

3 - MICROSCOPIA

3.1. MICROSCOPIA ÓPTICA DE LUZ

Ao se estudar os seres vivos, ao nível celular, devem-se empregar várias técnicas visando superar três principais limitações destes estudos: as pequenas dimensões celulares, a grande espessura da maioria dos tecidos e a transparência (falta de contraste) das células e de suas estruturas. Em consequência, o estudo da organização celular depende do uso de microscópios, aparelhos destinados à observação de detalhes difíceis de serem observados a olho nu e do emprego de técnicas básicas de preparação do material a ser analisado.

Para uma boa observação microscópica, além de saber preparar adequadamente o material, é necessário conhecer os componentes do microscópio e as funções de cada um, para tirar deles o máximo proveito.

O microscópio de luz é assim chamado pelo fato de ter como fonte luminosa a luz branca, geralmente proveniente de uma lâmpada com filamento de tungstênio. Este microscópio é composto basicamente por dois sistemas de lentes de aumento (oculares e objetivas) que produzem imagens ampliadas do material observado. Além dessas lentes, o microscópio possui uma parte mecânica (base, braço, revólver, platina, charriot, parafusos macro e micrométrico e parafuso de regulagem do condensador) e um sistema de iluminação (fonte luminosa, diafragmas, condensador e filtros). Os componentes básicos do microscópio de luz são mostrados na figura 1.1.

DESCRIÇÃO DO MICROSCÓPIO ÓPTICO

1. Parte Mecânica
 - Pé ou Base
 - Braço ou Coluna
 - Platina
 - *Charriot*
 - Parafuso Macrométrico
 - Parafuso Micrométrico
 - Canhão ou Tubo de Observação
 - Revólver

2. Parte Óptica
 - Sistemas de Iluminação (abaixo da platina):
 - Fonte de luz
 - Condensador
 - Diafragma
 - Objetivas
 - Ocular (es)

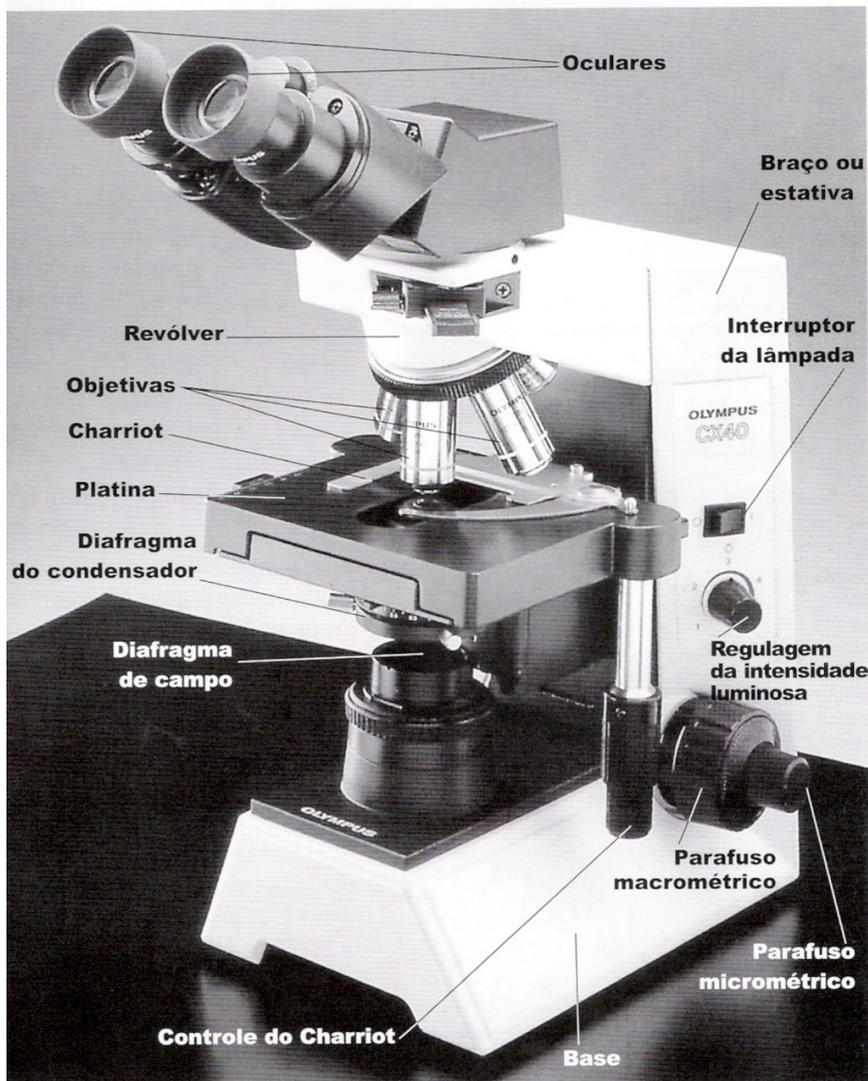


Figura 3.1 – Componentes do microscópio de luz.

