



Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Escola Politécnica de Saúde Joaquim Venâncio

Arthur Moreira Mendes

**Advento do microscópio eletrônico e sua importância para o
desenvolvimento da virologia**

Orientador:
Marcos Antônio Pereira Marques

Rio de Janeiro, 2007

Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Escola Politécnica de Saúde Joaquim Venâncio

Arthur Moreira Mendes

**Advento do microscópio eletrônico e sua importância para o
desenvolvimento da virologia**

Orientador:

Marcos Antônio Pereira Marques

Monografia final apresentada como
requisito parcial para conclusão do
Curso de Formação Profissional em
Laboratório em Biotecnologia em
Saúde

Rio de Janeiro, 2007

Dedico este trabalho aos cientistas que tornam o impossível em possível.

“No meio da dificuldade
encontra-se a oportunidade.”
Albert Einstein

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradecerei a Deus, pelo ar que respiro, pela água que bebo e pelo pão de cada dia. Agradecerei a minha família pela paciência e compreensão, e também aos amigos pela sinceridade e ajuda.

Agradeço ao professor Marquinhos por aceitar o desafio de orientar-me, sabendo das adversidades que se apresentavam. Agradeço também ao professor Cláudio, pelas boas palavras e compreensão. Agradeço, em especial, às professoras Verônica e Luciana, pela atenção e preocupação com o andamento do meu trabalho e comigo mesmo. Agradeço aos professores em geral pelos ensinamentos, tanto acadêmicos quanto de vida. Agradeço a todos que de um modo ou de outro contribuíram com tudo isso que pude viver nesses três anos aqui na EPSJV. A todos meu muito obrigado e minha admiração eterna.

Resumo

Esse trabalho pretende reunir os fatos que antecederam o surgimento do microscópio eletrônico, bem como esclarecer as limitações do tipo de microscopia anterior ao enfatizar a importância desse novo instrumento para a história da virologia. O primeiro capítulo destina-se aos acontecimentos importantes para a história da microscopia. Diz respeito à evolução das técnicas de ampliação, desde o uso das lentes simples até o microscópio eletrônico. Na segunda parte temos a distinção entre os dois tipos de microscopia empregados atualmente, tratando também de alguns conceitos importantes para o melhor esclarecimento das limitações do microscópio óptico. Ainda no segundo capítulo entramos de fato na microscopia eletrônica, descrevendo seus principais constituintes e posteriormente algumas de suas variantes, ressaltando também as diferenças entre cada tipo. Feito isso, traça-se a história da virologia evidenciando seu problema inicial, que vinha a ser a observação do agente descoberto e as incertezas entorno de sua natureza. Por fim, trata-se das propriedades gerais dos vírus, demonstrando como a virologia acumulou conhecimentos em algumas décadas de existência, muitos desses somente viáveis graças ao advento do microscópio eletrônico.

Sumário

1. Introdução.....	08
2. Capítulo 1 – História da microscopia.....	10
3. Capítulo 2 – Os tipos de microscópios.....	15
2.1 - Conceitos importantes em microscopia eletrônica	
2.2 - O microscópio eletrônico	
4. Capítulo 3 - História da virologia.....	24
5. Capítulo 4 - Os vírus.....	27
6. Considerações finais.....	34
7. Bibliografia.....	35
8. Anexos.....	36

Introdução

O homem sempre tentou superar suas limitações, essa é uma característica que atravessa o tempo histórico. A visão era um fator limitante do conhecimento humano. Tendo consciência de tal limitação, o homem buscou meios para contorná-la. Esse é o ponto de partida da história da microscopia. É somente quando o homem percebe que necessita enxergar muito mais do que a simples capacidade natural de seus olhos o permite, que ele procura meios para potencializar sua visão.

Assim, procuram-se objetos que proporcionem o aumento desejado e surgem as lentes. Mas o aumento proporcionado não é o satisfatório, então trabalha-se a lente de modo que ela possa fornecer o aumento desejado. Percebe-se, então, que uma composição de lentes trabalhadas pode oferecer um aumento maior do que uma única lente. Surge, dessa composição, o que conhecemos por microscópio óptico, que também encontraria suas limitações, dando início as pesquisas que terminariam por possibilitar a concepção de um instrumento capaz de dar ao olho humano acesso a estruturas nunca antes vistas nem sequer imaginadas.

O microscópio eletrônico é fundamental em diversas áreas do conhecimento, nos mais variados tipos de pesquisas, mas certamente tem um sentido muito especial para virologia, em seu desenvolvimento.

Foi, de certo modo, um desafio à microscopia: a doença conhecida como mosaico do tabaco era estudada e, ao contrário do que ocorria em outras moléstias, o agente infeccioso dessa doença não podia ser visualizado ao microscópio óptico. Então, experiências foram realizadas no intuito de estabelecer o tamanho do agente, mesmo sem ser visualizado. Concluiu-se, a partir de trabalhos com filtros, que deveria ser muito menor

do que as bactérias. A confusão era tanta que se cogitou ser uma toxina e não um microorganismo o responsável pela doença nas folhas de tabaco. Contudo, demonstrou-se que essa proposição era inviável, uma vez que o causador da doença era capaz de se multiplicar e infectar outras plantas. Mas até o momento, a morfologia do ser em questão continuava desconhecida e muito pouco ou nada se sabia acerca do seu processo de infecção e reprodução.

Sendo assim, o presente trabalho destina-se a relatar o desenvolvimento da microscopia até a criação do microscópio eletrônico e os princípios dessa nova ferramenta que conferem sua vantagem frente ao seu congênere óptico. Também neste trabalho temos um levantamento dos acontecimentos que compõe a história da virologia, evidenciando as dificuldades iniciais e como esta poderosa ferramenta que é o microscópio eletrônico potencializou o desenvolvimento desse nascente campo das ciências biológicas.

