

RELATÓRIO FINAL DE ESTÁGIO INSTRUMENTAL OBRIGATÓRIO EM MISCROSCOPIA ELETRÔNICA

Aluno: Daniel De Fraia

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao curso de graduação em Ciências Biomédicas, Instituto de Biociências de Botucatu, UNESP, como parte dos requisitos para conclusão do curso.

Orientadora: Daniela Carvalho dos Santos

Botucatu, 2017

1. LOCAL ONDE FOI REALIZADO O ESTÁGIO

O estágio foi realizado na Unidade Auxiliar de Estrutura Simples “Centro de Microscopia Eletrônica” do Instituto de Biociências de Botucatu, Campus de Botucatu, UNESP.

Conforme informado no site <http://www.ibb.unesp.br/#!/cme>, o Centro de Microscopia Eletrônica (CME) de Botucatu começou a ser idealizada em 1975, para ser uma unidade auxiliar de serviços da Faculdade de Ciências Médicas e Biológicas de Botucatu (FCMBB), visando inicialmente estudos e pesquisas utilizando microscópios eletrônicos de transmissão.

Durante o ano de 1977, a FCMBB passa a ser uma unidade UNESP, e as chegadas dos equipamentos adquiridos coincidiram com essa mudança. Em 14 de Abril de 1977 entra então em funcionamento o CME de Botucatu. Seu patrimônio ficou sob responsabilidade do Instituto de Biociências de Botucatu, e seus serviços ficaram destinados a todas as unidades do Campus de Botucatu, e também a qualquer outra instituição pública ou privada, caracterizando o CME então como um laboratório multiusuário.

Em 1987 foi montado o serviço de Microscopia Eletrônica de Varredura, com auxílio financeiro da FINEP – Financiadora de estudos e projetos. Posteriormente a FAPESP - Fundação de amparo à pesquisa do estado de São Paulo – financiou a modernização e readequação dos serviços do Microscópio eletrônico de Transmissão.

Atualmente o arsenal de equipamentos do CME Botucatu consiste em dois Microscópios Eletrônicos de Transmissão, um Tecnai Spirit da FEI Company e um CM100 da Philips, um Microscópio Eletrônico de Varredura Quanta 200 da FEI Company, e também um microscópio confocal de varredura a laser SP5 da Leica.

No CME Botucatu há pessoal técnico especializado responsável pela operação de equipamentos, assistência técnica para o processamento das amostras e também treinamento de usuários. A equipe técnica atual consiste em uma assistente administrativa, e quatro assistentes de suporte acadêmico. Até os dias de hoje o CME é amplamente procurado e utilizado por diversos docentes, pesquisadores e pós-graduandos das mais variadas instituições do Brasil.

2. ESTÁGIO NO CENTRO DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA

Durante o meu estágio no CME de Botucatu, orientado pela Profa. Dra. Daniela Carvalho dos Santos, supervisora do Centro de Microscopia Eletrônica, tive a oportunidade de participar de todas as atividades desenvolvidas durante o segundo semestre de 2017.

Atividades de Pesquisa e Prestação de Serviços da Unidade:

Minhas principais atividades durante o período do estágio foram atividades práticas e instrumentais no laboratório da Unidade. Acompanhei e auxiliei em todas as etapas da rotina de prestação de serviços e pesquisa do Centro de Microscopia Eletrônica.

Primeiramente fui introduzido ao protocolo de processamento de amostras, tanto para MET quanto MEV. Minha rotina inicial do semestre foi aprender o preparo e a utilização das diferentes substâncias utilizadas durante o processo. A preparação da solução de Karnovsky, utilizada na etapa primordial do processo, a fixação, e dos componentes necessários para prepará-la – paraformaldeído, glutaraldeído e tampão fosfato – foram as primeiras etapas nas quais tive participação.

Seguindo com a pós-fixação, aprendi o preparo da substância responsável por essa etapa, o tetróxido de ósmio. Importante para preservar os lipídios das amostras, o ósmio é um metal pesado bastante tóxico, sendo necessária a utilização de luvas de nitrila e o uso da capela para uma manipulação segura.

A próxima etapa é diferente entre o MET e o MEV. Na microscopia de transmissão, é feita a imersão do material em acetato de uranila 0,5%, preparado a partir da mistura de álcool e acetato de uranila. Na microscopia de varredura não é necessária esta etapa.

Segue-se então com a etapa de desidratação, etapa importante para retirar toda a água da amostra e substituí-la por material que seja miscível em resina. Esse processo é feito com álcool no MEV e acetona no MET. Além das diluições necessárias para que seja possível desidratar com concentrações

gradualmente mais altas, eu também pude praticar o processo de desidratação em si.

