



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS

Thaniele Müller Ramos

**Potencialidades da microscopia eletrônica (transmissão e varredura)  
e microscopia confocal como ferramentas para  
análises de amostras biológicas.**

Porto Alegre

2013



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS

Thaniele Müller Ramos

**Potencialidades da microscopia eletrônica (transmissão e varredura)  
e microscopia confocal como ferramentas para  
análises de amostras biológicas.**

Trabalho de conclusão do curso de  
graduação como requisito parcial para  
obtenção do grau de bacharel em  
Ciências Biológicas.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dra. Fátima Costa  
Rodrigues Guma

Porto Alegre

2013

## AGRADECIMENTOS

Como já dizia Steve Jobs, “cada sonho que você deixa para trás, é um futuro que deixa de existir”. Obrigada a todos que vivem seus sonhos e desenham seus futuros, contribuindo para que todas as pessoas continuem fazendo o mesmo. Obrigada àqueles e àquelas que compartilham seu conhecimento comigo: “aqueles que passam por nós, não vão sós, não nos deixam sós. Deixam um pouco de si, levam um pouco de nós.” (Antoine de Saint-Exupéry). Assim também é a ciência: o resultado de um pouquinho de tantos pesquisadores, que igualmente levam na bagagem um pouco das diversas descobertas, teorias e hipóteses.

Agradeço à diretora do CME-UFRGS, orientadora, doutora e professora Fátima Guma, que além de excelente profissional em todas as funções que desempenha, é uma pessoa admirável!

Obrigada aos atuais e ex-funcionários/bolsistas do Centro de Microscopia Eletrônica da UFRGS pela troca de conhecimentos, assim como os momentos descontraídos. Obrigada: Aline, Bia, Carlos, Chris, Daniel, Henrique, Karina, Leandro, Letícia, Lucas, Mari, Naira, Raquel, Rodrigo, Rômulo (muito agradecida pela compreensão e variadas dicas!), Ronei, Salete, Suelen e Tati. Em especial, agradeço à querida Mô, por toda a cooperação neste trabalho e por ser uma grande amiga! Obrigada à infraestrutura do CME-UFRGS, um centro de ponta que possibilitou a execução deste trabalho.

Obrigada à UFRGS, por ser uma excelente universidade, oportunizando a atividade em diferentes laboratórios, ampliando minha experiência profissional. Obrigada aos doutores que me presentearam com suas palavras durante a graduação.

Obrigada às amigas formadas ao longo do estágio obrigatório no Museu de Ciências e Tecnologia da PUCRS, que além de possibilitarem um local muito rico em experiências, ofereceram um ambiente prazeroso de trabalho. Obrigada a todos os funcionários, especialmente à Doutora Melissa Guerra, Charles, Diana, Helena, Silvio, Roberta e Suelen.

Agradeço aos meus pais, Gernani e Tania, pela educação, cuidados, carinho e amor extraordinários. Amo vocês! Obrigada à minha irmã e irmão, Tanise e Emanuel, os melhores do mundo! Vocês me ensinaram muito do que eu sei. Obrigada pelos anos incríveis da infância que se estendem até os dias atuais quando nos encontramos.

Agradeço a minha família e amigos, pelos bons momentos, pelas dicas, conversas ... Obrigada ao meu padrinho José Luís, por ser um exemplo de pessoa e me apoiar muito!

Muito obrigada, Márcio Zamfonato, por simplesmente conferir tanto amor ao único exemplar da espécie *Thanis thanis*.

Obrigada físicos, engenheiros, matemáticos, entre outros cientistas, por terem ideias brilhantes e construírem ferramentas tão incríveis como são os microscópios, contribuindo ao trabalho de outros profissionais!

Agradeço à natureza, por ser tão deslumbrante e me encher de prazer e curiosidade ao ficar a observá-la macro e microscopicamente.

## RESUMO

Os microscópios eletrônicos de transmissão (MET), varredura (MEV) e o microscópio confocal (MC) são importantes ferramentas para a pesquisa com amostras biológicas. O MET possui o maior poder de resolução entre os microscópios utilizados neste trabalho. Sua principal vantagem é a capacidade de analisar o interior da amostra, a ultraestrutura subcelular. O MEV geralmente é utilizado para observar a superfície das amostras. Possui poder de alta resolução e de grande profundidade de foco, resultando em imagens tridimensionais. O MC é um equipamento que combina princípios da óptica com microscopia digital, possibilitando regulagens extremamente precisas no foco e na capacidade de ampliação. Nele é possível determinar colocação de estruturas e obter imagens tridimensionais, bem como realizar ensaios *in vivo*. Este trabalho teve por objetivo descrever e comparar o resultado da análise de uma mesma amostra biológica por MET, MEV e MC. Foram utilizadas culturas de células-tronco mesenquimais humanas derivadas de tecido adiposo, indiferenciadas e diferenciadas para adipócitos como modelo amostral. Por microscopia eletrônica de transmissão foi possível realizar a análise ultraestrutural da célula, observando a presença, localização e quantificação de organelas celulares relacionadas ao metabolismo deste tipo celular e especializações de membrana como cavéolas. Em microscopia eletrônica de varredura observou-se o volume das gotas lipídicas citoplasmáticas (GLC) sob a membrana plasmática, bem como projeções citoplasmáticas. Através do microscópio confocal, foi possível colocalizar proteínas presentes nas membranas e GLC, além de construir imagens tridimensionais de diferentes cortes ópticos. As três técnicas de microscopia analisadas neste trabalho produziram resultados que podem ser considerados complementares, evidenciando aspectos diferentes da mesma amostra. Finalmente, a escolha da técnica vai depender do objetivo do projeto de pesquisa e da disponibilidade de materiais e equipamentos.

**Palavras-chave:** microscópio eletrônico de transmissão, microscópio eletrônico de varredura, microscópio confocal, células-tronco mesenquimais humanas derivadas de tecido adiposo, amostras biológicas.

## ABSTRACT

The transmission electron microscope (TEM), scanning (SEM) and confocal microscopy (CM) are important tools for the study of biological samples. The TEM has the highest resolution power between microscopes used in this work. Its main advantage is the ability to examine inside the sample, the subcellular ultrastructure. The SEM is usually used for observing the sample surface. It has high-resolution power and large focus depth, resulting in three-dimensional images. The CM is an equipment that combines optical with digital microscopy, enabling extremely precise adjustments in focus and magnification capacity. It is possible to determine colocalization of structures and obtain three-dimensional images beyond perform *in vivo* tests. This study aimed to describe and compare the result of the analysis of the same biological sample by TEM, SEM and CM. It was used as an experimental model cultures of human adipose-derived stem cells (hADSC), undifferentiated and differentiated to adipocytes. The transmission electron microscopy enable to perform ultrastructural analysis of the cell, noting the presence, location and quantification of cellular organelles related to the metabolism of this cell type, and membrane specializations, like caveolas. In scanning electron microscopy, it was observed bulk of cytoplasmic lipid droplets (CLD) under the plasma membrane and cytoplasmic projections. Through the confocal microscope, it was obtained the protein colocalization present in membranes and CLD, besides constructing three-dimensional images of different optical sections. The three microscopic techniques analyzed in this work show complementary results, and demonstrate different aspects of the same sample. Finally, the choice of the one or another technique will be dependent of the main research objective and of the material and equipments availability.

**Keywords:** transmission electron microscope, scanning electron microscope, confocal microscopy, human adipose-derived stem cells, biological samples.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> O microscópio eletrônico construído por Ruska. ....	10
<b>Figura 2:</b> Diagrama esquemático dos componentes mais importantes do MET .....	12
<b>Figura 3:</b> Desenho esquemático e fotografia de um corte transversal de um microscópio eletrônico de transmissão JEOL 120CX.....	13
<b>Figura 4:</b> A) blocos de resina B) dois tipos de trapézio (a e b) C) modelos de grades. ....	17
<b>Figura 5:</b> Desenho esquemático dos componentes básicos do MEV. ....	19
<b>Figura 6:</b> Câmara de ponto crítico BAL-TEC CPD030 .....	22
<b>Figura 7 :</b> Metalizadora modelo BAL-TEC SCD050 .....	23
<b>Figura 8:</b> Representação esquemática de um microscópio confocal.....	25
<b>Figura 9:</b> Microscópio confocal moderno. ....	26
<b>Figura 10:</b> Eixos de uma amostra e exemplo de corte óptico.....	27
<b>Figura 11:</b> A, B e C : hADSC indiferenciadas. D, E e F: hADSC diferenciadas de 7 dias. G, H e I: hADSC diferenciadas de 21 dias.....	34
<b>Figura 12:</b> hADSC submetidas ao meio de diferenciação adipogênica por 7 dias (A) e 21 dias (B). ....	35
<b>Figura 13:</b> A e B: hADSC indiferenciada e hADSC diferenciadas por 7 dias, respectivamente. ....	36
<b>Figura 14:</b> hADSC diferenciadas de 21 dias.....	37
<b>Figura 15:</b> hADSC diferenciadas em 21 dias, com detalhes nas gotas lipídicas citoplasmáticas (GLC).....	38
<b>Figura 16:</b> hADSC diferenciadas de 21 dias., com detalhes nos prolongamentos de membrana plasmática.....	38
<b>Figura 17:</b> hADSC indiferenciadas – A: GD2; B: GM1; C: sobreposição de A e B.....	40
<b>Figura 18:</b> hADSC, pré-adipócitos, 7 dias de indução.....	40
<b>Figura 19:</b> hADSCs, pré-adipócitos, 21 dias de indução.....	41
<b>Figura 20:</b> Varredura no eixo Z .....	42
<b>Figura 21:</b> Reconstrução tridimensional da varredura em Z da Figura 20.....	43

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	8
1.1 JUSTIFICATIVA .....	8
1.2 OBJETIVOS .....	8
1.2.1 Objetivo geral.....	8
1.2.2 Objetivos Específicos.....	9
<b>2 REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	10
2.1 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (MET) .....	10
2.1.1 Histórico .....	10
2.1.2 Princípios.....	11
2.1.3 Aplicações.....	15
2.1.4 Preparação de amostras.....	15
2.2 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV).....	17
2.2.1 Histórico .....	17
2.2.2 Princípios.....	18
2.2.3 Aplicações.....	21
2.2.4 Preparação de amostras.....	21
2.3 MICROSCÓPIO CONFOCAL (MC) .....	23
2.3.1 Histórico .....	23
2.3.2 Princípios.....	24
2.3.3 Aplicações.....	28
2.3.4 Preparação de amostras.....	28
2.4 CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS HUMANAS DERIVADAS DE TECIDO ADIPOSO (hADSC).....	29
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	30
3.1 CULTURA DE CÉLULAS .....	30
3.2 PREPARAÇÃO DE AMOSTRAS PARA MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (MET).....	30
3.3 PREPARAÇÃO DE AMOSTRAS PARA MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV).....	31
3.4 PREPARAÇÃO DE AMOSTRAS PARA MICROSCOPIA CONFOCAL.....	32
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	33
4.1 ANÁLISE POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (MET) .....	33
4.2 ANÁLISE POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV) .....	36
4.3 ANÁLISE POR MICROSCOPIA CONFOCAL (MC).....	39
<b>5 CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	44
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	46

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 JUSTIFICATIVA

Durante as atividades exercidas como microscopista no Centro de Microscopia Eletrônica da UFRGS foi possível constatar que muitas vezes o pesquisador não tem conhecimento sobre as vantagens de cada tipo de microscópio para análise de amostras biológicas. Percebe-se que a dúvida está em saber qual é a técnica ideal para a obtenção dos dados que o pesquisador procura, bem como em compreender as diferentes possibilidades de estudo que cada equipamento pode oferecer.

A escolha das células-tronco mesenquimais humanas derivadas de tecido adiposo (hADSC) como modelo para este estudo decorreu pela possibilidade de comparar dois fenótipos (indiferenciado e adipogênico) em um mesmo tipo celular e pela facilidade de ser a linhagem utilizada no laboratório da professora orientadora deste trabalho.

A microscopia eletrônica é uma técnica avançada que tem contribuído com a ciência na medida em que possibilita alcançar detalhes que antes eram imperceptíveis ao microscópio óptico cujo aumento máximo é 2000 vezes. Ao longo do tempo, o desenvolvimento dos microscópios eletrônicos de varredura e transmissão, ambos utilizando feixes de elétrons no lugar de fótons (usados em microscópios ópticos convencionais), possibilitou maior resolução em comparação à fonte de luz branca.

A microscopia confocal é uma técnica que combina os princípios da óptica e da físico-química, pois associa o emprego de compostos químicos, os fluoróforos, com microscopia digital de alta resolução, possibilitando regulagens extremamente precisas no foco e na capacidade de ampliação. Essa técnica é utilizada para determinação da colocalização de proteínas e construção de imagens tridimensionais. Nesse microscópio também podem ser realizados ensaios *in vivo* em tempo real.

## 1.2 OBJETIVOS

### 1.2.1 Objetivo geral

Descrever e comparar o resultado da análise de uma mesma amostra por microscopia eletrônica de varredura e transmissão e por microscopia confocal. Finalmente, tendo como base as informações obtidas, criar um documento que sirva de guia ou orientação para os

usuários do CME-UFRGS escolherem a melhor técnica para responder a pergunta proposta pelo projeto de pesquisa em questão.

### **1.2.2 Objetivos Específicos**

- Avaliar o tipo de informação obtida na análise de amostras biológicas em microscópio eletrônico de transmissão (TEM);
- Avaliar o tipo de informação obtida na análise de amostras biológicas em microscópio eletrônico de varredura (MEV);
- Avaliar o tipo de informação obtida na análise de amostras biológicas em microscópio confocal (MC).

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (MET)

#### 2.1.1 Histórico

Na década de 1930, em Berlin, Max Knoll e Ernst Ruska, apresentaram o primeiro microscópio eletrônico (DE GRAEF, 2003), demonstrando a ideia de lentes eletrônicas em uma realidade prática e exibiram imagens eletrônicas tiradas no instrumento que elaboraram (**Figura 1**). Dentro de um ano após a publicação de Knoll e Ruska, a resolução limite do microscópio óptico foi ultrapassada. Ruska pensava que o comprimento de onda limite a fótons não se aplicava a elétrons. Apesar de um pesquisador, Louis de Broglie, em 1925, ser o primeiro a teorizar que o elétron tem aspectos ondulatórios característicos, com um comprimento de onda substancialmente menor que a luz visível, Ruska afirmou desconhecer essa teoria de Broglie (WILLIANS, CARTER, 2009).



