

Padrão Resposta Preliminar às Questões Discursivas
Biólogo – Morfologia/Microscopia Confocal

Questão 1

- a) A profundidade de campo diminui, tornando as imagens mais nítidas pela eliminação de *background*.
- b) A abertura do *pinhole* define a espessura do *frame* a ser obtido na aquisição dos *frames* a fornecerem as informações para a renderização ou quantificação volumétrica das estruturas de interesse.
- c) Quanto mais fechado o *pinhole* menor a profundidade de campo, logo mais delgados serão os campos, e menos marcação será observada, por consequência, a intensidade de marcação será diminuída.

Questão 2

- a) Processo: fagocitose.
Justificativa: uso de macrófagos e leveduras; uso de faloidina para filamentos de actina.
- b) Um microscópio do tipo *spinning disk* ou microscópio de fluorescência convencional.
- c) Manter as células vivas em uma câmara estéril adequada, acoplada a uma bomba de CO₂ e um dispositivo para troca do meio de cultura. Para isso, as células não poderiam ser fixadas, e o uso da faloidina iria causar alterações no citoesqueleto durante a fagocitose.

Questão 3

- a) Realizando capturas de imagens ao longo do tempo (*time lapse*) associadas à segmentação da cor de sua expressão na célula.
- b) A partir da definição do intervalo de tempo de captura entre os *frames*, pode-se medir a velocidade com que foi realizado.
- c) Realizando capturas ao longo do tempo (*time lapse*) associadas à segmentação da cor de sua expressão na célula e a mensuração da variação da área ocupada pela estrutura, pode-se inferir o aumento ou diminuição da expressão de determinada proteína em um determinado período. Outras técnicas como o FRAP também permitem esse tipo de mensuração.

Questão 4

- a) 1 - A amostra deve ser congelada;
2 - Após a microtomia em criostato, a amostra deve ser fixada com paraformaldeído a 4% ou similar;
3 - Em seguida os cortes podem ser guardados em freezer a -20°C ou seguir para o processamento para fluorescência.
- b) 1 - Após a fixação, os cortes devem ser lavados com solução salina tamponada como PBS, incubados com cloreto de amônio por 30 minutos, novamente lavados em salina e, em seguida, o bloqueio pode ser realizado com salina contendo albumina a 5% ou soro inativado de animais;
2 - Após o bloqueio, segue-se a incubação com anticorpos primários antiproteína da glia, como GFAP, e antiproteína mielínica MBP, ambos obtidos em animais diferentes, durante um mínimo de 2 horas ou *overnight*;
3 - Após nova lavagem em solução salina, segue-se com incubação com anticorpos secundários com afinidades para os respectivos anticorpos primários, conjugados com diferentes fluoróforos, como Alexa 488 (verde) e Alexa 594 (vermelho);
4 - Ao final, os cortes devem ser incubados com corante nuclear DAPI, montados em meio *anti-fading* e conservados a -20°C até observação em microscópio confocal.

Questão 5

- a) Fluoróforos: GFP, Alexa 488 e FITC, entre outros semelhantes.
Justificativa: Os filtros HFT 458 e NFT 490 refletem a luz no comprimento de excitação do FITC (490), transmitindo o restante; o filtro *band pass* 505-550 permite a passagem da luz emitida pela excitação do FITC, de 525 nm.
- b) Diferença: O microscópio confocal equipado com filtro sintonizável acusto-óptico apresenta, no lugar de filtros e espelhos do microscópio convencional, um prisma de quartzo.
Vantagem: A luz que atravessa esse filtro permite o ajuste das intensidades dos diferentes lasers, permitindo escaneamento *pixel por pixel* em alta velocidade.
- c) Diferenças: O microscópio *spinning disk* apresenta um disco giratório com uma gama de *pinholes* (como um disco de Nipkow), a captura pode ser realizada com câmeras CCD e normalmente funciona com uma lâmpada de fluorescência no lugar de lasers.
- d) Vantagem: apresenta alta velocidade de captura de imagens.
Limitação: perda de confocalidade.