Formação da Imagem e Aumento

A imagem de um objeto pode ser ampliada quando observada por meio de uma simples lente de vidro. Combinando um número de lentes de forma correta, pode-se construir um microscópio que permitirá a obtenção de imagens em grandes aumentos. A primeira lente de um microscópio de luz é a que está mais próxima do objeto sendo examinado (amostra) e, por esta razão, é chamada de objetiva. Inicialmente, a luz da fonte luminosa do microscópio, geralmente uma lâmpada embutida no equipamento, passa pelo condensador que forma um cone de luz bem definido, concentrando a luz em direção à amostra (Figura 1.2). A luz passa por esta e em seguida pela objetiva que, então, projeta uma imagem real, invertida e aumentada da amostra em um plano fixo dentro do microscópio, chamado plano intermediário da imagem. Nessa etapa, a imagem parece estar “flutuando” em um espaço de cerca de 10 mm abaixo do topo do tubo de observação do microscópio.

A lente ocular é o mais distante componente óptico da amostra e serve para aumentar, posteriormente, a imagem real projetada pela objetiva. Dessa forma, a ocular produz uma imagem secundária aumentada que é captada pelo olho do observador (Figura 1.2).

O aumento total do objeto observado é calculado multiplicando-se os valores do aumento da ocular e da objetiva. Por exemplo, ao se usar uma ocular de 10X com uma objetiva de 4X, a imagem final do objeto estará aumentada 40X, onde:

Aumento final do microscópio = aumento da ocular x aumento da objetiva

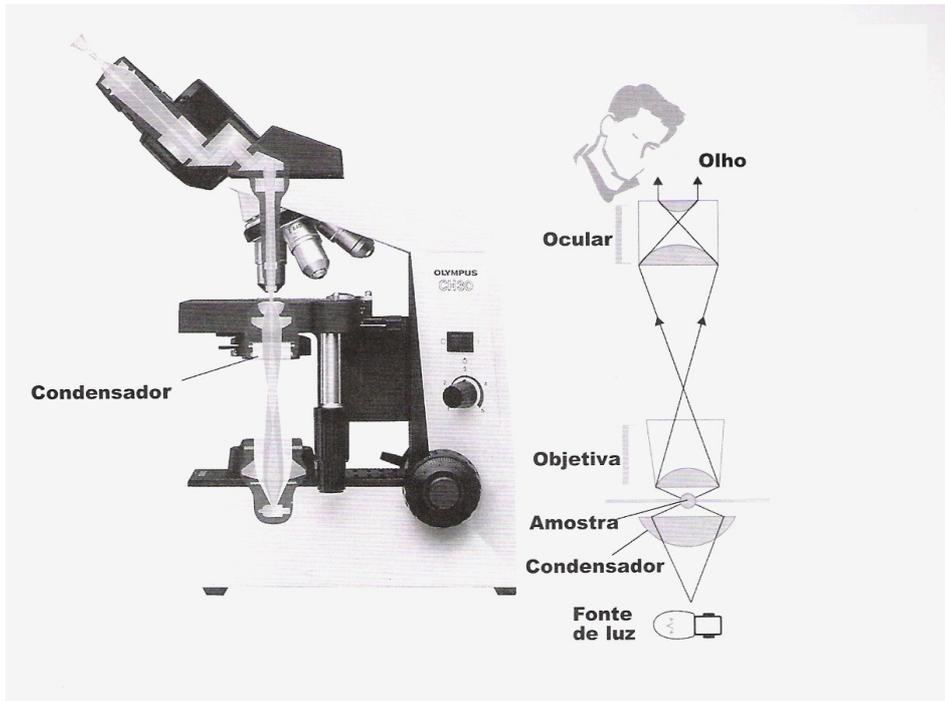


Figura 3.2 – Trajetória da luz no microscópio.

Especificações das lentes objetivas

As lentes objetivas não diferem entre si apenas quanto ao aumento. Existem diferentes tipos de lentes, dependendo do material usado na construção, da finalidade da lente e de sua especialização. Algumas características influenciam na qualidade da imagem, oferecendo maior ou menor grau de correção de aberrações. As mais sofisticadas têm custo elevado e são, de maneira geral, usadas para fins de pesquisa. As especificações de cada lente objetiva são fornecidas pelo fabricante e vêm indicadas na própria lente (figura 1.3).

