



Universidade de Aveiro Departamento de Biologia
Ano 2011/2012

**Juliana Maria Monteiro Análise de osteoblastos *in vitro* por microscopia
Ferrás de Sousa**



Juliana Maria Monteiro Ferrás de Sousa **Análise de osteoblastos *in vitro* por microscopia**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau em Mestre em Biologia Molecular e Celular, realizada sob a orientação científica da Professora Conceição Santos, Professora Associada com Agregação do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro, da Dr^a Helena Oliveira, Estagiária de pós doutoramento da Universidade de Aveiro e da Dr^a Sónia Silva, Estagiária de pós doutoramento da Universidade de Aveiro.

Aos meus Pais

o júri

presidente

Prof. Doutora Maria do Céu Gomes dos Santos
Professora Auxiliar Convidada, Universidade de Aveiro

Prof. Doutor Bruno André Fernandes de Jesus da Silva Nunes
Professor Auxiliar, Universidade Fernando Pessoa

Prof. Doutora Maria da Conceição Lopes Vieira dos Santos
Professora Associada Com Agregação, Universidade de Aveiro

Doutora Sónia Marina Pinto Nunes da Silva
Bolseira de Pós-Doutoramento, Cesam – Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

agradecimentos

O meu agradecimento a todos os que contribuíram para a realização deste trabalho de dissertação. Agradecimentos especiais à Professora Doutora Conceição Santos, à Doutora Helena Oliveira e à Doutora Sónia Silva, que contribuíram de forma significativa para a realização deste trabalho.

À Professora Conceição Santos, orientadora desta dissertação, agradeço por toda a simpatia e generosidade com que me acolheu no seu laboratório, bem como pela disponibilidade e orientação. A flexibilidade e tolerância demonstrada foram essenciais para que a realização deste projeto fosse possível.

À Doutora Helena Oliveira e Doutora Sónia Silva, co-orientadoras deste trabalho, agradeço o interesse e disponibilidade demonstrada na contribuição para a realização desta dissertação.

Aos colegas do laboratório, por me ter recebido tão bem, pela disponibilidade e ajuda prestada especialmente na curta temporada que estive no laboratório.

A todos que, de uma forma direta ou indireta, contribuíram para a realização deste trabalho.

Aos meus pais, pelo apoio incondicional, pelo incentivo e por toda a ajuda. Agradeço tudo o que sempre fizeram por mim.

A todos os que me ajudaram e estiveram comigo.

palavras-chave

Microscopia, suspensões celulares, microscópio eletrônico de transmissão (TEM), agar.

resumo

As amostras processadas para microscopia eletrônica são geralmente tecidos ou fragmentos sólidos. O processamento de células ou partículas isoladas permanece ainda um desafio pelas particularidades únicas que uma população de células/partículas apresenta em suspensão. A microscopia eletrônica fornece detalhes da estrutura, organização e interação das células, dentro dos tecidos. Esta informação microscópica das células pode ter múltiplas aplicações nas ciências da vida. O principal objetivo deste trabalho consistia em estabelecer um protocolo que permitisse analisar células cultivadas *in vitro* (osteoblastos), ao microscópio eletrônico de transmissão (TEM). Neste trabalho, a técnica otimizada baseou-se na incorporação das células num gel – agar, o que permitiu que fossem manipulados de forma semelhante a pedaços de tecidos durante os passos seguintes do processamento. A sua utilização apresentou resultados positivos e promissores. Este protocolo apresenta a vantagem de poder ser utilizado para o estudo de outras partículas em suspensão, não só células, mas também em estruturas subcelulares e organismos, como leveduras, vírus e bactérias.

keywords

Microscopy, cell suspensions, transmission electron microscope (TEM), agar.

abstract

The samples processed for electron microscopy are often, solid tissue or fragments. The processing of isolated cells or particulate remains as challenge. The electron microscopy provides details of the unique cell structure, organization and interaction within the tissues. The microscopic visualization of cells in suspension may have multiple applications in life sciences. The main objective of this study was to establish / achieve a protocol for analyzing / studying in vitro cultured cells (osteoblasts), for transmission electron microscope (TEM).

In this work, the technique optimized was based on the incorporation of the cells in gel - agar. This allows that can be handled similar to fragments during the following processing steps. Its use had positive results and promising. This protocol has the advantage that it can be used for the study of other particulate matter, not only cells but also in subcellular structures and organisms lives yeasts, viruses and bacteria.

Índice

Lista de abreviaturas	i
Índice de figuras	ii
1. Cultura de células <i>in vitro</i>	1
1.1 Aplicações das culturas <i>in vitro</i>	2
1.2 Condições de assépsia	3
1.3 Meios de cultura e incubação.....	7
1.4 Culturas primárias vs. imortalizadas.....	10
1.5 Linhas celulares	11
1.6 Morfologia das células em cultura	12
1.7 Contaminações das culturas	14
2. O osso	15
2.1. Osteossarcoma	17
2.2. Tipo de células e importância.....	18
2.3. Importância da cultura osteoblastos ou osteossarcoma.....	19
3. Morfologia das células <i>in vitro</i> : osteoblastos.....	19
3.1. Microscopia no estudo da morfologia celular	20
3.2. Microscopia ótica.....	22
3.2.1. História.....	22
3.2.2. Princípios e procedimentos.....	23
3.2.3. Aspectos das células.....	26
3.2.4. Protocolos.....	27
3.3. Microscopia eletrónica.....	27
3.3.1. História.....	28
3.3.2. Princípios e procedimentos.....	29
3.3.3. Aspectos das células.....	33
3.3.4. Protocolos gerais	33
3.3.5. Protocolos para TEM usando células em cultura.....	39
4. Enquadramento e objetivo do trabalho	41

5. Material e métodos	42
6. Resultados e Discussão	46
6.1. Resultados	46
6.2. Discussão.....	46
6.3. Conclusões gerais.....	49
7. Perspetivas futuras.....	50
8. Bibliografia.....	52
Anexos	56

Lista de abreviaturas

BSA	Albumina de soro bovino
CDC	“Center for disease control” (Centros de controlo de doenças)
DNA	Ácido desoxirribonucleico
HE	Hematoxilina-eosina
EDTA	Ácido etilenodiamina tetracético
EPIs	Equipamentos de proteção individual
FBS	Soro Fetal Bovino
LaB ₆	Filamento de <i>lanthanum hexaboride</i>
ME	Microscópio eletrónico
MO	Microscópio ótico
NIH	“National institute of health” (Institutos nacionais de saúde)
OsO ₄	Tetróxido de ósmio
PIPES	1,4 piperazine bis [2-ethanosulfonic acid]
PBS	Tampão fosfato salino
Rb	Gene do retinoblastoma
SEM	Microscópio eletrónico de varrimento
STEM	“Environmental transmission electron microscope”
TEM	Microscópio eletrónico de transmissão

Índice de figuras

Figura 1: Esquema básico da organização de uma câmara de cultura de células para utilizadores destros. Adaptado de Invitrogen ¹	7
Figura 2: Células tipo fibroblasto. Retirado de Ryan, (2008a).	13
Figura 3: Células tipo epitelial. Retirado de Ryan, (2008a).	13
Figura 4: Células tipo linfoblasto. Retirado de Invitrogen ¹	14
Figura 5: Células do tecido ósseo. Retirado de Junqueira & Carneiro, (2004).	16
Figura 6: Antony van Leeuwenhoek (1632-1723). Retirado de FEI Company, (2010).	23
Figura 7: Réplica de um dos microscópios de luz feito por Antony van Leeuwenhoek. Retirado de FEI Company, (2010).	23
Figura 8: Microscópio ótico de fundo claro. Adaptado de Junqueira & Carneiro, (2004).	25
Figura 9: Microscópio eletrónico de transmissão (TEM). Retirado de Junqueira & Carneiro, (2004).	30
Figura 10: Microscópio eletrónico de transmissão. Retirado de Junqueira & Carneiro, (2004).	32
Figura 11: Procedimento geral para microscopia eletrónica de transmissão. Adaptado de Bozzola & Russel, (1999).	35
Figura 12: Esquema dos procedimentos (A e B) realizados. Adaptado de Bozzola & Russel, (1999).	45

¹ Acedido a 9 de março 2012. Disponível em: <http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/References/gibco-cell-culture-basics.html>.

