



I Ciclo de Treinamentos

Boas Práticas em Microscopia de Fluorescência

Laboratório de Imagens Biológicas
Laboratório de Bioensaios
Equipe de Dados Biológicos



CNPq

MINISTÉRIO DA
CIÊNCIA, TECNOLOGIA
E INOVAÇÃO



Objetivo do Ciclo de Treinamentos:

O treinamento tem como objetivo capacitar a comunidade de usuários do CNPEM na aplicação de **boas práticas em bioimagem**, promovendo o uso consciente, crítico e quantitativo das técnicas de imageamento. Busca-se fornecer uma base conceitual para o **desenho experimental**, a **aquisição adequada de imagens**, a **análise quantitativa** e a **interpretação reprodutível dos dados**, alinhada aos *guidelines* internacionais estabelecidos pelas comunidades global e latino-americana de bioimagem.

Dividido em 3 encontros com 3 horas de duração cada:

28/01/2026 - Fundamentos de Microscopia Ótica e Boas Práticas Experimentais

26/02/2026 - Preparo de Amostras para Microscopia de Luz

31/03/2026 - Fundamentos dos Softwares de Análise e Processamento de Imagens



CNPEM

MINISTÉRIO DA
CIÊNCIA, TECNOLOGIA
E INOVAÇÃO



Laboratório de Imagens Biológicas - LIB

Microscópios de Fluorescência

Microscópio de Super Resolução STED Leica

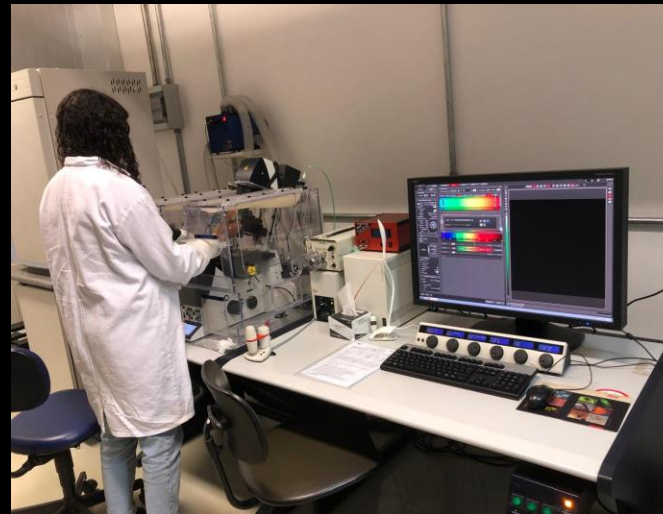
O Laboratório de Imagens Biológicas oferece aos usuários externos e internos acesso ao microscópio confocal invertido de **super-resolução** – Leica **STED**, que ultrapassa o limite de difração da luz, permitindo a investigação de detalhes subcelulares em amostras biológicas fixadas.



Microscópio Confocal

SP8 Leica

SP8 Leica permite a visualização detalhada de células vivas, utilizando a fluorescência para marcar estruturas e processos intracelulares, realiza **FRAP** - *Fluorescence Recovery After Photobleaching*: Uma técnica utilizada em biologia celular para estudar a dinâmica de moléculas dentro das células e **FRET** - *Fluorescence Resonance Energy Transfer*: em microscopia é uma técnica que utiliza a transferência de energia não radiativa entre duas moléculas fluorescentes para estudar interações moleculares e dinâmica celular

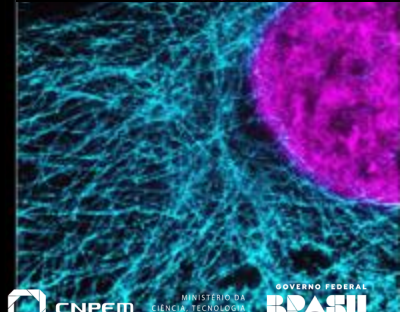
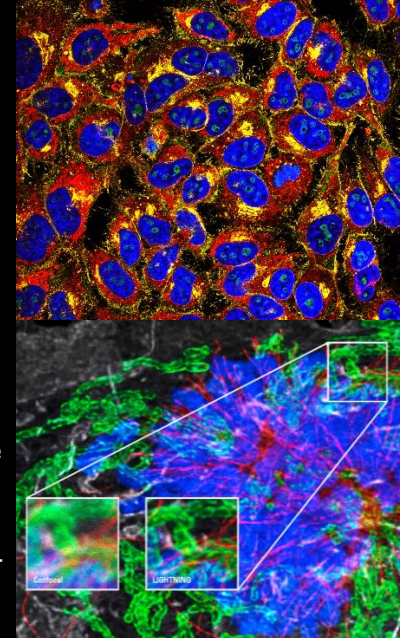


Microscópio Widefield-

DM6 Leica

Microscopia de Fluorescência, técnica de imagem que utiliza fonte de luz filtrada para iluminar e examinar amostras, como células, tecidos ou estruturas microscópicas coradas por marcadores fluorescentes ou com autofluorescência.

Microscopia de Luz Polarizada: é uma técnica de microscopia óptica que utiliza luz polarizada para realçar o contraste e a resolução de imagens de materiais, principalmente aqueles que são birrefringentes (anisotrópicos), como minerais, polímeros e estruturas biológicas.

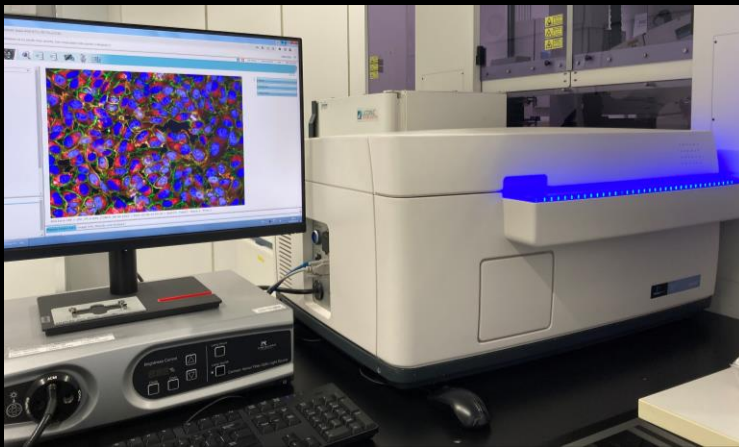


Laboratório de Bioensaios - LBE

Microscópios HCS

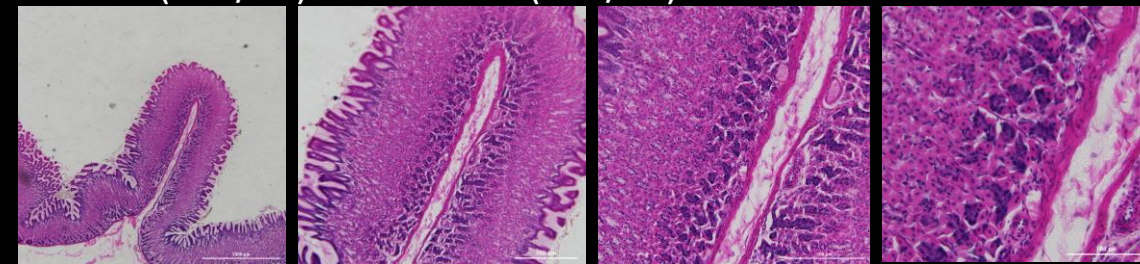
Operetta

- Objetivas 2x, 10x, 20x, 40x, 60x
- Fluorescência: 8 filtros excitação e 13 filtros emissão e campo claro
- Controle de temperatura (StandAlone – LOA)
- Modo confocal (HTS – LPNB-2)



Cytation5

- Leitor de placas: fluorescência/polarizada, absorbância, luminescência.
- Microscópio: imagens de fluorescência e campo claro colorido;
- Objetivas 2,5x, 4x, 10x, 20x, 40x, 60x
- Filtros disponíveis: **azul** (460/40), **verde** (525/39) e **vermelho** (590/35)



4x

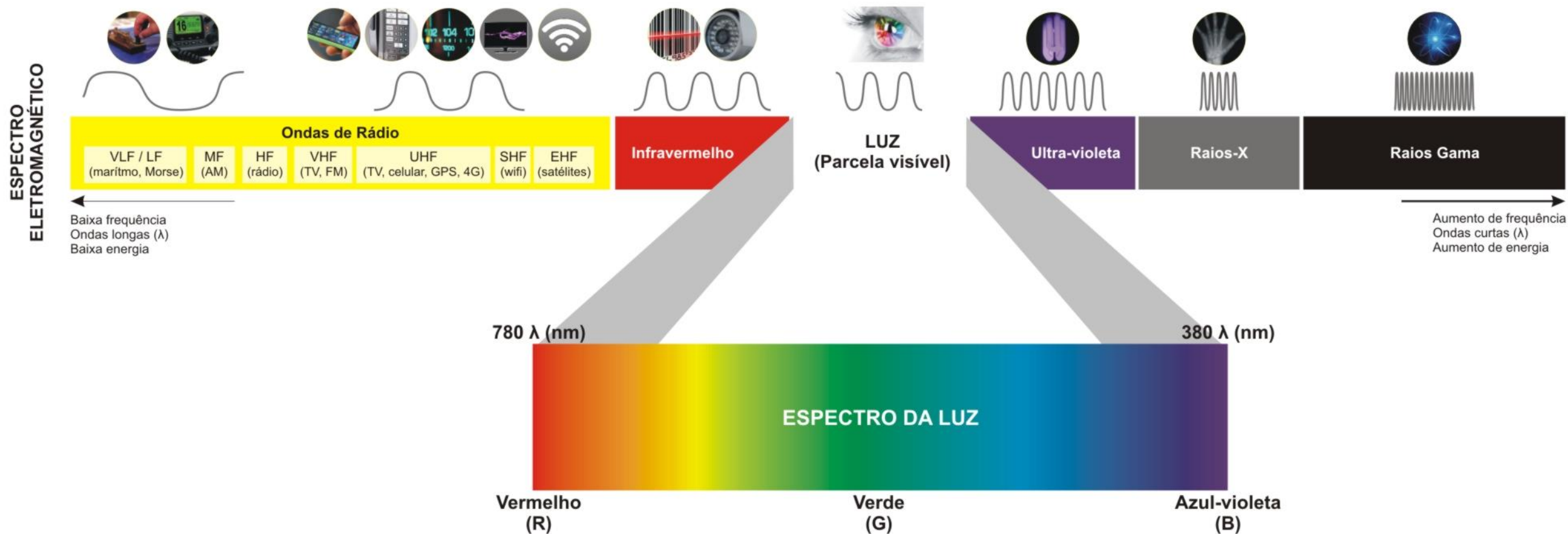
10x

20x

40x

Imagens de campo claro colorido de epitélio (Hematoxilina-eosina)

Espectro da Luz



A luz é uma radiação eletromagnética caracterizada pelo **comprimento de onda (λ)** ou **energia**.

- **Ultravioleta (UV):** ~200–400 nm
- **Visível:** ~400–700 nm
- **Infravermelho (IV):** >700 nm

Na microscopia de fluorescência, trabalhamos principalmente no **visível** e, em alguns casos, no **UV** ou **infravermelho** próximo.

