

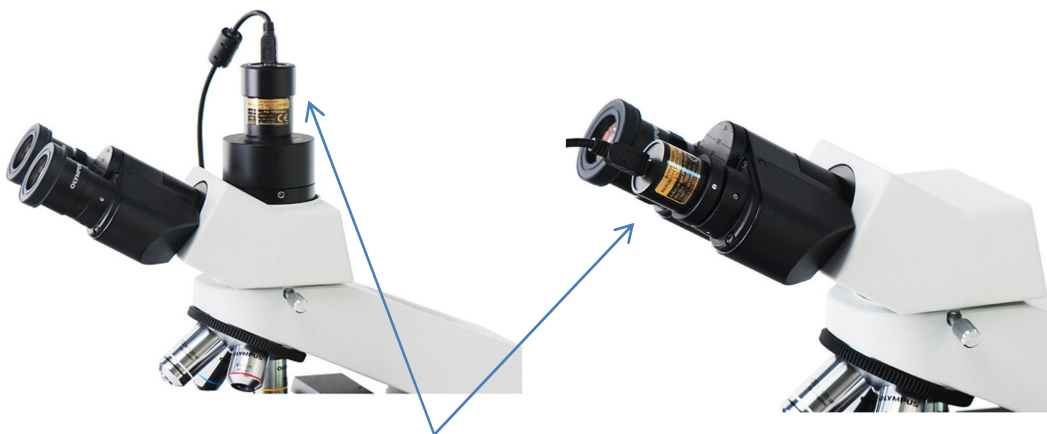
Microscópios

Temos percebido que muitos veterinários encontram problemas diversos com microscópios, como por exemplo, iluminação, foco, ajuste de câmera etc. Resolvemos criar um **booklet** tratando o assunto em detalhes, para ajudar você num dos pontos mais críticos para a análise computadorizada de sêmen.

Parte I

A Microscopia Óptica

- A Importância de conhecer o microscópio que você usa para uma boa análise de sêmen
- Conhecendo as partes de seu microscópio
- Recursos de cada componente
- Cuidados e ajustes para um bom sistema de iluminação durante a análise
- Dicas para uma boa calibragem óptica de seu microscópio
- A manutenção e limpeza preventiva (Limpeza das Lentes e ajustes na mecânica macrométrica e micrométrica)
- Microscópios Binoculares e Trinoculares, quando e como utilizá-los
- Adaptação de câmeras digitais



Microscópio Trinocular c/ Câmera Digital

Microscópio Binocular c/ Câmera Digital

O microscópio óptico utiliza a luz e um conjunto de lentes para ampliar o tamanho de amostras analisadas. Dessa forma, possui diversos componentes que possibilitam uma observação eficiente de diversos materiais. A maioria dos microscópios possui uma estrutura bastante semelhante. No entanto, há diversos modelos de microscópio com variadas partes que fazem com que esses equipamentos se diferenciem uns dos outros. Sua composição é dividida em partes mecânicas e ópticas. Veja abaixo os componentes da parte óptica de um microscópio.

Conhecendo as partes de seu microscópio

1. **Lentes Objetivas:** São capazes de aumentar um objeto em até 100x.
2. **Oculares:** Em geral, com um aumento de até 15x, é a lente utilizada diretamente pelo observador.
3. **Diafragma:** Regula a quantidade de luz que entra no condensador.
4. **Condensador:** Concentra os feixes de luz sobre a amostra.
5. **Fonte de Luz:** Geralmente, trata-se de uma iluminação de baixa voltagem. Lâmpadas Halógenas ou LEDs.
6. **Canhão:** Utilizado como suporte para as lentes (Objetivas).
7. **Revólver:** Disco que acomoda as objetivas, possibilitando a modificação da lente através da rotação.
8. **Platina ou Mesa:** Local onde se apoia a lâmina para observação da amostra.
9. **Macrométrico e micrométrico:** Responsáveis por focar a amostra ao movimentar a platina.
10. **Braço:** É um suporte para as demais peças do microscópio.
11. **Base:** Peça que dá sustentação ao microscópio.



Para um bom uso do equipamento de microscopia óptica laboratorial o analista deve conhecer o tipo de engenharia utilizada na sua ferramenta de trabalho – o microscópio. Para isso, vamos fazer uma apresentação sintética de dois modelos tecnológicos utilizados.

Microscópios - Com Contraste e Sem Contraste de Fase

Espécimes biológicos que não tenham sido corados, em geral, se apresentam transparentes, o que torna sua observação difícil ao microscópio óptico comum **sem contraste de fase**, já que o detalhamento da imagem fica prejudicado pela proximidade das densidades ópticas e, índices de refração das diferentes partes do tecido das células.