1-História da microscopia

O progresso de um determinado campo de conhecimento científico depende do grau de informações acumuladas pelo homem sobre o objeto que se deseja conhecer. O grande interesse humano pelas pequenas estruturas da matéria, viva ou morta, só podia equiparar-se a curiosidade acerca dos mundos que se vislumbravam no espaço. Contudo, como tais descobertas necessitavam de uma enorme capacidade visual, certos conhecimentos ficaram restritos devido à capacidade do olho humano: não só a visão do homem não ia muito longe, como não diferenciava bem a intimidade dos objetos terrestres. (Freitas e Bolsanello, 1979)

Desde a antiguidade já havia a tentativa de potencializar a visão por meio de dispositivos ópticos. Em escavações feitas em Nínive foram encontrados pedaços de vidro que eram usados como lentes. Aristóteles, filósofo grego (384-322 a.C.) considerado como criador da Anatomia e Fisiologia comparadas, refere-se claramente a uma lente, e Seneca descreveu o uso de glóbulos de vidro na ampliação de imagens. A partir do século XIV lentes começaram a ser usadas para corrigir defeitos visuais e como dispositivos de aumento.¹

O estudo teórico das lentes bem como algumas propriedades ópticas das superfícies curvas vem de tempos longínquos, tendo sido conhecidas por Euclides (323 a.C.), Ptolomeu (151) e Alhazen (1039), mas nada de prático se havia feito em torno do assunto até se construírem lentes em 1285 por Salvino degli Armati na Itália. No século XVI, Leonardo Da Vinci e Francisco Maurolyco insistiram na vantagem de aplicação das lentes para aumentar a visão de pequenos objetos. (Freitas e Bolsanello, 1979) Mas essa

¹ <http://www.fortunecity.com/greenfield/eco/813/mod1aula1.html>

aplicação proposta por Da Vinci só ocorreria alguns anos mais tarde, com dois irmãos holandeses...

Em 1590 os irmãos Jensen compuseram sistemas de lentes aos quais o médico italiano Jaime Faber de Bamberg deu o nome de “microscópio”. A microscopia óptica que a partir daí se desenvolveria, baseia-se no uso de lentes de vidro ou cristal. (Freitas e Bolsanello, 1979)

O microscópio encontrou, a princípio, sua mais perfeita aplicação na observação das pequenas estruturas de animais e microorganismos. O conhecimento que temos acerca das células, só foi possível mediante o desenvolvimento da microscopia. À medida que aumentava a qualidade daquele instrumento, aprendia-se cada vez mais sobre a estrutura celular. As primeiras observações de células foram feitas no século XVII, por Robert Hooke, na Inglaterra, e Anton Von Leeuwenhoek, na Holanda.²

O cientista inglês Robert Hooke em seu trabalho *Micrographia* (1665), considerado como o primeiro passo no estudo celular, descreve um corte fino de cortiça com o auxílio de um precário microscópio de então, que para época era o que havia de mais desenvolvido em termos de microscopia. (Ibid)

Leeuwenhoek (1632-1723 d.C.), fabricante de lentes holandês, influenciado pela *Micrographia*, montou seus próprios microscópios simples (composto de uma lente apenas) que lhe possibilitaram visualizar diversas estruturas com aumentos consideráveis, como células, espermatozóides e hemácias de peixes. As observações feitas por Leeuwenhoek foram tantas e de tamanha qualidade, dada a simplicidade de seus instrumentos, que ele é considerado o pai da microscopia científica.³

² http://www.iesambi.org/iesambi_arquivos/roteiromicroscopia2004.htm

³ http://www.iesambi.org/iesambi_arquivos/roteiromicroscopia2004.htm

Com o decorrer do tempo, a microscopia óptica desenvolveu-se gradativamente, demonstrando que realmente havia um mundo de estruturas que desconhecíamos e que sem o advento do microscópio óptico continuaria sendo desconhecido.

Mas o desenvolvimento do assunto mostrou também as limitações do próprio microscópio óptico. O físico alemão Ernest Abbé (1840-1905) demonstrou em seus trabalhos que o poder de resolução destes microscópios dependia do comprimento de onda da luz utilizada, isto é, quanto menor o comprimento de onda, maior o poder de resolução, que é a característica do microscópio que nos permite distinguir pontos cada vez mais próximos um do outro. (Freitas e Bolsanello, 1979)

Sabendo-se o limite de resolução desses microscópios, que é a metade do menor comprimento de onda do espectro da luz visível, ficava bem claro que existiam estruturas que o microscópio óptico era incapaz de nos revelar. (Freitas e Bolsanello, 1979) Era, portanto, imprescindível procurar uma outra fonte de energia, que tivesse um comprimento de onda menor que o da luz, de modo que o poder de resolução do microscópio aumentasse.

A princípio tentou-se resolver o problema usando os raios ultravioleta, mas a aparelhagem microscópica era muito complexa, requerendo óptica de quartzo e substituindo a observação visual pela fotografia. Com os progressos na microscopia eletrônica, tal pesquisa foi abandonada. (Ibid)

A história da microscopia eletrônica está diretamente associada às descobertas nos campos da eletricidade e do magnetismo, as mais significantes são as seguintes:

- 1880-partículas elétricas são descobertas por L.Lorentz, físico holandês(1853-1928);
- 1897-J. Thomson, físico e matemático inglês (1856-1940), descobre os elétrons;

- 1923-é estabelecida a natureza do elétron por Luiz de Broglie, físico francês;
- 1925-a difração dos elétrons é observada por W. Elsasser;
- 1926-a difração eletrônica é estudada por C. J. Davidsohn e L. A. Germer;
- 1927-H. Bush estabelece a teoria das lentes eletromagnéticas, estudadas por C. J. Davidsohn e C. J. Calbick no ano de 1921.

Esses trabalhos e descobertas levaram a concluir que o feixe de luz utilizado no microscópio deveria ser substituído por um feixe eletrônico, pois o mínimo comprimento de onda deste deveria garantir um maior poder de resolução. Foi seguindo esta idéia que, em fevereiro e março de 1931, Knoll e Ruska obtiveram as primeiras imagens de um microscópio eletrônico, com pouco aumento, cerca de 17x, mas com os princípios básicos deste tipo de microscopia bem alicerçados. É de se estranhar, mas os dois não requereram patente do instrumento, apenas o relataram num congresso da Technische Hochschule Berlin, em 4 de junho de 1931. Ficaram bastante surpresos ao saber que cinco dias antes R. Rudenberg havia registrado uma patente do instrumento. A história dessa patente nunca foi esclarecida ao certo, mas sabe-se que foi recusada na Alemanha, sendo aceita em poucos países. (Ibid)

No ano de 1932, além do microscópio eletrônico de Knoll e Ruska, surge outro de Brücke e Johnson, o qual dispunha de lentes eletrostáticas e um feixe eletrônico acelerado por diferença de potencial de 300V. No ano seguinte, Knoll e Ruska aperfeiçoam seu microscópio, obtendo imagens com resolução superior ao microscópio óptico, objetivo que desde o início norteava as pesquisas com feixes de elétrons. (Ibid)