1. Cultura de células *in vitro*

A cultura de células e tecidos representa atualmente um dos principais instrumentos para o estudo funcional e estrutural das células/organismos em diversos campos das ciências da vida. O termo “Cultura de tecidos” é usado *sensu lato* para definir a remoção de células, tecidos ou órgãos de um animal ou planta e a sua posterior inoculação num ambiente artificial que permita o seu crescimento/proliferação (Helgason & Miller, 2005; Ryan, 2008a).

Desde o início do século XX que se iniciaram os primeiros estudos sobre cultura de tecidos e células, e sobretudo na segunda metade do século XX esta ferramenta tem sido largamente usada em laboratórios de todo o mundo. De fato, a cultura de tecidos animais foi realizada pela primeira vez, como abordagem experimental sobre o comportamento das células (e.g., de embriões) quando estão fora de variações sistêmicas que podem surgir *in vivo* (Freshney, 2010).

Nos primeiros ensaios do início do século XX, a cultura de tecidos foi elaborada primeiro com fragmentos de tecido não desagregado (Freshney, 2010). Durante os primeiros 50 anos de cultura de tecidos, a técnica foi realizada com fragmentos de tecido explantado. Esta é possivelmente a razão por que ainda se mantém a denominação "cultura de tecidos" em uso como um termo genérico, apesar da explosão de técnicas desenvolvidas na segunda metade do século XX para cultivar células ou linhas celulares (Ryan, 2008a; Roche Diagnostics, 2009; Freshney, 2010).

Para o avanço da cultura de células *in vitro* contribuiu a possibilidade do seu cultivo em suspensão ou de células aderentes. Considera-se em geral que a designação cultura de células, se refere às culturas derivadas de células dispersas obtidas a partir de um tecido original (e.g., uma cultura primária) ou a partir de uma linha celular. Nos anos 50 do século XX, observou-se que as células tumorais poderiam originar linhas de células com grande capacidade de proliferação levando à produção de culturas contínuas. Mais tarde, na década de

60, desenvolveram-se técnicas que permitiram a utilização de células normais em cultura mas que apresentavam um tempo de vida (gerações) finito (Ryan, 2008a; Freshney, 2010).

A introdução dos antibióticos (em meados do século passado) e o desenvolvimento de meios definidos (que proporcionam um ambiente controlado) também contribuíram para a generalização da utilização das culturas de células e tecidos (Roche Diagnostics, 2009; Freshney, 2010).

Com a melhoria e aperfeiçoamento dos sistemas de cultura de células, a compreensão da fisiologia de um grande número de células aumentou significativamente. A avaliação funcional das células *in vitro* pode envolver várias análises complementares e multiparamétricas como a contagem do número absoluto de células ao longo do tempo, a caracterização de metabolitos ou de expressão/atividade de proteínas, ou ainda a identificação de múltiplos marcadores da célula quando exposta a uma determinada condição. Esta técnica permite que várias experiências que não podem ser executadas num animal vivo possam ser feitas e investigadas *in vitro*, e permite também a análise direta do comportamento de células vivas através de um microscópio (Stewart et al, 2000; Junqueira & Carneiro, 2004).

1.1 Aplicações das culturas *in vitro*

A cultura de células tem sido largamente usada em inúmeros estudos de biologia celular e molecular (permitindo compreender melhor a fisiologia e regulação da célula), em estudos de células tumorais, no desenvolvimento de novos fármacos, etc. Proporciona ainda excelentes modelos para estudar resposta das células a drogas e compostos tóxicos e efeitos de genotoxicidade, permitindo assim, substituir em fases mais precoces muitos dos ensaios até ao momento realizados em animais e usar linhas celulares humanas, assim mais próximas do modelo alvo (Junqueira & Carneiro, 2004; Ryan, 2008a).

1.2 Condições de assépsia

Num laboratório de cultura de células, a componente mais importante de segurança é o cumprimento das técnicas e práticas de assépsia padrão. O laboratório deve permitir um tratamento estéril de células em cultura, e deve ser desenhado de forma a minimizar o risco de contaminação (Yadav & Tyagi, 2006; Ryan, 2008a; ECACC, 2012).

Os regulamentos e recomendações para a biossegurança elaborados pelos Center for Disease Control (CDC) e National Institutes of Health (NIH), definem quatro níveis ascendentes de contenção. Estes níveis de contenção são designados por níveis de biossegurança de 1 a 4. Os regulamentos descrevem ainda práticas de assépsia, equipamento de segurança e proteção das instalações que são adequadas e necessárias para o correspondente nível de risco associado (ou seja, tendo em conta o agente biológico a ser manipulado) (ECACC, 2012; Invitrogen¹).

O nível de biossegurança 1 é o nível de proteção comum para a maioria das pesquisas e laboratórios clínicos, este é apropriado para os agentes que não provocam doenças nos seres humanos.

O nível de biossegurança 2 é o mínimo que a maioria dos laboratórios de cultura de células devem ter, mas as reais condições necessárias para cada situação dependem da linha de células utilizada e do tipo de trabalho realizado. É adequado quando está presente risco moderado de agentes conhecidos por causarem doenças humanas com severidade variada, quer por ingestão ou através de exposição (e.g., cutânea, pelas mucosas).

O nível de biossegurança 3 exige mais rigor e cuidados que os anteriores, quando se manipulam agentes, indígenas ou exóticos, conhecidos por terem um potencial

¹ Acedido a 9 de março 2012. Disponível em: <http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/References/gibco-cell-culture-basics.html>.

de transmissão por via aerossol, e agentes que podem causar infeções graves e potencialmente letais, este é o nível apropriado.

Finalmente, o nível máximo de biossegurança 4 é usado quando se utilizam agentes exóticos que representam um alto risco de provocar doença por aerossóis infecciosos e para as quais não está disponível tratamento. Estes agentes são restritos a laboratórios de contenção específica e elevada, requerendo apertada legislação para manipulação de agentes biológicos de elevado risco (Invitrogen¹).

Existem vários equipamentos de segurança num laboratório de cultura de células. Os primeiros equipamentos são as barreiras primárias (controlos definidos para remover ou minimizar a exposição a materiais perigosos, armários de biossegurança, recipientes fechados entre outros), bem como os equipamentos de proteção individual (EPIs) que são muitas vezes usados em conjunto com os anteriores. A cabine de segurança biológica (câmara de cultura de células) é provavelmente o equipamento mais importante, pois limita a proliferação de microrganismos e outras fontes de contaminação das células, devendo ainda ser considerada importante na prevenção da contaminação do operador. Este equipamento permite a proteção do produto e/ou do utilizador através da utilização de filtros HEPA (alta eficiência de partículas de ar), o nível de contenção que fornece varia de acordo com a classe utilizada.

A barreira imediata entre a pessoa /utilizador e o agente perigoso é composta pelos EPIs, onde se incluem luvas, batas, proteções de sapatos, botas, proteções faciais, óculos de segurança, óculos de proteção entre outros. Estes são muitas vezes utilizados em combinação com outros dispositivos de biossegurança (Freshney 2010; ECACC, 2012; Invitrogen¹).