Como o microscópio usa o espectro da luz

O microscópio de fluorescência separa luz espectralmente usando filtros:

Fonte de luz

- a) Lâmpadas (mercúrio, xenônio);
- b) LEDs Lasers (linhas discretas: 405, 488, 561, 640 nm)

Filtro de excitação

- a) Seleciona apenas os comprimentos de onda que excitam o fluoróforo

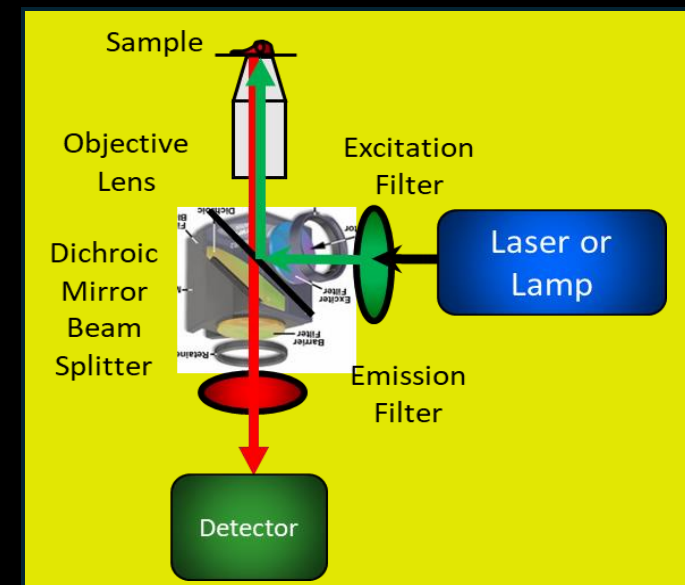
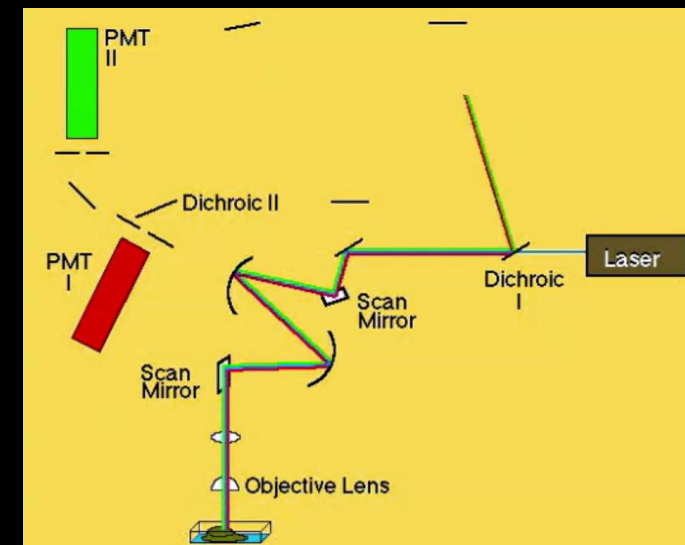
Espelho dicróico

- a) Reflete a luz de excitação
- b) Transmite a luz de emissão (comprimento de onda maior)

Filtro de emissão

- a) Bloqueia a luz de excitação residual
- b) Deixa passar apenas a fluorescência desejada

👉 **no Leica SP8 há filtros, mas eles não são filtros físicos fixos como no Operetta ou no DM6; a seleção é feita de forma espectral e eletrônica dentro do detector.**



O que é fluorescência?

Fluorescência é um fenômeno físico no qual uma molécula absorve luz em um determinado comprimento de onda e, quase imediatamente, reemite luz em um comprimento de onda maior (menor energia).

Fluorescência ocorre quando:

1. Um fóton excita uma molécula
2. Um elétron passa para um estado eletrônico excitado
3. Parte da energia é dissipada (vibrações/relaxamento)
4. A molécula retorna ao estado fundamental emitindo um fóton

👉 A luz emitida é a fluorescência.

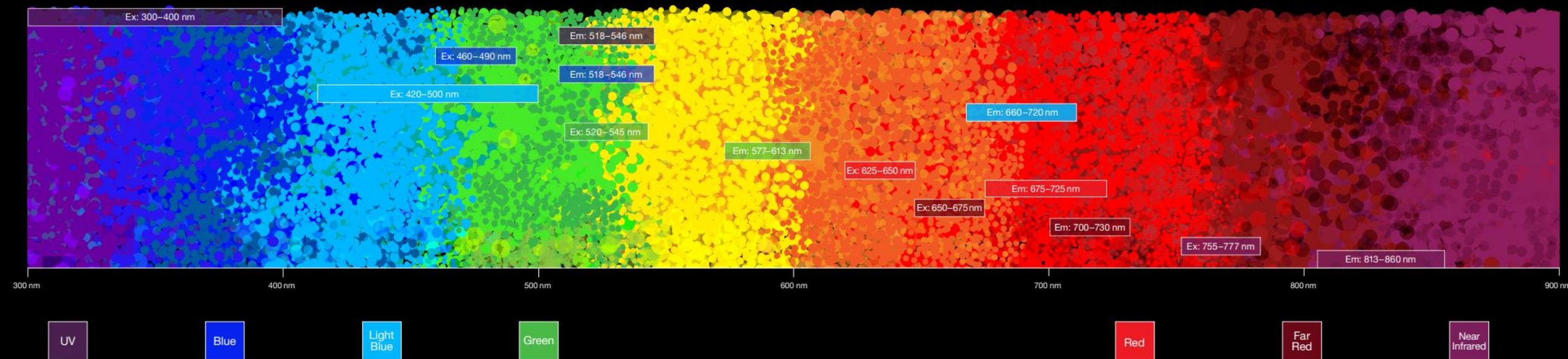
O que um fluoróforo?

Um fluoróforo é uma molécula capaz de fluorescer, ou seja, absorver luz em um determinado comprimento de onda e reemitir luz em um comprimento de onda maior.

Em microscopia de fluorescência, ele é o elemento que gera o sinal que você detecta.



Como escolher um fluoróforo?



1. Tipo de amostra

🧫 Células em cultura (monocamada)

- Pouca autofluorescência
- Espessura pequena
- Maior liberdade de escolha

Pode usar azul, verde, vermelho sem grandes problemas.

🧠 Tecidos / amostras espessas

- Alta autofluorescência (colágeno, elastina, lipofuscina)
- Espalhamento de luz
- Absorção diferencial

Prefira fluoróforos no vermelho / infravermelho próximo.

2. Comprimento de onda importa (regra de ouro)

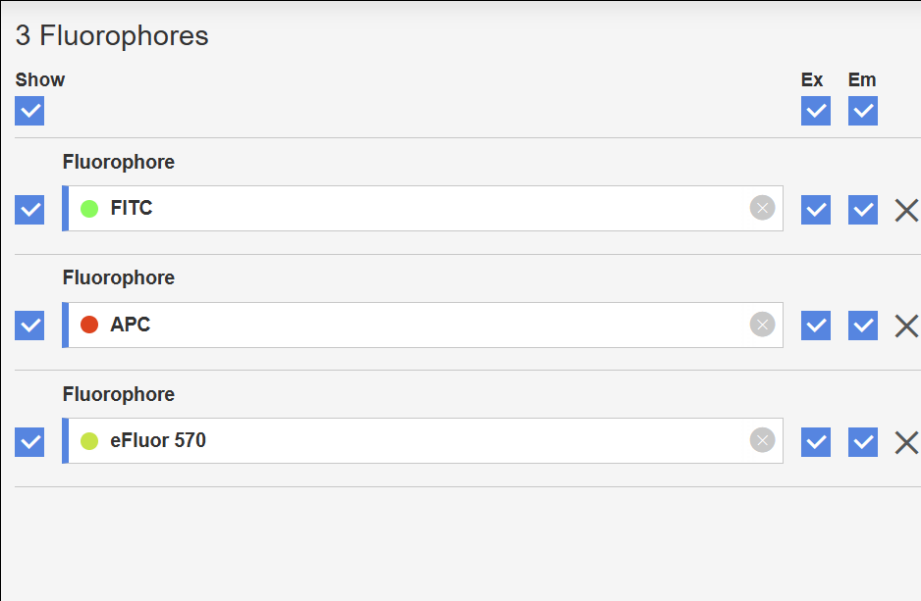
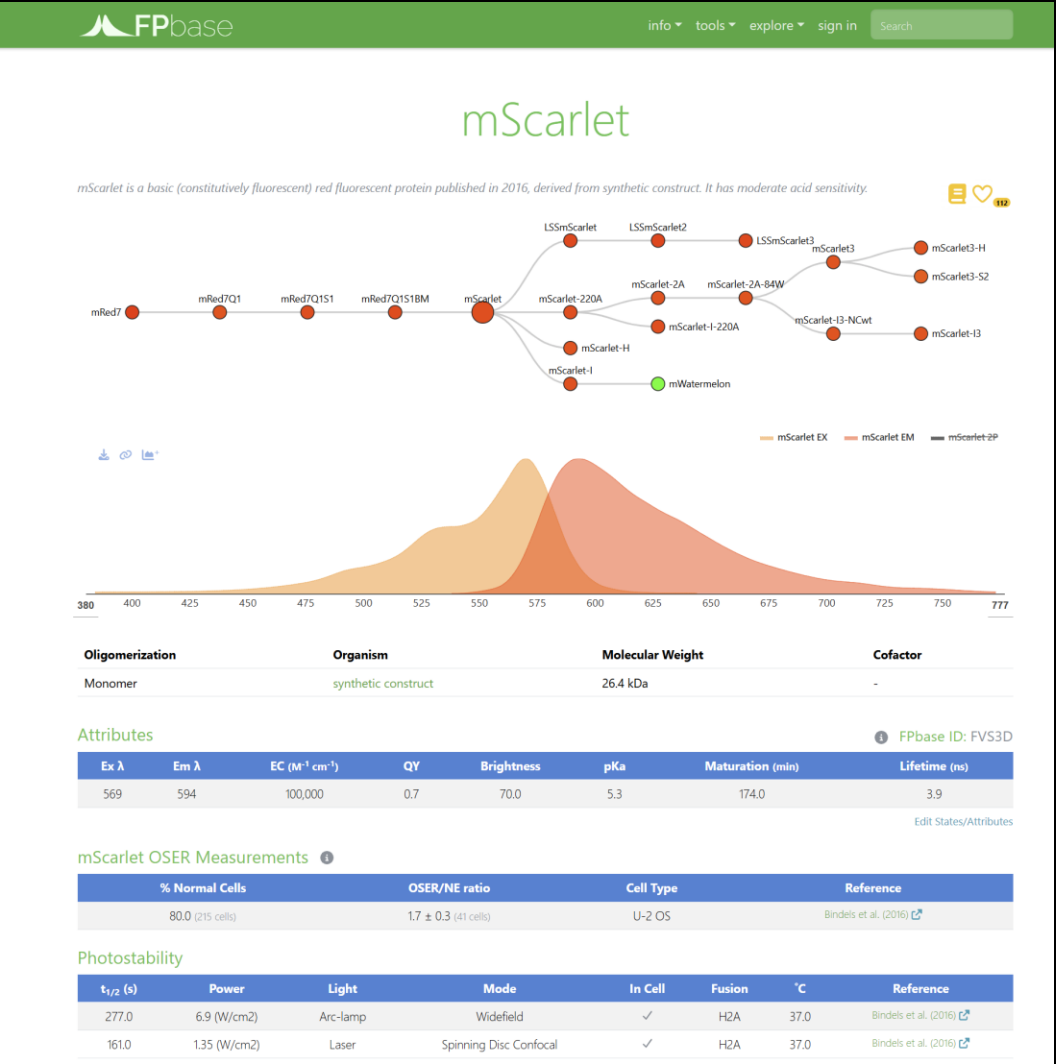
Luz azul/UV:

- Mais espalhamento
- Mais autofluorescência
- Mais fototoxicidade

Luz vermelha:

- Penetra mais
- Menos autofluorescência
- Menos dano celular

Como combinar fluoróforos diferentes?