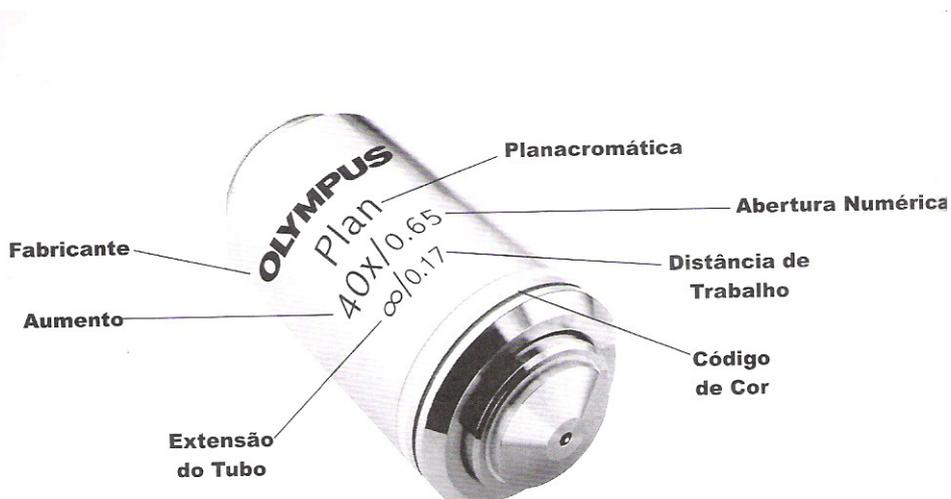


Figura 3.3 – Especificações da lente objetiva.

Tipos de objetivas de acordo com a qualidade óptica

- a) Acromáticas: são as mais simples e baratas, presentes em microscópios comuns.
- b) Semi-apocromáticas: construídas com fluorita, um material que proporciona alguma correção para aberrações.
- c) Apocromáticas: fornecem correção ampla para as aberrações.
- d) Planacromáticas: além de proporcionar correção, são ótimas para fotomicrografias, pois o campo fica todo em foco.
- e) Planapocromáticas: são as melhores e as mais caras, combinando as correções das apocromáticas e planacromáticas, o que resulta em grande resolução.

Códigos de cores das lentes objetivas

Ao usar o microscópio, observe que cada lente objetiva (figura 1.3) tem uma marcação (anel) com determinada cor que ajuda na identificação rápida do aumento a ser utilizado. A presença desses códigos é bastante útil quando se utiliza um equipamento contendo muitas objetivas. As objetivas de imersão têm código adicional de cor que indica o meio de imersão que deve ser usado.

Aumento	Código de Cor
2X ou 2,5X	Marrom
4X ou 5X	Vermelho
10X	Amarelo
16X ou 20X	Verde
40X ou 50X	Azul claro
60X	Azul cobalto
100X – óleo	Preto
100X – glicerina	Laranja

Extensão do tubo

Esta especificação vem gravada na objetiva (Fig. 1.3) e corresponde ao comprimento do tubo do microscópio, situado entre as objetivas e as oculares. Essa medida pode ser fixa (geralmente 160 mm) ou corrigida ao infinito (nos microscópios mais modernos). No primeiro caso, a obtenção de imagens de qualidade só é possível quando a objetiva é construída a uma determinada distância das oculares. No segundo caso, o tubo é equipado com acessórios ópticos que permitem a obtenção de uma imagem precisa, sem necessidade de se estabelecer um comprimento fixo para o mesmo (símbolo ∞).

Distância de trabalho

É a distância em mm entre a lente objetiva e a superfície da lâmina, quando a amostra está em foco. Encontra-se indicada na lente (Fig. 1.3). De maneira geral, a distância de trabalho da objetiva diminui à medida que a ampliação aumenta.

Poder de resolução e limite de resolução

Quando se observa qualquer estrutura ao microscópio, o observador não está vendo diretamente a estrutura e sim a imagem desta. A imagem é uma representação da estrutura e, obviamente, ela deve reproduzir de forma acurada o material analisado. Portanto, um bom microscópio não é aquele que dá maior aumento e sim aquele que reproduz os detalhes do material observado. Não importa quantas vezes uma lente amplia, se ela não é capaz de fornecer uma imagem nítida do objeto observado. Dessa forma, um bom microscópio é sempre considerado em termos do seu poder de resolução.

Poder de resolução é um termo usado em microscopia para se referir à fineza de detalhes que pode

ser obtida em um microscópio. Conforme mencionado, a capacidade de aumento de um microscópio só tem valor quando acompanhada de um aumento paralelo do poder de resolução.

Poder de resolução: fineza de detalhes fornecida pelo microscópio

O poder de resolução de um microscópio é estimado pelo seu limite de resolução, definido como a menor distância que deve existir entre dois pontos para que eles apareçam individualizados.

Quanto menor o limite de resolução, maior o poder de resolução

O limite de resolução é calculado pela equação do matemático e físico alemão Ernest Abbe:

$$LR = 0,612 \times \lambda / AN$$

0,612 = constante

AN = abertura numérica da lente objetiva

λ = comprimento de onda da fonte luminosa utilizada

Abertura numérica

A abertura numérica (AN), ou número de abertura, indica a resolução de uma lente objetiva, ou seja, sua capacidade de captar a luz e fornecer detalhes da amostra a uma determinada distância desta. Esse número é pré-determinado na construção das lentes objetivas e já vem grafado na própria lente (Fig. 1.3), podendo variar entre 0,1 (para aumentos muito pequenos) até 1,4 (para grandes aumentos obtidos com objetivas de imersão).