Em 1934, na Bélgica, Marton constrói um dispositivo com lentes magnéticas e também tenta pela primeira vez estudar um material biológico num microscópio eletrônico. No ano de 1935, o mesmo Marton constrói o primeiro microscópio eletrônico

comercial, o EM1, que foi vendido para *Metropolitan Vickers Electrical Company*. A produção em série dos microscópios eletrônicos foi viável somente em 1938, sendo realizado por Von Borries e Ruska na Siemens e Halske Co. de Berlin. Durante a Segunda Guerra (1938-1945) as pesquisas no assunto foram prejudicadas, embora tenha surgido nos Estados Unidos um novo modelo o RCA-B e, na Alemanha, Von Ardenne tenha construído o primeiro microscópio eletrônico de varredura, adaptando bobinas de varredura ao microscópio eletrônico de transmissão. Nesse período a divulgação da microscopia eletrônica também aumentou, tendo colaborado para tanto o mesmo Von Ardenne, ao publicar trabalhos mais esclarecedores. (Ibid)

Em nosso continente o primeiro microscópio eletrônico foi construído no Canadá em 1939, por Hillier e Prebus, no laboratório de Burton. No mesmo ano, mas posteriormente, Hall construiu outro nos laboratórios da Eastman-Kodak, nos Estados Unidos. (Ibid)

A partir de 1945, a microscopia eletrônica se desenvolveu rapidamente, além do microscópio eletrônico de transmissão, aperfeiçoou-se o microscópio eletrônico de varredura, no qual a imagem obtida mostra apenas detalhes da superfície da amostra, sem necessidade de cortá-la e sem que o feixe de elétrons perpassasse-a, ao contrário do que ocorre no microscópio de transmissão.

A microscopia eletrônica vem trazendo grandes contribuições ao conhecimento das pequenas estruturas da matéria e dos pequenos seres existentes. É, atualmente, indispensável para vários ramos da ciência, como a Biologia, Cristalografia e Física Eletrônica, por exemplo.

2-Tipos de microscópios

Os microscópios pertencem basicamente a duas categorias: os que usam luz e os que usam elétrons para gerar as imagens finais. Também diferem quanto à forma de refratar o tipo de radiação recebida.

Na microscopia óptica temos instrumentos que usam a radiação de ondas luminosas, sendo esta refratada por lentes de vidro. A área estudada aparece bastante iluminada e os objetos um pouco escurecidos. Os microscópios desse tipo nos fornecem um aumento de 1000x. (Galetti, 2003)

Na microscopia eletrônica usa-se a radiação de feixe de elétrons, sendo esta refratada por lentes eletromagnéticas. O microscópio eletrônico produz aumentos úteis de 200000 a 400000x, sendo seu poder resolvente cerca de 100x maior que o microscópio óptico. Essa melhora considerável em sua capacidade se deve diretamente à natureza da radiação empregada (comprimento de onda mais curto que o da luz) e também a maior abertura numérica conseguida a partir da diminuição da distância focal. Os microscópios eletrônicos dividem-se basicamente em microscópios de transmissão e de varredura. (Galetti, 2003)

Segue-se um quadro que resume as principais diferenças entre os dois tipos de microscopia.

Quadro: Comparação entre a microscopia óptica e eletrônica.

Características	M. Óptico	M. Elet. de Varredura	Mic. Elet. de Transmissão
Fonte de radiação	Filamento de Tungstênio	Filamento de Tungstênio	Filamento de Tungstênio
Tipo de radiação	Luz (fótons)	Feixe de elétrons	Feixe de elétrons
Meio de propagação	Atmosfera	Vácuo $< 10^{-4}$ Pa	Vácuo $< 10^{-6}$ Pa
Lentes	Vidro ou quartzo	Eletromagnéticas	Eletromagnéticas
Ampliação	1500 vezes	9000 vezes	250 000 vezes
Modo de Ampliação	Substituição das Lentes	Alteração da largura de varredura	Alteração da corrente das Lentes de Ampliação
Poder de resolução	≈ 200 nm	≈ 5 nm	$\approx 0,14$ nm
Profundidade de Foco	Reduzida	Muito Elevada	Elevada
Contraste	Absorção/Reflexão	Elétrons Secundários	Dispersão/Difração
Observação	Direta da imagem luminosa	Conversão de Elétrons em Fótons e Análise em Monitor de TV	Conversão de Elétrons em Fótons por um Alvo Fluorescente
Imagem	Geralmente colorida	Preto e Branco	Preto e Branco
Espessura do Material	$> 0,5$ μ m	< 10 nm	< 1 μ m
Material a observar	Vivo e não vivo	Não vivo	Não vivo
Preparação do Material	Fácil	Relativamente Fácil	Difícil

Adaptado do site <http://www.fop.unicamp.br/microbiologia/aulas/aulavirus06.pdf>

2.1-Conceitos importantes em microscopia eletrônica

São três os conceitos a serem esclarecidos para que melhor se compreenda as limitações do microscópio óptico, as quais foram imperativas para as pesquisas de um novo instrumento com maior capacidade de aumento: poder de resolução, comprimento de onda e abertura numérica.

2.1.1-Poder de resolução ou poder resolvente

Quando usamos um microscópio, seja qual for o tipo dele, visamos enxergar mais do que naturalmente somos capazes. Logo, se tal instrumento não nos fornecer uma imagem que contenha mais detalhes do que podemos ver ou resolver com os olhos, a ampliação proporcionada por ele não terá valor algum.

O poder de resolução é definido como "a menor distância em que dois pontos em um espécime podem ser afastados e visualizados separadamente como dois pontos e não como um só."(Martinez)Em outras palavras, é a capacidade de distinguir separadamente dois pontos adjacentes. Sem o auxílio de microscópios de luz podemos diferenciar pontos distantes até 0,1mm , já com esse instrumento essa distância cai para 200nm.

O poder resolvente dos microscópios é dado em função do comprimento de onda da radiação utilizada e da abertura numérica, que é uma característica do sistema de lentes. (Galetti, 2003)

2.1.2-Comprimento de onda

A imagem que vemos ao microscópio é o resultado da interação entre o objeto que desejamos visualizar e o feixe de luz.A interação do objeto com o feixe de luz, provoca desvios neste.Se o objeto for muito pequeno e não conseguir produzir desvios detectáveis, não poderá ser resolvido, isto é, continuará não sendo visualizado.Sendo assim, quanto menor o comprimento de onda do feixe utilizado menores serão os objetos capazes de produzir desvios apreciáveis nele, e, portanto, maior será também seu poder de resolução.Levando em conta isso, podemos perceber como a natureza da luz visível limita a quantidade de objetos que podem ser resolvidos em um microscópio, uma vez que seu comprimento de onda está entre 400nm-700nm e seu melhor poder de resolução é a metade disto, cerca de 200nm, como mencionado anteriormente.(Galetti,2003)

2.1.3-Abertura numérica

A abertura numérica é a medida do ângulo formado pelo eixo óptico e os raios mais externos ainda cobertos pela objetiva. Este valor está diretamente relacionado com o índice de refração do meio entre a objetiva e a amostra. Assim nas objetivas de imersão temos um maior valor para a abertura. Mas isso não melhora muito o limite de resolução dos microscópios de luz, pois o valor da abertura não pode ser aumentado. (Galetti, 2003)

Uma vez que o limite de resolução, isto é, o menor objeto que pode ser visualizado, é obtido com o menor comprimento de onda e a lente de maior abertura numérica (Galetti, 2003), fica evidente que a solução para esta limitação encontrava-se no comprimento de onda a ser empregado: ele deveria ser o menor possível.