Na microscopia de transmissão, o material passa então pelo processo de infiltração, para que a acetona seja substituída por uma mistura 1:1 de resina Araldite® e acetona 100%. Os frascos devem então ser fechados e vedados com Parafilm® para que não ocorra a volatilização da acetona. Após aproximadamente 12 horas em temperatura ambiente, retira-se essa mistura e embebemos o material em resina pura por cerca de 1 hora em estufa a 37°C, em um processo chamado de embebição. Nessa etapa devemos deixar os frascos abertos para que qualquer resíduo de acetona volatilize. Finalizando esse processo, o material é emblocado em moldes apropriados, e depois são deixados em estufas de 60°C por cerca de 2 a 3 dias.

Após algumas semanas participando da rotina de processamento, eu já podia fazer todo o protocolo sozinho, e pude então começar a participar das outras etapas da preparação das amostras. Na microscopia de varredura, as amostras precisam passar por uma secagem final após a desidratação, etapa chamada de elevação ao ponto crítico. Nesta etapa, feita em um aparelho chamado de câmara de ponto crítico, utilizamos dióxido de carbono como agente de troca, para que seja possível impor na amostra uma condição de temperatura e pressão específica, na qual ocorre a secagem total do material sem deformação na sua estrutura biológica.

Após a secagem em ponto-crítico, nós montávamos o espécime em suporte porta-amostras específicos para o MEV, chamados *Stubs*. Finalizando essa montagem o material era metalizado, ou seja, sua superfície era coberta com micropartículas de ouro, visando promover ou aumentar a condutividade da superfície da amostra. Após essa etapa o material estava pronto para visualização no microscópio eletrônico de varredura.

Já no microscópio eletrônico de transmissão, as amostras, agora emblocadas, iam para o processo de trimagem. Esse processo consiste em reduzir a área dos blocos para que depois possam ser feitos os cortes semifinos. Na trimagem utilizam-se lâminas de barbear para reduzir o excesso de resina ao redor da amostra, facilitando o processo de cortes semifinos. Já

estes, são feitos em um micrótomo com navalhas de vidro, e consistem em produzir cortes de aproximadamente 0,5µm. Estes cortes são então visualizados em lupas para que seja escolhida a área de interesse, a qual será utilizada para fazer os cortes ultrafinos.

O laboratório oferece diversos blocos de resina utilizáveis para treino de trimagem, os quais eu utilizei exaustivamente antes de trimar as amostras da rotina do laboratório. Após me familiarizar com as técnicas de trimagem, pude ter a oportunidade de realizar cortes semifinos no micrótomo, com auxílio dos técnicos do laboratório. Além disso, as navalhas de vidro são produzidas no próprio laboratório, utilizando um cortador de vidro, processo o qual eu aprendi e pelo qual eu fiquei encarregado durante meu tempo de estágio.

Finalizando os cortes para a microscopia de transmissão, são feitos os cortes ultrafinos, de aproximadamente 90nm, realizados no ultramicrotomo com navalhas de diamante. Os cortes são capturados em pequenas grades específicas. Nesta etapa, só pude acompanhar o processo e não praticá-lo, pois as navalhas de diamante são bastante caras além de sensíveis, e um corte errado nessa etapa poderia prejudicar todo o processo feito até agora.

Em seguida, são feitas as colorações das amostras, primeiramente com acetato de uranila e em seguida com citrato de chumbo. Nesta etapa eu pude participar ativamente, corando o material e finalizando-o para ser observado no microscópio de transmissão.

Além dos protocolos de processamento de amostras, eu pude treinar o manuseio do microscópio de transmissão, tanto na prestação de serviços quanto na matéria oferecida para alunos da pós-graduação, à qual eu participei como aluno especial. Durante minha estadia no laboratório, não pude manusear o microscópio de varredura, devido à problemas técnicos no funcionamento deste.

Por fim, no laboratório há também prestação de serviços para uso da microscopia confocal. Este é manuseado pelos técnicos do laboratório, e também foi me dada a oportunidade de acompanhar a formação de imagens através deste aparelho.

Atividades de Extensão e Ensino:

Além disso, o laboratório oferece atividades de ensino e extensão, das quais eu pude participar juntamente com as equipes envolvidas. Participei de duas atividades de extensão: Projeto de extensão “Conhecendo uma célula em um microscópio eletrônico” e Evento de extensão: “Venha conhecer o IB”.