Dependendo do tipo de investigação conduzida as condições específicas de um laboratório de cultura de células varia. Os equipamentos e acessórios presentes, permitem que o trabalho realizado ocorra de forma mais eficiente e com maior

¹ Acedido a 9 de março 2012. Disponível em: <http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/References/gibco-cell-culture-basics.html>.

precisão. No entanto, o requisito comum a todos os laboratórios de cultura de células é o de estar livres de microrganismos patogénicos (assépsia) (Helgason & Miller, 2005; Yadav & Tyagi, 2006).

De uma forma resumida e de acordo com Helgason & Miller (2005), Yadav & Tyagi (2006) e Freshney (2010) um laboratório de cultura de células deve ter equipamento/material básico, do qual se destaca:

Câmara de cultura de células (ou seja, câmara de fluxo laminar ou cabine de biossegurança), incubadoras, banho-maria, centrífugas, frigorífico e congelador, contador de células (contador de células automatizado ou hemocítmetro), microscópio (e.g., fundo claro e fluorescência; invertido), esterilizador (e.g., autoclave), recipientes de células de cultura (e. g., frascos, placas de Petri, multipoços), pipetas e pipetadores, recipientes de resíduos, meios, soros e reagentes de uso geral em cultura *in vitro*, linhas celulares (há vários fornecedores disponíveis, como as coleções americana, a American Type Culture Collection (ATCC), ou europeia, a European Collection of Cell Cultures (ECACC).

De forma a manter as condições de assepsia seria preferível existir uma sala limitada à cultura de células, mas quando não é possível pode ser usada uma área para cultura de células dentro de um laboratório, desde que se assegure uma manipulação estéril, existam condições necessárias para a incubação e armazenamento correto das culturas de células, reagentes, e que seja um local de pouco movimento de pessoas. A utilização de uma câmara de cultura de células é a forma mais simples e mais económica para proporcionar condições assépticas (Yadav & Tyagi, 2006; Freshney, 2010).

A câmara de cultura de células apresenta uma área de trabalho asséptica: esta permite o controlo de infeções por microrganismos, e por outro lado previne a propagação de agentes biológicos (e.g., salpicos, aerossóis). Existem três tipos de câmaras de cultura de células, designadas como sendo de classe I, II e III. A proteção oferecida por cada uma destas classes permite satisfazer as diferentes necessidades de segurança aquando da cultura *in vitro* de diferentes agentes biológicos (Freshney, 2010).

As câmaras de cultura de células de classe I oferecem algum nível de proteção das culturas contra infeções, apresentando ainda baixo nível de proteção individual e para o ambiente quando usadas com técnicas microbiológicas.

As câmaras de cultura de células de classe II fornecem o ambiente asséptico necessário para as experiências de cultura de células, sendo as mais usadas e geralmente as indicadas, para esta técnica. São concebidas para trabalhar com materiais de nível de biossegurança 1, 2 e 3, e devem ser usadas para manipular materiais potencialmente perigosos (e.g., culturas infetadas por vírus, radioisótopos, reagentes cancerígenos ou tóxicos). No entanto, antes de cada estudo deve-se fazer uma avaliação dos riscos que este proporciona e é possível que este exija um nível de contenção maior (Yadav & Tyagi, 2006; ECACC, 2012).

Já as câmaras de cultura de classe III de biossegurança proporcionam o mais alto nível possível de proteção individual e ao ambiente, são totalmente seladas e à prova de gás. Quando se trabalha com materiais de nível de biossegurança 4 são a classe de câmaras utilizadas.

A proteção do ambiente de trabalho (e.g., de poeiras e outros contaminantes) das câmaras de cultura de células é feita por filtros HEPA, e por um sistema de fluxo de ar constante e unidirecional filtrado que circula sobre a área de trabalho. O fluxo pode ser horizontal ou vertical, se o fluxo de ar circula paralelo à superfície de trabalho, ou se circula a partir do topo para a superfície de trabalho, respetivamente (Yadav & Tyagi, 2006; Freshney, 2010).

Uma câmara de cultura de células deve ter dimensão suficiente para poder ser lá colocado o material necessário. Deve ser facilmente limpa por dentro e por fora, ter iluminação adequada e ser fácil de manipular. O espaço de trabalho na câmara de cultura de células deve ser mantido limpo e organizado. Cada material colocado dentro deve ser limpo e desinfetado (e.g., etanol a 70%). A colocação dos artigos dentro da câmara de cultura de células pode ficar como mostra a Figura 1, mas pode ser modificada por opção do utilizador ou quando aplicações

específicas exigem outros equipamentos e organização (Freshney, 2010; Invitrogen¹).

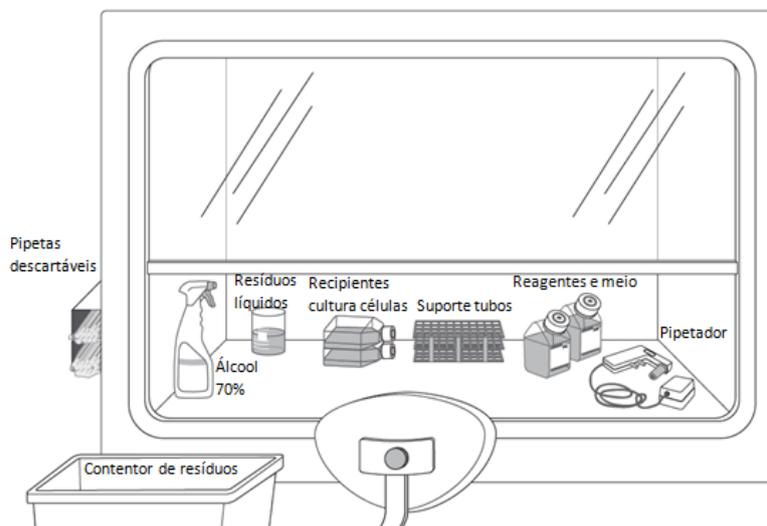


Figura 1: Esquema básico da organização de uma câmara de cultura de células para utilizadores destros. Adaptado de Invitrogen¹.

1.3 Meios de cultura e incubação

Tendo em conta o tipo de células que se cultiva, as condições de cultura variam. As células são cultivadas num recipiente apropriado, onde está presente um substrato / meio que fornece os nutrientes essenciais (aminoácidos, minerais, hidratos de carbono, vitaminas), fatores de crescimento, gases (O_2 , CO_2) e hormonas. O ambiente físico (pH, temperatura, pressão osmótica) também é controlado. Assim, está disponível um ambiente artificial apropriado para o seu desenvolvimento. As células podem ser cultivadas de duas formas: num meio de cultura flutuante, cultura em suspensão; ligadas a um substrato sólido ou semi-sólido, as chamadas culturas em monocamada ou aderente (Ryan, 2008a; Freshney, 2010; ECACC, 2012).

¹ Acedido a 9 de março 2012. Disponível em: <http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/References/gibco-cell-culture-basics.html>.

A grande parte das células derivadas de vertebrados têm que ser cultivadas sobre um substrato adequado que é tratado de forma a permitir a adesão e propagação celular, isto é, são dependentes de ancoragem (Ryan, 2008a; Freshney, 2010).

Para crescer uma cultura de células exige um ambiente estritamente controlado e a incubação proporciona o ambiente e as condições apropriadas ao crescimento das células. A estufa, onde ocorre a incubação, deve permitir a circulação de ar, e manter a temperatura controlada. Embora uma estufa não exija condições de assépsia tão rigorosas como uma câmara de cultura de células, é contudo um local onde a limpeza frequente é essencial para evitar contaminações (Freshney, 2010; ECACC, 2012).