A AN é calculada a partir da seguinte equação:

$$AN = n \times \sin \alpha$$

N = índice de refração do meio situado entre a amostra e a lente objetiva

α = metade do ângulo de abertura da lente objetiva

Índice de refração (n): para objetivas secas = 1 (ar)
para objetivas de imersão = 1,51 (óleo)
= 1,45 (glicerina)

Medidas das células

As células só podem ser observadas ao microscópio porque têm dimensões abaixo do limite de resolução do olho humano (Figura 1.4). As dimensões de uma célula, vista ao microscópio de luz, são expressas em micrômetros (μm), unidade que representa a milésima parte do milímetro (mm). Para estruturas intracelulares observadas ao microscópio eletrônico, a medida utilizada é o nanômetro (nm) que significa um milésimo do micrômetro.

Unidade de medida	Símbolo	Valor
Micrômetro	μm	0,001 mm
Nanômetro	nm	0,000001 mm ou $10^{-3} \mu\text{m}$

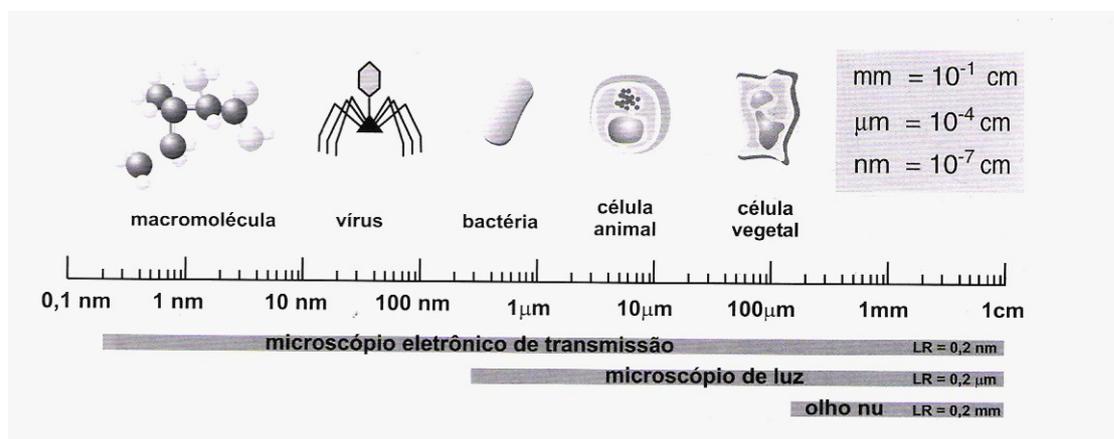


Figura 3.4 – Escala de limite de resolução.

Como usar o Microscópio

1. Antes de ligar o microscópio, verifique se ele está ligado a corrente elétrica, em seguida verifique o **controle de intensidade da iluminação** e certifique-se de que a **objetiva de menor aumento** (4 ou 5X) está posicionada.
2. Ligue o microscópio e gire o **parafuso macrométrico** até abaixar toda a platina. Coloque a lâmina na **platina**, sempre com a lamínula voltada para cima, prendendo-a convenientemente. Em seguida ajuste o foco do espécime observado utilizando o **parafuso macro e micrométrico**. Ajuste a intensidade da iluminação mais adequada. Certifique-se de estar observando a estrutura em foco simultaneamente com os dois olhos. Se não estiver, acerte a distância interpupilar aproximando ou afastando as duas oculares. Verifique também se as duas oculares estão em foco. Se não estiverem, focalize bem o material olhando em apenas uma delas, e gire depois a outra ocular até acertar o foco. Quem é míope ou tem hipermetropia não precisa usar óculos para observar ao microscópio, somente quem possui astigmatismo. Atenção: não tocar os dedos nas lentes!
3. Utilizando os parafusos do **Charriot**, examine a lâmina e selecione a área que deverá ser observada com maior aumento. A área selecionada deverá estar no centro do campo e em foco, antes de se passar ao aumento seguinte (10X). Posicione a objetiva e, desse momento em diante, ajuste o foco utilizando-se **apenas do parafuso micrométrico**. Ajuste sempre a iluminação mais adequada para cada aumento, utilizando-se também do **diafragma do condensador**.
4. Para passar ao aumento seguinte (40X) proceda exatamente como no item anterior.
5. Para focalizar com a objetiva de 100X é necessária a utilização de **óleo de imersão**. A lâmina deverá estar perfeitamente focalizada na objetiva de 40X, e a área a ser observada colocada no centro do campo. Desloque a objetiva de 40X girando o revolver, porém sem encaixar a objetiva de 100X, parando a meio caminho. Coloque uma pequena gota de óleo sobre a área iluminada da lâmina e posicione a objetiva de imersão. Note que a extremidade inferior da lâmina ficará imersa na gota de óleo. Utilizando-se **apenas** do parafuso micrométrico encontre o foco que deverá estar bem próximo.

Caso não consiga, volte para a objetiva de menor aumento, reiniciando todos os passos. **Importante: não tente focalizar o material nas objetivas de 10, 40 e 100X com o parafuso macrométrico, pois, com grande chance, você quebrará a lâmina.**

6. Para retirar a objetiva da imersão, gire o revólver posicionando a objetiva de menor aumento (4X). Retire a lâmina, limpe-a bem, fazendo o mesmo com a objetiva de imersão com lenço de papel embebido levemente em álcool-éter. **Cuidado ao manusear estas substâncias que, além de serem solventes de plástico, são inflamáveis e seus vapores são tóxicos.**

7. Verifique se as objetivas estão encaixadas, caso contrário você verá o campo completamente escuro ou parcialmente iluminado.