Dentro dessas atividades de extensão, o CME se organiza para fazer e receber visitas nas/de escolas de ensino fundamental e médio da cidade de Botucatu, nas quais propõem atividades, oficinas e palestras com o intuito de interagir e trocar conhecimentos sobre biologia e estrutura celular com os alunos, além de apresentar às crianças e adolescentes os microscópios eletrônicos e suas aplicações nas diferentes áreas científicas.

Nas atividades de ensino, pude acompanhar as aulas e demonstrações práticas oferecidas aos alunos de graduação de diferentes cursos da UNESP Botucatu. Finalmente foi me dada a oportunidade de participar como aluno especial, regularmente matriculado – conforme documento em anexo - em uma disciplinas da pós-graduação, “Microscopia Eletrônica e Ultraestrutura Celular”, de responsabilidade da Profa. Dra. Daniela Carvalho dos Santos, oferecida aos alunos dos Programas de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Biotecnologia e Zoologia do Instituto de Biociências de Botucatu. Os créditos dessa disciplina serão contabilizados para o meu curso de mestrado, que pretendo iniciar no próximo ano (2018). A disciplina tem por objetivo fornecer conhecimentos teórico-práticos sobre metodologias de preparo e análise de materiais biológicos ao nível de microscopia eletrônica de transmissão e varredura, e sua aplicabilidade nas diferentes áreas de graduação. Os alunos durante a disciplina são treinados para que se tornarem capacitados na interpretação de morfologia ultraestrutural, correlacionando-a com o funcionamento celular, além de desenvolver habilidades de utilização dos microscópios eletrônicos e de planejamento metodológico de pesquisa com abordagem ultraestrutural.

Seguem imagens realizadas por mim durante as aulas práticas da disciplina:

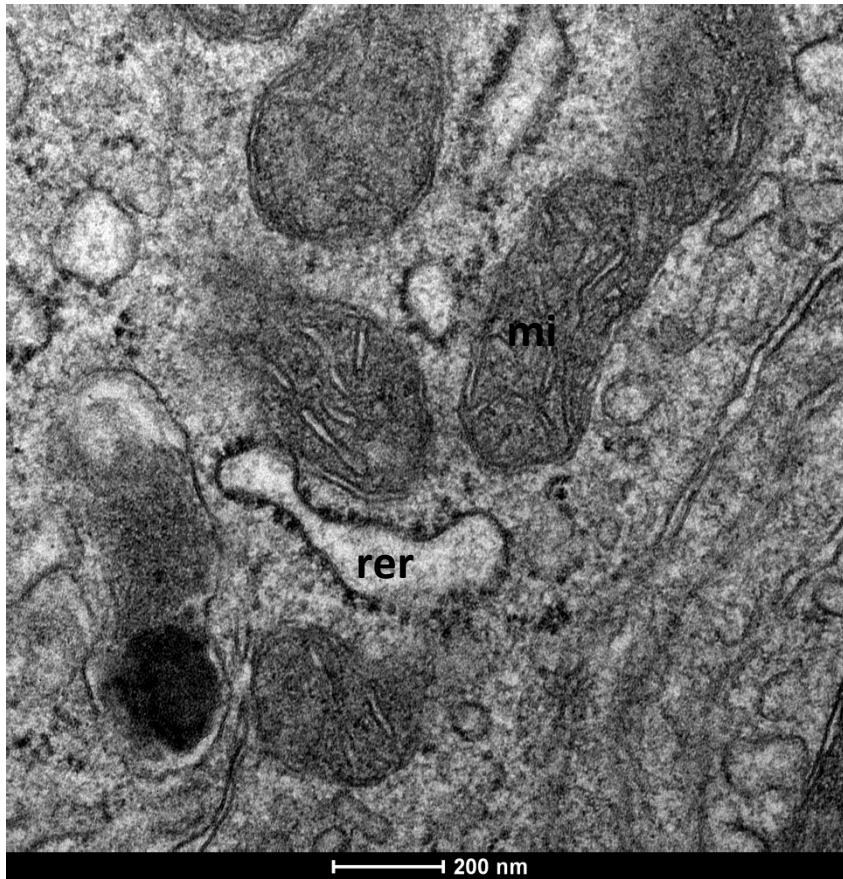


Figura 1: Fotomicrografia de Transmissão. Detalhe de mitocôndrias (mi) e cisterna de retículo endoplasmático rugoso (rer).