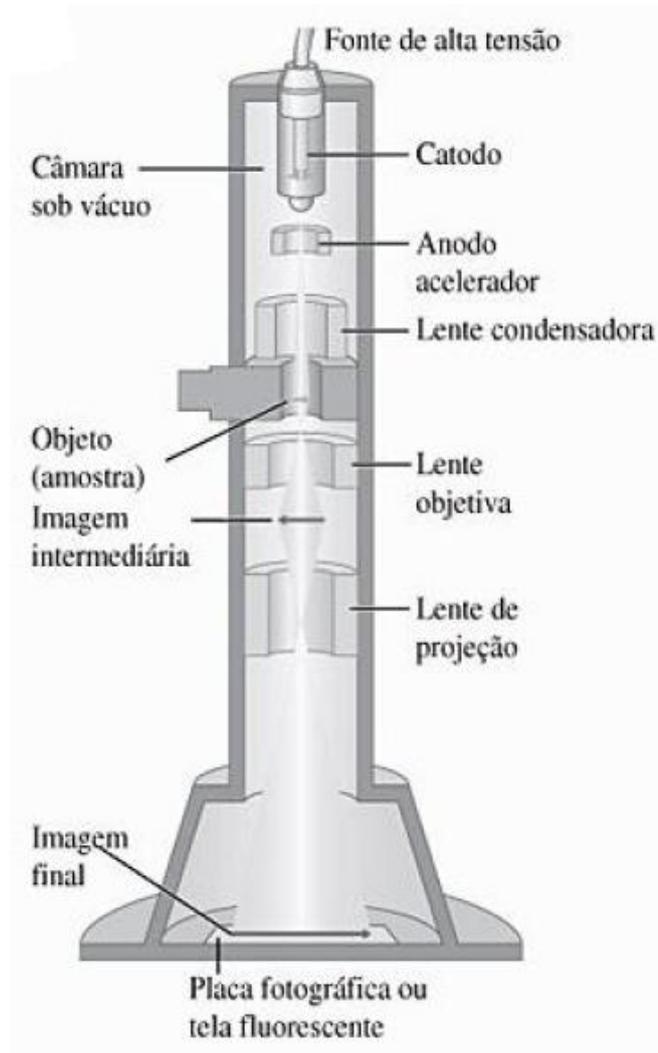
**Figura 1:** O microscópio eletrônico construído por Ruska (vestindo jaleco) e Knoll em Berlin nos anos de 1930 (Traduzido de WILLIANS, CARTER, 2009, p.4).

Por volta de 1939, iniciou-se a produção em escala comercial do microscópio eletrônico de transmissão pela empresa Siemens e Halske, também em Berlin. Os pesquisadores da Siemens que iniciaram os trabalhos, principalmente na área biológica, foram Ernst Ruska e Bodo Von Borries. Nessa época, já atingia uma resolução em torno de 2nm, representando uma qualidade de resolução 100 vezes superior ao microscópio óptico (KESTENBACH, BOTTA FILHO, 1989).

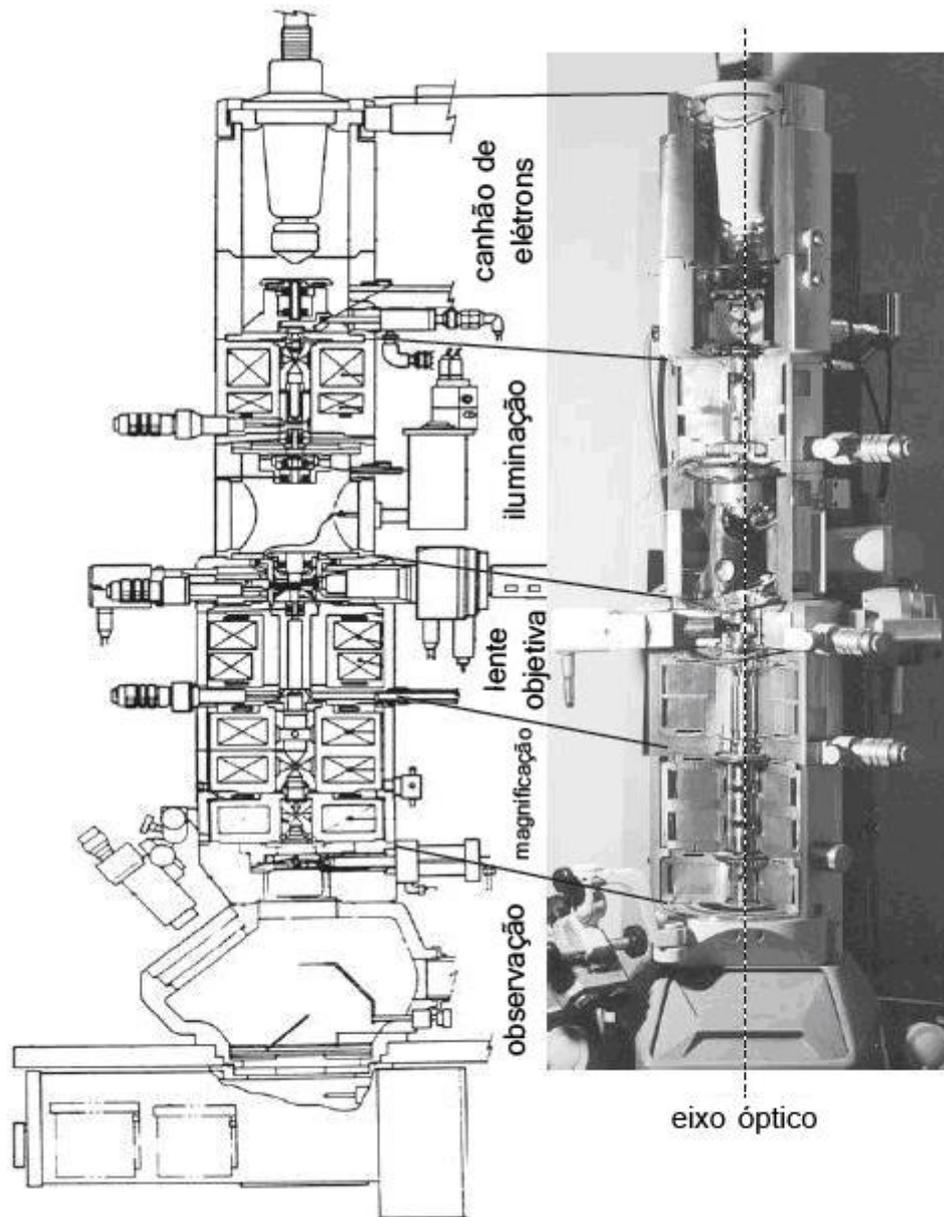
O MET, além de seu grande poder de resolução, oferece outras duas vantagens positivas em relação ao microscópio óptico: a possibilidade de observar o interior de amostras biológicas ou inorgânicas e a facilidade de observação dos detalhes da microestrutura (KESTENBACH, BOTTA FILHO, 1989).

### **2.1.2 Princípios**

Em linhas gerais, o microscópio eletrônico de transmissão utiliza um feixe de elétrons sob alta tensão emitido por uma coluna de elétrons. Lentes eletromagnéticas são utilizadas para focalizar o feixe de elétrons na amostra. Ao passar através da amostra, os átomos que constituem o feixe de elétrons produzem diferentes tipos de radiação. Em geral, apenas os elétrons transmitidos são analisados pelo detector, o que se traduz sinal de imagem mista. A parte mais importante deste microscópio é a coluna, onde o feixe de elétrons é gerado e dirigido para atravessar a amostra e onde a imagem será ampliada para a realização da análise e registro digital. Os elementos principais que controlam a passagem dos elétrons pela coluna são: filamento, anodo, sistema de alinhamento, lente condensadora, correção de astigmatismo e campo escuro, lente objetiva, lente projetora e tela (KESTENBACH, BOTTA FILHO, 1989). Esses elementos podem ser melhor visualizados nos esquemas abaixo (**Figura 2 e 3**):



**Figura 2:** Diagrama esquemático dos componentes mais importantes do microscópio eletrônico de transmissão (YOUNG, FREEDMAN, 2009, p. 228).



**Figura 3:** Desenho esquemático e fotografia de um corte transversal de um microscópio eletrônico de transmissão JEOL 120CX, com as principais etapas descritas (desenho reproduzido e traduzido de De Graef, 2003, p.140).

Durante a análise, a coluna deve estar em vácuo, porque só assim o feixe de elétrons é produzido. Se não estiver nessa condição, os elétrons irão percorrer apenas distâncias muito curtas, pois serão barrados por colisão com moléculas de gás. O vácuo deve atingir  $7,5 \times 10^{-6}$  torr (ou aproximadamente  $10^{-5}$  mbar) nas posições mais críticas e, nos microscópios modernos, é controlado por um sistema pneumático de válvulas. Há também um sistema de geração de alta tensão (GRIMSTONE, 1980; KESTENBACH, BOTTA FILHO, 1989).

A fonte de iluminação do microscópio eletrônico chama-se canhão eletrônico. Ele consiste de um pequeno pedaço de fio em forma de V, o filamento ou catodo, geralmente

sendo um filamento de tungstênio, e duas placas metálicas circulares com uma perfuração central. Uma voltagem é aplicada entre o filamento (negativo) e uma das placas, o anodo (positivo). Ao fluir uma corrente através do filamento, ele é aquecido por incandescência, fazendo com que emita elétrons. Estes são atraídos em direção ao anodo, que tem carga oposta, e alguns deles passam através da abertura central. A proporção dos que assim fazem aumenta devido à presença da segunda placa metálica, denominada grade catódica ou *Wehnelt*, que é negativamente carregada em relação ao filamento. Esta carga negativa ocasiona a concentração dos elétrons, emitidos pelo filamento, em um feixe que passa simetricamente ao longo do eixo do canhão e através da abertura central do anodo (GRIMSTONE, 1980). Assim, os elétrons saem do filamento e são direcionados a um ponto chamado ponto de convergência (ou *cross-over*), entre o *Wehnelt* e o anodo. Essa conversão ocorre devido a um potencial (*bias*) aplicado no *Wehnelt*. O diâmetro do feixe é dado pelo tamanho do ponto de convergência (*do*) e o feixe é tão melhor em termos de coerência quanto menor for o *do* (WILLIANS, CARTER, 2009).

A lente condensadora realiza a colimação do feixe de elétrons, ou seja, produz um feixe paralelo que deve passar através da amostra que será examinada. Os microscópios mais utilizados são os de 120 ou 200 kV, referentes aos valores máximos de alta tensão, sendo que o 120kV é mais utilizado para amostras biológicas e o 200kV para inorgânicas. Isso porque o aumento da tensão pode danificar a amostra biológica, já que a composição orgânica é frágil. Justamente por isso, ela precisa passar por cuidadosa preparação (como será explicado mais adiante) para suportar o processo de análise em microscópio eletrônico de transmissão e também porque a amostra precisa ser fina o bastante para os elétrons não diminuam de velocidade de forma significativa ao passarem por ela. A lente objetiva forma uma imagem intermediária do objeto e a lente de projeção forma a imagem real final (esta lente faz o papel da ocular de um microscópio óptico). A imagem final é projetada em uma tela fluorescente (ou placa fotográfica) (KESTENBACH, BOTTA FILHO, 1989; YOUNG, FREEDMAN, 2009).

O poder de resolução do MET atinge atualmente valores na faixa de 0,2nm. Os principais mecanismos de contraste que geram diferenças nas imagens são o contraste de espessura em massa, contraste por difração (amplitude) e o contraste de fase. O contraste de espessura por massa se refere ao processo de espalhamento de elétrons pelos átomos da amostra que regulam a intensidade do feixe transmitido. Quanto maior a espessura da amostra ou quanto maior o número atômico, menor será o número de elétrons transmitidos, assim originando uma região mais escura na imagem gerada. O contraste de difração é referente ao

espalhamento elástico em amostras cristalinas. E após os elétrons atravessarem a amostra, os feixes transmitidos e difratados podem ser recombinados no plano da imagem para resolução direta da rede cristalina, constituindo o contraste de fase (KESTENBACH, BOTTA FILHO, 1989).

### 2.1.3 Aplicações

O microscópio eletrônico de transmissão é muito utilizado para análise de materiais biológicos, pois permite a definição de imagens intracelulares, possibilitando observar a morfologia celular, aspectos gerais das organelas, a organização molecular de vírus ou constituintes subcelulares, a interação de parasitas-células, fornecendo informações sobre alterações celulares ocasionados por vírus, fitoplasmas, micoplasmas, bactérias, entre outros organismos diminutos, de impossível visualização na microscopia óptica (GALLETI, 2003).

Embora, na última década, grande parte da utilização da microscopia eletrônica para amostras biológicas passou a poder ser substituída por técnicas menos prejudiciais às amostras, como a microscopia confocal (que será vista neste trabalho) ou pela microscopia de dois-fótons e multifótons, o MET ainda apresenta um papel importante no estudo de biomateriais, interfaces bio/inorgânicos e nanobiomateriais (WILLIANS, CARTER, 2009).

### 2.1.4 Preparação de amostras

A preparação de amostras para microscopia eletrônica de transmissão requer muito cuidado. O material precisa ser cortado em uma série de secções ultrafinas (GRIMSTONE, 1980). Para obtenção desses cortes, a amostra precisa ser submetida a vários processos específicos que garantam a preservação de suas propriedades originais durante a análise. Esses passos variam de acordo com a amostra e objetivo de estudo, mas em linhas gerais, são:

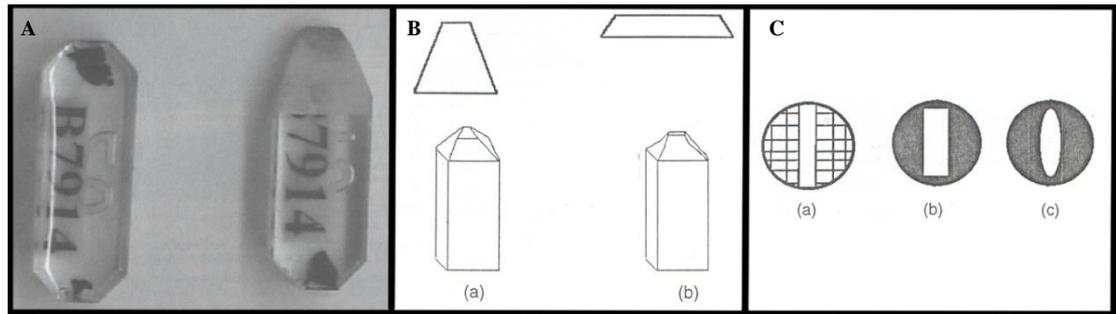
**1. Fixação:** processo pelo qual se obtém estabilização das estruturas celulares e intracelulares. Idealmente a morfologia dos diferentes tipos de biomacromoléculas, suas relações topológicas, bem como da fase aquosa com os respectivos solutos devem ser preservados como na situação *in vivo*. Essa fixação pode ser feita por métodos físicos (como secagem ao ar e criofixação) ou fixação química (uso de fixadores goagulantes ou não aditivos e fixadores não goagulantes ou aditivos) e suas variações (SESSO, 1998).

**2. Desidratação:** esse passo é necessário devido ao fato de que todos os meios de inclusão (passo seguinte) usados em microscopia eletrônica não são miscíveis á água. Desse modo,

torna-se necessário retirar toda a água do sistema biológico, o que deve ser feito de maneira gradual, pois modificações bruscas podem levar ao colapso das projeções citoplasmáticas, afetando a estrutura celular. Após a fixação, o material deve ser bem lavado, iniciando-se o processo de desidratação por uma sequência de banhos de concentrações crescentes de um agente adequado que substitua a água e a elimine do espécime. Os desidratantes mais utilizados são o etanol e a acetona (MACHADO, SOUZA, 1998).