Qualidade das moléculas fluorescentes

A qualidade de qualquer corante fluorescente depende de três fatores:

1. Coeficiente de absorção (ϵ): quantidade de energia luminosa que a molécula absorve.
2. Rendimento quântico (QY): fração da energia luminosa absorvida que é emitida como fluorescência, e não desviada para outros processos, como estado tripleto, fosforescência ou relaxamento vibracional.
3. Fotoestabilidade: estabilidade química da molécula no estado excitado.

➤ O brilho de um fluoróforo é o produto do coeficiente de absorção pelo rendimento quântico.



CNPq

MINISTÉRIO DA
CIÊNCIA, TECNOLOGIA
E INOVAÇÃO

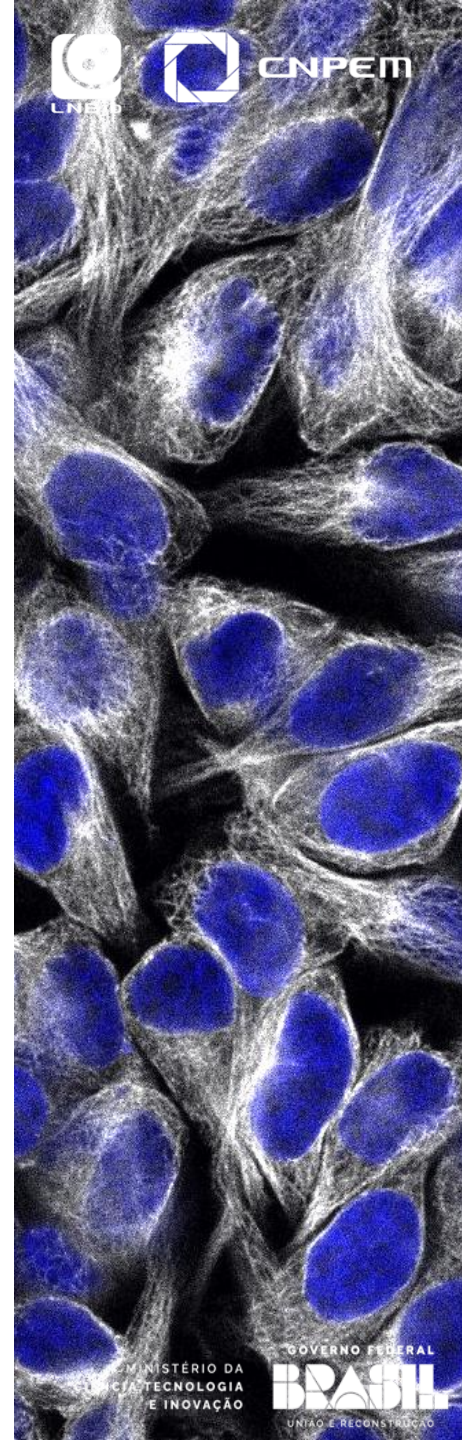
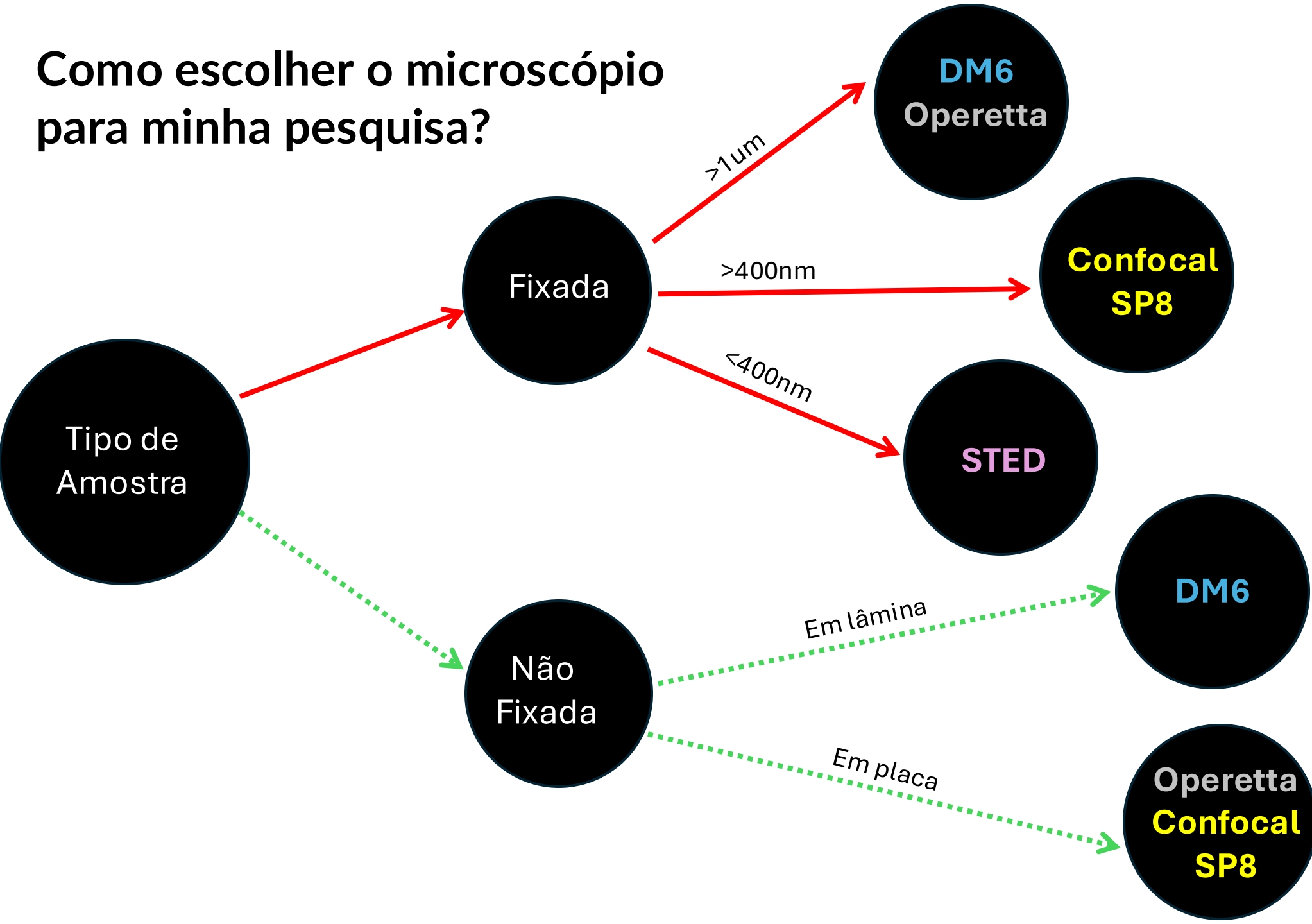


GOVERNO FEDERAL

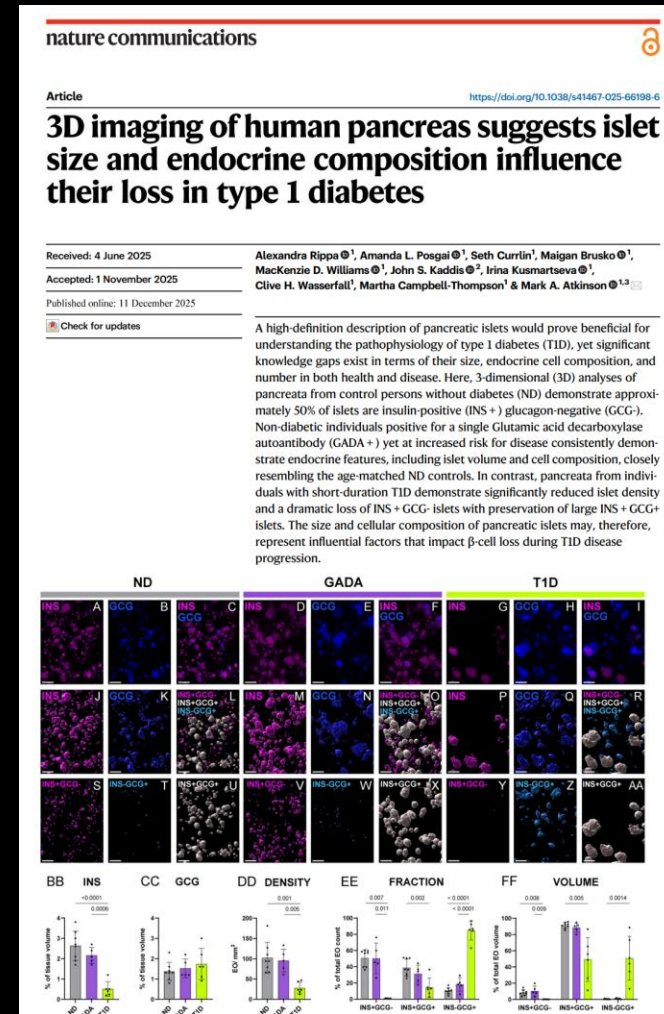
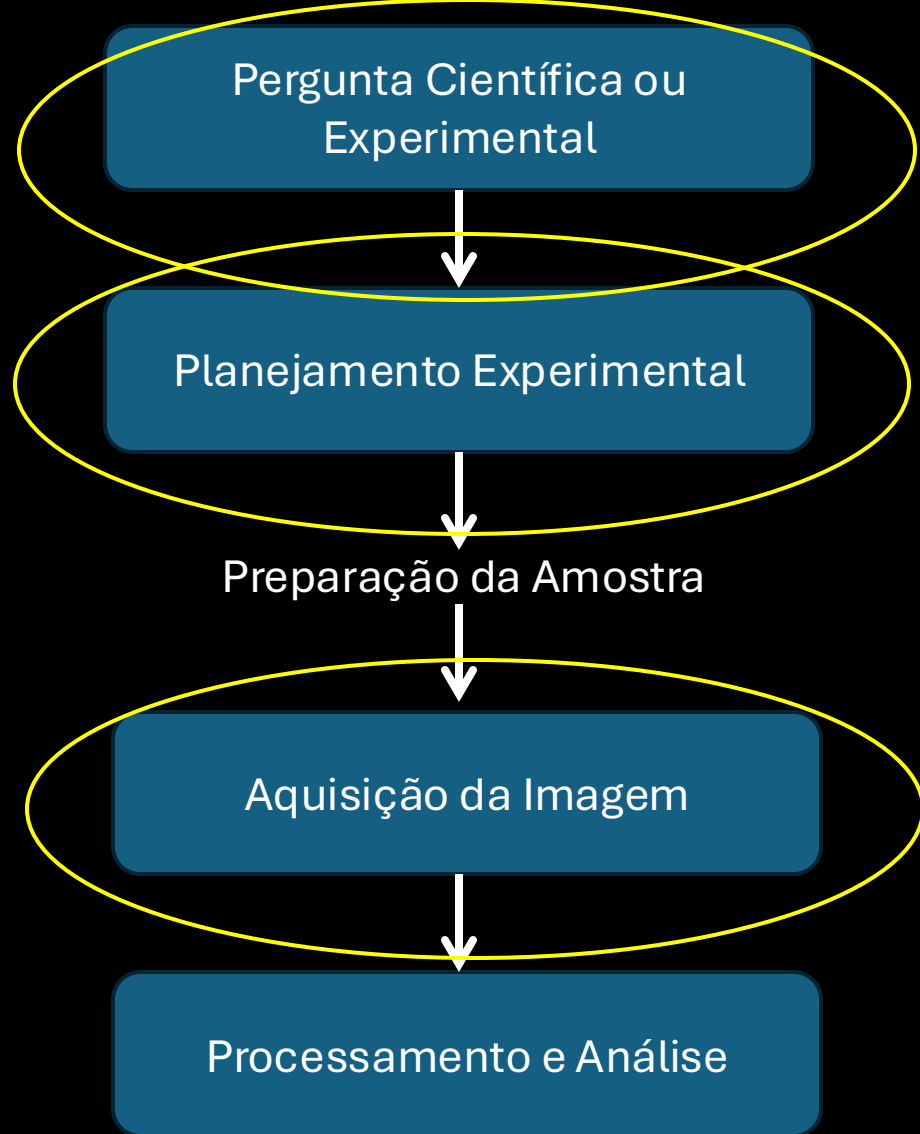
BRASIL

