

Aula Prática: MICROSCOPIA CONFOCAL (Grupo Poliuretano)

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

- 1) **Controle negativo:** células incubadas somente com meio de cultura DMEM.
- 2) **Teste:** células pré-incubadas com 5 µg/mL (2 µM) de actinomicina D (em DMEM) por 20 h.

A. Procedimento

- 1) Descarte todo o DMEM do poço.
- 2) Lave as lamínulas 3 vezes com 1 mL de PBS 1X.
- 3) Adicione 0,5 mL de 3,7% de formaldeído (diluído em PBS 1X) por 30 min.
- 4) Lave 3 vezes com 1 mL de PBS 1X.
- 5) Adicione 0,5 mL de 2% de BSA (diluído em PBS 1X) por 10 min.
- 6) Lave 3 vezes com 1 mL de PBS 1X.
- 7) 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) 6 µL de WGA-AF 488 (5 µg/mL);
 - d) 1160 µL de PBS 1X.
- 8) Adicione 300 µL da mistura de fluoróforos sobre cada lamínula e incube por 20 min.
- 9) Lave 3 vezes com 1 mL de PBS 1X.
- 10) Lave uma vez com 1 mL de água destilada.
- 11) Limpe uma lâmina de vidro com papel-toalha e álcool 70%. Espere secar e coloque 5 µL do meio de montagem para proteção de fluorescência (Fluoroshield, Sigma-Aldrich).
- 12) 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.**
- 13) 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).
- 14) 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:

Actinomicina D (Sigma-Aldrich):

<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/a9415?lang=pt®ion=BR>

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>

WGA-AF 488 (Life Technologies):

<https://www.lifetechnologies.com/order/catalog/product/W11261?ICID=search-product>

Fluoroshield (Sigma-Aldrich):

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