As estufas podem ser de secar ou então estufas húmidas de CO₂. As estufas de secar são mais económicas, mas as culturas de células necessitam de ser colocadas em frascos selados para evitar a evaporação. Neste tipo de estufa, para se proporcionar alguma humidade pode-se utilizar um prato de água, mas o controlo das condições atmosféricas da estufa é baixo e pouco rigoroso. Contrariamente, as estufas húmidas de CO₂ permitem um controlo superior das condições da cultura. Estas estufas podem ser usadas para incubar células (e.g., frascos, placas de Petri ou multi-poços) que requerem uma atmosfera controlada de humidade elevada e aumento da pressão de CO₂, contudo são mais dispendiosas (Freshney, 2010).

A capacidade de manipulação do ambiente físico-químico (temperatura, pH, pressão osmótica, pressão de O₂ e CO₂) e do ambiente fisiológico (hormonal e concentrações de nutrientes) que são essenciais para a proliferação das células é uma das vantagens das culturas *in vitro*. O ambiente físico-químico está melhor definido do que o fisiológico, mas uma melhor compreensão dos componentes do meio, nomeadamente do soro (e.g., a identificação dos fatores de crescimento necessários para a proliferação) e uma melhor apreciação do ambiente das células em cultura (interações célula-célula, a difusão de gases, interações com a

matriz) permitem definir condições ótimas para a cultura de linhas celulares de elevada exigência e/ou recalcitrância (Freshney, 2010; Invitrogen¹).

Pelo exposto acima, percebe-se assim que um dos componentes mais importantes na cultura *in vitro* é o meio de cultura. O meio de cultura fornece nutrientes necessários, fatores de crescimento e hormonas, e permite ainda ajustar o pH e a pressão osmótica das células. Os primeiros ensaios com cultura de células foram realizados com meios naturais obtidos a partir de extratos de tecidos e fluidos corporais. Ao longo dos anos, a exigência da padronização e da maior qualidade e quantidade dos meios de cultura levou ao desenvolvimento de meios definidos. Consideram-se em geral três classes de meios básicos: meios basais, meios com redução de soro, e meios livres de soro (Roche Diagnostics, 2009; Freshney, 2010; Invitrogen¹).

O soro contém fatores de crescimento e adesão (promovem a proliferação celular), tem atividade anti-tripsina e é uma fonte de minerais e hormonas, regula a permeabilidade da membrana da célula e transporta lípidos, enzimas, micronutrientes, e oligo elementos para o interior da célula. O uso de soro no meio pode ter desvantagens, incluindo o preço, frequente variabilidade, e a possível ocorrência de efeitos indesejáveis, (e.g., estimulação ou a inibição do crescimento e / ou função celular em determinadas culturas de células).

Para reduzir os potenciais efeitos nefastos do soro pode-se usar meio com redução de soro. Podem usar-se meios basais enriquecidos com nutrientes e fatores de derivados animais, os quais podem substituir as principais funções do soro, e assim levar à sua redução (Freshney, 2010; Roche Diagnostics, 2009).

¹ Acedido a 9 de março 2012. Disponível em: <http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/References/gibco-cell-culture-basics.html>.

1.4 Culturas primárias vs. imortalizadas

Pode-se considerar a cultura primária como a fase da cultura que engloba o crescimento das células, diretamente isoladas a partir do tecido, que proliferaram sob condições apropriadas, até ocupar todo o substrato disponível (confluência de alcance). A preparação de culturas primárias é intensa e estas podem ser mantidas *in vitro* apenas por um período limitado de tempo, e durante esse tempo geralmente muitas das características diferenciadas da célula *in vivo*, são mantidas. O crescimento das células em cultura continua mas, quando a capacidade do meio para suportar o crescimento adicional de células em cultura em suspensão é excedido, ou quando as células em culturas aderentes não têm espaço para expansão e ocupam todo o substrato disponível, a proliferação celular reduz significativamente ou termina por completo. Logo, para o crescimento continuar, a densidade ótima ser mantida e a proliferação estimulada, a cultura tem de ser dividida e fornecida com meio novo. A subcultura, ou passagem, consiste na remoção do meio e transferência das células de uma cultura anterior para um meio de crescimento novo, com este procedimento é permitida a propagação da linha celular ou estirpe da célula. As culturas primárias, não sofrem passagem, por isso, assim que esta ocorre deixam de ser consideradas culturas primárias e tornam-se uma linha de células (Ryan, 2008a; Freshney, 2010; ECACC, 2012).

As células podem ser propagadas em cultura, num número limitado de divisões celulares ou de uma forma indefinida. As células normais (não transformadas) geralmente dividem-se apenas um número limitado de vezes antes de perder a sua capacidade para proliferar, um evento (geneticamente determinado) conhecido como senescência. Estas linhas celulares com vida finita, conhecidas por ter uma vida em cultura limitada, comportam-se de uma maneira bastante reprodutível.

Contudo, através de um processo chamado de transformação, é possível obter linhas de células imortalizadas (i.é. com capacidade de divisão por muitas

gerações). A transformação pode ocorrer espontaneamente ou pode ser quimicamente ou biologicamente induzida. Assim, a transformação de uma linha de células com vida finita leva a que esta se possa multiplicar por mais gerações, tornando-se uma linha celular contínua (Ryan, 2008a; Freshney, 2010; ECACC, 2012).

Um exemplo de células que permitem culturas contínuas são as células tumorais. Frequentemente, as linhas de células de tumor são derivadas de tumores clínicos reais. Contudo, a transformação também pode ser induzida nas células que lhes dão origem. Uma das vantagens das linhas celulares transformadas é a disponibilidade quase ilimitada, contudo têm a desvantagem de terem mantido muito pouco das características originais, o que levanta questões sobre a sua utilização como células modelo da fisiologia celular.

Como exemplo, pode citar-se que a maioria das células normais tem um tempo de vida finito (e. g., entre 20 a 100 gerações); contudo, há certas linhas (e. g., de roedores e da maioria dos tumores) que podem ter teoricamente uma expectativa de vida infinita (Ryan, 2008a; Freshney, 2010; ECACC, 2012).

1.5 Linhas celulares

Após a subcultura, as células derivadas da cultura primária designam-se por linha de células ou subclone. Estas linhas têm um tempo de vida limitado. Com a transferência sucessiva, as células que predominam são as que têm maior capacidade de crescimento, fazendo com que a população apresente uma uniformidade a nível genotípico e fenotípico.

Quando uma subpopulação de uma linha de células é selecionada por clonagem esta linha celular torna-se uma estirpe de células. De notar que uma linhagem de

células pode sofrer alterações genéticas adicionais relativamente à linha parental (Roche Diagnostics, 2009; ECACC, 2012; Invitrogen¹).

1.6 Morfologia das células em cultura

A observação periódica da morfologia (forma e aparência) das células em cultura é essencial em qualquer prática de cultura de células. Para além de confirmar o estado das células, a visualização ao microscópio permitirá detetar eventuais sinais de contaminação. Alguns dos sinais de deterioração celular incluem o citoplasma vacuolizado, granularidade ao redor do núcleo e desprendimento das células do substrato. A deterioração pode ser causada por múltiplas razões, como por exemplo, a contaminação da cultura, a senescência da linha de células, a presença de substâncias tóxicas no meio. A falta de renovação do meio de cultura pode também implicar uma senescência da cultura (Ryan, 2008a; Roche Diagnostics, 2009; Invitrogen¹).

A maioria das células animais, quando em cultura, pode ser dividida em três categorias básicas com base na sua forma e aparência:

- Fibroblásticas (tipo fibroblastos): as células são bipolares ou multipolares, crescem ligadas a um substrato, apresentam formas alongadas e frequentemente formam remoinhos nas culturas (Figura 2) (Ryan, 2008a).