**3. Inclusão:** a amostra deve ser incluída em um material, que é uma resina, que permita a posterior obtenção de cortes ultrafinos. Este material deve apresentar boa estabilidade quando submetido ao feixe de elétrons e possibilitar uma boa contrastação. Entre os exemplos de resinas, têm-se Epon, Spurr, Araldite. Antes de levar à estufa para polimerização, as amostras já infiltradas pela resina ainda fluida devem ser colocadas em blocos cilíndricos (cápsulas de gelatina) ou em moldes flexíveis com a devida identificação para o emblocamento (**Figura 4**). O tamanho dessa cápsula/molde deve corresponder ao suporte prendedor do ultramicrotomo (MACHADO, SOUZA, 1998).

**4. Ultramicrotomia:** realização de cortes ultrafinos nas amostras emblocadas, com espessuras entre 10 e 100nm. Os cortes devem ser realizados em micrótomos especiais providos de navalhas de fio mais uniforme e agudo do que as de aço, feitas de vidro, safira ou diamante. A extremidade do bloco deve ser lapidada em forma de pirâmide (**Figura 4**), à mão, com uma lima e uma lâmina ou em aparelhos especiais. Essa pirâmide deve ter o cume em forma de trapézio e com superfície mais plana possível. A navalha deve encontrar primeiro a base maior, para diminuir a compressão no momento do corte. Os cortes são colhidos sobre uma grade (*grid* - **Figura 4**) em geral de cobre, mas que também, quando necessário, pode ser de níquel ou de ouro. As grades podem ter 2,3 ou 3,5 nm de diâmetro e convém verificar qual o tamanho correspondente ao microscópio usado (MACHADO, SOUZA, 1998; ATTIAS, 1998).



**Figura 4:** **A)** blocos de resina com amostras inseridas. **B)** dois tipos de trapézio (a e b) realizados na face das pirâmides após emblocamento, mostrando que quanto menor a face do corte, maior número de cortes será possível coletar em uma mesma grade. **C)** modelos de grades que podem ser usadas para coletar cortes seriados. Na figura **C(a)** o esquema é de uma tela comum adaptada pela remoção de alguns fios. (adaptado de ATTIAS, 2007, p.40; 1998, p.155).

**5. Contrastação:** as grades, já com os cortes, são colocadas sobre uma gota de acetato de uranila a 5% em água destilada durante 20-30 minutos, com o corte voltado para a gota. Depois deve ser lavada em água destilada, secada e colocada posteriormente sobre uma gota de citrato de chumbo durante 5 minutos. Esses processos são para intensificar o contraste dos cortes ultrafinos (MACHADO, SOUZA, 1998).

## 2.2 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

### 2.2.1 Histórico

A microscopia eletrônica de varredura iniciou com o trabalho de M. Knoll (1935), descrevendo a concepção do MEV. Em 1938, Von Ardenne descreveu a utilização de bobinas de varredura no microscópio eletrônico de transmissão, gerando uma imagem de transmissão-varredura (DEDAVID; GOMES; MACHADO, 2007). Assim, foi construído o primeiro microscópio eletrônico de transmissão de varredura, contudo, as amostras não podiam ser espessas, pois se tratava de um microscópio de transmissão (MALISKA, s.d.).

O primeiro microscópio eletrônico de varredura para observação de amostras espessas foi construído em 1942 por Zworykin e colaboradores, com resolução na ordem de  $1\mu\text{m}$ , sendo de qualidade inferior à microscopia óptica. Os autores descreveram que a emissão de elétrons secundários poderia ser responsável pelo contraste topográfico da imagem gerada (KESTENBACH; BOTTA FILHO, 1989; DEDAVID; GOMES; MACHADO, 2007). Após várias modificações no primeiro microscópio, se conseguiu obter uma imagem com resolução de  $50\text{ nm}$  ( $500\text{ \AA}$ ). A substituição das lentes eletrostáticas por lentes eletromagnéticas

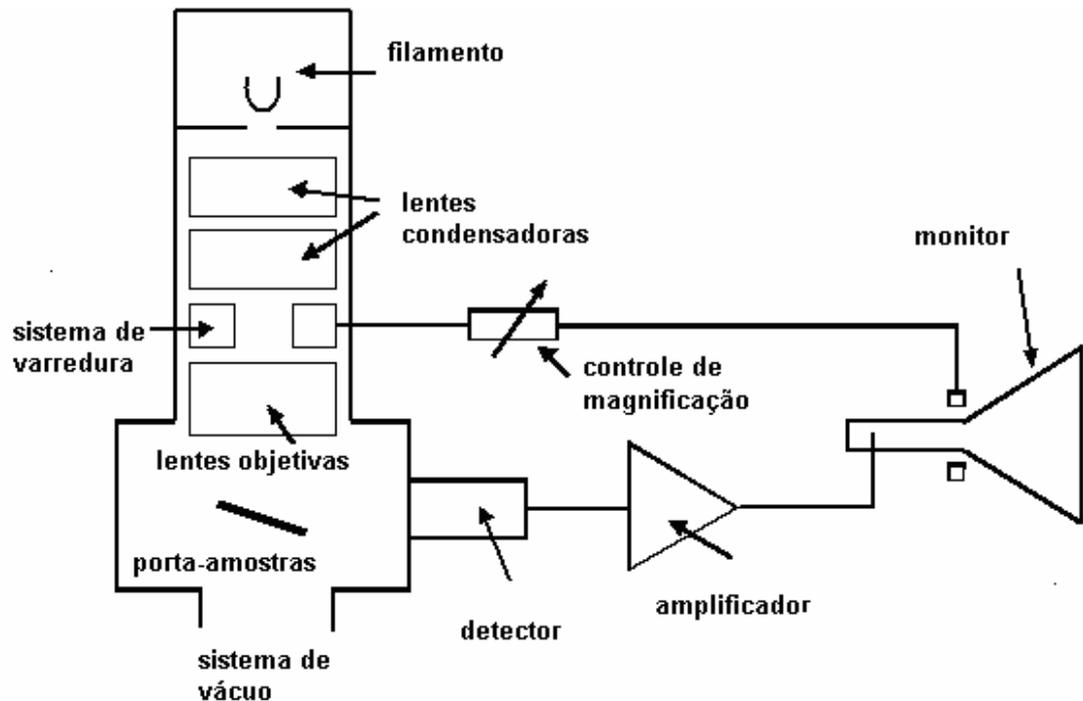
permitiu melhorar ainda mais a resolução passando para 25 nm (MALISKA, s.d.). Em 1952 surgiu o primeiro instrumento comercial, Mark I da Cambridge Scientific Instrument (KESTENBACH; BOTTA FILHO, 1989).

Atualmente, os MEV atingem resoluções que na ordem de 3.0 nm e grande profundidade de foco, da ordem de 300 vezes melhor que a do microscópio óptico, resultando em imagens com aparências tridimensionais. Utilizando-se elétrons de baixa energia, da ordem de 50eV, têm-se informações topológicas da amostra. Já com elétrons de alta energia, têm-se informações sobre topologia, número atômico ou orientação (KESTENBACH; BOTTA FILHO, 1989; DEDAVID; GOMES; MACHADO, 2007).

O MEV é uma ferramenta bastante utilizada, tanto por pesquisadores das áreas biológicas, quanto das áreas de materiais. Ele pode fornecer rapidamente informações sobre a morfologia e identificação de elementos químicos de uma amostra sólida, portanto, sua utilização é comum em biologia, odontologia, farmácia, engenharia, química, metalurgia, física, medicina e geologia. Há vários modelos, com diferentes aplicações. Um exemplo é o MEV com EDS (Energy Dispersive X-Ray Detector), no qual se pode fazer a análise da composição química da amostra. Portanto, essa técnica é mais utilizada por pesquisadores das áreas de Engenharia de Materiais, Química, Geologia, etc., não sendo usual a utilização do EDS para avaliação de amostras biológicas. Paralelamente com o desenvolvimento do microscópio eletrônico, o desenvolvimento dos computadores, softwares e imagens digitais facilitou bastante a análise e publicação de resultados (DEDAVID; GOMES; MACHADO, 2007).

### 2.2.2 Princípios

O Microscópio Eletrônico de Varredura assemelha-se muito ao Microscópio Eletrônico de Transmissão, tanto que foi criado a partir do MET. A coluna do MEV tem funcionamento similar ao MET, embora sendo muito mais simples. Os componentes do MEV são: canhão eletrônico, a coluna composta de uma série de lentes eletrônicas, uma câmara para amostra (porta amostra), detectores e sistema de vácuo, como se pode ver na **Figura 5** (GRIMSTONE, 1980; DEDAVID; GOMES; MACHADO, 2007).



**Figura 5:** Desenho esquemático dos componentes básicos do MEV. (Adaptado de KESTENBACH, 1994 *apud* DEDAVID; GOMES; MACHADO, 2007, p.14).

O princípio de funcionamento de um MEV consiste em um feixe de elétrons de pequeno diâmetro que explora a superfície da amostra, ponto a ponto, por varredura em linhas sucessivas, onde o sinal é transmitido a um detector e este a uma tela catódica. As bobinas de exploração eletromagnéticas, alimentadas por um gerador de varredura, fazem com que o feixe explore a superfície da amostra aproximadamente de 10 em 10nm. O sinal de imagem resulta da interação do feixe de elétrons incidente com a superfície da amostra. O detector é quem recebe o sinal e modula o brilho do monitor, permitindo a observação (DEDAVID; GOMES; MACHADO, 2007).

O feixe eletrônico de alta intensidade é gerado em uma coluna óptico-eletrônica. O canhão eletrônico é a fonte de elétrons e é composto por um filamento de tungstênio (W) ou de hexaboreto de lantânio ( $\text{LaB}_6$ ), além do catodo (relação Whenelt- filamento) e o anodo. Quando o filamento é aquecido, há emissão termiônica de elétrons. Esses são atraídos para o anodo e mantidos em potencial positivo em relação ao filamento (W) na faixa de 1 a 50 kV. O feixe é acelerado pela alta tensão criada entre o filamento e o anodo, sendo em seguida focalizado sobre a amostra por uma série de três lentes eletromagnéticas com um *spot* (diâmetro do feixe de elétrons) menor que 4 nm. Existem detectores para coletar os sinais emitidos pelos diferentes tipos de interações entre o feixe primário e a amostra, resultando em elétrons secundários (“secondary electron” – SE) ou retroespalhados (“backscattering

electron"- BSE). Os detectores são ligados a uma tela de visualização e um sistema de gravação de imagens. A exemplo do MET, a coluna é mantida em alto vácuo e a câmara das amostras (porta-amostras) a uma pressão igual ou menor  $10^{-6}$  Torr. Alguns modelos têm uma pré-câmara mantida a  $10^{-3}$  Torr (DEDAVID; GOMES; MACHADO, 2007). O porta-amostra (câmara da amostra) é dotado de controles para mover o material em exame e localiza-se na base da coluna (GRIMSTONE, 1980).

Os elétrons secundários resultantes da interação do feixe eletrônico com o material da amostra são de baixa energia ( $<50\text{eV}$ ) e formarão imagens com alta resolução (3-5 nm). São formados pela excitação de elétrons fracamente ligados ao núcleo, devido à interação com outros tipos de elétrons, passando próximo à superfície. Já os elétrons retroespalhados, que apresentam energia próxima à dos elétrons primários, são aqueles que sofreram espalhamento elástico e são estes que formam a maior parte do sinal de BSE. Sua energia varia entre 50eV até o valor da energia do elétron primário. Os elétrons retroespalhados de alta energia, por serem resultantes de uma simples colisão elástica, provêm de camadas mais superficiais da amostra. Logo, se somente este tipo de elétrons forem captados, as informações de profundidade contidas na imagem serão poucas se comparadas com a profundidade de penetração do feixe. A imagem gerada por esses elétrons fornece diferentes informações em relação ao contraste que apresentam: além de uma imagem topográfica (contraste em função do relevo) também se obtém uma imagem de composição (contraste em função do número atômico dos elementos presentes na amostra) (DEDAVID; GOMES; MACHADO, 2007).

Para amostras bem preparadas, condutíveis, é vantajoso trabalhar-se com feixe primário de elétrons acelerados com 20 a 25 kV, pois ganha-se na resolução. Mas, com amostras mais sensíveis ou isolantes por natureza, é aconselhável baixar a tensão para 10, ou mesmo 5kV. A escolha da distância de trabalho (medida entre o topo da amostra e a saída do feixe de elétrons) deve levar em consideração que distâncias curtas favorecem melhor resolução de foco. Já maiores distâncias de trabalho, garantem boa profundidade de foco e são necessárias para se fotografar com pequeno aumento as áreas e volumes grandes (SILVEIRA, 1998).

É importante salientar que a interação entre o feixe eletrônico com a amostra pode resultar em vários efeitos, os quais podem ser usados para obter informações sobre a estrutura ou a composição da amostra, como acontece na técnica de EDS. O EDS (Energy Dispersive X-Ray Detector) é a emissão de raios-x de comprimento de onda característicos dos átomos que os emitem. Esses raios-x podem ser coletados e analisados, usando-se um sistema detector apropriado, e podem ser convertidos numa imagem em um tubo de raios catódicos,

representando a distribuição de um determinado elemento. O instrumento utilizado para esse propósito é chamado microanalisador de raios-X (GRIMSTONE, 1980). Contudo, o EDS faz uma análise semiquantitativa da composição química da amostra, ou seja, não quantifica a porcentagem dos elementos com números atômicos menores ou iguais a nove (por exemplo: hélio, berílio, nitrogênio, etc.).

### **2.2.3 Aplicações**

As principais aplicações do MEV para as áreas biológicas demandam o estudo de detalhes estruturais finos, de objetos pequenos, tridimensionais. Assim, o microscópio tem sido utilizado em análises de objetos, como grãos de pólen, esporos de fungos, superfícies de folhas, ornamentação superficial de sementes de frutos, cutícula e ovos de insetos, diatomáceas, foraminíferos e pequenos fósseis (GRIMSTONE, 1980).

A riqueza de detalhes estruturais reveladas pelo MEV tem permitido, por exemplo, que taxonomistas identifiquem espécies e que encontrem informações importantes para a classificação. Para os paleontólogos, esse tipo de análise tem contribuído para distinção minuciosa de fósseis, podendo utilizar os dados obtidos para fins estratigráficos. Assim, em qualquer área de pesquisa que solicite conhecimentos de topografia superficial, a microscopia eletrônica de varredura será muito valiosa (GRIMSTONE, 1980).

### **2.2.4 Preparação de amostra**

Como a análise em MEV é realizada com a coluna do instrumento em vácuo, as amostras precisam estar secas. Espécimes relativamente resistentes que contenham em sua forma original baixo teor de água, tais como grãos de pólen, sementes, diatomáceas, carapaças de foraminíferos, paredes celulares espessas ou cutícula de insetos, necessitam de pouca preparação. Essas amostras resistem à dissecação sem colapsar. No entanto, para amostras mais delicadas (como protozoários ou células inteiras crescidas em cultivo de tecidos) ou naquelas onde a estrutura interna deve ser examinada, são necessários outros processos, por exemplo, métodos específicos de desidratação, que evitam o dano geralmente causado por agentes desidratantes orgânicos, como o etanol. Logo, o método de preparação da amostra depende da natureza da mesma (GRIMSTONE, 1980).