8. Ao terminar a sua prática, abaixe toda a platina, gire o revolver de modo a posicionar a objetiva de menor aumento. Desligue o microscópio e limpe-o utilizando lenço de papel. Verifique se a lâmina foi retirada e guardada no seu respectivo lugar, e se o controle de iluminação está no mínimo. Por fim, cubra o microscópio e **deixe-o sempre como gostaria de encontrá-lo!**

ATENÇÃO: Não use as capas do microscópio para limpar bancada ou outro!! Não jogue sujeira (papel, aparas de lápis, etc) no chão ou gavetas!! Nunca arrastar o microscópio pela bancada!!

IMPORTANTE:

Para limpeza das lentes do microscópio, inclusive a objetiva de imersão, nunca use soluções corrosivas ou xilol, as quais podem danificar o sistema óptico. A limpeza deverá ser feita periodicamente com solução apropriada (álcool e éter absolutos, na proporção de 3:7) e pela pessoa responsável pelo equipamento. Rotineiramente, usa-se para limpeza das lentes, apenas um lenço de papel macio e seco. O microscópio deve ser mantido protegido da poeira e livre da umidade. Esta pode provocar o aparecimento de fungos que danificam as lentes.

4 - TÉCNICAS HISTOLÓGICAS

Para análise em microscopia óptica de luz é necessária a preparação de lâminas com corte de tecidos muito finos. A seguir serão apresentados, de forma resumida, os passos para a confecção de lâminas seguindo a técnica para coloração com hematoxilina e eosina (HE):

Coleta do material: Partes de órgãos são retiradas com o auxílio de um bisturi, pinça ou lâmina de barbear. Não é indicada a extração de porções grandes, uma vez que o objetivo final é a obtenção de uma camada fina que possa ser analisada em um microscópio óptico.

Fixação do material: Esta etapa consiste na utilização de procedimentos físicos ou químicos para imobilizar as substâncias constituintes das células e dos tecidos, fornecendo maior resistência para suportar as demais etapas. Além disso, os fixadores retardam os efeitos *post mortem* do tecido, mantendo sua arquitetura normal. Os agentes fixadores mais utilizados são o formol tamponado e o líquido de Bouin. Ambos fixam as proteínas evitando sua degradação.

Inclusão: Este procedimento consiste na impregnação do tecido com uma substância de consistência firme que permita, posteriormente, seccioná-lo em camadas delgadas. Pelo fácil manuseio e bons resultados, a parafina é a mais utilizada neste procedimento. Como ela não é miscível em água, a primeira etapa da inclusão compreende a desidratação, quando ocorre a retirada da água dos tecidos e a sua substituição por álcool. A diafanização é a etapa seguinte, com a substituição do álcool, agora presente nos tecidos, por xilol. Finalmente, na impregnação, última etapa, o xilol é substituído por parafina fundida a 60° em pequenos blocos. Neste momento a catalogação do bloco é importante para a posterior identificação da peça.

Microtomia: Esta etapa consiste, basicamente, em utilizar um micrótomo para obter cortes sucessivos, delgados e uniformes, a partir dos blocos de parafina com as peças incluídas. Este aparelho é formado por uma lâmina (fixa ou descartável) de aço, afiada, e um braço ao qual se prende o bloco e que se desloca verticalmente.

Montagem da lâmina histológica: As fitas obtidas a partir do micrótomo são transferidas para um banho-maria, com o auxílio de uma pinça, para serem distendidas. A água deve estar entre 3° e 8° abaixo do ponto de fusão da parafina utilizada. Nesta etapa, são retiradas as dobras e evitadas as bolhas abaixo da fita. Após a distensão, os cortes são separados individualmente ou em grupos, conforme a conveniência, utilizando-se lâminas de vidro previamente limpas com detergente, estocadas em álcool 80% e previamente secas. Os cortes obtidos podem ser transferidos, inicialmente, para uma estufa onde ficam alguns minutos (não mais que dez minutos) para posteriormente serem colocados em um suporte inclinado. Finalmente, os cortes devem ser depositados em uma estufa a 60° para secagem entre uma e 24 horas.

Coloração: A maioria dos preparados histológicos observados nas aulas práticas são corados com uma combinação de dois corantes: **Hematoxilina & Eosina** (H.E.). Quando o balanço de cargas de uma estrutura é ácida, ela apresenta grande afinidade por corantes básicos e é denominada estrutura basófila (exemplo: núcleo celular). A hematoxilina se comporta como um corante básico e portanto, cora constituintes celulares e intercelulares de comportamento ácido em *roxo-azulado*. A eosina se comporta como um corante ácido e portanto, cora em *róseo-avermelhado* as estruturas acidófilas (exemplo: colágeno).