¹ Acedido a 9 de março 2012. Disponível em: <http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/References/gibco-cell-culture-basics.html>.

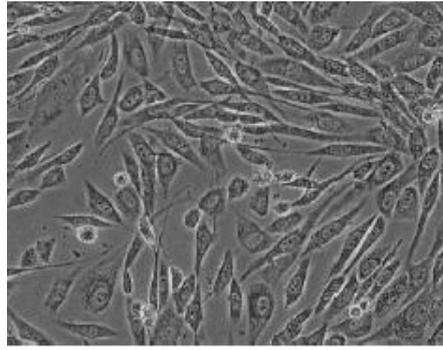


Figura 2: Células tipo fibroblasto.
Retirado de Ryan, (2008a).

- Células tipo epitelial: crescem ligadas a um substrato, e apresentam uma forma achatada e poligonal mas com dimensões mais regulares (Figura 3) (Ryan, 2008a).

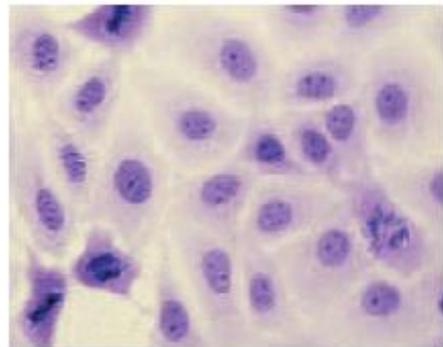


Figura 3: Células tipo epitelial.
Retirado de Ryan, (2008a).

- Células tipo linfoblasto: são células com formas semelhantes a esferas e geralmente são cultivadas em suspensão sem aderir a uma superfície (Figura 4) (Ryan, 2008a).

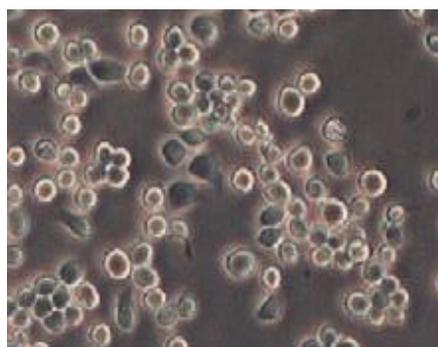


Figura 4: Células tipo linfoblasto. Retirado de Invitrogen¹.

1.7 Contaminações das culturas

A contaminação das culturas celulares tem consequências graves em qualquer ensaio.

Podem-se classificar duas categorias de contaminantes: 1) contaminantes químicos (e.g., impurezas nos meios, soros e água, endotoxinas, plastificantes e detergentes); 2) contaminantes biológicos por microrganismos ou vírus (e.g., bactérias, fungos/leveduras, vírus, micoplasmas), e ou contaminação cruzada por outras linhas celulares. Eliminar completamente a contaminação não é possível, contudo é possível reduzir a sua frequência se forem seguidas boas técnicas de assépsia e se se souber quais as suas fontes (Ryan, 2008 a; b; Freshney, 2010; Invitrogen¹).

Inicialmente introduziu-se nos meios de cultura antibióticos, com o objetivo de reduzir a frequência de contaminação. Em geral, não se recomenda a utilização de antibióticos nas culturas de rotina. A adição de antibióticos pode ser desvantajosa, pois pode levar à proliferação de organismos resistentes, podendo ainda levar a alterações metabólicas nas células. Sempre que possível, deve-se

¹ Acedido a 9 de março 2012. Disponível em: <http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/References/gibco-cell-culture-basics.html>.

limitar o uso de antibióticos, ou poderá usar-se culturas paralelas como medida de controlo adicional da qualidade das células (Ryan, 2008b; Freshney, 2010).

2. O osso

O osso tem diferentes funções, que são classificadas como mecânicas, de depósito mineral e hematopoética. O osso forma o endosqueleto, local onde os músculos esqueléticos estão presos e permite assim o movimento. Para além de ser um reservatório de cálcio e importante na homeostasia deste, também armazena fosfato, sódio e magnésio. Funciona igualmente, como hospedeiro para a medula óssea hematopoética. Uma camada externa densa e rígida de osso compacto, córtex, e uma zona medular central ou esponjosa com trabéculas ósseas interconectadas, é a forma como a maioria dos ossos estão organizados. O número, a espessura e a orientação das trabéculas ósseas dependem das forças às quais o osso está exposto (Young & Heath, 2001; Rubin et al, 2006).

O osso é composto por células e por uma matriz extracelular predominantemente de colagénio (colagénio do tipo I) que forma o denominado osteoide, que é mineralizado mediante o depósito de sais de cálcio em forma de hidroxiapatita o que confere ao osso rigidez e força consideráveis (Young & Heath, 2001; Stevens & et al, 2003; Junqueira & Carneiro, 2004). A síntese do osteoide (uma zona de matriz óssea orgânica que ainda não está mineralizada) acontece através de células especializadas, os osteoblastos. O período desde a deposição de osteoide até à sua mineralização é denominado tempo de demora de mineralização. O osso é constantemente renovado, por isso, a disposição arquitetural do osso pode modificar-se em resposta aos apelos funcionais. O osso calcificado proporciona um grande reservatório de cálcio (Young & Heath, 2001; Stevens et al, 2003; Junqueira & Carneiro, 2004; Rubin et al, 2006).

As células presentes no tecido ósseo, cada uma delas com funções específicas relacionadas com formação, reabsorção e remodelação do osso são os osteoblastos, osteócitos e osteoclastos (Figura 5) (Rubin et al, 2006).

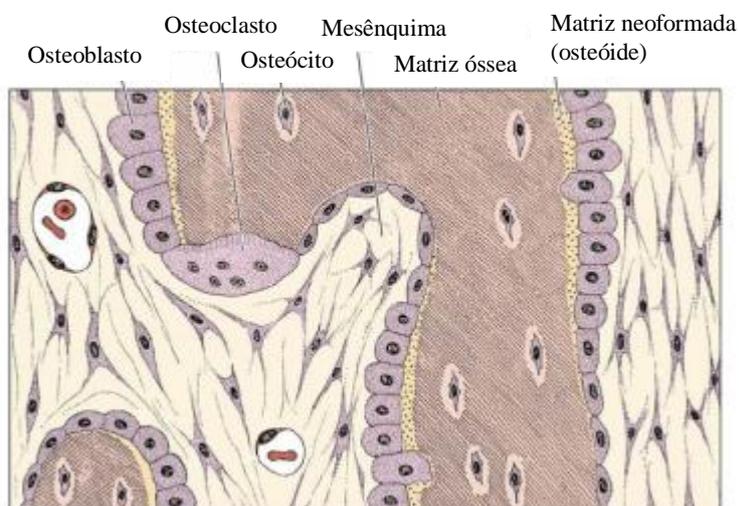


Figura 5: Células do tecido ósseo. Retirado de Junqueira & Carneiro, (2004).

