

Aula Prática: MICROSCOPIA CONFOCAL (Grupo *Naegleria*)

Células da linhagem de fibroblastos murinos (L929) foram cultivadas em lamínulas de vidro por 24 h, e então deverão ser submetidas aos seguintes tratamentos:

A1= incubação das células por **50 min** com a proteína Pulchellina II (PII), conjugada ao fluoróforo Alexa Fluor 488 (PII-AF 488).

A2= incubação das células por **10 min** com a proteína Pulchellina II (PII), conjugada ao fluoróforo Alexa Fluor 488 (PII-AF 488).

A3= controle (sem tratamento com pulchellina)

A1. PARA AS DUAS AMOSTRAS DE 50 min .

- 1) Descarte todo o DMEM do poço.
- 2) Lave as lamínulas 3 vezes com 1 mL de PBS 1X.
- 3) Em um tubo de 1,5 mL, prepare a solução de PII-AF 488: adicione 1,2 mL de DMEM e 6 µL de PII-AF 488.
- 4) Coloque 300 µL dessa solução sobre as 2 lamínulas.
- 5) Incube as células durante 50 min na estufa de cultivo celular.
- 6) Iniciar a etapa a 12, preferencialmente junto com as demais amostras (A2 e A3)

A2. PARA AS DUAS AMOSTRAS DE 10 min

- 7) Descarte todo o DMEM do poço.
- 8) Lave as lamínulas 3 vezes com 1 mL de PBS 1X.
- 9) Coloque 300 µL da solução de PII-AF 488 sobre as 2 lamínulas.
- 10) Incube as células durante 10 min na estufa de cultivo celular e, a seguir, inicie a etapa 12.

A3. CONTROLE (duas amostras)

- 11) Descarte todo o DMEM do poço e, a seguir, inicie a etapa 12

PARA TODAS AS AMOSTRAS APÓS A INCUBAÇÃO COM PII-AF 488

- 12) Lave 3 vezes com 1 mL de PBS 1X.
- 13) Adicione 0,5 mL de 3,7% de formaldeído (diluído em PBS 1X) por 20 min.
- 14) Lave 3 vezes com 1 mL de PBS 1X.
- 15) Adicione 0,5 mL de 2% de BSA (diluída em PBS 1X) por 5 min.
- 16) Para um volume final de 1,2 mL, adicione os seguintes fluoróforos em um tubo de 1,5 mL:
 - a) 28 µL de Faloidina-Rodamina;
 - b) 6 µL de Hoechst 33342 (5 µg/mL);
 - c) 1166 µL de solução de 2% de BSA (diluída em PBS 1X).
- 17) Adicione 300 µL da mistura de fluoróforos sobre cada lamínula e incube por 5 min.
- 18) Lave 3 vezes com 1 mL de PBS 1X.
- 19) Lave uma vez com água destilada.

- 20) Limpe uma lâmina de vidro com papel-toalha e álcool 70%. Espere secar e coloque 5 μ L do meio de montagem para proteção de fluorescência (Fluoroshield, Sigma-Aldrich).
- 21) Com o auxílio de uma agulha de seringa com a ponta em forma de alavanca e de uma pinça com ponta fina, retire a lamínula do poço e coloque-a sobre o meio de montagem, com o lado onde as células foram cultivadas em contato com o meio de montagem. **Cuidado para não pressionar a lamínula com a pinça.**
- 22) Delicadamente, pressione um pedaço de papel higiênico sobre a lamínula para retirar o excesso de meio de montagem. **Não esfregue o papel, somente o pressione levemente uma única vez.**
- 23) Passe uma pequena camada de esmalte somente na borda da lamínula. Com uma caneta, identifique o nome do grupo na borda da lâmina. Espere secar (cerca de 5 min).
- 24) Embrulhe a lamínula em papel alumínio para proteger a fluorescência e guarde-a a 4 °C até a visualização.

B. Roteiro de estudo

- 1) Quais são as funções das seguintes soluções: DMEM, PBS, formaldeído e BSA?
- 2) AF 488, Hoechst e Rodamina são fluoróforos. Quais são os comprimentos de onda de excitação e emissão de cada um? Quais cores serão observadas ao microscópio? Quais macromoléculas/estruturas celulares são evidenciadas por cada fluoróforo?
- 3) Fluoroshield é um meio de montagem para proteção de fluorescência. Como a fluorescência de uma amostra pode diminuir?

C. Informações adicionais

Informações sobre alguns dos reagentes utilizados nesta aula podem ser obtidas nos *sites* dos fabricantes através dos seguintes endereços:

Alexa Fluor 488 (Empresa Invitrogen):

<http://products.invitrogen.com/ivgn/product/A10235?ICID=search-a10235>

Faloidina-Rodamina (Life Technologies):

<https://www.lifetechnologies.com/order/catalog/product/R415?ICID=search-product>

Hoechst 3342 (Life Technologies):

<https://products.invitrogen.com/ivgn/product/H3570?ICID=search-h3570>

Fluoroshield (Sigma-Aldrich):

<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/f6182?lang=pt®ion=BR>