O microscópio **com Contraste de Fase** é um instrumento que converte diferenças do índice de refração que não podem ser vistas, em diferenças de intensidade que se tornem visíveis. As ondas de luz que atravessam os componentes celulares de densidades ópticas diferentes assim o farão em diferentes velocidades. Desse modo, as ondas luminosas que atravessam núcleos, mitocôndrias e inclusões celulares emergirão em tempos diferentes e em fases diversas, de um elemento em relação ao outro facilitando a identificação digital das células nos *“Plug-ins”* de leitura dos sistemas **CASA**.

Existe também a microscopia de fase diferencial (microscopia de Nomarski), capaz de produzir imagens que se apresentam aparentemente tridimensionais durante a observação do espécime. Este tipo de microscópio também pode ser denominado microscópio de diferença *“interferencial”* de contraste segundo Nomarski.

Microscópios

Parte II

Macrométrico e micrométrico

Botões giratórios de dois sentidos (horário e anti-horário), sendo um dos ajustes, maior externo e o outro menor interno, respectivamente. Eles são responsáveis por focar a imagem da amostra ao movimentar a platina ou mesa do microscópio. Estes dois botões de recursos devem estar sempre com mecanismo muito bem lubrificados, ajustados e calibrados, pois são fundamentais para o correto curso da mecânica e conseqüentemente o perfeito ajuste da imagem. O macrométrico faz o ajuste “*grosso*” no movimento da mesa do microscópio, enquanto o micrométrico realiza o ajuste “*fino*” como numa sintonia de um televisor ou rádio antigo.



Para um melhor ajuste da imagem e maior rapidez na manipulação da análise, gire sempre em primeiro lugar o macrométrico, logo depois refine a imagem e o foco com o giro do micrométrico.

Observação:

Ao mover o macrométrico ou o micrométrico observe sempre à distância entre a objetiva instalada no revólver do microscópio e a lâmina, pois se a amostra estiver sem lamínula para proteção da mesma, e você encostar o canhão da objetiva em fluido seminal, poderá contaminar a lente da objetiva e até mesmo, danificá-la permanentemente.

Microscópios

Parte III

O Condensador e o Diafragma

Estes dois componentes são os responsáveis diretos pelo tratamento da iluminação do microscópio, são eles que fazem a diferença no perfeito ajuste da imagem, seja na difusão, concentração ou uniformidade na iluminação da amostra.



Distribui regularmente no campo da preparação a luz que atravessa o diafragma



O **Condensador** concentra os feixes de luz incidente na amostra. Isto quer dizer, que é ele quem ajusta em qual camada do fluido da amostra (entre a lâmina e a lamínula) a luz deve ser concentrada. O resultado de um bom ajuste no condensador poderá ser observado, através de uma imagem com contraste nas células e boa definição de contornos. A correta calibragem do condensador pode ser observada na estrutura destacada na morfologia dos espermatozoides.

O **Diafragma** é o dispositivo que regula a quantidade de luz que entra no condensador. Ou seja, você pode ajustar a iluminação do microscópio no máximo e através do diafragma regular quanto de luz você quer que passe através da amostra. Ele deve ser usado para ajustar a profundidade e dar destaque aos espermatozoides, com relação ao plano de fundo. Nem sempre uma imagem com muita luz apresenta um bom contraste, boa definição e foco. Às vezes é necessário reduzir a quantidade de luz, repassada ao condensador, por meio do diafragma para que seja apresentada uma imagem com maior nitidez e definição.

Parte IV

Estabilização do Microscópio e Padronização



Sistemas **CASA** (Computer Assisted Sperm Analyzer) exigem um certo padrão para análise das amostras de sêmen. O **mace**[®] é um sistema de fácil utilização, com botões intuitivos que facilitam sua operação, porém, são necessários alguns cuidados para que os resultados sejam impecáveis. Tendo sempre em mente, que a chave para o sucesso é a uma boa gravação do vídeo. Para isso temos de nos ater a alguns detalhes.

- São recomendadas amostras com concentração padrão de: 50×10^6 ml, 100×10^6 ml ou 200×10^6 ml.
- Cuidado para não deixar o sêmen “escorrendo/escorregando” na lâmina, às vezes os espermatozoides mortos ficam deslizando pela lâmina, o que pode gerar falsos resultados positivos. Para tentar evitar isso, solte a lamínula com cuidado em cima da amostra. Observe a estabilidade da base do microscópio na mesa de apoio e também da placa aquecedora, caso seja utilizada, isso é fundamental.
- Grave vídeos com boa luminosidade, contraste e foco, isso facilitará as leituras dos algoritmos do **mace**[®], quando mais nítido e contrastado, melhor.
- Padronizar todo o processo de gravação do vídeo. A padronização é imprescindível para bons resultados, isso envolve ajustar luminosidade, contraste, preparo de amostra, aumento do microscópio, de preferência usar o mesmo microscópio, tamanho da gota (padrão = 10 microlitros), tamanho da lâmina e lamínula, e assim por diante.