Em linhas gerais, as amostras biológicas que precisam ser preparadas, passam por etapas de coleta, seleção, limpeza (remoção de detritos depositados na superfície a ser

estudada, mas sem afetar suas características originais), estabilização da forma (fixação) e desidratação (SILVEIRA, 1998). Esses materiais biológicos, após o processo de fixação e desidratação, serão transferidos para a câmara do equipamento de secagem ao ponto crítico do CO<sub>2</sub> (CPD - critical point drying - **Figura 6**). O processo de secagem ao ponto crítico não é totalmente livre de problemas. Alguns tipos de tecidos podem sofrer contração significativa, por exemplo (DEDAVID; GOMES; MACHADO, 2007). Estando o material seco, ele deve ser montado em um suporte porta-amostras do MEV (*stub*). Vários tipos de adesivos podem ser usados, sendo um dos mais indicados a fita carbono, que também é condutora e auxilia no escoamento de elétrons, pois cria um “caminho” para eles percorrerem após interagirem com a amostra.



**Figura 6:** Câmara de ponto crítico utilizada para secagem de amostras biológicas modelo BAL-TEC CPD030. (Arquivo pessoal: fotografia registrada em CME-UFRGS).

A seguir, independente do método de preparação utilizado, toda a amostra não condutível necessita ser recoberta por uma superfície condutora para aterrar os elétrons que as atingem e, portanto evitar efeitos de carregamento ou calor durante a análise, que impedem a obtenção de imagens satisfatórias. Além disso, as camadas depositadas podem melhorar o nível de emissão de elétrons uma vez que emitem muito mais elétrons que o material da amostra (KESTENBACH; BOTTA FILHO, 1989). Essa etapa chama-se Metalização, sendo geralmente utilizado ouro ou carbono para recobrimento, que são depositados por evaporação em vácuo em instrumento especial para tal fim (**Figura 7**) (GRIMSTONE, 1980). Apesar de a Metalização ser uma etapa considerada rotineira, deve-se ter atenção ao fato de que

recobrimentos podem mascarar a superfície real da amostra (KESTENBACH; BOTTA FILHO, 1989).



**Figura 7:** Metalizadora modelo BAL-TEC SCD050: equipamento que recobre amostras com uma fina camada de material condutível (Arquivo pessoal: fotografia registrada em CME-UFRGS).

Uma preparação de boa qualidade é fundamental para garantir a melhor imagem da amostra biológica. Ao final, a amostra a ser introduzida no MEV deve satisfazer alguns requisitos básicos: 1) ter dimensões compatíveis com a câmara; 2) estar desidratada e limpa; 3) estar bem preservada nas três dimensões, que serão “vistas” pelo feixe; 4) não conter material volátil, sendo, portanto, resistente ao vácuo; 5) ser condutora de cargas elétricas; 6) estar perfeitamente fixada ao suporte, por intermédio de adesivo também condutor (SILVEIRA, 1998).

## 2.3 MICROSCÓPIO CONFOCAL (MC)

### 2.3.1 Histórico

O desenvolvimento da microscopia confocal foi impulsionado em grande parte pelo desejo por imagens de eventos biológicos na medida em que ocorrem *in vivo*. A invenção do microscópio confocal é geralmente atribuída a Marvin Minsky, que o construiu em 1955, com o objetivo de visualizar redes neurais em preparações de cérebros vivos (PADDOCK, 1999).

Minsky percebeu que a iluminação de um volume relativamente grande, em comparação às estruturas a serem observadas, era o que levava ao aumento da quantidade de luz espalhada. Ele intuiu que o que queria observar era muito pequeno e dispensava a iluminação de um volume grande da amostra (GOMES, SOUZA JR., 2010).

No microscópio confocal original de Minsky, a fonte pontual de luz era produzida por um orifício ou abertura confocal (chamada pinhole) colocado em frente de uma fonte de arco de zircônio. O ponto de luz foi focado por uma lente objetiva em direção à amostra e a luz que passou através do espécime foi colocada em foco por uma segunda lente objetiva num segundo pinhole, que tinha o mesmo foco como o primeiro ponto, ou seja, foi confocal com ele. Assim, toda luz que passou através do segundo pinhole atingiu um fotomultiplicador de baixo ruído, que produziu um sinal que estava relacionado com o brilho da luz. O segundo pinhole evitava a luz vinda de cima ou de baixo do plano do foco do fotomultiplicador. Este é um dos princípios mais importantes para a abordagem confocal, ou seja, eliminando a luz fora de foco ou a "queima" da amostra através da filtragem. Minsky também descreveu uma versão de luz refletida do microscópio que usa uma única lente objetiva e um arranjo de espelho dicromático. Esta é a configuração básica do sistema utilizado para fluorescência confocal de imagem. Todos os microscópios confocais modernos empregam o princípio da imagem confocal patenteada em 1957 (PADDOCK, 1999).

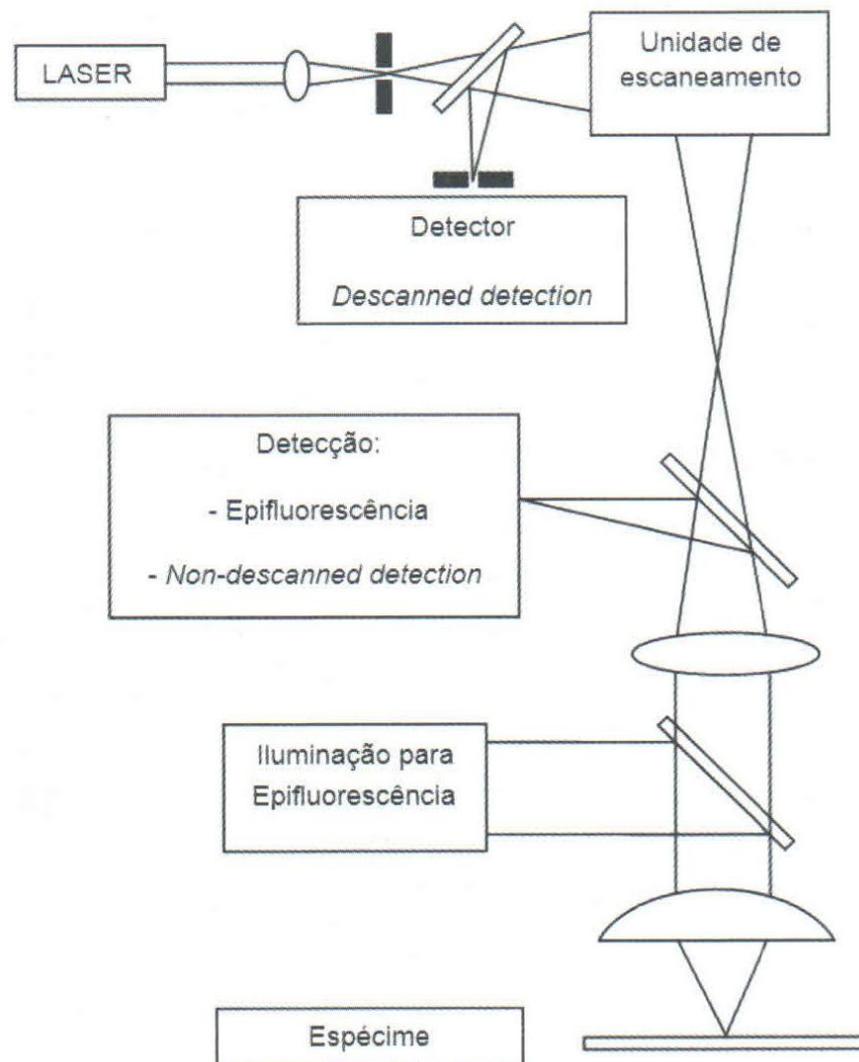
O microscópio óptico não passou por grandes mudanças nos últimos anos, porque a resolução final conseguida pelo instrumento é regulada pelo comprimento de onda da luz, a lente objetiva e as propriedades da própria amostra. No entanto, com o avanço da tecnologia associada aos corantes usados para adicionar contraste às espécimes, a microscopia óptica foi sendo aprimorada. Vários avanços tecnológicos que partiram do modelo do microscópio de Minsky têm se tornado úteis para os biólogos. Estes incluem: lasers estáveis de múltiplos comprimentos de onda para fontes pontuais de luz intensa; espelhos refletores mais eficientes; fotodetectores sensíveis de baixo ruído, microcomputadores rápidos com capacidade de processamento de imagem; soluções de software para analisar as imagens; monitores de vídeo de alta resolução e impressoras digitais, etc. (PADDOCK, 1999).

### **2.3.2 Princípios**

Os microscópios confocais usam lasers como fontes de luz. Um feixe de laser expandido é alinhado ao eixo óptico da objetiva que focaliza um volume limitado pela difração da luz dentro da amostra gerando a iluminação pontual desejada. O diâmetro do

ponto iluminado pelo laser varia de 0,25 a 0,8 micrômetros. O tamanho do ponto confocal é determinado pelo tipo de microscópio, comprimento de onda de luz incidente e características da objetiva (GOMES, SOUZA JR., 2010).

Assim, a luz refletida ou a fluorescência emitida pela amostra é coletada pela mesma objetiva que passará por um espelho dicróico e formará uma imagem que estará em um plano focal conjugado (confocal) ao do ponto iluminado e será projetada sobre um detector. Essa projeção ocorre através de uma abertura confocal (pinhole), colocada em frente ao fotodetector, onde o sinal deste detector é digitalizado e guardado em um computador para processamento posterior (**Figura 8**) (GOMES, SOUZA JR., 2010).



**Figura 8:** Representação esquemática de um microscópio confocal (GOMES, SOUZA JR., 2010, p. 117).

Diferentemente do modelo de Minsky que possuía duas lentes objetivas (uma para emissão e outra para coleta de luz), nos MC atuais, a lente objetiva faz o papel da lente objetiva e condensadora, atuando no processo de formação da imagem e de iluminação, resultando em um aumento na resolução em um fator de 1,4, tornando-se esse poder de resolução uma importante vantagem nesse equipamento (exemplo de um moderno MC na **Figura 9**) (GOMES, SOUZA JR., 2010).

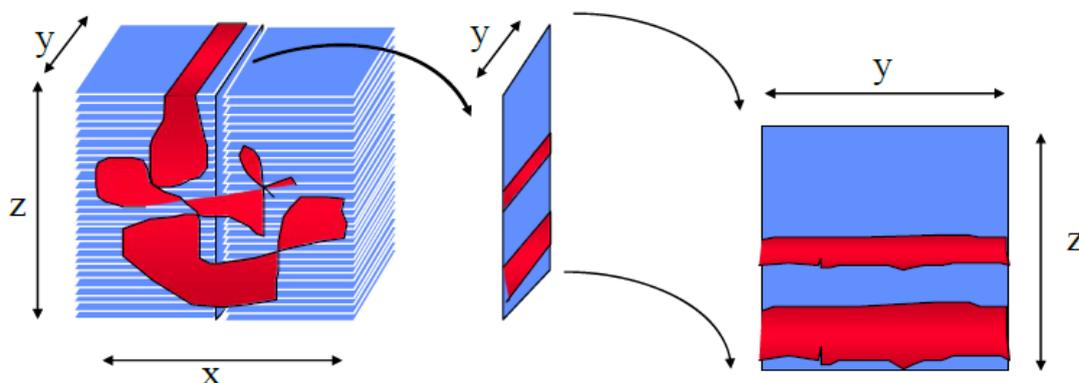
A imagem confocalizada é formada a partir de um ou mais feixes de lasers que varrem a amostra nos sentidos linear horizontal ponto a ponto e de cima para baixo (PADDOCK, 1999). Essa varredura horizontal ocorre no eixo X-Y e se pode variá-la ao longo do eixo Z (de cima para baixo). Assim, pode-se montar uma imagem tridimensional da amostra, como mostra a **Figura 10** (GOMES, SOUZA JR., 2010).



**Figura 9:** Microscópio confocal moderno, modelo *FluoView™* FV10000 (Olympus® Inc. Tóquio, Japão) (Arquivo pessoal: fotografia registrada em CME-UFRGS).

Durante a varredura, cada ponto capturado corresponde a um pixel na imagem final e, conseqüentemente, o número de pontos por linha e o número de linhas define a resolução física da imagem digitalizada (GOMES, SOUZA JR., 2010).

Quando excitados por lasers, marcadores fluorescentes emitem luz num comprimento de onda acima e com energia abaixo do de excitação. Softwares próprios para aquisição de imagem para este tipo de análise possuem canais específicos para cada laser na janela de visualização, onde estes canais podem ser visualizados sobrepostos ou isolados. Cada canal apresenta a imagem da fluorescência excitada pelo laser correspondente. Para modificar a intensidade de fluorescência emitida pela amostra, se altera a potência do laser, a voltagem que alimenta a fotodetectora e a velocidade de varredura (BIEHL, 2012).



**Figura 10:** Eixos de uma amostra e exemplo de corte óptico, demonstrando o resultado em uma imagem tridimensional (MORTARA, 2013).

Há uma técnica analítica muito útil chamada colocalização. É usada para investigar se duas moléculas ou estruturas estão compartilhando um mesmo espaço (BOLTE, CORDELIÈRES, 2006). Nesta técnica, observa-se a sobreposição das cores de ambas as estruturas formando uma terceira cor nas regiões de colocalização (BIEHL, 2012).

Além dos marcadores fluorescentes, outros elementos da amostra podem ser excitados e emitirem luz, sendo captados pela fotomultiplicadora, gerando uma fluorescência que não corresponde à desejada (BIEHL, 2012). A autofluorescência é um exemplo e ocorre naturalmente em muitos tipos de células. Em leveduras e em células vegetais, por exemplo, a fluorescência da clorofila ocorre no espectro vermelho. Além disso, alguns reagentes, como o fixador glutaraldeído, são fontes de autofluorescência. Ela pode ser evitada pelo uso de comprimentos de onda para excitação que está abaixo da faixa da autofluorescência natural (PADDOCK, 1999).

### 2.3.3 Aplicações

O microscópio confocal apresenta grande vantagem para o estudo de tecidos e células que necessitam de imagens que ilustrem grandes detalhamentos (BIEHL, 2012). Uma das principais vantagens da microscopia confocal é a sua capacidade de produzir imagens tridimensionais (3D) de diferentes objetos, sejam finos ou espessos. Outra vantagem é a possibilidade de observar um plano específico da amostra sem que seja necessário processar fisicamente o material em fatias finas, o que poderia destruir a estrutura original da amostra, gerando resíduos. Dessa forma, fatias ópticas (0,5 a 1,5 micrômetros) podem ser analisadas. Na área biológica, esse processamento exige a fixação da amostra, inviabilizando a observação de amostras frescas ou vivas. A microscopia confocal não necessita desse tipo de processamento, porque realiza cortes ópticos, causando danos mínimos a outras partes da amostra. Atualmente, a microscopia confocal é fortemente empregada na Biomedicina, sendo principalmente utilizada na sua vertente fluorescente e na indústria para inspeção de superfícies e camadas, além de medições de pequenas estruturas, onde é utilizada no modo de reflexão de campo claro (GOMES, SOUZA JR., 2010).