Os osteoblastos, são as células que sintetizam a parte orgânica da matriz óssea (colagénio tipo I, proteoglicanos e glicoproteínas), são capazes de concentrar fosfato de cálcio e participam na mineralização da matriz (são as células que sintetizam as proteínas que produzem e mineralizam o tecido ósseo). Dispõem-se ao longo das superfícies ósseas alinhados, lado a lado, num arranjo típico de um epitélio simples. Graças à sua capacidade de síntese proteica, os osteoblastos apresentam um citoplasma complexo, contendo retículo endoplasmático abundante, aparelho de Golgi proeminente e mitocôndrias com grânulos que contêm cálcio (Young & Heath, 2001; Junqueira & Carneiro, 2004; Rubin et al, 2006). Os osteoblastos, aparecem cuboides e com o citoplasma muito basófilo, quando estão em intensa atividade sintética. Contudo, a sua forma altera-se quando estão em estado pouco ativo, aparecem achatados, como células fusiformes inativas, e ocorre uma diminuição da basofilia citoplasmática. Os osteoblastos passam a ser chamados de osteócitos, quando se fixam à matriz recém-sintetizada (Stevens et al, 2003; Junqueira & Carneiro, 2004). Os osteoblastos são células com diversas funções, produzem muitos fatores de

crescimento, fabricam a osteocalcina, contêm fosfatase alcalina, apresentam recetores para a hormona paratireídea, secretam colagenase (pode facilitar a atividade osteoclástica) e desempenham um papel importante na regulação do crescimento e na diferenciação do osso (Rubin et al, 2006).

Os osteócitos são principalmente osteoblastos inativos presos dentro do osso formado, podem ajudar na nutrição do osso, situam-se em cavidades ou lacunas no interior da matriz. Recentemente surgiram evidências que indicam que o osteócito pode ser a célula que reconhece e responde às forças mecânicas (Young & Heath, 2001; Junqueira & Carneiro, 2004; Rubin et al, 2006).

Por fim, os osteoclastos que são células fagocitárias, gigantes, móveis e multinucleadas com muitos lisossomas e ricas em enzimas hidrolíticas. São capazes de reabsorver o tecido ósseo. Encontram-se na superfície dos ossos em pequenas depressões, denominadas lacunas de Howship (Young & Heath, 2001; Junqueira & Carneiro, 2004; Rubin et al, 2006). Os osteoclastos são células derivadas da linhagem celular dos macrófagos-manócitos (Young & Heath, 2001; Rubin et al, 2006).

A célula osteoprogenitora é uma célula mesenquimal primitiva a partir da qual os osteoblastos e os osteócitos derivam. Aparece na medula, no perióstio e em todas as estruturas de apoio dentro da cavidade medular. Esta célula é inespecífica, tem forma estelar ou fusiforme, mas apresenta dimensões reduzidas por isso, não é imediatamente reconhecida ao microscópio ótico. Mas em resposta a um sinal adequado (e. g., fator de transcrição do CBFA-1) origina um osteoblasto (Young & Heath, 2001; Rubin & et al, 2006).

2.1. Osteossarcoma

Todos os tipos de células presentes no tecido ósseo podem originar tumores primários ósseos.

O tumor primário maligno mais comum do osso é o osteossarcoma, também denominado sarcoma osteogénico, caracterizado pela formação de tecido ósseo por células tumorais. Representa um quinto de todos os cancros ósseos, aparece geralmente ao redor do joelho e ocorre principalmente em crianças e adolescentes entre 10 e 20 anos de idade, atingindo preferencialmente o sexo feminino, contudo também se pode encontrar em pacientes mais idosos com doença de Paget (distúrbio crónico caracterizado por lesões no osso, na qual algumas zonas crescem de modo anormal, desorganizado e excessivo). Histologicamente o tumor apresenta um aspeto muito variável, mas são frequentes ilhotas de osteoide com coloração rosa delicada. Quando as células tumorais derivam dos osteoblastos, geralmente são pouco diferenciadas e pleomórficas mas apresentam uma intensa atividade mitótica. Estes tumores estão muito vascularizados, e apresentam muitas vezes metástases pulmonares precoces (Stevens & et al, 2003; Rubin et al, 2006).

O osteossarcoma é um tumor mais comum em indivíduos altos, e está entre os cancros relacionados com a inativação dos genes supressores de tumor, pois quase dois terços dos casos exibem mutações do gene do retinoblastoma (Rb), e em muitos casos também contêm mutações no gene p53 (Rubin et al, 2006).

2.2. Tipo de células e importância

Existem diferentes tipos de linhas celulares de osteoblastos – osteossarcoma, que podem ser comercializadas, por exemplo MG-63, Saos-2, e U-2 OS na American Type Culture Collection (ATCC). Já a European Collection of Cell Cultures (ECACC) comercializa linhas celulares de osteoblastos, como por exemplo HOb (406-05a), HOb (406-05f).

A cultura de células tem sofrido muitos avanços nos últimos anos. As linhas de células *in vitro* podem ser utilizadas para caracterizar melhor e para discriminarem as propriedades de crescimento das células. Os métodos de cultura celular são essenciais para a pesquisa (ECACC, 2012).

2.3. Importância da cultura osteoblastos ou osteossarcoma

Os potenciais alvos biológicos para o tratamento do osteossarcoma são os processos de proliferação celular deste, a adesão, a invasão a apoptose e as metástases. Por isso, a base genética do osteossarcoma tem sido estudada, juntamente com o papel de fatores de transcrição e de crescimento (Broadhead et al, 2011).

A caracterização das alterações imunohistoquímicas na matriz extracelular do osteossarcoma, e as alterações na proliferação de células não é a melhor. São descritas diferenças na expressão gênica de linhas de células de osteossarcoma e osteoblastos normais, mas a expressão da proteína celular, e a composição molecular da matriz extracelular não estão bem analisadas. Como a maioria dos osteossarcomas contêm diferentes subpopulações, há a necessidade de estudos ao nível da célula individual *in vitro* (Pautke et al, 2004).

3. Morfologia das células *in vitro*: osteoblastos

Os osteossarcomas, tumores ósseos malignos, baseiam-se em células com funções celulares anormais. Estes tipos de células são, regra geral, usadas como modelos osteoblásticos (Pautke & et al, 2004). Um estudo sobre a análise, de linhas de células de osteossarcoma MG-63, Saos-2 e U-2 OS, de Pautke et al (2004), refere que estas apresentam perfis muito heterogêneos de organização. As células Saos-2 revelam o perfil mais maduro de osteoblastos. Cada linha de células de osteossarcoma exibe características próprias de organização. Isto pode ser útil e utilizado na tentativa de melhorar a caracterização do osteossarcoma, bem como no seu diagnóstico. As células MG-63, são células que mostram um aspeto oval a fusiforme, sem ramificação celulares. Enquanto as células Saos-2 têm uma forma poligonal, já as células U-2 OS exibem uma forma

de triângulo. Em contraste, os osteoblastos normais exibem uma forma variável com células com vários processos celulares proeminentes e alongados (Pautke et al, 2004).

De referir ainda que, os osteoblastos quando se encontram totalmente diferenciados são capazes de se adaptar muito rapidamente para sobreviver e funcionar nas condições de cultura (Jones & Boyde, 1976).

3.1. Microscopia no estudo da morfologia celular

Como as células são pequenas e complexas, observa-las só é possível ao microscópio. Por isso, só a partir da construção deste, é que se iniciou o seu estudo (Alberts et al, 2008).

Desde o primeiro microscópio que técnicos e investigadores têm vindo a aperfeiçoar os diferentes tipos de microscópios.

A Microscopia é a área que se ocupa da observação microscópica. Existem 2 tipos básicos de microscópios, os que obtém imagem a partir de fótons que são denominados microscópios óticos (ou de luz, ou fotónicos), e os que utilizam eletrões para produzir a imagem, e são designados microscópios eletrónicos (Bozzola & Russel, 1999; Junqueira & Carneiro, 2004; Alberts et al, 2008).