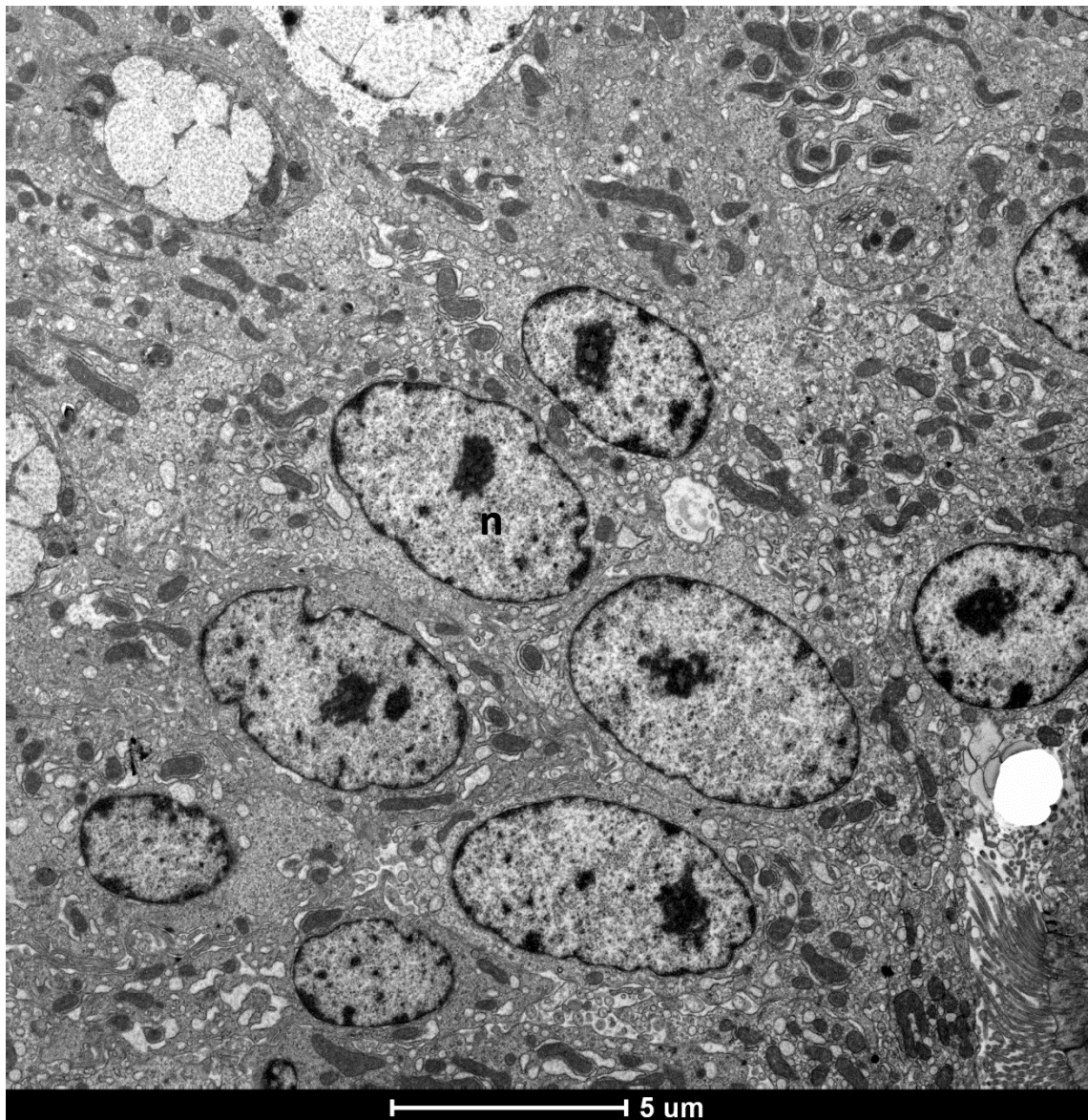


Figura 2: Fotomicrografia de Transmissão. Visão geral de células do intestino de ratos, com núcleos descondensados (n), nucléolo evidente e citoplasma contendo mitocôndrias e cisternas de retículo endoplasmático.