A utilização de técnicas de fluorescência em microscopia tem grande vantagem de permitir a marcação específica de moléculas e estruturas biológicas, fornecendo um método sensível para a observação de processos bioquímicos. Outras informações também podem ser avaliadas, como biofísico-químicas sobre os sistemas estudados, incluindo a cinética de reações, pH, oligomerização de biomoléculas, viscosidade e difusão, entre outros, em análise com células vivas. Porém, há algumas desvantagens desse equipamento, como a alta intensidade de radiação do laser sobre as amostras biológicas podem levar a danos que comprometerão a análise do material estudado. Além disso, o MC tem um alto custo, o que acaba limitando a aquisição desse em laboratórios (GOMES, SOUZA JR., 2010).

### 2.3.4 Preparação de amostras

A preparação para análise em microscópio confocal é bastante diferenciada, pois depende do tipo de amostra a ser analisada. Geralmente emprega-se um fixador, como glutaraldeído ou formaldeído tamponados.

Alguns cuidados durante a preparação são: a montagem da lâmina, com lamínula sobre a amostra; verificação da presença de autofluorescência na amostra com garantia de que o sinal procurado seja superior a essa autofluorescência. A escolha do fluorocromo deve levar

em consideração as linhas dos lasers e espelhos dicróicos disponíveis no equipamento. Também, para marcações duplas ou triplas, os fluoróforos devem ser excitados com linhas de lasers diferentes e os espectros de emissão devem ser bem separados e com o mínimo de sobreposição. Além disso, deve-se sempre preparar uma lâmina em que a amostra foi incubada somente com o anticorpo secundário (controle negativo), usando meio de montagem sem o corante fluorescente para núcleo (DAPI) (Centro de Microscopia Eletrônica, s.d.).

#### 2.4 CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAS HUMANAS DERIVADAS DE TECIDO ADIPOSEO (hADSC)

O tecido adiposo representa fonte abundante de células para transplantes autólogos, além de ser facilmente obtido por lipoaspiração, que é um método de menor custo e menos invasivo do que a punção da medula óssea. Neste tecido, há células progenitoras que residem entre adipócitos e são chamadas de células-tronco mesenquimais humanas derivadas de tecido adiposo, do inglês *human adipose-derived stem cells* (hADSC) (YARAK, OKAMOTO, 2010).

As análises comparativas das células-tronco derivadas do estroma da medula óssea (*bone marrow stromal cells* - BMSC), das hADSC e das células-tronco do cordão umbilical demonstraram que as hADSC não são diferentes quanto à morfologia e ao fenótipo imunológico, comparativamente às outras duas. Contudo, a frequência de hADSC no tecido adiposo excede à frequência de outras células-tronco mesenquimais. Além disso, a taxa de proliferação celular das hADSC é maior do que a das BMSC (YARAK, OKAMOTO, 2010).

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 CULTURA DE CÉLULAS

Foi utilizada a linhagem de hADSC (*human adipose-derived stem cells* ou células-tronco mesenquimais humanas derivadas de tecido adiposo ) PT-5006 obtida da LONZA-USA para cultura celular. As células obtidas foram preparadas, então, conforme Viera, 2013:

1. Descongelamento e ressuspensão em Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) suplementadas com 10% de soro fetal bovino (SFB);
2. Expansão para manutenção dos estoques no laboratório;
3. Armazenamento em ampolas de congelamento e preservação em nitrogênio líquido até serem novamente descongeladas para os experimentos.

Para a diferenciação adipogênica, as células semiconfluentes foram cultivadas em DMEM suplementado com 10% de SFB em coquetel adipogênico contendo 10  $\mu$ M de insulina, 1  $\mu$ M de dexametasona , 200  $\mu$ M de indometacina e 0,5  $\mu$ M de isometilbutilxantina (IBMX) por 21 dias (ZUK, ZHU et al. 2002). O tempo limite de diferenciação em 21 dias foi escolhido devido à grande quantidade de GLC observadas nas células por microscopia óptica.

A diferenciação foi acompanhada por observação diária em microscópio de contraste de fase e pela coloração das gotas lipídicas citoplasmáticas com utilização do corante *Oil Red O*.

#### 3.2 PREPARAÇÃO DE AMOSTRAS PARA MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (MET)

Para a análise ultraestrutural, foram utilizadas culturas indiferenciadas e induzidas para diferenciação, com 70% a 80% de confluência. As células foram tripsinizadas e após, os *pellets* obtidos foram ressuspensos na densidade de aproximadamente 10<sup>6</sup> células/mL para os processos de fixação (PETERS, HUNZIKER, 2001).

A seguir, as células foram preparadas conforme descrito por Karnovsky (1965):

1. Fixação em paraformaldeído 8%, glutaraldeído 2,5% em tampão fosfato 0,1M pH-7,4 por um período mínimo de 4 horas em temperatura ambiente;
2. Pós-fixação em tetróxido de ósmio 1% tamponado;
3. Desidratação em séries ascendentes de acetona (30%, 50%, 70%, 90% e 100%);

4. Pré-embebição, onde o pellet celular foi submetido a misturas de 25%, 50% e 75% entre resina epóxi (Araldite Durcupan ACM-Fluka) e acetona 100%;
5. Inclusão dos pellets feita com resina pura dentro de tubos tipo eppendorf em estufa 60°C durante 72 horas para polimerização;
6. Cortes obtidos com 100nm de espessura por ultramicrotomia e depositados em grades de cobre com 300 mesh;
7. Contrastação dos cortes com acetato de uranila aquosa 2% e citrato de chumbo (REYNOLDS, 1963).

As análises foram realizadas no Centro de Microscopia Eletrônica da UFRGS (CME-UFRGS) em microscópio eletrônico de transmissão JEM 1200 EX II, Jeol.

### 3.3 PREPARAÇÃO DE AMOSTRAS PARA MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

Para as análises por microscopia eletrônica de varredura (MEV) as células foram cultivadas e tratadas para diferenciação sobre lamínulas de vidro redondas de 13 mm de diâmetro em placas de cultivo. A preparação para MEV seguiu os passos abaixo, conforme protocolo cedido pelo Centro de Microscopia Eletrônica da UFRGS:

1. Fixação: em glutaraldeído 2,5%, tampão Fosfato 0,2M e H<sub>2</sub>O destilada. A solução fixadora continha volumes de 1,2ml, 5,0ml e 3,8ml, respectivamente;
2. Lavagem: 3 lavagens com duração de 30min cada uma, contendo tampão fosfato 0,2M e H<sub>2</sub>O destilada na proporção de 1:1;
3. Desidratação, conforme a ordem, concentração do desidratante e tempo mostrados a seguir:

**Tabela 1:** Etapas do processo de desidratação para preparação de amostras para análise em microscopia eletrônica de varredura:

<b>Desidratante</b>	<b>Concentração</b>	<b>Tempo</b>
Acetona	30%	10 min
Acetona	50%	10 min
Acetona	70%	10 min
Acetona	90%	10 min
Acetona	90%	20 min
Acetona	100%	10 min
Acetona	100%	20 min

4. Dessecação em equipamento Ponto Crítico, modelo *Critical Point Dryer* da BAL-ZERS CPD030;
5. Montagem: colocação das lamínulas em suportes (*stubs*) para o microscópio;
6. Metalização: recobrimento do material com uma fina camada de ouro, em equipamento modelo SPUTTER COATER da BAL-ZERS SCD050, no Centro de Microscopia Eletrônica da UFRGS realizada pelo técnico responsável.

As análises foram realizadas no Centro de Microscopia Eletrônica da UFRGS (CME-UFRGS) em microscópio eletrônico de varredura JSM 6060, Jeol.

### 3.4 PREPARAÇÃO DE AMOSTRAS PARA MICROSCOPIA CONFOCAL

As células foram semeadas sobre lamínulas, fixadas com 4% de paraformaldeído tamponado, permeabilizadas com 0,3% de SDS (dodecil sulfato de sódio), bloqueadas com 1% de soro albumina. As incubações com os anticorpos foram feitas sempre na presença do bloqueador.

Foram utilizados anticorpos para revelar proteínas e lipídios presentes na membrana plasmática e na hemimembrana que envolve a gota lipídica. Sendo eles, anti-ecto -5' - nucleotidase; anti-gangliosídeos: -GD2, -GM1 e -GM3.

O conteúdo das gotas lipídicas citoplasmáticas foi visualizado pela coloração dos triglicerídeos com Oil Red O. Como anticorpos secundários foram utilizados anti IGg conjugados com Alexa flúor 405, 488 ou 555.

As análises foram realizadas no Centro de Microscopia Eletrônica da UFRGS (CME-UFRGS) em microscópio confocal modelo *FluoView<sup>TM</sup>* FV10000 (Olympus® Inc. Tóquio, Japão), onde se reconstruiu tridimensionalmente as seções de varreduras no eixo Z. A análise e processamento das imagens foram feitas utilizando-se o software Olympus Fluoview v.4 ou o software livre ImageJ (NIH; [HTTP://rsb.info.nih.gov/ij](http://rsb.info.nih.gov/ij)).

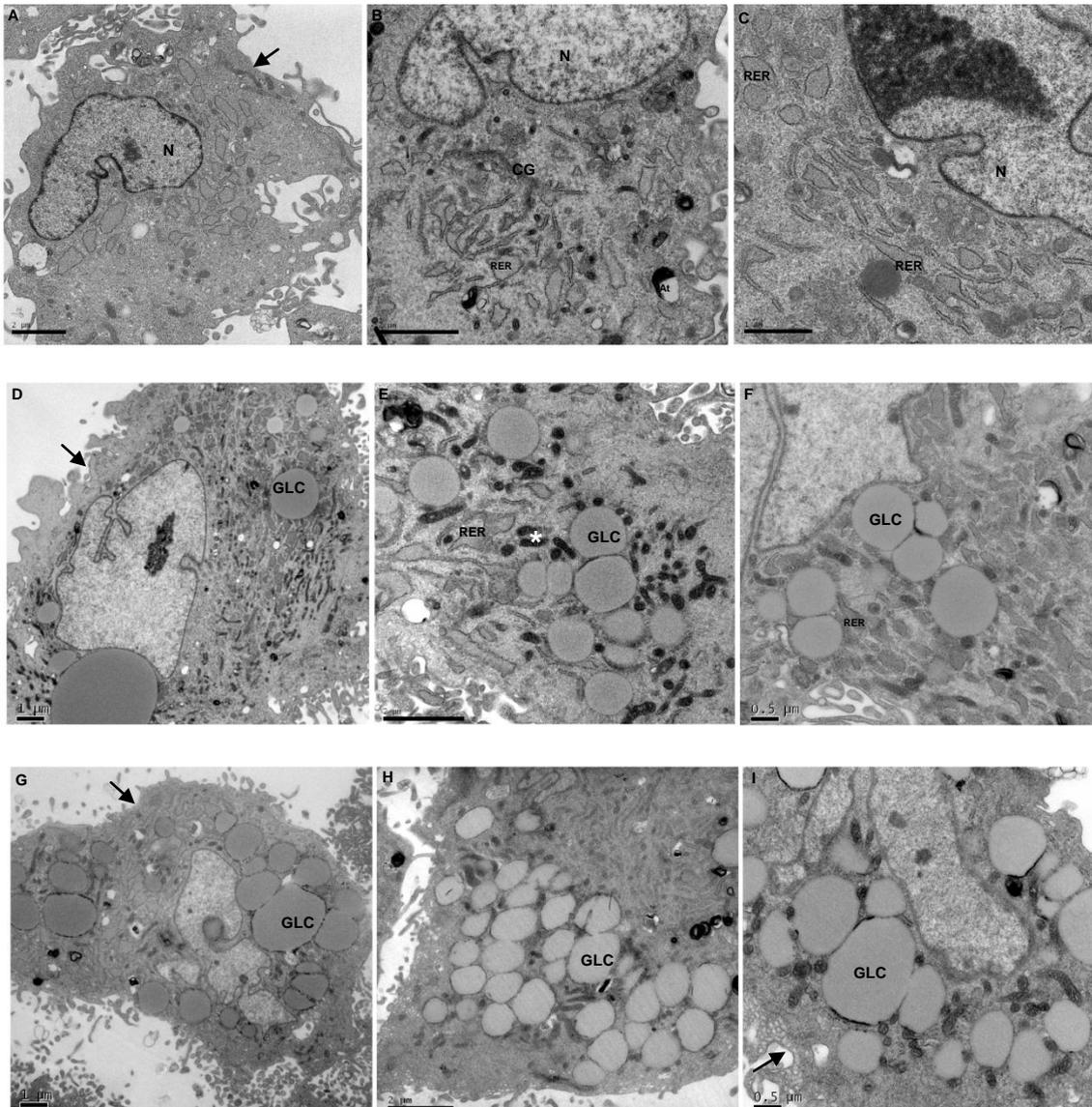
## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 ANÁLISE POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (MET)

Essa técnica permite analisar a amostra em seu interior, conforme os cortes ultrafinos realizados durante a preparação. A grande vantagem é o aumento com boa definição no qual o MET tem potencial para alcançar. No caso dessas imagens, chegou-se a um aumento de 50000x com uma escala nanométrica. Assim, podem-se observar várias estruturas subcelulares como núcleo, retículo endoplasmático, retículo endoplasmático rugoso, complexo de Golgi, gotas lipídicas, mitocôndrias e a membrana plasmática com especializações como as cavéolas.