2.2-O microscópio eletrônico

Em condições específicas, os elétrons apresentam características ondulatórias, bem como a luz visível, que estão diretamente associadas ao seu comprimento de onda, que é cerca de 0,005nm. Sabendo que a luz visível tem seu comprimento na casa de 500nm, podemos presumir que a melhora no poder de resolução de um microscópio eletrônico esteja também nessa proporção, 100000x em relação ao seu congênere óptico. De fato se considerássemos somente esse fator teríamos o aumento desejado no poder resolvente. Porém, o poder resolvente efetivamente obtido está abaixo dessa previsão, devido à outros constituintes do microscópio eletrônico que são extremamente sensíveis. (Galetti, 2003)

Apesar dos diferentes modelos existentes e dos diferentes materiais usados em sua fabricação, em linhas gerais um microscópio eletrônico consta do seguinte:

1-Um canhão eletrônico, que é a fonte de iluminação do microscópio e é constituído por um filamento de tungstênio em forma de V ,ao qual é aplicado uma alta voltagem(40-10000V),que o torna incandescente e faz emitir elétrons.Essa propriedade de emitir elétrons é comum a todos os metais, sendo conhecida por emissão termoiônica. (Freitas e Bolsanello,1979)O comprimento de onda dos elétrons é inversamente proporcional à voltagem aplicada,assim quanto maior a voltagem ,menor será o comprimento de onda obtido.(Galetti,2003)Após serem emitidos,os elétrons são atraídos pelo pólo positivo e desse modo o feixe eletrônico é movido.

2-Um sistema de lentes eletromagnéticas condensadoras que pode ser simples ou duplo conforme o microscópio,que tem por função focalizar o feixe de elétrons divergentes para que este incida sobre a amostra a examinar,atravessando-a.(Freitas e Bolsanello,1979)Na prática, a lente eletromagnética consiste basicamente de uma bobina ,composta por milhares de voltas de fio,através da qual passa uma corrente elétrica .(Galetti,2003)

3-Um sistema de lentes eletromagnéticas chamadas objetivas as quais desviam os elétrons do feixe eletrônico, ampliando muito o diâmetro deste. Causam com isso o aumento inicial da imagem da amostra que o feixe atravessou, focalizando-a em um ponto a apenas alguns milímetros abaixo do espécime(Freitas e Bolsanello,1979) .É um dos componentes mais importantes do microscópio eletrônico,pois qualquer defeito que ocorra nestas lentes será ampliado pelo resto do sistema.São também elas que determinam a resolução do microscópio.(Martinez)

4-Um sistema de lentes eletromagnéticas chamadas “de projeção” as quais aumentam ainda mais o diâmetro do feixe eletrônico e o projetam sobre a placa fotográfica ou o écran fluorescente.(Freitas e Bolsanello,1979)O aumento da amplitude do feixe é determinado pela intensidade da corrente nessas lentes:quanto maior a corrente,maior a ampliação,e por conseguinte,maior a imagem.(Martinez)

5-Um sistema de bombas que geram vácuo dentro do tubo, pois o feixe de elétrons só pode ser produzido em vácuo.A colisão com moléculas de gases diminuiria a distância percorrida pelos elétrons.Esse sistema é constituído por uma bomba mecânica que faz o pré-vácuo, a partir da pressão atmosférica,e outras bombas,chamadas de bombas de difusão,que são acionadas após o vácuo anterior ser alcançado.O vácuo produzido por essas bombas é chamado de alto vácuo.(Martinez)

6-Um sistema de resfriamento das lentes eletromagnéticas e das bombas de vácuo(de difusão)durante o uso do microscópio eletrônico. O resfriamento é feito pela circulação de água fria por todos esses locais.Sua parada pode ocasionar a queima das lentes ou a contaminação do interior do tubo com o óleo responsável pelo funcionamento das bombas de difusão. (Freitas e Bolsanello,1979)

7-Uma câmara porta objeto, que permite a introdução e retirada das amostras no tubo do microscópio.(Ibid)

8-Uma tela fluorescente ou écran fluoroscópio,que é uma placa fotosensitiva na qual a imagem final é projetada.Esta placa é recoberta por sulfeto de zinco, material eu fluoresce quando irradiado por elétrons.A necessidade desta tela se explica pelo fato de que nossos olhos não são sensíveis aos elétrons.Ela nos fornece uma espécie de imagem-sombra (áreas claras e escuras),na qual a área clara é resultante dos elétrons que conseguiram incidir na placa e, as áreas escuras,regiões onde os elétrons teriam incidido se não fossem barrados pela abertura da objetiva.(Martinez)

9-Uma câmara fotográfica colocada sob a tela fluorescente. Dispositivo que permite fotografar a imagem microscópica ampliada levantando-se a tela para que o filme seja exposto.(Ibid)

Esses são os constituintes comuns tanto ao microscópio eletrônico de transmissão quanto ao de varredura, mas existem diferenças bastante significativas entre ambos.

2.2.1-O Microscópio Eletrônico de Transmissão(MET)

É assim designado devido ao fato de produzir a imagem do objeto simultaneamente à passagem do feixe eletrônico. É bastante empregado no estudo de materiais biológicos, pois permite a definição de imagens intra celulares, possibilitando estudos acerca da interação de parasitas com as células,fornecendo,por exemplo ,informações sobre alterações e efeitos citopáticos ocasionados por vírus.Contudo, a alta resolução oferecida pelo MET tem seu preço: ele é um instrumento extremamente complexo, exige preparação especial das amostras e não fornece informações em três dimensões.(Galetti,2003)

2.2.2-O Microscópio Eletrônico de Varredura(MEV)