Uma das características que define um microscópio é o poder de resolução. Resolução é a capacidade de distinguir pontos muito próximos. Esta capacidade pode ser quantificada, o valor do limite de resolução é definido como a menor distância entre dois pontos, de forma a serem visualizados em separado. O limite de resolução do olho humano é cerca de 0,1 a 0,3 milímetros (mm) (100 a 300 μm). Dois pontos que se encontrem a uma distância abaixo deste valor serão vistos como um único ponto. Num microscópio ótico o limite de resolução varia consoante a objetiva utilizada, situando-se entre 0,2 e 0,3 μm , já a resolução do microscópio eletrónico pode atingir 0,002 – 3 nm, uma vez que o comprimento de onda dos eletrões é inferior ao dos fótons, teoricamente é entre 200 e 100.000

vezes mais do que a do microscópio de luz e 4.000.000 vezes mais que a do olho humano (Young & Heath, 2001; Junqueira & Carneiro, 2004; Alberts et al, 2008; FEI Company, 2010).

Imagens muito ampliadas mas com pouca resolução tem fraca qualidade, não permitem distinguir pormenores, por isso o poder de resolução deve ser acompanhado pelo poder de ampliação. Atualmente, a resolução dos microscópios eletrónicos pode ser 4000 vezes melhor do que a de um microscópio de luz típico e 4.000.000 vezes melhor do que se pode alcançar a olho nu (FEI Company, 2010).

Lentes visíveis claras e transparentes são o que os microscópios óticos usam para ver objetos na escala de um micrómetro (milionésima parte do metro), como um glóbulo vermelho (7 μm) ou um cabelo humano (100 μm). Já os microscópios eletrónicos, utilizam um feixe de partículas carregadas (eletrões) em vez de luz, e usam lentes eletromagnéticas ou eletrostática e permitem ver materiais tão pequenos como um décimo do nanómetro (um décimo bilionésimo do metro), como os átomos individuais (FEI Company, 2010).

Os poderes do microscópio ótico (MO) e do microscópio eletrónico (ME) são diferentes, mas complementa-se. O MO, permite a análise de grandes áreas de uma amostra. Tem à sua disposição, uma grande variedade de métodos de coloração, uns empíricos outros específicos, que permitem a identificação das características das células e dos tecidos. Alguns destes corantes são policromáticos, têm a capacidade de produzir múltiplas cores na amostra, o que permite identificar os diferentes componentes. Quando se pretende evidenciar as características tridimensionais de uma amostra, pode-se utilizar cortes mais espessos do que o normal. O ME devido à sua resolução permite a visualização de muitas características que não podem ser observadas ao MO. Contudo o microscópio eletrónico pode ser menos flexível do que o MO. Por exemplo, a área observada ao ME é geralmente menor do que 1 mm^2 , o que pode dificultar a obtenção de campos característicos. Apresenta poucos métodos de coloração, e produzem somente imagens monocromáticas (preto e branco). O microscópio

eletrónico é também, mais caro, consome mais tempo e não está tão disponível (Young & Heath, 2001).

3.2. Microscopia ótica

A microscopia ótica usa radiações eletromagnéticas para formar imagens ampliadas dos objetos a observar. Uma célula animal tem um diâmetro de cerca de 10-20 μm (um quinto do tamanho da partícula mais pequena visível a olho nu). O microscópio ótico utiliza a luz visível (radiação com comprimento de onda compreendido entre os 400 e os 700 nm) (Alberts et al, 2008).

O microscópio ótico de fundo claro é o mais utilizado na visualização de preparações histológicas e células que não exijam grande detalhe estrutural (Junqueira & Carneiro, 2004; Alberts et al, 2008). Será sobre ele que mais à frente se desenvolverá os seus princípios, procedimentos e protocolos.

3.2.1. História

A palavra microscópio é derivada das palavras gregas mikros (pequeno) e skopeo (olhar). Desde o início da ciência que existe o fascínio de ser capaz de olhar para o menor e menor detalhe do mundo que nos rodeia. Desde os Biólogos aos Cientistas de Materiais e até na Geologia (FEI Company, 2010).

O microscópio de luz foi desenvolvido provavelmente a partir do telescópio de Galileu durante o século XVII, mas ninguém sabe ao certo quem inventou o microscópio. Mas a invenção do microscópio composto de luz por Hans Janssen e Zacharias Janssen, fabricantes de óculos, em 1590, permitiu o acesso ao mundo microscópico. Este microscópio permitia ampliar objetos 20 a 30 vezes a partir do seu tamanho original.

Foi o holandês Antony van Leeuwenhoek (1632-1723) (Figura 6) que desenvolveu um dos primeiros instrumentos (Figura 7) que permitia ver objetos com dimensões reduzidas. Este era composto por uma poderosa lente convexa e um suporte ajustável para o objeto que está a ser estudado. Com este aparelho, Van Leeuwenhoek, descobriu protozoários, espermatozoides, bactérias e foi capaz de classificar os glóbulos vermelhos pela forma, pode mesmo ter ampliado objetos até 300x (Bozzola & Russel, 1999; FEI Company, 2010).



Figura 6: Antony van Leeuwenhoek (1632-1723). Retirado de FEI Company, (2010).



Figura 7: Réplica de um dos microscópios de luz feito por Antony van Leeuwenhoek. Retirado de FEI Company, (2010).

No início do século XIX, em 1838, Schleiden e Schwann propõem a teoria celular, afirmando que a célula é a unidade da estrutura e função em plantas e animais, marcando assim o nascimento da biologia celular (Alberts et al, 2008).

3.2.2. Princípios e procedimentos

A observação das preparações, no microscópio ótico de fundo claro, ocorre devido à iluminação que atravessa a amostra. O microscópio (Figura 8) é composto por duas partes, a parte mecânica e a parte ótica. Da componente ótica fazem parte três sistemas de lentes: condensador, objetiva e ocular. O primeiro, concentra a luz e projeta um feixe luminoso sobre a amostra. A objetiva projeta uma imagem aumentada do objeto em direção à ocular, que depois a amplia e

projeta a imagem na retina, num negativo fotográfico ou num detetor (com uma câmara CCD) (Junqueira & Carneiro, 2004).

Da parte mecânica do microscópio fazem parte:

Pé ou base: placa retangular responsável pela estabilidade do microscópio (assenta sobre a mesa). Para além disso, é onde a fonte luminosa terá suporte.

Braço: suporta as restantes partes do microscópio, consiste numa haste com uma parte vertical e outra oblíqua que se encontra fixada à base.

Tubo ou canhão: Também composto por duas partes, uma vertical e outra inclinada. Esta última, encontra-se na parte superior do microscópio e é um tubo binocular, com dois tubos porta-oculares reguláveis.

Botões de comando dos movimentos: parafusos macrométricos e micrométricos e parafusos de deslocação vertical do condensador e os botões de controlo da sobreplatina (permitem deslocar a preparação sobre a platina).

Platina: local onde se coloca a preparação, tem uma abertura no centro para deixar passar a luz na amostra.

Pinça da sobreplatina: utilizadas na imobilização da preparação, para permitir a observação.

Revólver: acessório que comporta as objetivas e que roda de forma, permitindo que a objetiva desejada seja colocada no tubo do microscópio.

Interruptor: botão que permite ligar e desligar o microscópio (Eraut & Snook, 1975; Junqueira & Carneiro, 2004; Dokland et al, 2006).

A componente ótica do microscópio consiste:

Sistema de iluminação: responsável pela orientação e regulação da quantidade de luz transmitida.

- Fonte luminosa: lâmpada incandescente que se encontra na base do microscópio, fornece o feixe de raios luminosos.
- Filtro de luz: a utilização de filtros corados pode melhorar a quantidade da imagem. O filtro também contribui para o aumento do poder de resolução do microscópio, pois absorve o excesso de calor e brilho e as radiações de maior comprimento de onda (vermelho e amarelo).
- Diafragma do condensador (diafragma-íris): regula a abertura do feixe de luz.