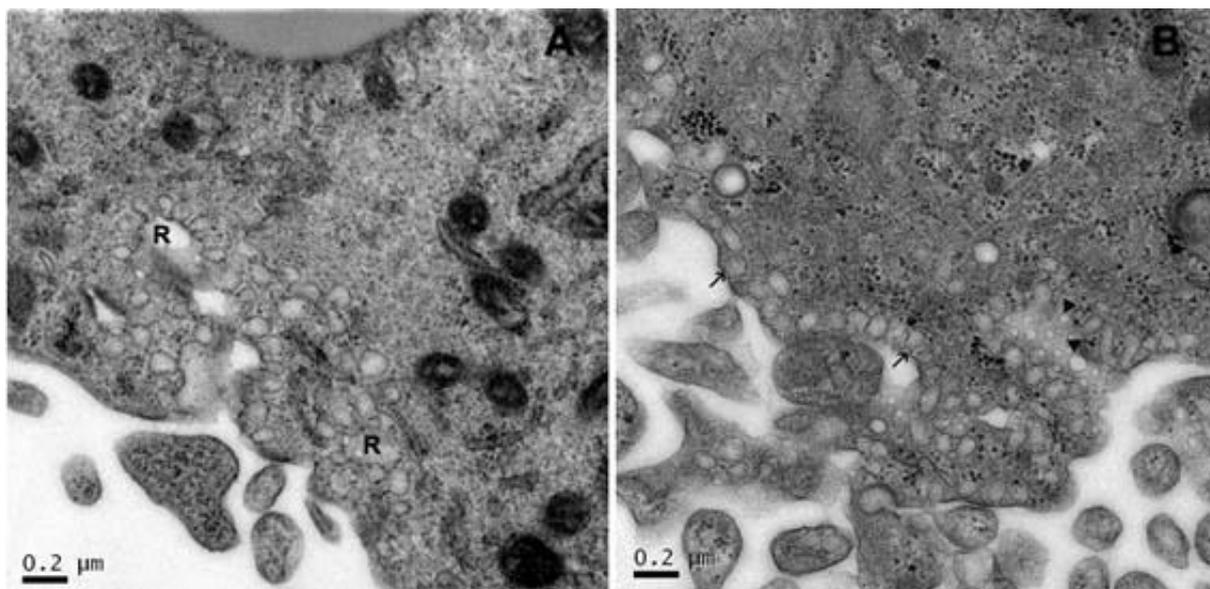
Conforme **Figura 11**, é possível fazer um levantamento qualitativo e quantitativo das amostras. Neste caso, observa-se que as hADSC indiferenciadas apresentam o citoplasma compacto, com baixa diversidade de organelas celulares, onde retículo endoplasmático rugoso (RER) aparece em forma de cisternas bem desenvolvidas, as mitocôndrias apresentam-se pequenas, observando-se ainda vacúolos autofágicos ou autofagossomos no citoplasma de algumas células (VIEIRA, 2013).

As hADSC tratadas com o coquetel de diferenciação adipogênica por 7 e 21 dias apresentaram características muito diferentes das células indiferenciadas. Essas células passam a apresentar numerosas gotas lipídicas citoplasmáticas de diferentes tamanhos e o citoplasma aparece com diversidade de organelas (**Figura 11**) (VIEIRA, 2013).



**Figura 11:** A, B e C: hADSC indiferenciadas. D, E e F: hADSC diferenciadas de 7 dias. G, H e I: hADSC diferenciadas de 21 dias. A -10000x; B - 15000x; C - 25000x- D - 10000x; E - 15000x; F - 20000x; G - 10000x; H-12.000x; I-20000x. Retículo Endoplasmático Rugoso (RER); Retículo Endoplasmático Liso (REL); Autofagossomos (At); Núcleo(N); Complexo de Golgi (G); Gotas lipídicas (GLC); Mitocôndrias (asteriscos); Membrana Plasmática (setas). Análise em JEM 1200 EX II, Jeol (VIEIRA, 2013).

Comparando-se as hADSC de 7 dias com as hADSC de 21 dias, observa-se hADSC de 7 dias com gotas lipídicas citoplasmáticas menores e distribuídas próximas da membrana plasmática, associadas umas as outras ou individualizadas. Já as de 21 dias, apresentam GLC maiores e mais perinucleares, aparecendo associadas umas as outras ou como uma grande gota lipídica. Nessas células também foi possível observar um aumento significativo do número de mitocôndrias e de RER associados com as GLC, conforme vai ocorrendo a diferenciação celular (**Figura 11**) (VIEIRA, 2013).



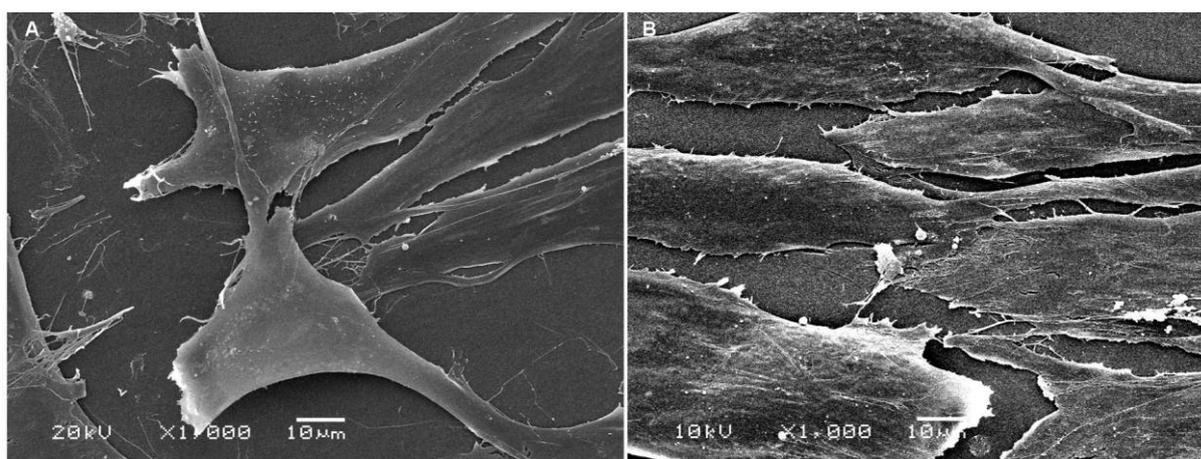
**Figura 12:** hADSC submetidas ao meio de diferenciação adipogênica por 7 dias (A) e 21 dias (B). A: 50000x, membrana plasmática contendo cavéolas, invaginações de membrana formando estrutura tipo roseta (R); B: 50000x, membrana plasmática contendo cavéolas (setas); cavéolas cortadas perpendiculares ao plano de corte (ponta de seta). Análise em JEM 1200 EX II, Jeol (VIEIRA, 2013).

Nesse modelo amostral, sabe-se que as cavéolas aumentam na membrana plasmática na medida em que ocorre a diferenciação celular. E em 21 dias de diferenciação ocorreu um aumento de invaginações tridimensionais da membrana plasmática, que formam estruturas semelhantes a “rosetas” (NOVIKOFF, NOVIKOFF et al., 1980 *apud* VIEIRA, 2013). Ao serem analisadas em microscópio eletrônico de transmissão, as cavéolas aparecem como invaginações similares a uma “taça” e é possível observar o perfil circular da superfície da cavéola, quando cortadas transversalmente (**Figura 12**) (VIEIRA, 2013).

As potencialidades desse microscópio perpassam na capacidade do exame em grande aumento, com detalhes ultraestruturais, podendo-se realizar inúmeras observações, como a composição da membrana celular, do citoplasma; análise das estruturas celulares, medindo-as, observando suas localizações, relações com outras estruturas; relações célula-célula; comparação de cortes transversais e longitudinais da mesma estrutura celular, etc.. No caso das hADSC, foi fundamental a realização da análise em MET, pois foi possível fazer relações e distinções entre as células indiferenciadas, as diferenciadas de 7 dias e 21 dias. Sem uma observação do número e diversidade das estruturas celulares nessas três etapas do desenvolvimento, não se conseguiria fazer deduções como a demanda energética da célula, capacidade de síntese proteica, necessidade de renovação do conteúdo citoplasmático, entre outros, que só podem ser inferidas através de um olhar minucioso do interior celular.

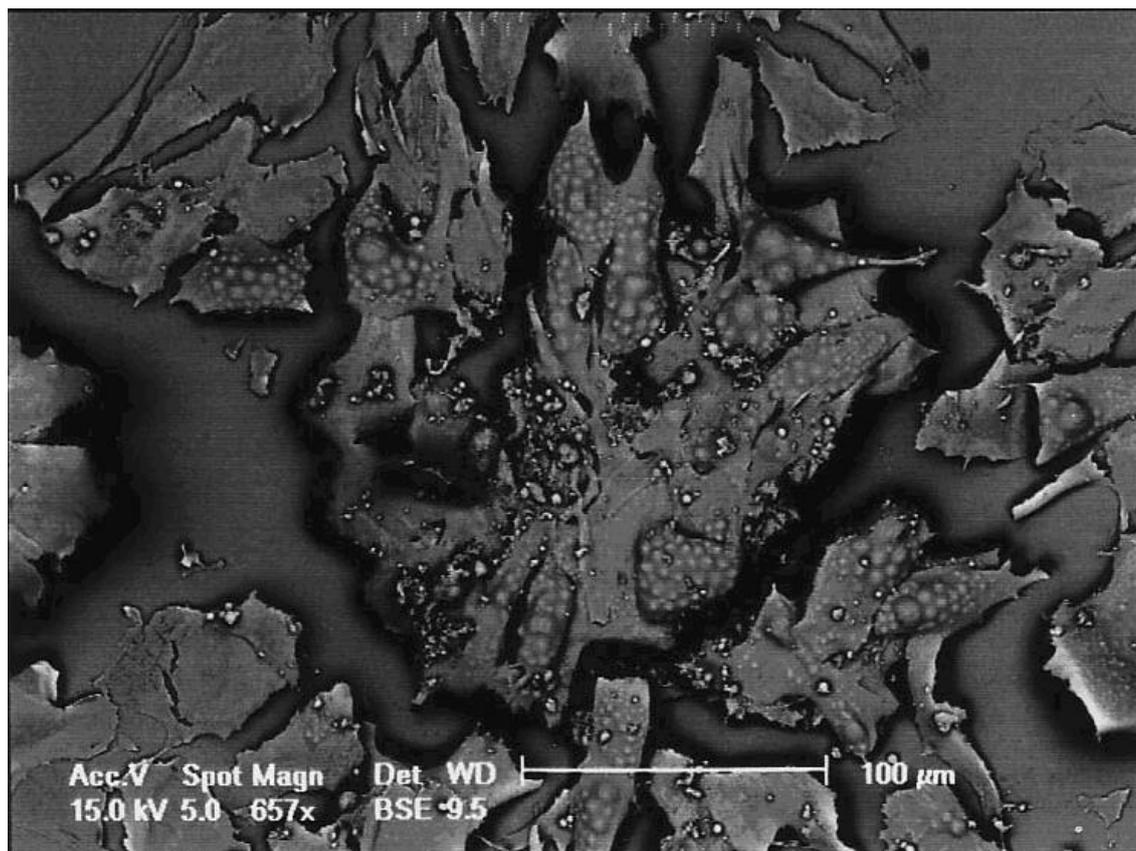
## 4.2 ANÁLISE POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

A análise em MEV evidencia a superfície celular. Nele tem-se grande profundidade de foco, onde a morfologia fica evidente. Ele é capaz de realizar maiores aumentos que o microscópio confocal, mas menores que o microscópio eletrônico de transmissão. Conforme já mencionado na seção “Referencial Teórico”, elétrons secundários e retroespalhados são diferentes tipos de interações entre o feixe primário e a amostra. Os elétrons secundários são de baixa energia (<50eV), e formam imagens com alta resolução (3-5 nm). Os elétrons retroespalhados são resultantes de uma simples colisão elástica e provêm de camadas mais superficiais da amostra. Sua energia varia entre 50eV até o valor da energia do elétron primário. A imagem gerada por esses elétrons fornece diferentes informações em relação ao contraste que apresentam, resultando em informações de topografia (contraste em função do relevo).



**Figura 13: A e B:** hADSC indiferenciada e hADSC diferenciadas por 7 dias, respectivamente. Detecção de elétrons secundários (SE). **A e B**-1000x. Análise em JSM 6060, Jeol.

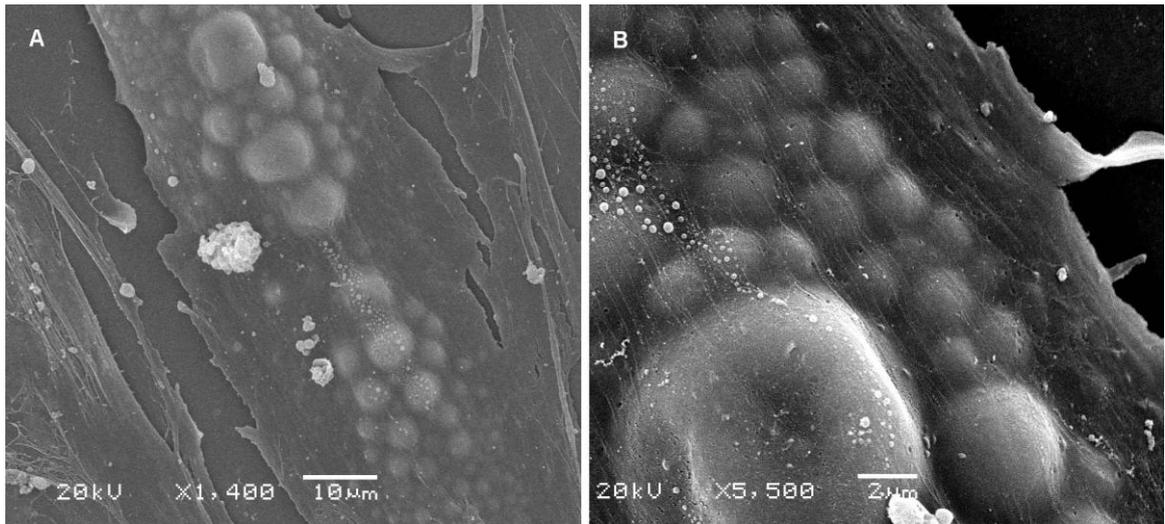
Na **Figura 13**, observa-se a morfologia das hADSC indiferenciadas e após serem submetidas ao meio de diferenciação adipogênica por 21 dias. As células indiferenciadas apresentam aspecto fibroblástico, enquanto as diferenciadas têm morfologia mais arredondada e poligonal. Observa-se tanto em **A** quanto em **B** da figura, prolongamentos da membrana plasmática.



**Figura 14:** hADSC diferenciadas de 21 dias. Detecção de elétrons retroespalhados (BSE). 657x. Análise em JSM 5800, Jeol.

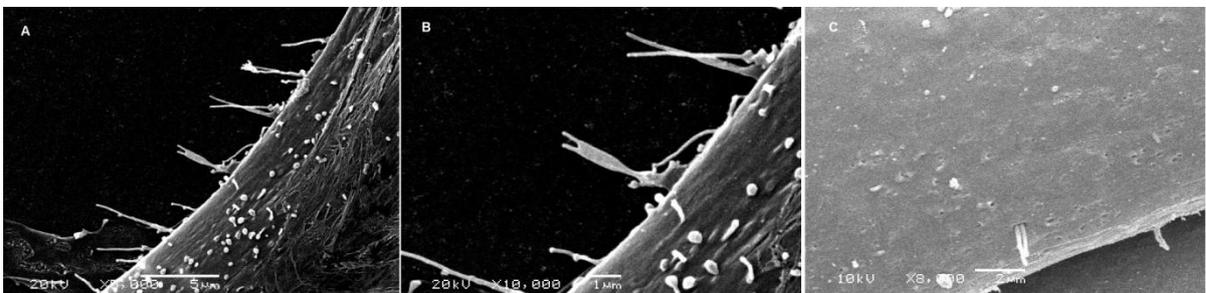
A **Figura 14** apresenta a distribuição das células hADSC diferenciadas de 21 dias, bem como sua morfologia, reforçando o que foi constatado na **Figura 13** a respeito do aspecto poligonal das células em diferenciação. Nestes pré-adipócitos ficam evidentes as GLC, estruturas arredondadas e em relevo presentes em grande quantidade no interior das células.