UNIRÃO E RECONSTRUÇÃO

Como escolher o microscópio para minha pesquisa?

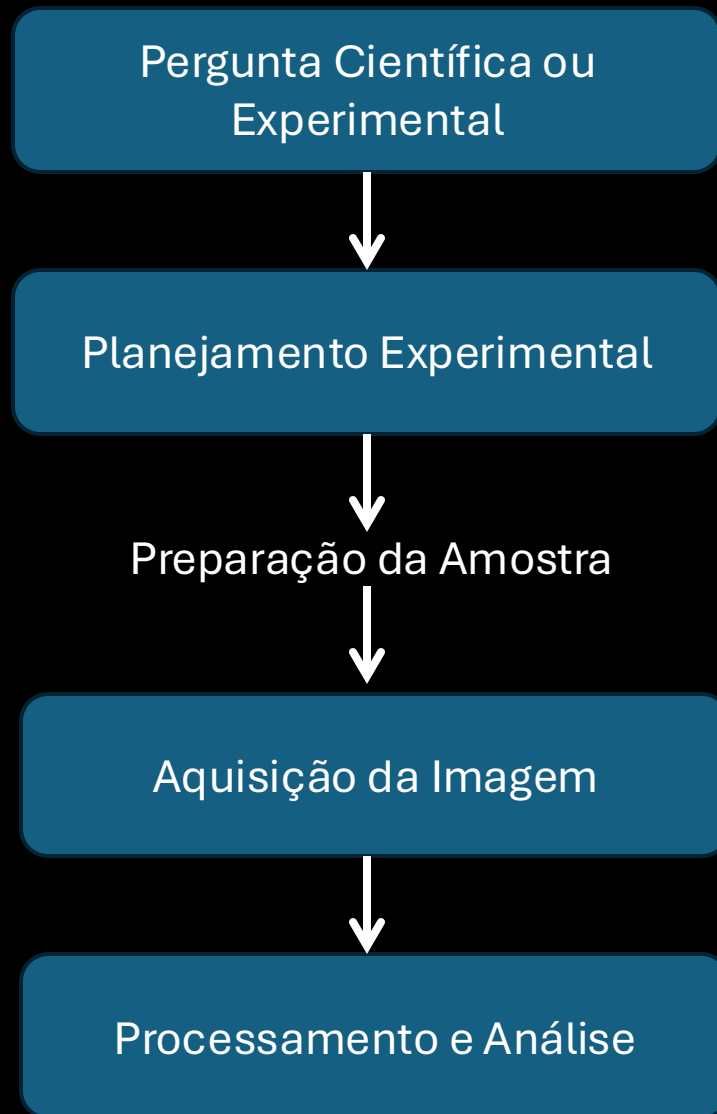


Como realizar um experimento quantitativo usando a microscopia de fluorescência?



<https://www.nature.com/articles/s41467-025-66198-6>

Como realizar um experimento quantitativo usando a microscopia de fluorescência?



- Qual minha pergunta?
- O que eu quero quantificar?
- São objetos ou é intensidade de fluorescência?
- A pergunta que eu estou fazendo pode ser respondida usando microscopia?

Exemplo:

Existem diferenças estruturais e composicionais detectáveis em 3D nas ilhotas pancreáticas humanas que expliquem por que algumas ilhotas são perdidas preferencialmente no diabetes tipo 1?

O que eu quero quantificar?

No paper, os autores **não querem apenas “ver”** — eles querem **medir**. Especificamente:

- 📊 **Número total de ilhotas** por volume de tecido
 - 📐 **Tamanho/volume das ilhotas** (pequenas, médias, grandes)
 - 🧬 **Composição celular das ilhotas**, por exemplo:
 - Proporção de células β (INS+)
 - Proporção de células α (GCG+)
 - 🌐 **Distribuição espacial das ilhotas** ao longo do pâncreas
 - 📉 **Perda diferencial de subpopulações de ilhotas** em indivíduos com T1D
- 👉 Ou seja, o output final são **parâmetros morfológicos e quantitativos em 3D**, não apenas presença/ausência de sinal.

Como realizar um experimento quantitativo usando a microscopia de fluorescência?

Pergunta Científica ou Experimental

Planejamento Experimental

- Seleção das regiões de interesse
- Estabelecimento da ordem de trabalho
- Avaliar o N experimental
- É possível fazer o experimento “as cegas”?
- Colaborações

Preparação da Amostra

Assunto do próximo encontro!

Aquisição da Imagem

Processamento e Análise

Planejamento Experimental

Como isso aparece no trabalho do exemplo?

O objeto de interesse não é uma célula isolada, mas ilhotas pancreáticas distribuídas ao longo de um órgão inteiro.

Portanto, a ROI não é um campo microscópico arbitrário, e sim:

- Grandes volumes do pâncreas
- Diferentes regiões anatômicas do órgão (cabeça, corpo, cauda)

Decisão experimental implícita:

👉 Os autores evitam viés de amostragem ao:

- Trabalhar com volumes extensos de tecido
- Não selecionar apenas “regiões bonitas” ou ricas em ilhotas
- Usar reconstrução 3D para detectar todas as ilhotas dentro do volume analisado

Aqui a ROI é definida pela biologia da pergunta, não pela conveniência do microscópio.

No paper, existem vários “Ns”:

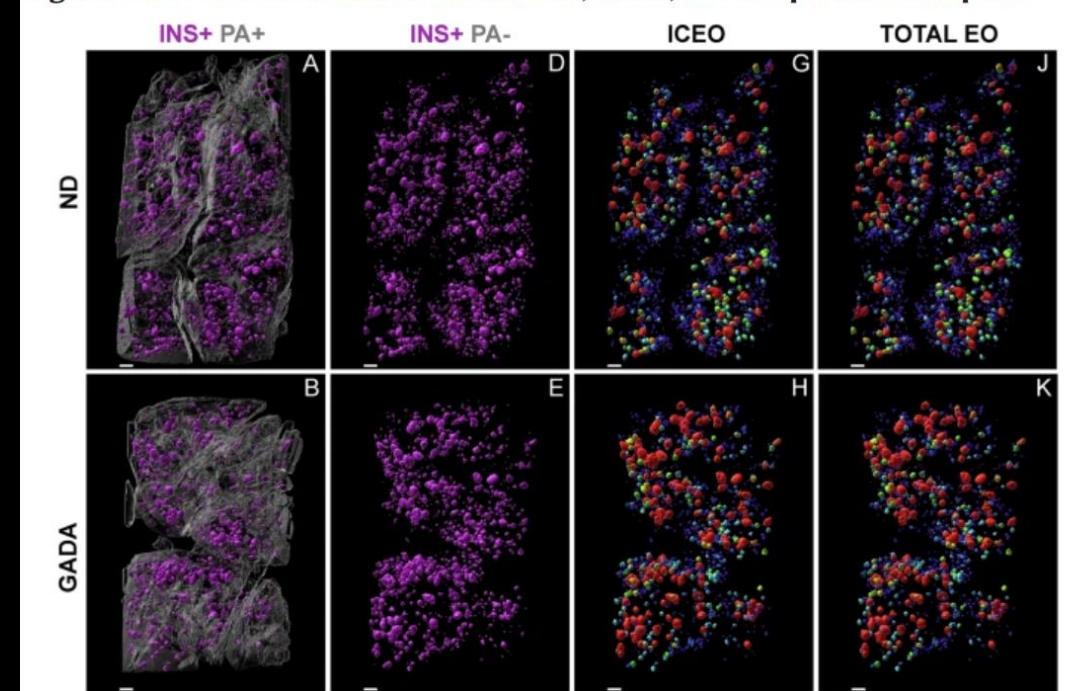
- 👤 **N biológico primário:**
 - Número de doadores humanos por grupo (controle, GADA+, T1D)
- 🧠 **N de órgãos:**
 - Quantos pâncreas foram analisados
- 🧩 **N de objetos:**
 - Número de ilhotas analisadas por pâncreas (centenas a milhares)

Ponto crítico:

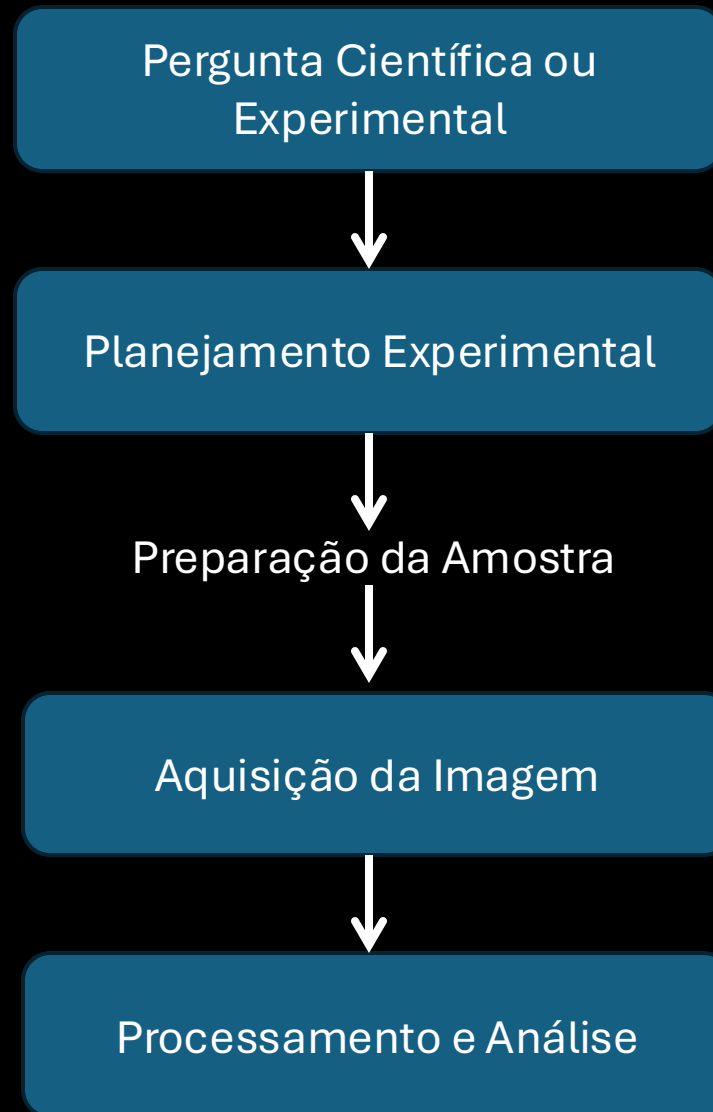
👉 **Ilhotas NÃO são réplicas biológicas independentes**

O verdadeiro N estatístico é o **número de doadores**, não o número de ilhotas.

Fig. 2: 3D islet distribution across human ND, GADA, and T1D pancreas samples.



Como realizar um experimento quantitativo usando a microscopia de fluorescência?



CONTROLES

- Checar autofluorescência usando uma amostra não marcada;
- Em Imunos fazer o controle sem primário;
- Reduzir ou levar em conta o sinal de vazamento entre canais;

ANTES E DURANTE A AQUISIÇÃO

- Confirmar o alinhamento do microscópio;
- Escolher a objetiva apropriada;
- Monitorar a intensidade da lâmpada ou laser;
- Checagem dobrada nos parâmetros de aquisição;
- Ajustar o colar para seu tipo de porta amostra e meio de montagem (placa, lamínula, água, tampão, meio...)



INTERVALO

15 MINUTOS

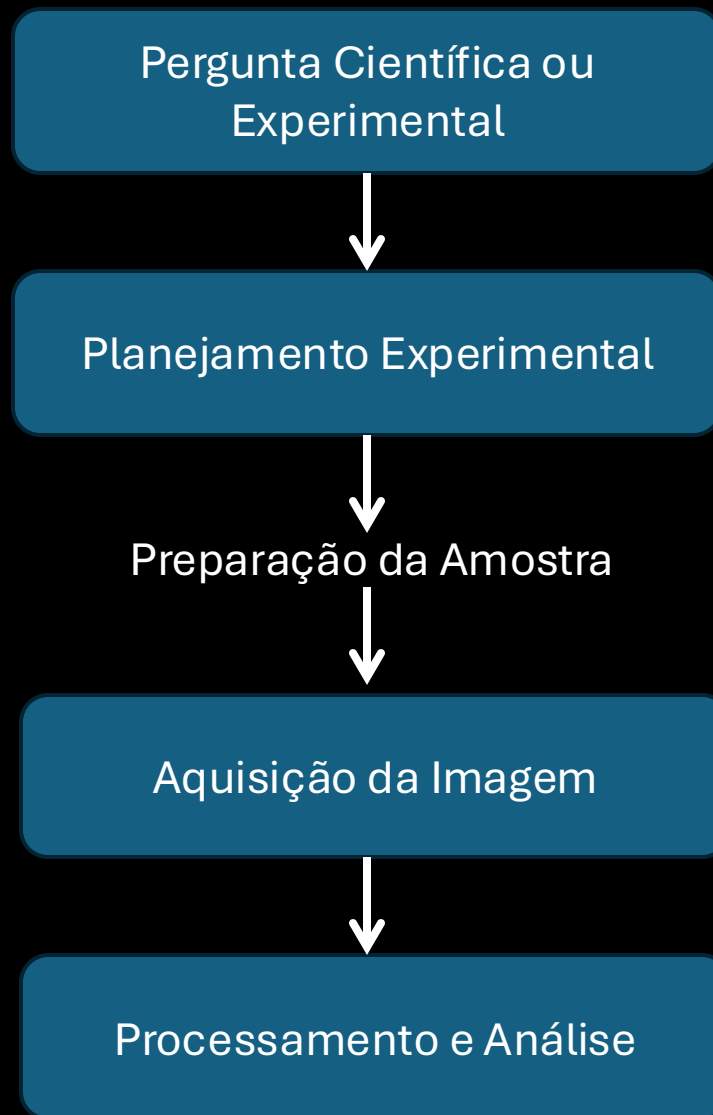


CNPq

MINISTÉRIO DA
CIÊNCIA, TECNOLOGIA
E INOVAÇÃO

GOVERNO FEDERAL
BRASIL
UNIÃO E RECONSTRUÇÃO

Como realizar um experimento quantitativo usando a microscopia de fluorescência?



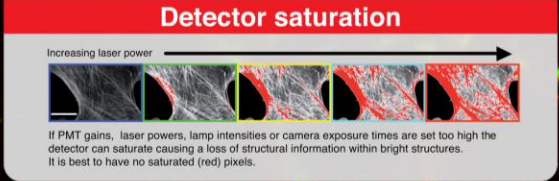
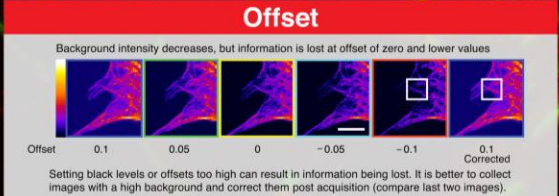
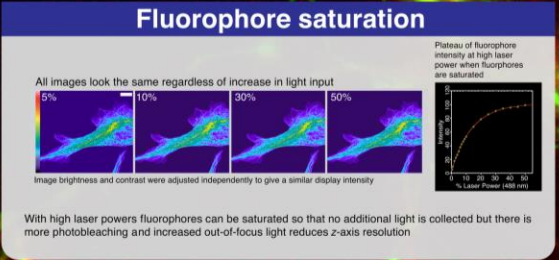
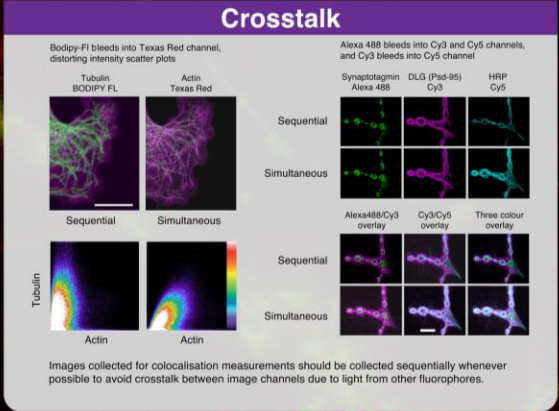
QUALIDADE DA IMAGEM

- EVITAR saturação;
- Adquirir imagens com pixel e tempo suficientemente pequenos para capturar toda a informação real da amostra (Critério de Shannon–Nyquist)

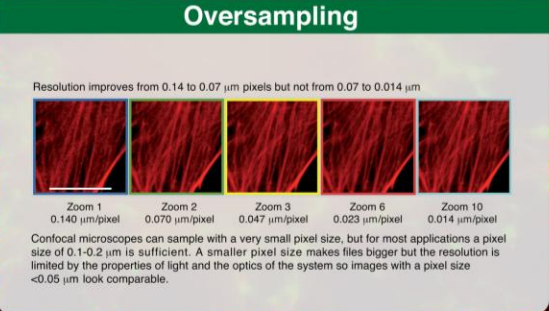
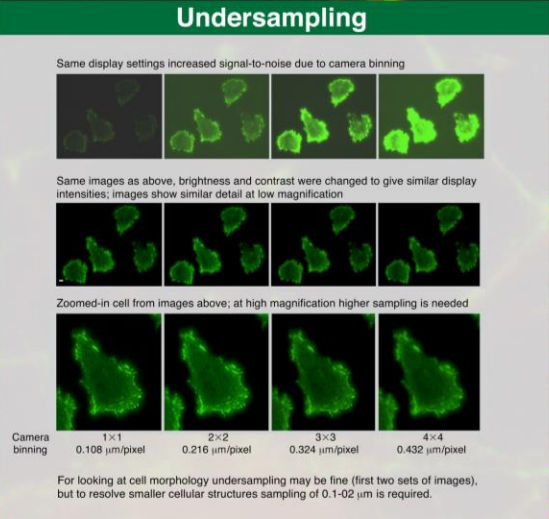
Aumentar o sinal por meio de:

- usar fluoróforos brilhantes e estáveis
- escolher uma objetiva com alta abertura numérica (NA)
- aumentar a intensidade de luz (mas atenção ao fotobranqueamento e à fototoxicidade)
- escolher conjuntos de filtros ideais
- casar/compatibilizar os índices de refração
- usar a objetiva com a menor magnificação possível

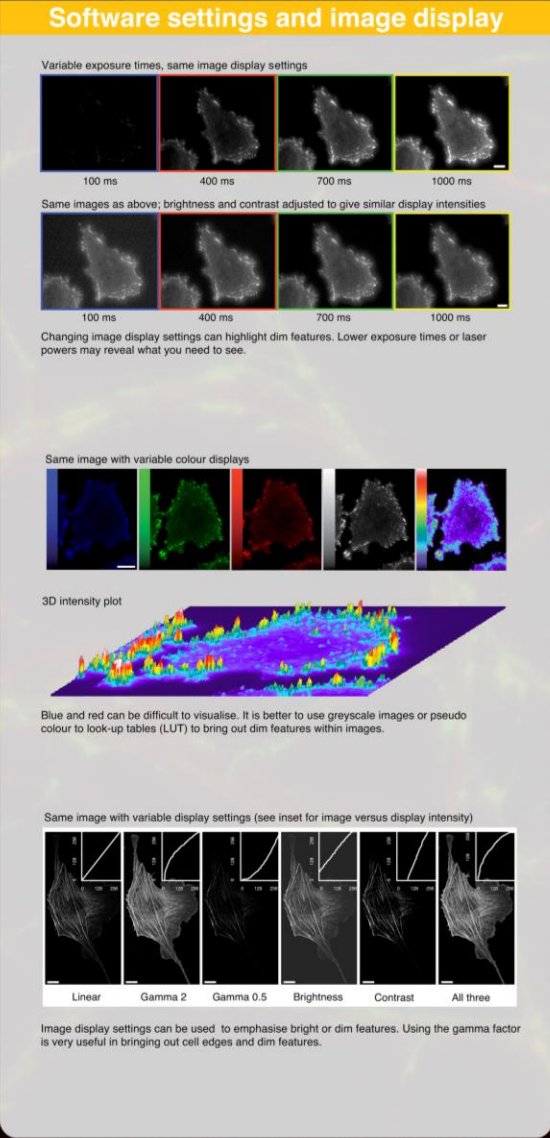
Qualidade da Imagem



All scale bars are 10 μ m



Journal of
Cell Science
jcs.biologists.org



© Journal of Cell Science 2007 (120, pp. 1703-1705)

