

Preparo das lamínulas redondas (13 mm)

- 1) Deixar as lamínulas na acetona por pelo menos 12 h.
- 2) Esfregar uma a uma em água destilada corrente. Usar luva sem pó.
- 3) Esfregar uma a uma em etanol 70%.
- 4) Com uma pinça de ponta fina, segurar a lamínula pela borda e flambar rapidamente (cerca de 3 passagens dentro do fogo).
- 5) Esperar uns 15 s para a lamínula esfriar. Se estiver quente, grudará no plástico do poço.
- 6) Colocar a lamínula no poço de uma placa de 12 poços.
- 7) Esterilizar com UV por 30 min, sem a tampa da placa.
- 8) Caso seja necessário, guardar a placa fechada e embalada, e esterilizar com UV novamente antes do uso.

Preparo das células

- 1) Colocar, 5×10^3 e 5×10^4 células em volume final de 100 μ L de meio de cultura.
- 2) Colocar esse volume, em gota única, no centro da lamínula. O volume não pode extravasar.
- 3) Deixar a placa parada na estufa por pelo menos 30 min, para as células aderirem.
- 4) Adicionar lentamente 1 mL de meio de cultura na parede do poço. Não jogar sobre as células, pois podem desaderir.
- 5) Incubar a placa por 24 h.

Preparo das lâminas para microscopia confocal

- 1) Descarte todo o meio de cultura 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 minutos.
- 4) Lave 3 vezes com 1 mL de PBS 1X.
- 5) Adicione 0,5 mL de 2% de BSA (diluído em PBS 1X) por 15 min.
- 6) Lave 3 vezes com 1 mL de PBS 1X.
- 7) Para cada lamínula, utilize o volume final de 300 μ L da mistura de fluoróforos diluídos em PBS 1X.
- 8) Incube com os fluoróforos por 30 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 nomeie a lâmina.
- 12) Coloque 5 μ L do meio de montagem para proteção de fluorescência (Fluoroshield, Sigma-Aldrich).
- 13) 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.**
- 14) Passe uma pequena camada de esmalte somente na borda da lamínula. Espere secar.
- 15) Embrulhe a lamínula em papel alumínio e guarde-a a 4 °C até a visualização.

Solução de Fluoróforos:

Para um volume final de 0,9 mL, adicione os seguintes fluoróforos em um tubo de 1,5 ml:

21 µL de Faloidina-Rodamina;

4,5 µL de Hoechst 33342 (5µg/mL);

4,5 µL de WGA-AF (5µg/mL);

870 µL de PBS 1X.

	1	2	3	4
HDFn	5*10 ³ cells		5*10 ⁴ cells	
HTC	5*10 ³ cells		5*10 ⁴ cells	