Um importante dado levantado ao longo das análises foi a projeção das GLC sob a membrana plasmática nas células diferenciadas por 21 dias. As GLC apresentam tamanho maior do que 5 μm (**Figura 15**) e aparecem com clareza na membrana plasmática (detalhe **B**).



**Figura 15:** hADSC diferenciadas em 21 dias, com detalhes nas gotas lipídicas citoplasmáticas (GLC). Detecção de elétrons secundários (SE). **A-** 1400x; **B-** 5500x. Análise em JSM 6060, Jeol.

Na **Figura 16**, observa-se evidentes prolongamentos da membrana plasmática distribuídos ao longo de toda a membrana (**A** e **B**) e o detalhe **C** evidencia a projeção para o meio exterior da célula.



**Figura 16:** hADSC diferenciadas de 21 dias., com detalhes nos prolongamentos de membrana plasmática. Detecção de elétrons secundários (SE). **A-** 5000x; **B-** 10000x; **C-** 8000x. Análise em JSM 6060, Jeol.

Durante as análises foram feitos alguns testes para demonstrar as potencialidades do MEV. Por exemplo, na **Figura 16 A** e **B** utilizou-se pouco brilho e muito contraste para capturar a imagem. Isso resultou em pontos muito escuros ou muito claros da célula, bastante benéfico quando pretende-se dar destaque à alguma estrutura, que no caso eram os prolongamentos de membrana. O contraste veio como uma ferramenta para ressaltá-los.

Outro teste foi a utilização da voltagem em 20kV. Geralmente não se utiliza voltagens muito altas para material orgânico, contudo foi possível ver que nesse caso, as imagens ficaram com maior resolução em 20kV (em comparação a utilização de 10kV) e as amostras

não sofreram deterioração (demonstradas na **Figura 13** e **16**). No entanto, é importante sempre ter cuidado ao alterar a voltagem. Pode-se utilizar uma amostra para teste e verificar se sua estrutura permanece inalterada. Além disso, é importante a amostra estar metalizada corretamente antes de fazer a alteração, bem como certificar-se de que o aumento da voltagem não resultará em contaminação da coluna do microscópio.

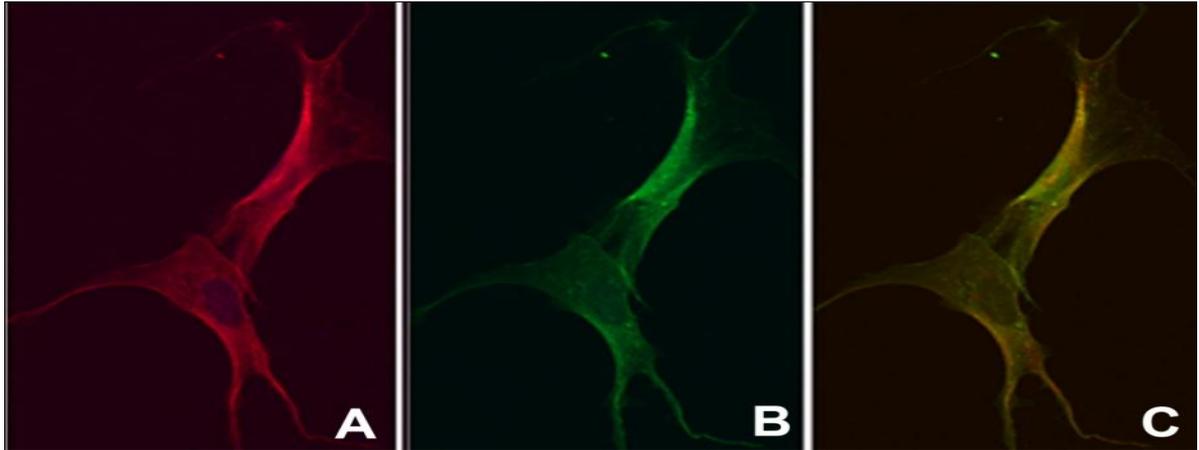
Todas as imagens de MEV foram registradas por detecção em elétrons secundários. Contudo, na **Figura 14** foi utilizada a detecção por elétrons retroespalhados (BSE) para obtenção de informações diferenciadas (como topografia), além de ser uma forma de teste das potencialidades do microscópio. Como se pode observar nessa figura, a imagem contém maiores detalhes do relevo da amostra em comparação às outras imagens, deixando bastante clara a distribuição das gotas lipídicas. Cada tipo de detecção é realizada conforme a presença do detector correspondente no MEV a ser utilizado.

Na **Figura 15B**, foi alterado o ângulo da amostra. Percebe-se que a imagem não é visualizada de topo (como em **A**), mas sim na lateral. Esse teste tornou-se importante para visualizar as gotas lipídicas e suas dimensões.

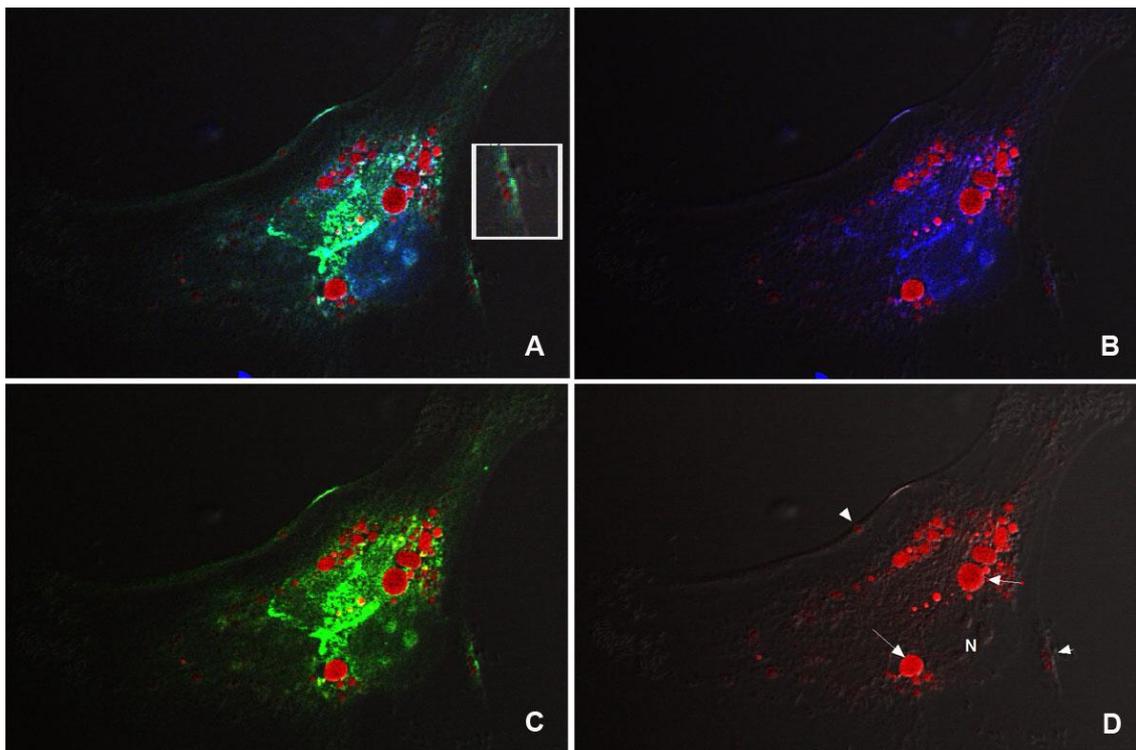
A microscopia eletrônica de varredura demonstrou ser uma técnica proveitosa para este tipo de amostra, apesar de limitar a análise à superfície externa da membrana celular. Apesar das restrições da técnica de MEV, é importante visualizar um objeto de estudo sob diferentes técnicas e equipamentos, pois em algum deles se pode encontrar novidades para a ciência.

#### 4.3 ANÁLISE POR MICROSCOPIA CONFOCAL (MC)

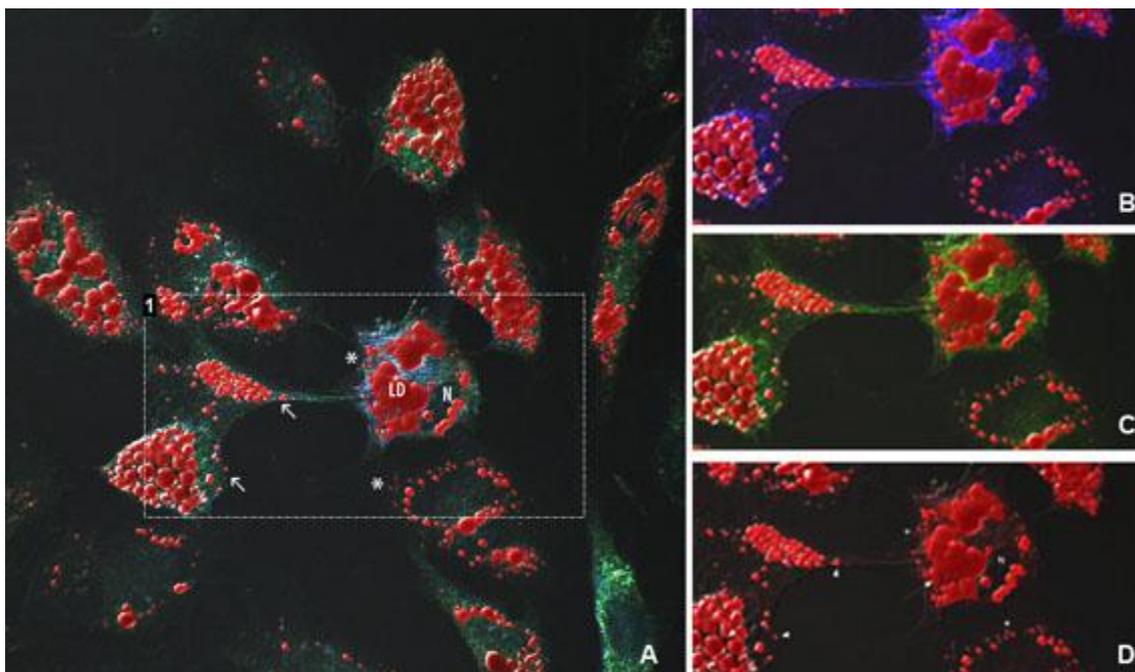
As **Figuras 17, 18 e 19** mostram hADSCs indiferenciadas e induzidas à diferenciação adipogênica por 7 ou 21 dias respectivamente.



**Figura 17:** hADSC indiferenciadas – **A:** anti-GD2, anticorpo secundário conjugado a Alexa Fluor 555; **B:** anti-GM1, anticorpo secundário conjugado a Alexa Fluor 488; **C:** sobreposição de **A** e **B**. 600x. Análise em microscópio Olympus FV1000 e processadas no software Fluo View FV1000, Olympus (TERRA, 2010).

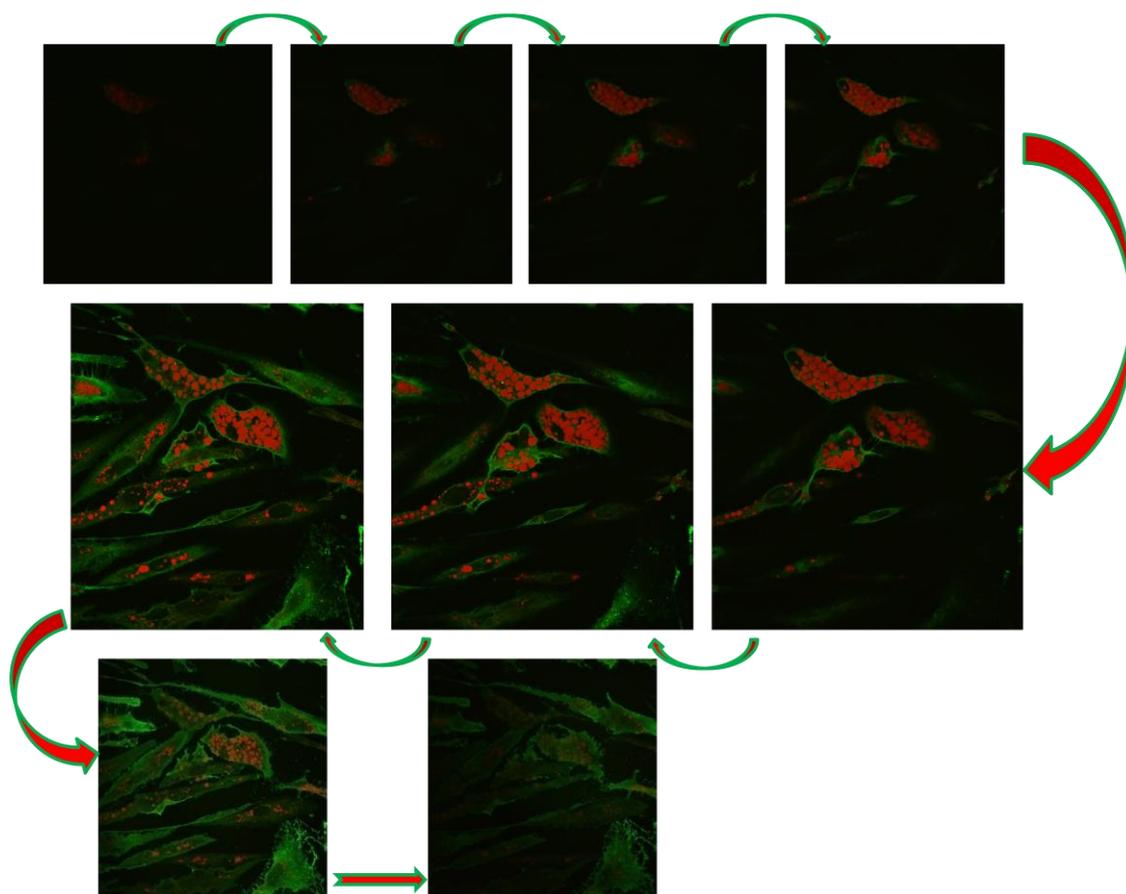


**Figura 18:** hADSC, pré-adipócitos, 7 dias de indução. **A, B, C e D:** triglicerídeos (TG), nas GLCs, corados com Oil Red O. **B)** Anticorpos para a Ecto-5'-nucleotidase, secundário Alexa Fluor 405; **C)** Anticorpo para o gangliosídeo GM3, secundário Alexa Fluor 488; **D)** Contraste diferencial de interferência (DIC), evidenciando as GLCs; **A)** A sobreposição de todas as marcações (Merged), no detalhe nota-se GLC em formação na membrana plasmática. N: núcleo. 600x. Análise em microscópio Olympus FV1000 e processadas no software Fluo View FV1000, Olympus (TERRA et al, 2010).



**Figura 19:** hADSCs, pré-adipócitos, 21 dias de indução. **A, B, C e D:** triglicerídeos (TG), nas GLCs, corados com Oil Red O. **B)** Anticorpos para a Ecto-5'-nucleotidase, secundário Alexa Fluor 405; **C)** Anticorpo para o gangliosídeo GM3, secundário Alexa Fluor 488; **D)** Contraste diferencial de interferência (DIC), evidenciando as GLCs; **A)** A sobreposição de todas as marcações (Merged), no detalhe nota-se GLC na região perinuclear. N, núcleo; LD, gota lipídica; setas mostram GLC em formação na membrana plasmática; asteriscos indicam pequenas GLCs. 600x. Análise em microscópio Olympus FV1000 e processadas no software Fluo View FV1000, Olympus (TERRA et al, 2010).