Nesse tipo de microscópio eletrônico, um feixe de elétrons extremamente estreito é usado para varrer o objeto. O feixe faz com que o próprio objeto passe a emitir elétrons. A imagem final é construída em seqüência, conforme o objeto é varrido, muito similar ao que ocorre nos televisores convencionais. O MEV apareceu no mercado em 1956, desde então têm sido de grande valor em certos ramos da ciência, como a classificação e taxonomia de insetos e fungos, estudo de morfologia de pólen e em pesquisas de superfícies de diversas estruturas de plantas e animais. Se por um lado o MEV é ideal no estudo da superfície dos objetos, por outro não é indicado para se estudar a estrutura interna dos mesmos. (Galetti, 2003) As vantagens do MEV são: as imagens, que tem aspecto tridimensional e são mais fáceis de interpretar; o preparo do material, que é mais simples do que no MET; e também seu considerável poder de resolução, que é da ordem de 20nm. (Martinez)

Devido ao fato de se atingir um poder resolvente na ordem de nanômetros, qualquer oscilação poderá interferir no resultado final. Desse modo, o poder resolvente obtido na prática, como dito no início deste capítulo, depende de outros fatores além do comprimento de onda do feixe utilizado, tais como a qualidade do projeto, a forma como foi construído o microscópio eletrônico, a natureza do objeto estudado, além, é claro, da perícia da pessoa que o maneja. (Galetti, 2003)

2.2.3-Outros tipos de microscópios eletrônicos

Existem algumas variáveis que não fogem muito aos dois modelos básicos, ou melhoram alguma característica ou reúnem num só os dois tipos. São eles:

Microscópio eletrônico de transmissão de alta voltagem:

MET que opera numa voltagem superior a 200V. Como consequência a resolução melhora (0,11nm) em relação ao MET convencional;(Martinez)

Microscópio eletrônico de transmissão e varredura(scanning transmission):

Como o próprio nome já nos sugere, é um microscópio que combina as virtudes do MET e do MEV no mesmo instrumento. Pode-se obter uma imagem combinada, de varredura e transmissão; (Ibid).

Microscópio eletrônico de varredura de tunelamento:

Pode-se obter imagens reais de superfícies pondo em relevo a superfície atômica.
(Ibid)

3-História da virologia

A história da descoberta dos vírus começa com o pesquisador alemão Adolf Mayer (1843-1942), em 1883. Ele, então, estudava a doença conhecida como mosaico-do-tabaco, na qual as folhas da planta de fumo (*Nicotiana tabacum*) desenvolvem manchas irregulares e despigmentação. Mayer descobriu que era possível infectar outras plantas pulverizando um macerado de folhas contaminadas, concluiu com isto que havia um agente infeccioso causador da enfermidade. Como tinha conhecimento dos trabalhos de Pauster, Koch e outros microbiologistas, Mayer pensou que devia haver um microorganismo envolvido. (Amabis e Martho, 2003)

Tentou, portanto, identificar tal agente causador com o microscópio óptico, mas foi em vão. Assim, Mayer propôs que o agente causador da moléstia devia ser extremamente pequeno. Lembremos de que, na época, o microscópio eletrônico ainda não havia sido inventado. (Ibid)

Muito interessado pelos trabalhos de Mayer, o biólogo russo Dimitri Ivanovski (1864-1920) imaginou uma estratégia para determinar o tamanho do possível agente infeccioso, mesmo sem ter uma imagem dele. Ivanovsky planejou uma experiência na qual o macerado de folhas seria passado, antes de ser pulverizado, por filtros de porcelana com finíssimos poros de tamanhos previamente determinados. A idéia era que se o agente infeccioso fosse maior do que os poros, ele ficaria retido e o pulverizado não contaminaria as folhas, mas se fosse menor, passaria e o filtrado seria infeccioso, produzindo a doença. Tal experiência, realizada em 1892, mostrou que o agente infeccioso era capaz de passar pelos mais finos filtros de porcelana. Dado esse fato, Ivanovsky chegou até mesmo a pensar que não se tratava de um microorganismo, mas sim de algum tipo de toxina. (Ibid)

O botânico holandês Martinus Beijerinck (1851-1931) descartou logo essa possibilidade. No ano de 1897 ele demonstrou que tal agente infeccioso era capaz de se

multiplicar, sendo transmitido de planta a planta, mesmo quando o extrato havia sido muito diluído, logo não poderia se tratar de uma toxina.(Ibid)

O agente infeccioso causador do mosaico do tabaco era muito similar ao causador da raiva em animais, que havia sido identificado pelo cientista francês Louis Pauster, mas nunca visualizado ao microscópio.O tipo de agente infeccioso em questão foi chamado de vírus, palavra do latim que significa veneno ou fluído venenoso.Mesmo sem poder visualizá-los, os cientistas logo identificaram diversas doenças virais em animais, em plantas e até mesmo em bactérias.(Ibid)

Os bacteriófagos, que são os vírus capazes de infectar bactérias, foram estudados independentemente nos anos de 1915 (TWORT), na Inglaterra e 1917(d'HERELLE), no instituto Pasteur de Paris. Os vírus, no entanto, não foram visualizados até o desenvolvimento do microscópio eletrônico, na década de 30, verificando-se que os bacteriófagos são considerados os vírus de estrutura mais complexa.⁴

Um marco na história da Virologia é o momento em que foi descoberto por Stanley (1940) que o vírus do mosaico do tabaco podia ser cristalizado (assim como os sais inorgânicos e proteínas moleculares) e que os cristais inanimados, eram capazes de produzir doença em plantas saudáveis.⁵

Essa descoberta teve um grande impacto no campo das ciências biológicas em geral, da ciência médica, e dentro do próprio campo da bioquímica, onde os conhecimentos que se acumulam, sobre a estrutura viral, deram origem uma nova área do conhecimento, a biologia molecular.

Vejam agora, um pouco daquilo que se sabe acerca dos vírus e como o microscópio eletrônico encaixou-se perfeitamente aos interesses da Virologia.

⁴ <http://www.fop.unicamp.br/microbiologia/aulas/aulavirus06.pdf>

⁵ <http://www.fop.unicamp.br/microbiologia/aulas/aulavirus06.pdf>

4-Os vírus

Os vírus são conhecidos agentes infecciosos, causadores de doenças em humanos, animais ou plantas. Em humanos, tanto podem ocasionar doenças benignas, como verrugas e gripes, assim como podem induzir sintomas mais severos, como câncer, poliomielite e

AIDS. Contudo, deve-se ressaltar, que além de causarem problemas aos seres humanos, vírus têm servido como ferramentas em pesquisas científicas. Muitas descobertas sobre o metabolismo celular foram viabilizadas pelo uso dos vírus, uma vez que estes usam a maquinaria celular em seus processos, e, além disso, devido ao seu pequeno genoma possibilitar um relativo fácil manuseio, recentemente vírus estão sendo usados como vetores para introdução de genes em organismos, abrindo as fronteiras da terapia gênica e apontando uma nova perspectiva no tratamento de diversas doenças. (Rácz e Menck, 2004).