<https://doi.org/10.1242/jcs.03433>

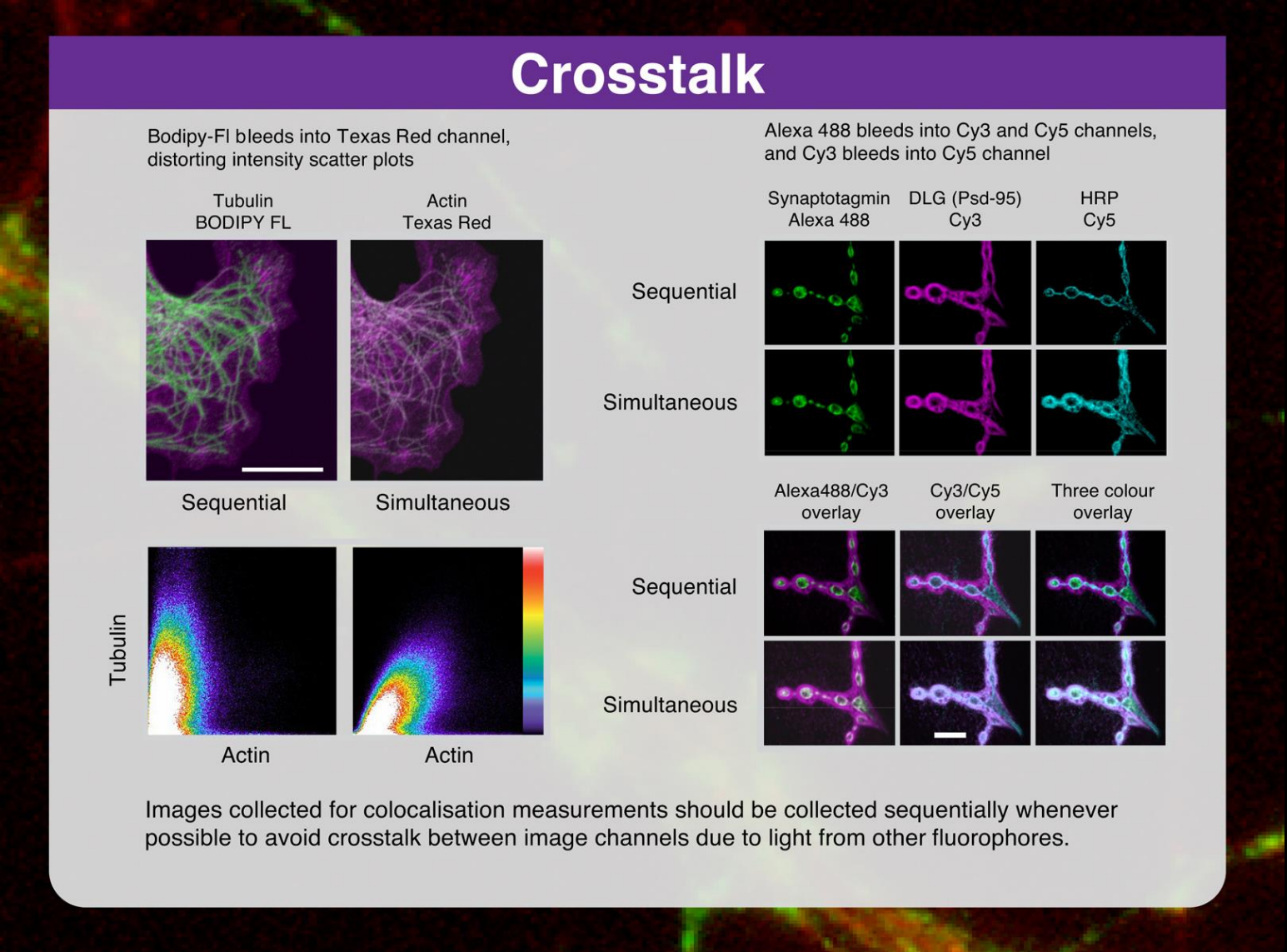


CNPq

MINISTÉRIO DA
CIÊNCIA, TECNOLOGIA
E INOVAÇÃO



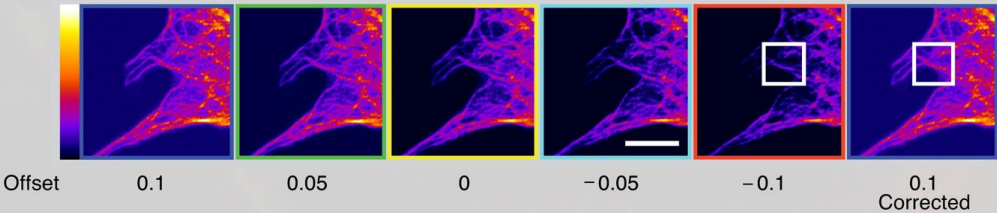
Qualidade da Imagem



Qualidade da Imagem

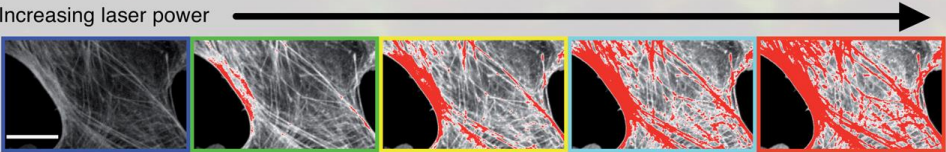
Offset

Background intensity decreases, but information is lost at offset of zero and lower values



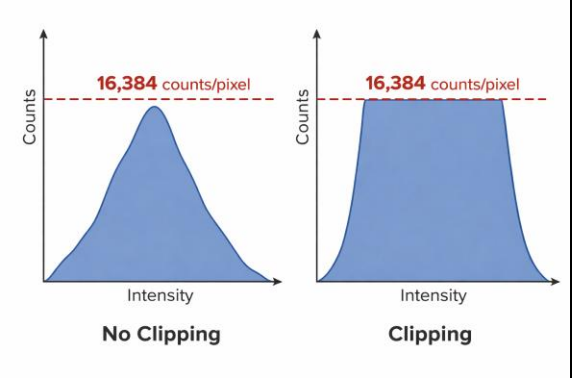
Setting black levels or offsets too high can result in information being lost. It is better to collect images with a high background and correct them post acquisition (compare last two images).

Detector saturation



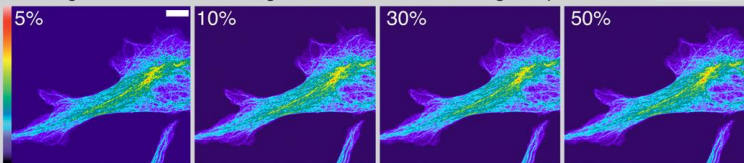
If PMT gains, laser powers, lamp intensities or camera exposure times are set too high the detector can saturate causing a loss of structural information within bright structures. It is best to have no saturated (red) pixels.

All scale bars are 10 μm

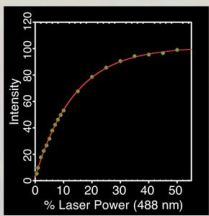


Fluorophore saturation

All images look the same regardless of increase in light input



Plateau of fluorophore intensity at high laser power when fluorophores are saturated



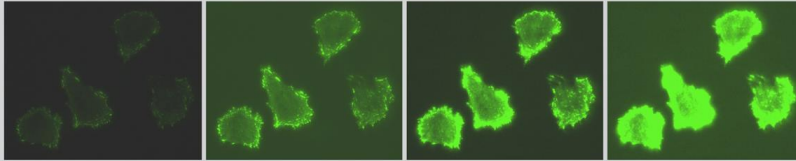
With high laser powers fluorophores can be saturated so that no additional light is collected but there is more photobleaching and increased out-of-focus light reduces z-axis resolution



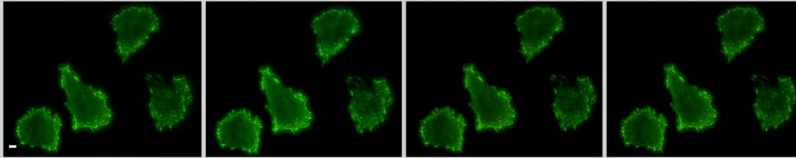
Qualidade da Imagem

Undersampling

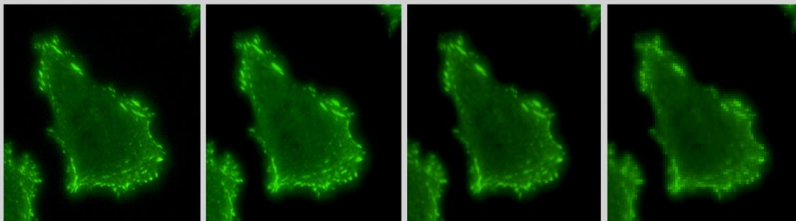
Same display settings increased signal-to-noise due to camera binning



Same images as above, brightness and contrast were changed to give similar display intensities; images show similar detail at low magnification



Zoomed-in cell from images above; at high magnification higher sampling is needed

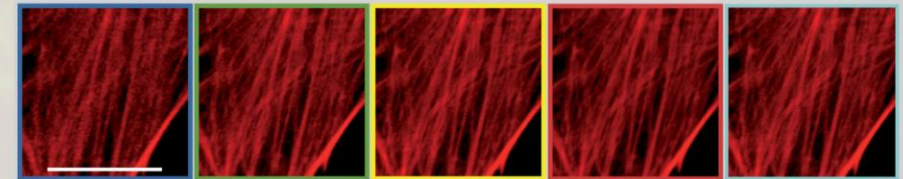


Camera binning	1×1	2×2	3×3	4×4
	0.108 $\mu\text{m}/\text{pixel}$	0.216 $\mu\text{m}/\text{pixel}$	0.324 $\mu\text{m}/\text{pixel}$	0.432 $\mu\text{m}/\text{pixel}$

For looking at cell morphology undersampling may be fine (first two sets of images), but to resolve smaller cellular structures sampling of 0.1-0.2 μm is required.