A morfologia fibroblastóide das hADSC indiferenciadas é mostrada na **Figura 17** revelada pela marcação dos gangliosídeos GD2 e GM1, componentes da membrana plasmática. A alteração morfológica que acontece durante a diferenciação adipogênica fica evidente na **Figura 19**, onde as células apresentam forma poligonal com GLC grandes e perinucleares. Na **Figura 18**, células no início da diferenciação apresentam GLC menores. As imagens também mostram a formação de GLC na membrana plasmática (detalhe **Figura 18A**), onde pequenas gotas de triglicerídeos aparecem circundadas pelos marcadores de membrana GM3 e ecto-5'-nucleotidase. A **Figura 18A** também demonstra a técnica de colocalização, onde há a sobreposição de diferentes marcações. Assim, a fluorescência de cada uma soma-se, resultando na emissão de uma terceira cor.



**Figura 20:** Varredura no eixo Z . Pré-adipócitos hADSC, onde os triglicerídeos das GLC foram corados com Oil Red O (vermelho) e a membrana plasmática revelada pela imunomarcagem do gangliosídeo GM1 (em verde). Nove secções confocais de  $0,7 \mu\text{m}$  foram tomadas paralelas a lamínula (plano  $xy$ ) com uma objetiva 60x, imersão a óleo (abertura numérica 1,35, Olympus, UPLSAAPO 60xO). Análise em microscópio Olympus FV1000 e processadas no software Fluo View FV1000, Olympus (Arquivos da professora Fátima Guma).

Na **Figura 20**, pode-se observar uma ferramenta da microscopia confocal que é a varredura em Z, ou seja, a varredura ocorre em planos de um seccionamento óptico ao longo da altura da amostra. Assim, consegue-se ter uma aquisição sequencial das imagens dos diferentes planos, o que pode ser muito útil para a pesquisa científica, pois “corta” a imagem sem precisar realizar cortes físicos no material. Dessa forma, amostras *in vivo* podem ser observadas através de cortes ópticos. Além disso, essa técnica permite avaliar as células desde sua superfície até seu interior. Como se pode observar na sequência da imagem, quanto mais no interior da célula, mais fica evidente as propriedades específicas da hADSC. No caso, a membrana celular, revelada pela presença do gangliosídeo GM1, está corada em verde, pois o fluoróforo conjugada ao anticorpo secundário foi o Alexa Fluor 488. Também observa-se que as células estão repletas de gotas lipídicas, já que os triglicerídeos foram corados com *Oil Red*

*O* que tem afinidade por lipídios neutros. Esta coloração pode ser observada na análise em luz transmitida (visível- DIC), mas também emite fluorescência vermelha.



**Figura 21:** Reconstrução tridimensional da varredura em Z da **Figura 20** (Arquivos da professora Fátima Guma).

A **Figura 21**, demonstra alguns recursos do software do microscópio confocal. Com ele, pode-se fazer uma reconstrução da imagem em todos os seus eixos: X, Y e Z. Logo, tem-se uma imagem 3D. Isso possibilita a análise da amostra sob vários pontos de vista.

Outro recurso é a inclinação da imagem, que permite considerar um plano focal por diferentes ângulos. Assim, pode-se analisar dados como espessura da membrana ou gotas lipídicas, estruturas transmembranas, entre outros. Por último, temos o recurso do zoom, que permite explorar o interior celular com maiores detalhes. A imagem fica restrita a um só plano bem definido.

O MC demonstrou ser uma excelente ferramenta para análise deste tipo amostral. Há uma variedade de técnicas que podem ser feitas, resultando em diferentes dados para a pesquisa. A análise multidimensional, o uso célula *in vivo*, marcação dos principais objetos de pesquisa (como as gotas lipídicas citoplasmáticas), cortes ópticos, colocação de estruturas, etc., foram importantes para explorar as hADSC indiferenciadas e diferenciadas.

## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

É evidente que o desenvolvimento da ciência se dá em paralelo ao desenvolvimento da tecnologia. Equipamentos como os apresentados neste trabalho foram criados devido à incessante procura de explicações. Nesse contexto, os microscópios eletrônicos de transmissão, varredura e o microscópio confocal entram como importantes ferramentas de trabalho na área das ciências biológicas.

A microscopia eletrônica de transmissão é excelente para a análise intracelular, seja ela de origem animal ou vegetal. Essa técnica permite observar a morfologia das estruturas, sua disposição na célula, sua diversidade e quantidade. Essa técnica pode ser útil também para analisar elementos na membrana celular, uma vez que sejam feitos cortes na membrana, expondo várias faces da mesma. Por esses motivos, o MET é muito apropriado à pesquisa nas áreas biológicas, pois realiza grandes aumentos e permite efetuar análises internas. O ponto negativo é a preparação de amostras, que exige muito cuidado, como já descrito.

O microscópio eletrônico de varredura demonstrou ser uma técnica favorável para a análise do modelo celular utilizado. Com ele, dados diferentes dos que foram apontados nas análises em MET e MC puderam ser explorados, tais como prolongamentos de membrana. Outros modelos amostrais como pequenos insetos, partes do corpo de animais (como dentes, pêlos, patas, órgãos genitais, etc.) podem ser bem exploradas em MEV, já que suas características morfológicas ficam bem nítidas.

Ambos os microscópios (MET e MEV) emitem elétrons para gerar imagens das amostras, contudo, o primeiro cria uma imagem a partir dos elétrons que atravessam a amostra e o segundo, através dos elétrons que são refletidos e captados por um detector. Em microscopia confocal, não há emissão de elétrons, mas sim, há lasers para interagir com a amostra. Essa característica torna o MC um equipamento muito útil às ciências biológicas, uma vez que os ensaios podem ser realizados *in vivo*, com a vantagem de obtenção da imagem em 3D. Pode-se explorar a membrana, o interior celular, marcar estruturas, medi-las, contá-las, observar aspectos morfológicos das estruturas, sua interação com outras moléculas, entre outros. É realmente uma ferramenta que pode ser bem explorada pelas ciências biológicas. Contudo, dependendo do material amostral, as técnicas de MET ou MEV podem ser mais interessantes, pois em ambos a morfologia do material tende a ficar mais evidente devido ao poder de resolução e aumento. Além disso, é importante ter atenção para os efeitos que o microscópio pode causar sobre a amostra, sejam eles a aceleração dos elétrons ou a intensidade da radiação do laser.

Ao iniciar um projeto de pesquisa, o primeiro passo é traçar “o que” será analisado especificamente no objeto de estudo e assim reconhecer qual equipamento mais terá potencial para contribuir com a pesquisa. O segundo passo é analisar se a amostra suportará o processo de preparação e o processo de análise para cada equipamento escolhido. Além disso, verificar a disponibilidade de materiais como fixadores, desidratantes, anticorpos, fluoróforos, entre outros compatíveis com o material amostral devem ser identificados com antecedência, pois dependendo, estes recursos podem ter altos custos e não serem encontrados com tanta facilidade.

## REFERÊNCIAS

ALBERTS, Bruce; BRAY, Dennis; LEWIS, Julian. **Biologia Molecular da Célula**. Tradução por Jocelei Chies, Gaby Renard. Porto Alegre: ARTMED, 2009.

ATTIAS, Márcia. Desidratação, Inclusão, Ultramicrotomia e Contrastação. In: SOUZA, Wanderley de. (Editor). **Técnicas de Microscopia Eletrônica Aplicadas às Ciências Biológicas**. Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Microscopia, 2007. pp. 30-46.

ATTIAS, Márcia. Reconstrução Tridimensional a Partir de cortes seriados. In: SOUZA, Wanderley de (Editor). **Técnicas básicas de microscopia eletrônica aplicadas às ciências biológicas**. Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Microscopia, 1998, pp.154-160.

BIEHL, Henrique Beck. **Implantação de técnicas para avaliação da dinâmica mitocondrial por microscopia confocal no Centro de Microscopia Eletrônica da UFRGS**. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2012. 27 f. Trabalho de conclusão de graduação - Ciências Biológicas, Porto Alegre, 2012. Disponível em <<http://hdl.handle.net/10183/54442>> Acesso em: 4 set. 2013.

BOLTE, S.; CORDELIÈRES, F. P. A guides tour into subcellular analysis in light microscopy. **Journal of Microscopy**, França, v. 224, pp. 213-232, dez. 2006.

BOZZOLA, John J.; RUSSEL, Bonnie D. **Electron Microscopy: principles and techniques for biologists**. Sudbury: Jones and Barlett, 1999.

CENTRO de Microscopia Eletrônica da UFRGS. **Microscópio Confocal**. Roteiro. Porto Alegre, s.d. Disponível em <[http://www.ufrgs.br/cme/wa\\_files/roteiro\\_basico.pdf](http://www.ufrgs.br/cme/wa_files/roteiro_basico.pdf)> Acesso em: 12 out. 2013.

DE GRAEF, Marc. **Introduction to Conventional Transmission Electron Microscopy**. Cambridge: Cambridge University Press, 2003.

DEDAVID, Berenice Anina; GOMES, Carmem Isse; MACHADO, Giovanna. **Microscopia eletrônica de varredura: aplicações e preparação de amostras: materiais poliméricos, metálicos e semicondutores**. Porto Alegre: EDIPUCRS, 2007.

GALLETI, Silvia Regina. Introdução à microscopia eletrônica. **Biológico**, São Paulo, v.65, n.1/2, pp.33-35, jan./dez. 2003.

GOLDSTEIN, Joseph I. et al. **Scanning electron microscopy and x-ray microanalysis: a text for biologists, material scientists, and geologists**. New York: Plenum, 1992.

GOMES, Andre Marco de Oliveira; SOUZA JR., Ivanildo Pedro de. Microscopia Confocal e Multifotônica – Princípios e Aplicações. In: SOUZA, Wanderley de. **Microscopia Óptica: fundamentos e aplicações às Ciências Biomédicas**. Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Microscopia e Microanálise, 2010, pp. 113-128.

GRIMSTONE, Albert Victor. **O Microscópio Eletrônico em Biologia**. Editora Pedagógica e Universidade Ltda; Editora da Universidade de São Paulo: São Paulo, 1980.

HALL, Cecil E. **Introduction to electron Microscopy**. New York: McGraw-Hill, 1953.

HAYAT, M.A. **Principles and Techniques of Electron Microscopy**: biological applications. Cambridge: Cambridge University Press, 2000.

KARNOVSKY, Morris J. . A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. **Journal of Cell Biology**, Boston, v. 27, pp. 137A-138A. 1965.

KESTENBACH, Hans-Jürgen.; BOTTA FILHO, Walter José. **Microscopia Eletrônica: Transmissão e Varredura**. São Paulo: Associação Brasileira de Metais, 1989.

MACHADO, Raul D; SOUZA, Wanderley. Desidratação, Inclusão, Ultramicrotomia e Contrastação. In: SOUZA, Wanderlei de (Editor). **Técnicas básicas de microscopia eletrônica aplicadas às ciências biológicas**. Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Microscopia, 1998, pp.22-28.

MALISKA, Ana Maria. **Microscopia eletrônica de varredura**. Universidade Federal de Santa Catarina, Laboratório de caracterização microestrutural e análise de imagens. Apostila. Disponível em <[http://www.materiais.ufsc.br/lcm/web-MEV/MEV\\_Apostila.pdf](http://www.materiais.ufsc.br/lcm/web-MEV/MEV_Apostila.pdf)> Acesso em: 19 de set. 2013.

MOLLRING, Friedrich Karl. **La microscopía desde el principio**. Oberkochen, Carl Zeiss, 1970.

MORTARA, Renato Arruda. **Princípio da microscopia confocal**. Universidade Federal de São Paulo. Aula. 2013. Disponível em <<http://www.ecb.epm.br/~ramortara/confocal/Aulas/CONFOCAL.pdf>>. Acesso em: 4 out. 2013.

PADDOCK, Stephen W. An Introduction to Confocal Imaging. In: PADDOCK, Stephen W. (Editor). **Confocal Microscopy: Methods and Protocols**. New Jersey: Humana Press, 1999. Série: Methods in Molecular Biology. vol 122, pp. 1-34.

PETERS, Peter J.; HUNZIKER, Walter. Subcellular localization of Rab17 by cryo-immunogold electron microscopy in epithelial cells grown on polycarbonate filters. **Methods in Enzymology**. Amsterdam, v. 329, pp. 210-225, 02/2001.

REYNOLDS, E. S..The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. **J Cell Biol**, Boston, v. 17, pp. 208-212, abril. 1963.

SESSO, Antonio. Fixação de sistemas biológicos. In: SOUZA, Wanderlei de (Editor). **Técnicas básicas de microscopia eletrônica aplicadas às ciências biológicas**. Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Microscopia, 1998, pp.1-17.

SILVEIRA, Marina. Preparo de Amostras Biológicas para Microscopia Eletrônica de Varredura. In: SOUZA, Wanderlei de (Editor). **Técnicas básicas de microscopia eletrônica aplicadas às ciências biológicas**. Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Microscopia, 1998, pp.33-44.

TERRA, Silvia Resende. **Expressão do gangliosídeo GD2 nas células tronco mesenquimais de tecido adiposo humano durante a diferenciação para adipócitos ou osteoblastos.** Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2010. 64f. Dissertação de Mestrado-Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica, Porto Alegre, 2010. Disponível em < <http://hdl.handle.net/10183/25903>> Acesso em: 22 out. 2013.

TERRA, Silvia Resende. et al. Pôster. In: **International Congress of Microscopy**, 17, 2010, Rio de Janeiro. Genesis of lipid droplets in plasma membrane during the Adipose- derived human mesenchymal stem cells differentiation into adipocytes. Rio de Janeiro: SBMM.

VIEIRA, Moema Queiroz. **Análise ultraestrutural de células-tronco mesenquimais humanas derivadas de tecido adiposo (hADSC) durante a diferenciação adipogênica: interações entre as gotas lipídicas citoplasmáticas e outras organelas.** Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2013, 62 f. Dissertação de Mestrado - Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica, Porto Alegre, 2013.

WILLIAMS, David B.; CARTER, C. Barry. **Transmission Electron Microscopy: A Textbook for Materials Science.** Springer: Nova York, 2009.

YARAK, Samira, OKAMOTO, Oswaldo Keith. Human adipose-derived stem cells: current challenges and clinical perspectives. **An Bras Dermatol**, Rio de Janeiro, v.85, n. 5, pp. 647-656. ISSN 0365-0596. Sept./Oct. 2010.

YOUNG, Hugh D.; FREEDMAN, Roger A. **Física IV: ótica e física moderna.** Tradução por Cláudia Martins. São Paulo: Addison Wesley, 2009.

ZUK, P. A., ZHU, M. et al.. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. **Mol Biol Cell**, Califórnia, v.13, n.12, pp. 4279-4295, dez. 2002.