A maioria dos vírus mede menos de 200nm, sendo por isso, somente observados ao microscópio eletrônico. Eles diferem dos seres vivos por serem acelular, ou seja, por não apresentarem estrutura celular. Basicamente um vírus é constituído por ácido nucléico, uma única molécula em geral, envolta por proteínas e, em certos tipos, possui uma membrana externa envolta por proteínas. (Amabis e Martho, 2004) Essa simplicidade faz com que eles sejam incapazes de crescimento independente em meio artificial, podendo replicar somente em células animais, vegetais ou de microorganismos, usando para tanto, a própria maquinaria da célula infectada. São por isso parasitas celulares obrigatórios. (Rácz e Menck, 2004)

Os vírus contêm, em geral, apenas um tipo de ácido nucléico, DNA ou RNA. (Rácz e Menck, 2004) O ácido nucléico contém os genes necessários para produzir novas partículas virais e que constituem o genoma viral. Se comparado a outros organismos, o vírus tem poucos genes. Por exemplo, o maior vírus conhecido, o vírus da varíola, tem cerca de 200 genes, enquanto o genoma humano tem entre 30 e 40 mil genes. (Amabis e Martho, 2004)

A atividade dos genes virais começa quando o vírus penetra na célula hospedeira, sendo ativados pelas próprias enzimas da célula infectada. O material genético também começa a se multiplicar e produz moléculas de RNA mensageiro que irão comandar a produção de proteínas virais. Algumas dessas têm por função desviar o metabolismo da célula para a produção de novos vírus, outras são componentes do envoltório viral (Ibid)

Os vírus podem ser classificados segundo o seu material genético: serão ditos vírus de DNA se possuírem o ácido desoxirribonucléico (DNA), e vírus de RNA caso possuam o ácido ribonucléico (RNA). Esse mesmo ácido nucléico pode ser de cadeia simples ou dupla. No caso dos vírus de RNA a maioria tem cadeias simples, dividindo-se em três tipos básicos: vírus de cadeia positiva, vírus de cadeia negativa e retrovírus. (Ibid)

Vírus de cadeia positiva são aqueles cujo RNA do genoma tem a mesma seqüência de bases nitrogenadas que os RNA mensageiros por ele produzidos. Os de cadeia negativa, por sua vez, são todos aqueles cujo RNA genômico tem seqüência de bases nitrogenadas complementar à dos RNA mensageiros. Já os retrovírus são os que possuem uma cadeia simples de RNA associada a transcriptase reversa, uma enzima que produz DNA tendo como modelo o RNA viral. O DNA produzido por esta enzima será usado tanto para transcrever moléculas de RNA mensageiro na síntese de proteínas, quanto para originar o RNA que será empacotado e constituirá o genoma dos novos vírus formados na célula infectada. (Ibid)

Os vírus que possuem DNA como material genético, similar às células, podem empregar diretamente a maquinaria celular para transcrição de seus genes, sua replicação e reparo de seu DNA, não necessitando de enzimas para intermediar esses processos, ao contrário dos vírus de RNA. Isso permite a alguns vírus ter um genoma grande, como os herpesvírus, que tem um genoma de 125 a mais de 240 mil pares de bases e evoluíram de

modo a produzir alguns genes próprios, ficando mais independentes do metabolismo celular.(RÁCZ e MENCK, 2004)

O ácido nucléico viral é revestido por um envoltório protéico protetor chamado capsídeo, apresentando formas variadas e complexas. É constituída por subunidades denominadas capsômeros. Juntos, ácido nucléico mais capsídeo constituem o núcleocapsídeo.(Ibid)

Existem ainda núcleo proteínas que envolvem o ácido nucléico do vírion (partícula viral), como uma capa. Servem como proteção contra ataques das enzimas celulares. Algumas auxiliam na replicação viral.⁶

Alguns vírus apresentam a nucleocapsíde coberta por um envoltório, uma membrana lipoprotéica denominada envelope viral.(Amabis e Martho, 2003). Os vírus que possuem tal estrutura são denominados encapsulados ou envelopados e os que não possuem designados por vírus nus.⁷

Tanto os vírus envelopados como os não-envelopados (vírus nus) possuem proteínas denominadas ligantes, capazes de se encaixar a proteínas da membrana da célula hospedeira, sendo que estas atuam como receptores virais, e os vírus utilizam-se destas para invadir a célula. Tal relação confere ao vírus uma especificidade muito elevada, pois eles somente infectarão as células com proteínas de membrana que se encaixem perfeitamente as proteínas dele, como uma chave e fechadura.(Amabis e Martho, 2003)

Como dito, os vírus não realizam processos metabólicos, sendo, em geral, inertes fora da célula. Entretanto, algumas partículas virais contêm enzimas de grande importância no processo infeccioso. Além do exemplo clássico do HIV, com a transcriptase reversa,

⁶ <http://www.fop.unicamp.br/microbiologia/aulas/aulavirus06.pdf>

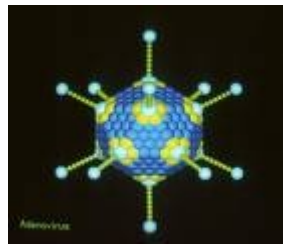
⁷ <http://www.fop.unicamp.br/microbiologia/aulas/aulavirus06.pdf>

fundamental para sua replicação, temos também alguns bacteriófagos que dispõem de enzimas e lisozimas, necessárias para a perfuração da parede celular e penetração do genoma viral.(RácZ e Menck, 2004)

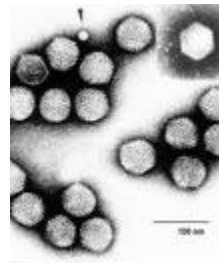
Os vírus podem ser classificados, segundo a simetria do capsídeo, como vírions icosaédricos, vírions helicodais e vírions de estrutura complexa.(RácZ e Menck,2004)É importante ressaltar como nessa divisão fica evidente, mais uma vez, a importância do microscópio eletrônico, pois tal classificação parte da observação direta da morfologia viral, e como sabemos, sem esse importante instrumento não teríamos acesso a um conhecimento dessa ordem.