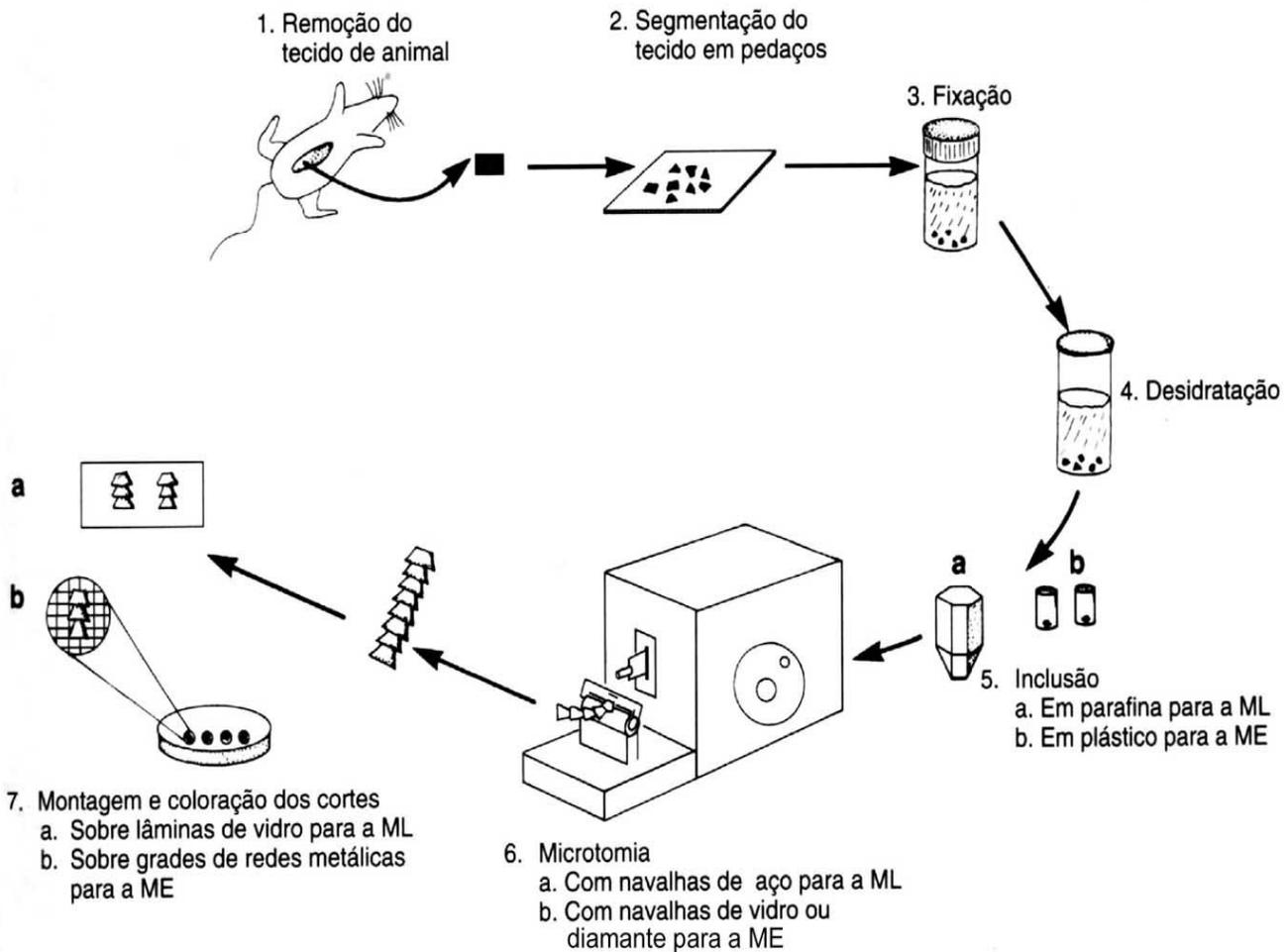


Figura 4.1 – Técnicas histológicas.

Interpretação dos cortes histológicos: Procure interpretar os diversos planos de secção das estruturas analisadas. Por exemplo, um vaso sanguíneo que é uma estrutura em forma de “tubo”:

- *corte transversal:* a secção é circular e a parede do tubo tem a mesma espessura em toda a circunferência;
- *obliqua:* a secção é elipsóide. A parede é mais espessa de um “lado” do que do outro;
- *longitudinal:* a secção é alongada, as laterais tem a mesma espessura e as extremidades tem espessura diferente;
- *Tangencial:* não se vê luz, mas só um aglomerado de núcleos.

