo ser um microscópio eletrônico de transmissão (MET) ou de varredura (MEV) (Tortora, 2017, p. 63).

Em uma microscopia eletrônica de transmissão (MET), a amostra é fixada através de agentes químicos, como glutaraldeído, ou então agentes físicos, como congelamento, e desidratada, um passo muito importante pois a microscopia eletrônica funciona sob vácuo para os elétrons não se dispersarem. Então, uma resina é incrementada à amostra para que ela seja fatiada em camadas finas, para que os elétrons atravessem a amostra. Os ultramicrotomos, cuja navalha é de vidro ou diamante, são aparelhos que realizam esses cortes. Para ter bom contraste, as amostras precisam ser tratadas com soluções de sais de metais pesados (Vieira, 2008, p. 61-65). Na MET, um feixe de elétrons direcionado por uma lente condensadora eletromagnética passa através da amostra cortada em fatias ultrafinas. Esses elétrons, ao atravessar a amostra, encontrarão átomos e serão desviados, espalhados, ou então passarão diretamente por ela e chegarão à tela de imagem. Esse microscópio tem um poder de aumento de até 1.000.000x, e pode ter uma resolução de até 1 nm. (Alberts, 2017, p. 11)

Já na microscopia eletrônica de varredura (MEV), a amostra deve ser fixada e desidratada, mas também deve ser secada. Em seguida, ela precisa ser coberta por um filme de metal pesado que seja um bom condutor de elétrons, que permita ao feixe de elétron varrê-la (Vieira, 2008, p. 66). A MEV tem a vantagem de gerar imagens 3D e de não precisar cortar a amostra em camadas ultrafinas. Nela, os elétrons são dirigidos à superfície da amostra, a “varrendo” e não a atravessando. O feixe arranca elétrons da sua superfície, que são transmitidos a um detector de elétrons e usados para produzir a imagem em uma tela (Alberts, 2017, p. 11). Esse microscópio pode determinar objetos tão próximos quanto 10 nm e tem um aumento de 1.000 a 10.000× (Tortora, 2017, p. 65).

9. Cryo-ET

A identificação de estruturas em criotomogramas de células intactas geralmente se limita ao reconhecimento visual de características grandes que podem ser claramente distinguidas (Li, X. 2021), incluindo membranas, organelas, o citoesqueleto e grandes complexos, como os ribossomos. O seccionamento vítreo, parte da preparação da amostra utilizando Cryo-ET, permitiu investigar e estruturas nas partes mais espessas das células intactas, como a cromatina (Li, X. 2021).

A Cryo-ET, em português, tomografia eletrônica criogênica, é utilizada para reconstrução volumétrica de imagens de macromoléculas ou células in situ (Lučić et al. 2013). Essa técnica é relevante porque permite observar uma célula em estado criogênico, ou seja, sem a desidratação ou cristalização, as últimas podem causar alterações no formato das amostras.

Referências bibliográficas

ALBERTS, B.; *et al.* **Fundamentos da Biologia Celular**. 4° ed. [s.l.] ARTMED EDITORA S.A, 2017.

ALLEN, T. **Microscopy: A Very Short Introduction (Very Short Introductions)**. Illustrated ed. [s.l.] Oxford University Press, 2015.

BANCROFT, J. D.; FLOYD, A. D. Light microscopy. Em: **Bancroft's Theory and Practice of Histological Techniques**. Elsevier, 2013. p. 37–68.

HOPPERT, M. **Microscopic Techniques in Biotechnology**. [s.l.] Wiley, 2003.

LEAL, Luiz Henrique Monteiro. **Fundamentos de microscopia**. Rio de Janeiro: UERJ, 2000

LI, X. Cryo-electron tomography: observing the cell at the atomic level. **Nature Methods**, v. 18, n. 5, p. 440–441, 7 maio 2021. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41592-021-01133-3>. Acesso em: 04 abr. 2024.

LOPEZ, M. A. P. A. **Microscopia Holográfica Digital Aplicada na Análise de Tecidos Biológicos**. 2012. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Instituto de Física, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

LUČIĆ, V.; *et al.* Cryo-electron tomography: The challenge of doing structural biology in situ. **Journal of Cell Biology**, v. 202, n. 3, p. 407–419, 5 ago. 2013. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3734081/>. Acesso em: 04 abr. 2024.

SANDERSON, J. B. **Understanding light microscopy**. Chichester: Wiley Blackwell, 2019.

TORTORA, G. J.; *et al.* **Microbiologia**. 12 Porto Alegre: Artmed, 2017

VIEIRA, F. S. **Introdução à Microscopia**. 1° ed. São Cristóvão: Universidade Federal de Sergipe - CESAD, 2008.

WANG, G.; FANG, N. **Methods in Enzymology**. Academic Press, 2012. Chapter Four - Detecting and Tracking Nonfluorescent Nanoparticle Probes in Live Cells, p. 83–108. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123918574000045?via%3Dihub>. Acesso em: 04 abr. 2024.

WOLLMAN, A. J. M. *et al.* From Animaculum to single molecules: 300 years of the light microscope. **Open Biology**, v. 5, n. 4, p. 150019, abr. 2015.