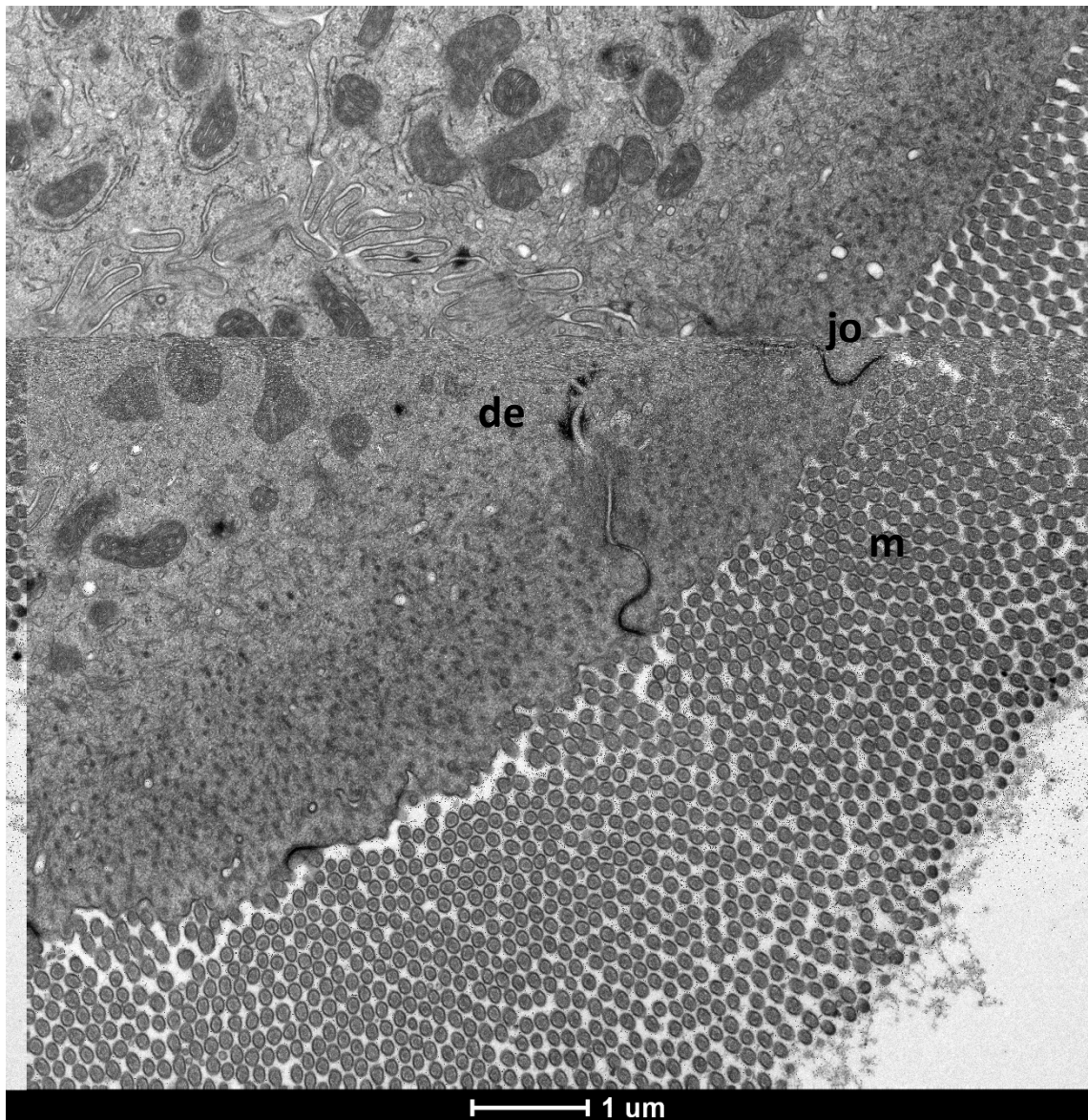


Figura 3: Fotomicrografia de Transmissão. Junções oclusivas (jo) e desmossomos (de) entre células absortivas do intestino de ratos. Notar microvilosidades em corte transversal (m).

3. RELAVÂNCIA DO ESTÁGIO PARA MINHA FORMAÇÃO PROFISSIONAL

Durante o semestre em que estagiei no CME Botucatu, tive a ótima oportunidade de aprender na teoria e na prática sobre a microscopia eletrônica, uma área com a qual não possuímos muito contato na graduação em ciências biomédicas. Pude perceber como faz falta uma disciplina que dê ênfase para uma tecnologia tão essencial para o avanço das pesquisas científicas.

O estágio inclusive me incentivou a seguir a área acadêmica, e desenvolver um projeto de mestrado que conecte pesquisa em biologia celular com o uso da microscopia eletrônica. Continuando assim o aprendizado iniciado no CME Botucatu.

4. REFERÊNCIAS

SIVIERO, F. Biologia molecular: Bases moleculares e metodologias de pesquisa. Grupo Editora Nacional

OLIVEIRA RIBEIRO, C.; SALVIANO DOS REIS FILHO, H.; GROTZNER REGINA, S. Técnicas e Métodos para utilização prática em Microscopia. Grupo Editora Nacional.