Oversampling

Resolution improves from 0.14 to 0.07 μm pixels but not from 0.07 to 0.014 μm



Zoom 1	Zoom 2	Zoom 3	Zoom 6	Zoom 10
0.140 $\mu\text{m}/\text{pixel}$	0.070 $\mu\text{m}/\text{pixel}$	0.047 $\mu\text{m}/\text{pixel}$	0.023 $\mu\text{m}/\text{pixel}$	0.014 $\mu\text{m}/\text{pixel}$

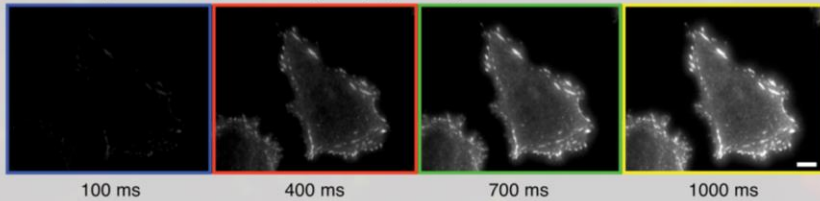
Confocal microscopes can sample with a very small pixel size, but for most applications a pixel size of 0.1-0.2 μm is sufficient. A smaller pixel size makes files bigger but the resolution is limited by the properties of light and the optics of the system so images with a pixel size $<0.05 \mu\text{m}$ look comparable.



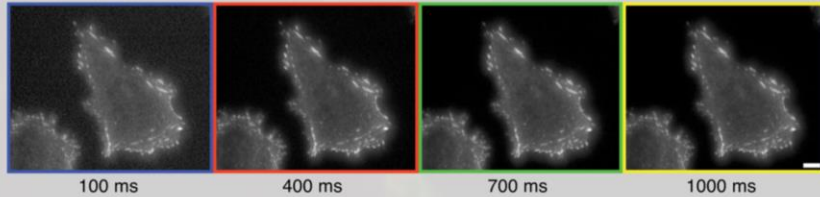
Qualidade da Imagem

Software settings and image display

Variable exposure times, same image display settings

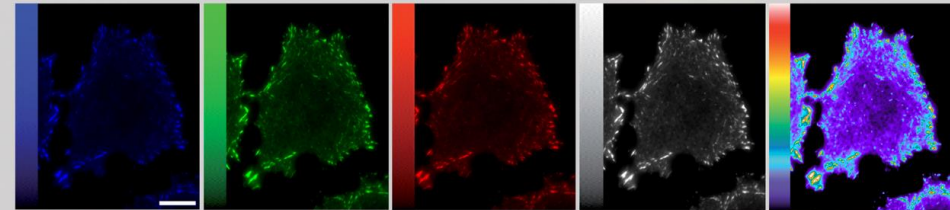


Same images as above; brightness and contrast adjusted to give similar display intensities

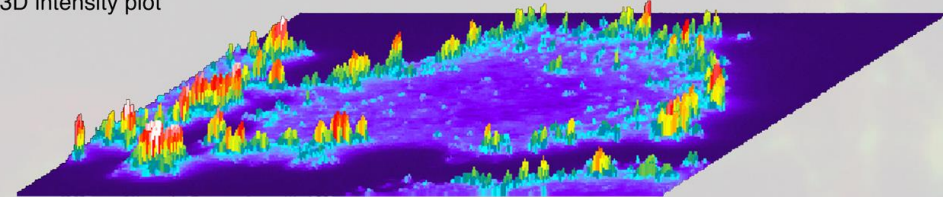


Changing image display settings can highlight dim features. Lower exposure times or laser powers may reveal what you need to see.

Same image with variable colour displays



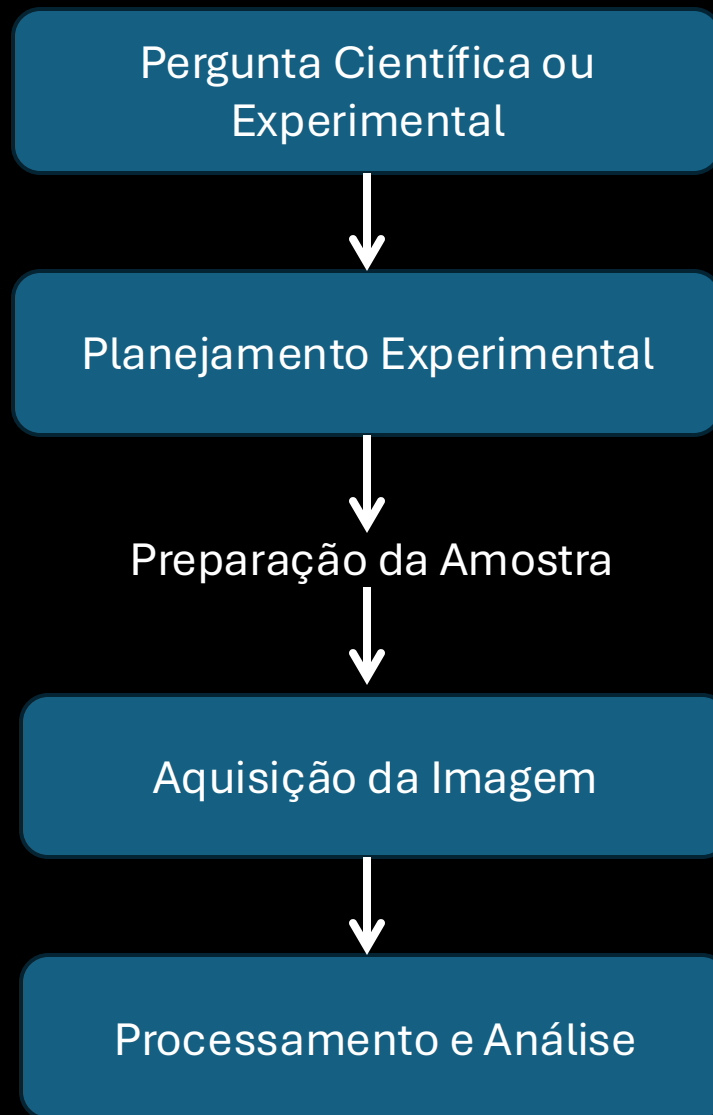
3D intensity plot



Blue and red can be difficult to visualise. It is better to use greyscale images or pseudo colour to look-up tables (LUT) to bring out dim features within images.



Como realizar um experimento quantitativo usando a microscopia de fluorescência?

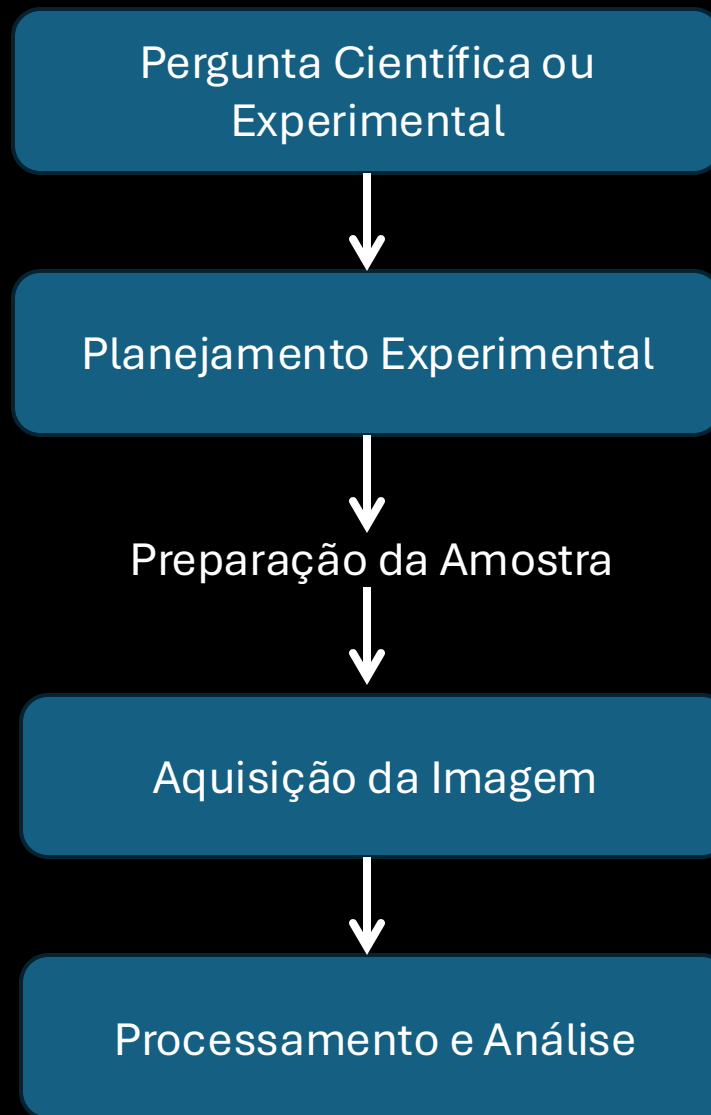


QUALIDADE DA IMAGEM

Reduzir o ruído por meio de:

- Usar meio de cultura celular sem vermelho de fenol ou riboflavina
- diminuir o ganho do detector
- Eliminar luz ambiente
- Fazer média de quadros (*frame averaging*) em microscopia confocal de varredura a laser

Como realizar um experimento quantitativo usando a microscopia de fluorescência?



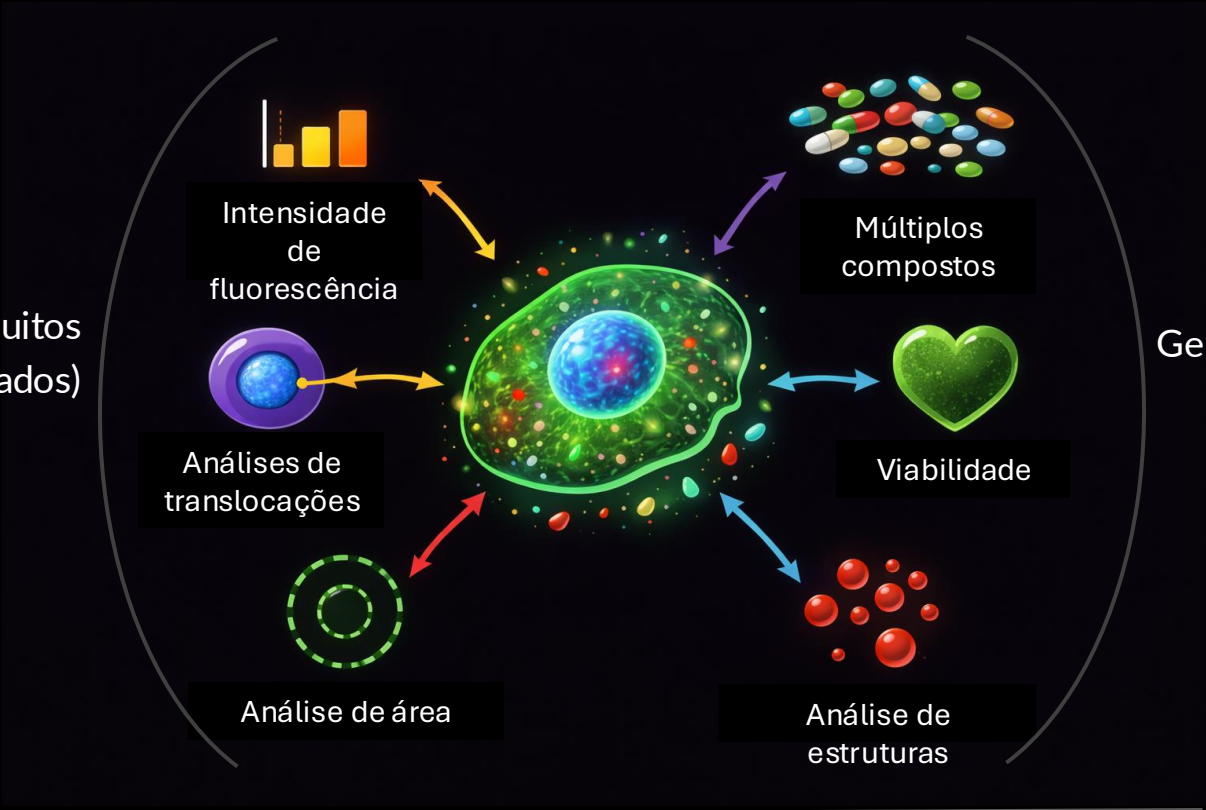
CONSISTÊNCIA DA AQUISIÇÃO

- Monitorar os fatores ambientais (CO_2 , temperatura, pH, humidade etc);
- Manter os parâmetros de Z, intensidade, preparação da amostra entre as sessões de imagem.