Virions icosaédricos

Os vírions icosaédricos são todos aqueles vírus cuja cápside apresenta simetria icosaédrica, não apresentando necessariamente morfologia icosaédrica, como é o caso do rinovírus. O icosaédro é um polígono que apresenta 20 faces, 12 vértices e 30 arestas, apresentando três eixos de simetria: 2x, 3x e 5x. O ácido nucléico situa-se empacotado na região central do polígono. Os capsômeros que se localizam nos vértices do polígono são pentâmeros, isto é, são constituídos por cinco protômeros e os capsômeros que se localizam nas faces são hexâmeros. Como exemplos, temos o adenovírus (DNA), os picornavírus (RNA) e os herpesvírus (DNA). (Rác e Menck, 2004)



.A



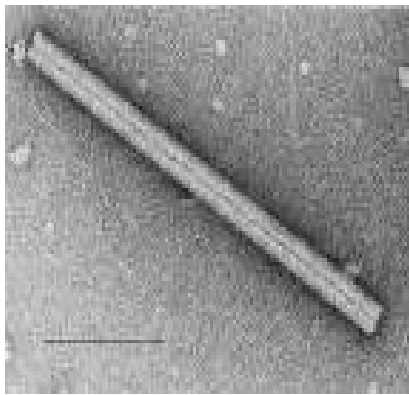
.B

Adenovírus.(A)Modelo estrutural.(B)Microscopia eletrônica.

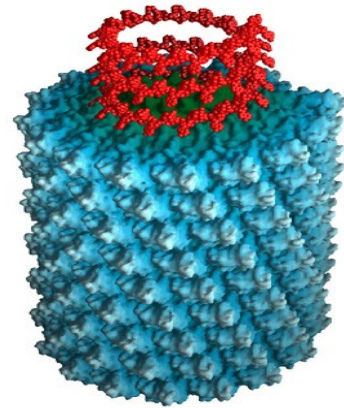
Virions helicoidais

Nos vírus helicoidais, os capsômeros estão dispostos em torno do ácido nucléico segundo uma estrutura em forma de hélice, como a própria classificação sugere. O ácido nucléico localiza-se no interior dessa estrutura, comumente associado aos capsômeros, formando assim um nucleocapsídeo mais compacto. Os exemplos de vírus helicoidais são os vírus do mosaico-do-tabaco, que não são envelopados, e o vírus da influenza e da raiva, que são envelopados. Bem como os vírus icosaédricos, os helicoidais podem apresentar morfologias diversas, como, por exemplo o vírus

Influenza ,que apresenta morfologia aproximadamente esférica.



.A

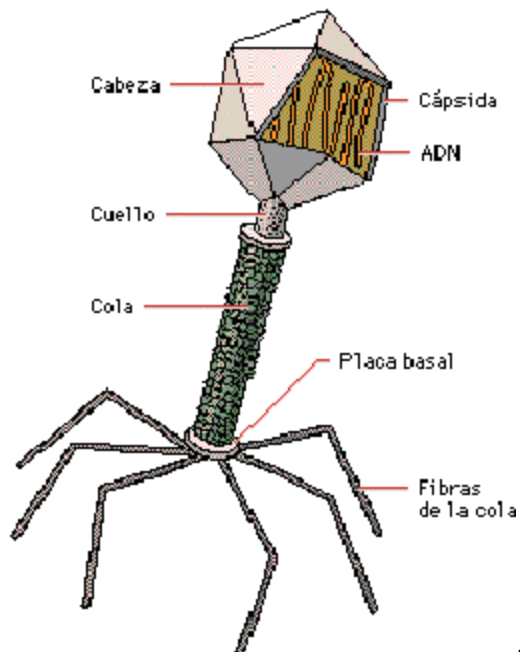


.B

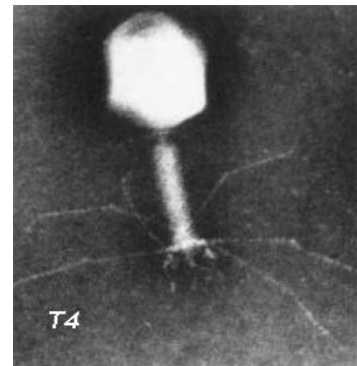
Vírus do mosaico do tabaco.(A)Microscopia eletrônica.(B)Modelo estrutural.

Virions complexos

Existem também os vírus que não podem ser classificados nas classes anteriores,sendo considerados como vírus de estrutura complexa.O exemplo mais característico são alguns bacteriófagos ,como o T4, cuja cápside tem a forma de cabeça poligonal ,além de estruturas adicionais que formam uma espécie de cauda.(Ibid)



.A



.B

Bacteriófago T4.(A)Modelo.(B)Microscopia eletrônica

Agentes subvirais

Alguns agentes infecciosos apresentam características gerais idênticas às dos vírus,mas por outro lado são de estrutura bem mais simples.Os viróides e os prions são dois desses casos.(Ibid)

O viróide é constituídos apenas de RNA,sem nenhuma forma de capsídio,que aparentemente não codifica nenhuma proteína.Sendo assim, ele é completamente dependente das funções celulares para sua replicação.Replicam-se em algumas espécies de plantas, causando doenças provavelmente por interferir no metabolismo destas.O processo de infecção não é bem determinado, mas se acredita que sua passagem seja pelo contato de células e/ou em células que sofram um corte mecânico.(Ibid)

Prions(proteína infecciosa) são provavelmente constituídos de apenas um tipo de proteína,sem ácido nucléico.Causam doenças neurodegenerativas,de progressão lenta e fatal.Atualmente, este agente infeccioso está em destaque devido à ser o causador da encefalopatia espongiforme de bovinos(BSE), mais popularmente conhecida como síndrome da vaca louca.(Ibid)

Considerações finais

Como pudemos perceber ao longo do trabalho o microscópio eletrônico teve um papel de destaque na história da virologia. Muito daquilo que sabemos atualmente acerca dos vírus é fruto em grande parte, do advento desta fantástica tecnologia que é o microscópio eletrônico. Sem esse importante instrumento nossos conhecimentos acerca da morfologia viral, por exemplo, não seriam possíveis. Foi somente com o microscópio eletrônico que tal estudo pôde ser iniciado.

As fotografias virais obtidas ao microscópio eletrônico revelaram suas formas, dimensões e estruturas internas. O microscópio eletrônico tornou possível a visualização dos vírus, tornando viável o estudo da interação destes com as células e o estabelecimento de muitas de suas propriedades gerais. Sem esse importante instrumento certamente não teríamos uma Virologia nos moldes que temos atualmente.

A história da Virologia se confunde com a da microscopia eletrônica: é uma história da superação das limitações humanas, em que a segunda foi crucial para o desenvolvimento da primeira.

Bibliografia

AMABIS, José Mariano; MARTHO, Gilberto Rodrigues. **Biologia dos Organismos**. São Paulo: Moderna, 2004. 617p.

Aula de parasitologia. Disponível em: <http://www.fortunecity.com/greenfield/eco/813/mod1aula1.html> Acesso em: 14 nov. 2007
MARTINEZ, Ana Maria Blanco. **Microscopia eletrônica**. Rio de Janeiro: ICB, s.d. 79p.