FIGURA 3.3
Esquema de
uma célula
seccionada em
diferentes planos.
Os planos de
corte 2, 3, e 5
passam pelo
núcleo. *Cortesia de
Gleydes G. Parreira.*

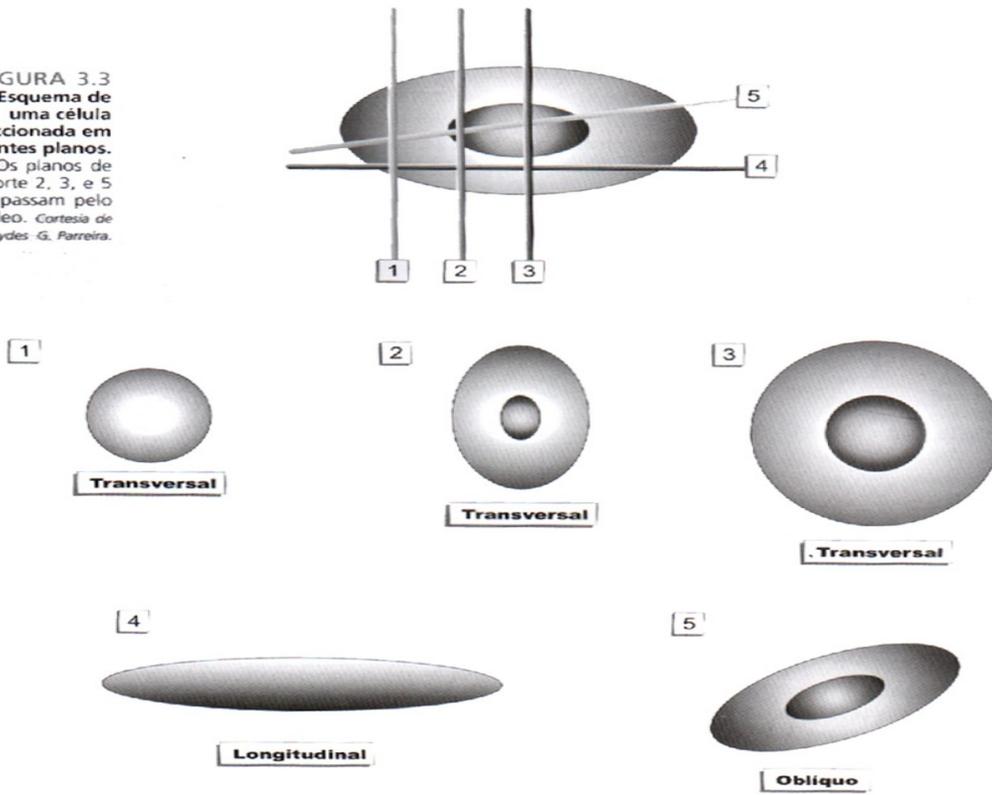


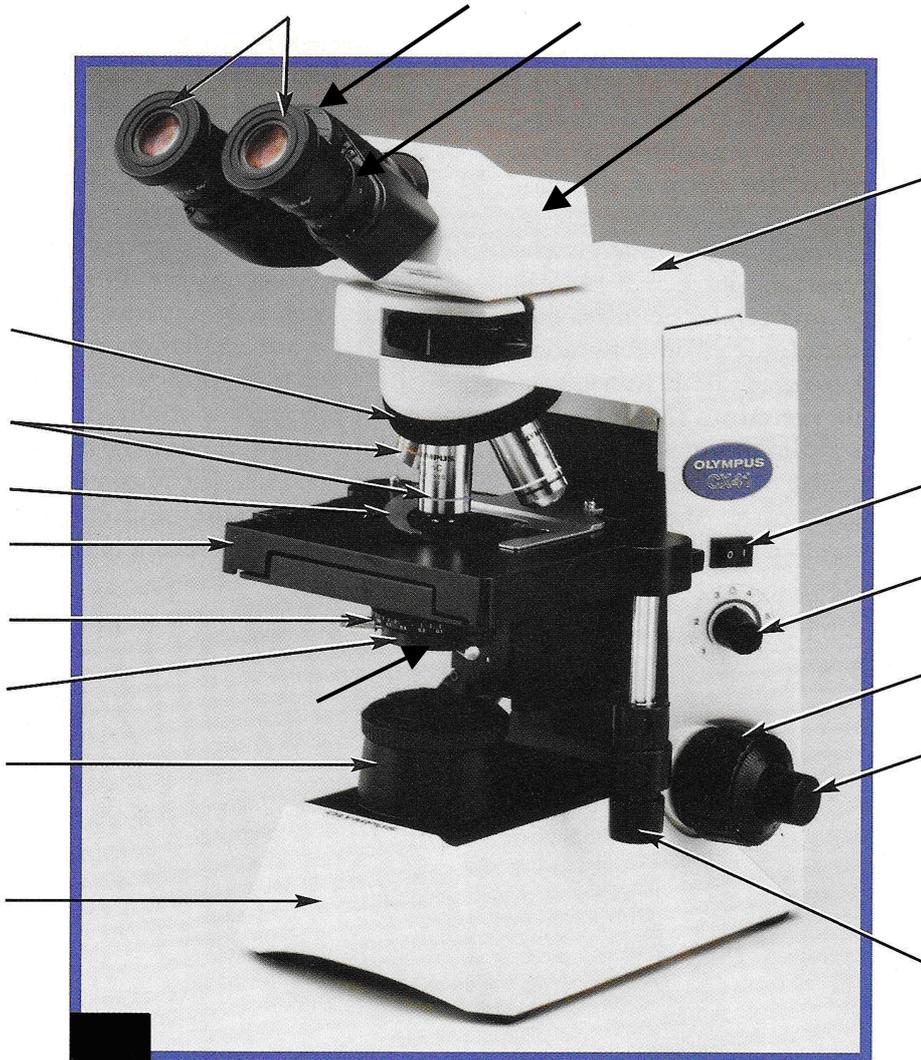
Figura 4.2 – Interpretação dos cortes histológicos.