Microscopia Automatizada - High Content Screening

Ensaio multiparamétrico em larga escala baseado em imagens celulares

Avaliar a atividade biológica de muitos compostos (simples ou combinados)



Gerar dados quantitativos e qualitativos

Aplicações:



Identificação de alvos



Multiplex



Apoptose



Mobilidade



Ciclo celular

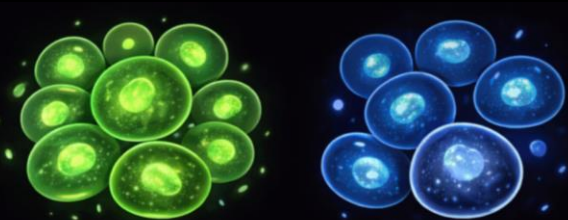
Conceitos básicos para o desenho experimental - HCS



Escolha do modelo celular (linhagens, primárias, 3D)

Linhagens exemplos:

- HeLa
- U2OS
- NIH 3T3
- HepG2
- MCF-7



Controles (positivo, negativo), dose-resposta

Ctrl Positivo:

- Dose máxima de um composto conhecido
- Ação citopática do patógeno estudado
- Estresse celular (H_2O_2)

Ctrl negativo:

- Veículo (ex.: DMSO)
- Células não tratadas
- Ausência de estímulo
- *Mock infection*
- Composto inativo
- Poços sem células



Células fixadas vs vivas

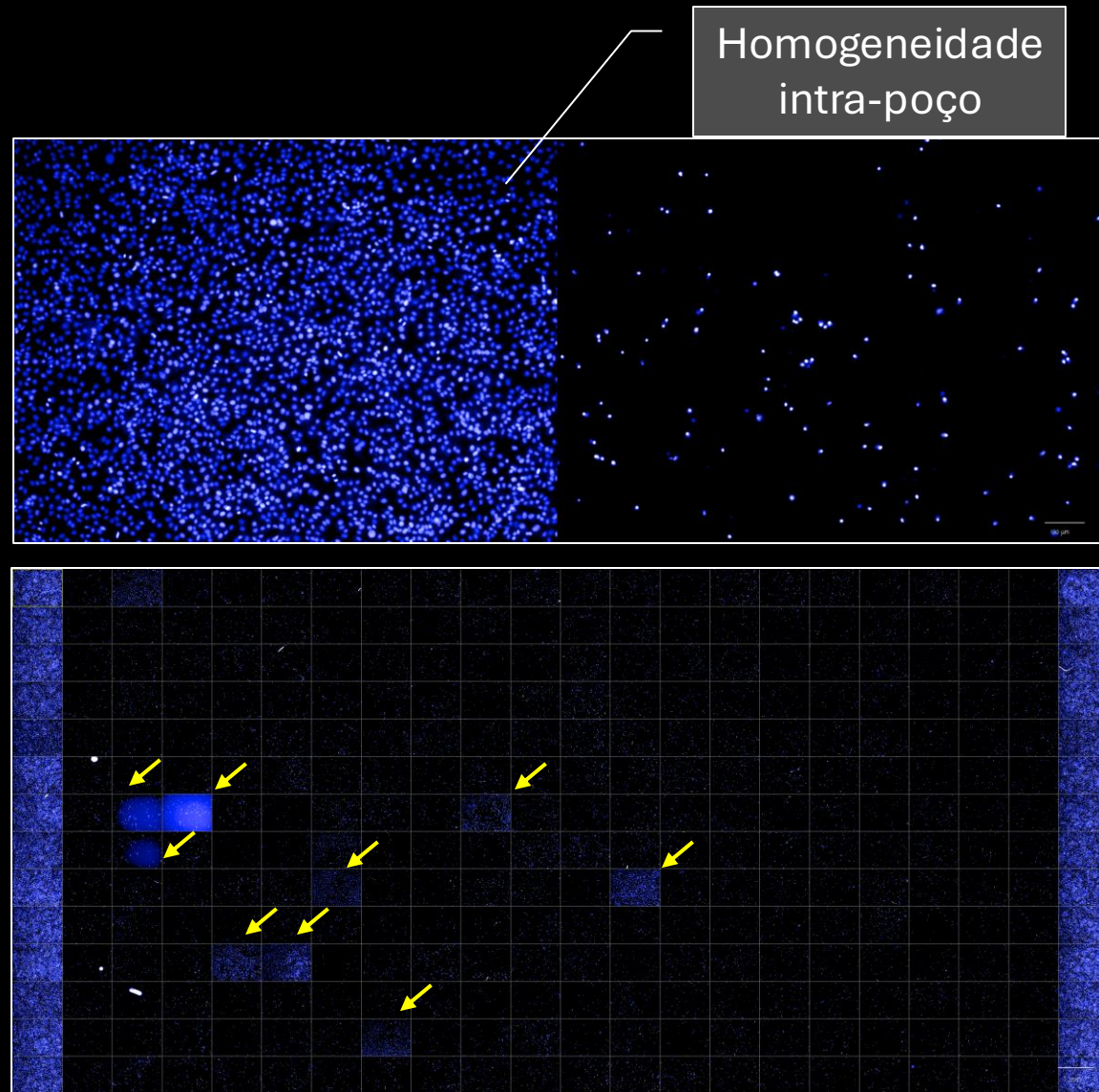
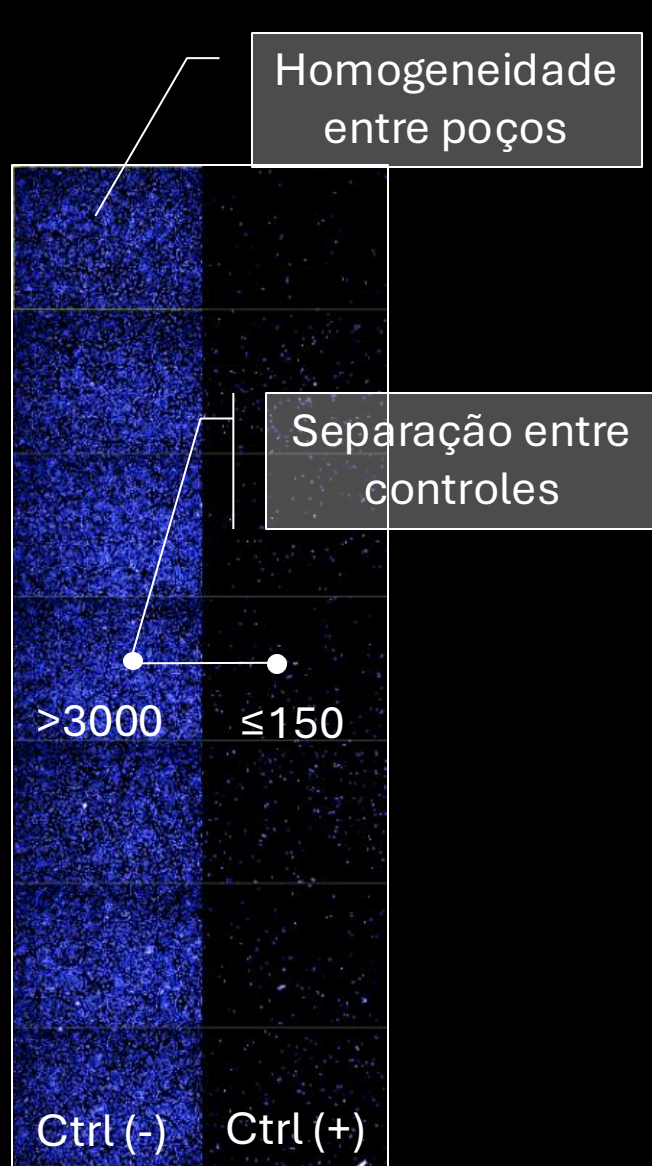


Número fields, objetiva, z-stack

$$Z' = 1 - \frac{3(\sigma_p + \sigma_n)}{|\mu_p - \mu_n|}$$

Estatísticas (Z')

Ensaio de HCS ideal



Resumo: Desenho experimental passo – a – passo



Referências

1. Vaidyanathan, P., Appleton, E., Tran, D. *et al.* Algorithms for the selection of fluorescent reporters. *Commun Biol*
2. Hickey SM et al. Fluorescence Microscopy-An Outline of Hardware, Biological Handling, and Fluorophore Considerations. *Cells*. 2021 Dec 23;11(1):35.
3. Sanderson MJ, Smith I, Parker I, Bootman MD. Fluorescence microscopy. *Cold Spring Harb Protoc*. 2014 Oct 1;2014(10)
4. Lee JY, Kitaoka M. A beginner's guide to rigor and reproducibility in fluorescence imaging experiments. *Mol Biol Cell*. 2018 Jul 1;29(13):1519-1525
5. Best Practices and Tools for Reporting Reproducible Fluorescence Microscopy Methods (Nature Methods: <https://www.nature.com/articles/s41592-021-01156-w>)
6. Quantitative Fluorescence Microscopy Techniques (PubMed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19768427/>)
7. A Beginner's Guide to Rigor and Reproducibility in Fluorescence Imaging Experiments (PMC: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC6080651/>)
8. Concepts in Quantitative Fluorescence Microscopy (PubMed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24974019/>)
9. Quantitative Fluorescence Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM) (Springer: https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4757-5348-6_3)
10. Tutorial: Guidance for Quantitative Confocal Microscopy (Nature Protocols: <https://www.nature.com/articles/s41596-020-0313-9>)
11. Johnston PA, Trask OJ. *High Content Screening: A Powerful Approach to Systems Cell Biology and Phenotypic Drug Discovery* (2 ed.), Humana Press, 2018.
12. Bray MA, Singh S, Han H, et al. Cell Painting, a high-content image-based assay for morphological profiling using multiplexed fluorescent dyes. *Nat Protoc*. 2016 11(9):1757-74. doi: 10.1038/nprot.2016.105.



Obrigada

lbesuporte@lnbio.cnpem.br

coordenadoreslib@lnbio.cnpem.br

edb@lnbio.cnpem.br



CNPem

MINISTÉRIO DA
CIÊNCIA, TECNOLOGIA
E INOVAÇÃO