COUTO, João. **Microscopia**. Disponível em: <http://www.iesambi.org.br/iesambiarquivos/roteiromicroscopia2004.htm/>. Acesso em: 15 nov. 2007.

FREITAS, Orlando T. de. BOLSANELLO, Aurélio. **Fundamentos da citologia**. Rio de Janeiro: Livros técnicos e científicos, 1979. 358p.

Galetti, Silvia Regina. Introdução a microscopia eletrônica. In: **Biológico**, v.65, n.1/2, p. 33-35, jan/dez., 2003, São Paulo. Disponível em: http://www.biologico.sp.gov.br/biologico/v65_1_2/galetti.PDF. Acesso em: 16 nov. 2007.

Maliska, Ana Maria. **Microscopia eletrônica de varredura e microanálise**. Disponível em: http://www.materiais.ufsc.br/lcm/web-MEV/MEV_Apostila.pdf. Acesso em: 19 nov. 2007.

TRABULSI, Luiz Rachid; ALTERTHUM, Flávio. Microbiologia. In: RACZ, Maria Lúcia; MENCK, Carlos Frederico Martins. **Propriedades gerais dos vírus**. São Paulo: Atheneu, 2004. p. 509-14.

Vírus. Disponível em: <http://www.fop.unicamp.br/microbiologia/aulas/aulavirus06.pdf> Acesso em: 15 nov. 2007

Anexos

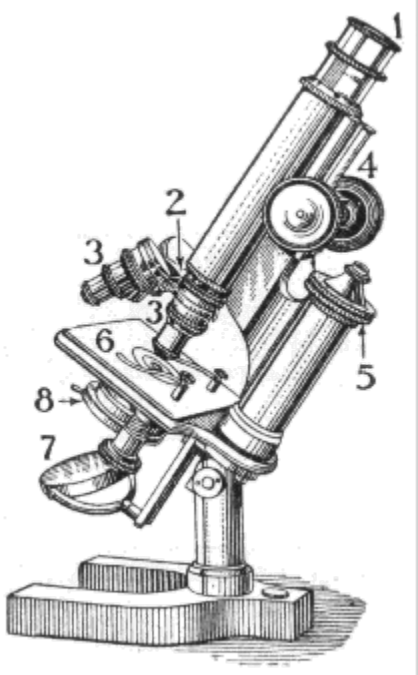


Fig.1-Microscópio composto.



Fig.2-Microscópio simples de Hooke.

Fig.3-Um dos primeiros microscópios.

Retirado de www.cdcc.sc.usp.br/.../microscopio.jpg

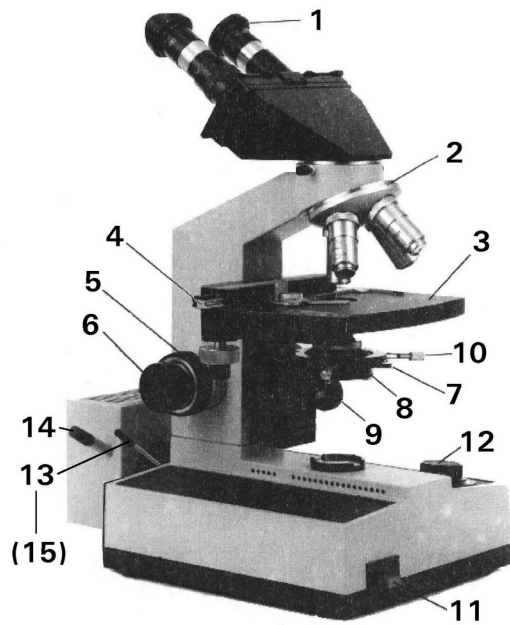


Fig.4-Microscópio óptico moderno.
Retirado de www.icb.ufmg.br/mor/biocelch/microscopio.jpg



Fig.5 -Microscópio eletrônico de transmissão(MET) antigo.

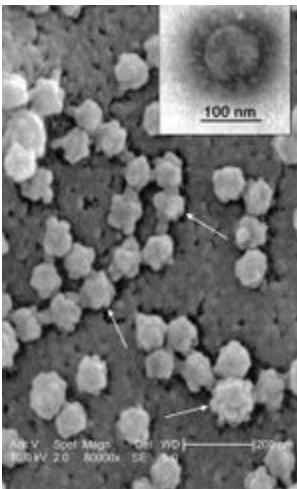
Retirado de www.poli.usp.br/.../imagens/pg348_n.jpg

Fig.6-MET mais atual.

Retirado de www.unifesp.br/.../microsceltronico.jpg



Fig.7-Microscópio eletrônico de varredura(MEV)
Retirado de www.las.inpe.br/imagens/MEV_Canon2.jpg



Vírus da Síndrome respiratória aguda(SARS) ampliado em microscopia eletrônica.
Retirado de upload.wikimedia.org/.../150px-SARS_CoV.jpg

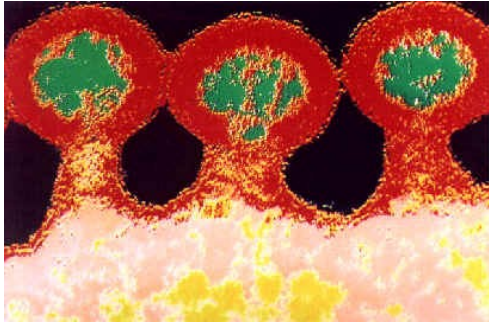


Fig.8-Vírus HIV introduzindo seu material genético no linfócito T auxiliar.MEV(360000x)

Retirado de www.ciencianews.com.br/universo4.htm

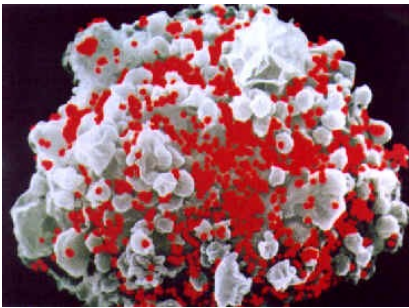


Fig.9-Vírus HIV atacando um leucócito.MEV(20000x)

Retirado de www.ciencianews.com.br/universo4.htm

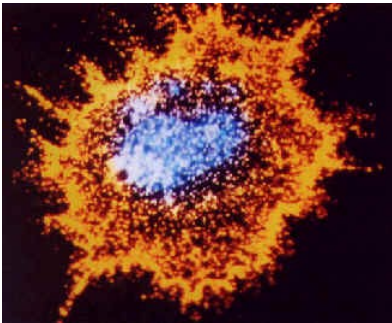


Fig.10-Príon causador da doença da vaca louca.

Retirado de www.ciencianews.com.br/universo4.htm