5 - ESTUDO DOS CONSTITUINTES DO MICROSCÓPIO

Estudos dos constituintes do microscópio:

- Reconheça os constituintes mecânicos e ópticos do microscópio fotônico ou de luz a medida que o professor (a) os for enumerando. Em seguida preencha o desenho do microscópio identificando cada um destes constituintes. Ao ligar o microscópio, sempre observar o potenciômetro. Ao desligar o microscópio, sempre girar o revólver e deixar na objetiva de menor aumento (4X). Na sequência abaixar a mesa ou platina, regular o potenciômetro até obter ausência de luz na fonte luminosa e finalmente desligar o equipamento e cobri-lo adequadamente.

Figura 5.1 – Constituintes do microscópio.



6 - VISÃO GERAL DOS TECIDOS CORPÓREOS: CÉLULAS E MATRIZ EXTRACELULAR

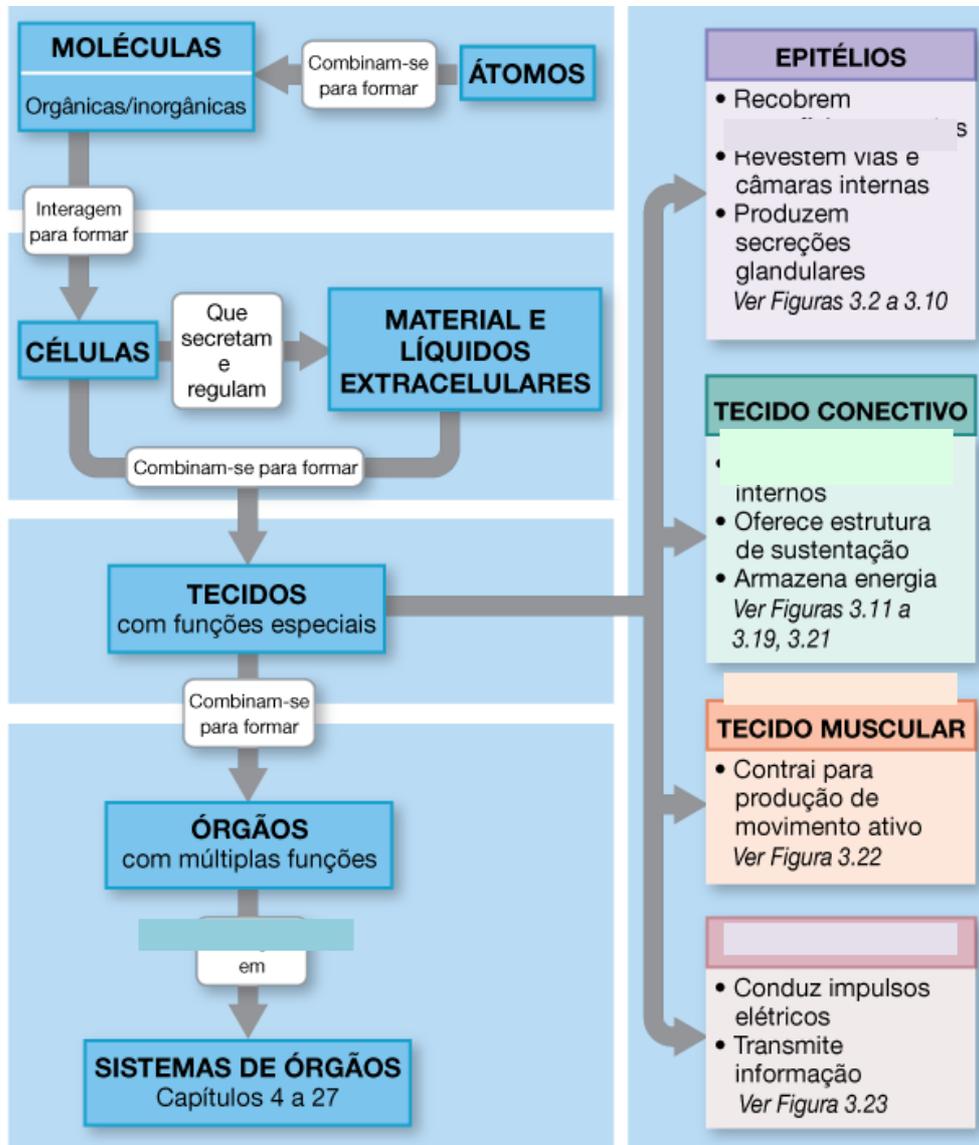


Figura 6.1 - Visão geral dos tecidos corpóreos.