Sistema de ampliação: constituído por lentes objetivas e oculares.

- Objetivas (lente frontal + lentes corretoras): associação de lentes situada na extremidade (Eraut & Snook, 1975; Junqueira & Carneiro, 2004; Dokland et al, 2006).

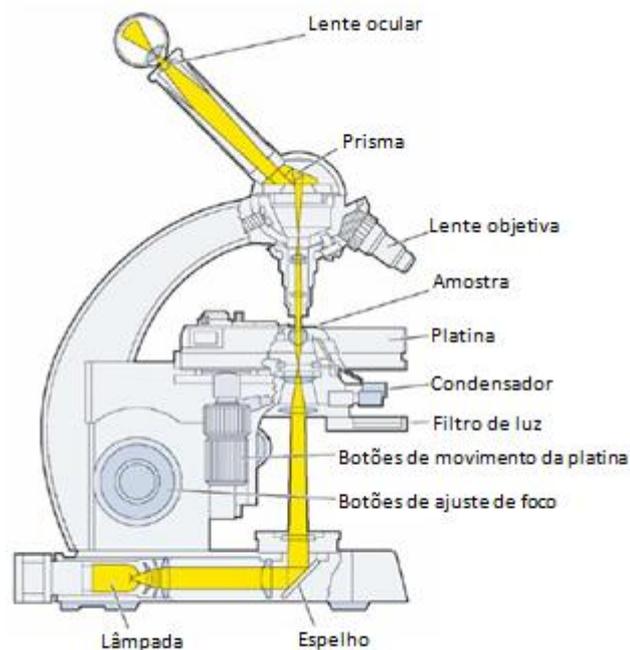


Figura 8: Microscópio óptico de fundo claro.
Adaptado de Junqueira & Carneiro, (2004).

Os objetos para a observação microscópica são preparados de forma a ficarem transparentes, e a luz que atravessa o objeto é chamada de luz transmitida.

A observação de uma célula e a capacidade de distinção das várias partes da célula depende do contraste que resulta da absorção da luz pelos componentes desta. À diferença relativa de intensidade luminosa ou de cor entre o objeto e o meio que o rodeia, dá-se o nome de contraste (Junqueira & Carneiro, 2004; Alberts et al, 2008).

Os objetos tornam-se visíveis ao microscópio quando são naturalmente corados (cloroplastos), estão corados artificialmente ou então são incolores, mas nesta situação têm que ter índices de refração diferentes dos do meio no qual estão montados. Para a observação correta têm que se realizar uma preparação microscópica, os objetos são montados numa lâmina e protegidos com uma lamela, entre estas é colocado um meio de montagem que permite eliminar as diferenças de índice de refração entre o objeto e os vidros (Junqueira & Carneiro, 2004; Alberts et al, 2008).

3.2.3. Aspetos das células

As primeiras colorações, desenvolvidas a partir de corantes usados na indústria têxtil, continuam a ser utilizadas como métodos empíricos para o microscópio ótico. Posteriormente, foram desenvolvidos outros métodos de colorações mais específicos que permitem a visualização ao MO de componentes intra e extracelulares com mais detalhe (Young & Heath, 2001).

Como a maioria dos cortes histológicos, para serem estudados ao microscópio devem ser corados, foram desenvolvidos métodos de coloração que tornam evidentes os vários componentes dos tecidos, e facilitam a distinção entre eles. Entre todos os métodos e colorações disponíveis, a combinação hematoxilina-eosina (HE) é a mais usada como coloração de rotina nos laboratórios (Junqueira & Carneiro, 2004).

3.2.4. Protocolos

Geralmente, os tecidos e órgãos são seccionados em cortes histológicos muito finos (regra geral são espessos demais para permitir a passagem de um feixe de luz) e são colocados em lâminas de vidro antes de serem examinados. Os tecidos e órgãos dos quais se fazem os cortes, sofrem uma série de tratamentos anteriores que permitem que sejam cortados (Junqueira & Carneiro, 2004).

Uma preparação microscópica ideal deve preservar as amostras, de tal forma que a sua estrutura e composição molecular seriam iguais às que tinha no corpo.

Os fragmentos depois da sua remoção devem ser tratados o mais rapidamente possível para evitar a digestão dos tecidos por enzimas presentes no interior das células (autólise) ou por bactérias e também para preservar a estrutura e a composição molecular. Este passo é chamado de fixação e pode ser feito por substâncias químicas (e. g., formaldeído), ou por métodos físicos (menos utilizados) (Junqueira & Carneiro, 2004).

Depois de terem sido fixados, os fragmentos sofrem desidratação, e são infiltrados com substâncias que lhes proporcionam uma consistência rígida – inclusão – as mais utilizadas são a parafina e as resinas plásticas.

O procedimento completo para a análise de um tecido ao microscópio, desde a fixação até a observação é demorado, pode durar de 12 horas a 2 dias e meio, dependendo do tamanho do tecido, do fixador e do meio de inclusão utilizados (Junqueira & Carneiro, 2004).

3.3. Microscopia eletrónica

A microscopia eletrónica é campo especializado da ciência que utiliza o microscópio eletrónico como ferramenta (Bozzola & Russel, 1999).

Os microscópios eletrônicos utilizam um feixe de elétrons altamente energéticos para examinar objetos. Esta análise pode produzir informações desde a topografia, morfologia, composição e informação cristalográfica de um objeto.

Desde o seu desenvolvimento, o microscópio eletrônico tem sido uma ferramenta valiosa. A capacidade de observar e caracterizar materiais em cortes ultrafinos permitiu um progresso considerável em áreas como Histologia, Biologia, Medicina e Ciências dos Materiais (Voutou & Stefanaki, 2008).

3.3.1. História

Em 1920 descobriu-se que os elétrons acelerados em vácuo exibiam um comportamento muito semelhante ao da luz. Estes circulam em linhas retas têm propriedades ondulatórias, e apresentam um comprimento de onda 100.000 vezes mais curto do que a luz visível. Mas descobriu-se também, que a utilização de campos elétricos e magnéticos podem moldar os caminhos seguidos pelos elétrons, da mesma forma que as lentes de vidro são usadas para dobrar e concentrar a luz visível (FEI Company, 2010).

Ernst Ruska e Max Knoll desenvolveram, na Alemanha, o primeiro microscópio eletrônico em 1932. Já em 1986, Ruska foi distinguido com o Prêmio Nobel da Física (Bozzola & Russel, 1999).

O microscópio eletrônico tirou vantagem do muito curto comprimento de onda do elétron e possibilitou o aumento da ampliação e o aumento paralelo na capacidade de resolução, permitindo aos biólogos definir e expandir o mundo de microscopia de luz. Deu-nos a capacidade de visualizar moléculas e até mesmo o átomo, vírus, DNA (ácido desoxirribonucleico) e muitos organelos menores foram visualizadas pela primeira vez (Bozzola & Russel, 1999).

O aperfeiçoamento do microscópio de luz básico levou cerca de 300 anos, mas em menos de 40 anos o microscópio eletrônico foi aperfeiçoado. O mundo que a microscopia eletrônica abriu, permitir uma experiência visual extremamente

excitante para os biólogos, no entanto, a idade descritiva da microscopia eletrônica biológica passou (Bozzola & Russel, 1999).

São chamados de microscópios eletrônicos dois tipos básicos de instrumentos. Foram inventados aproximadamente ao mesmo tempo, mas têm diferentes utilidades. Um deles, o microscópio eletrônico de transmissão (TEM) projeta elétrons através de um corte muito fino de tecido (amostra) para produzir uma imagem bidimensional num ecrã fluorescente. O brilho da imagem é proporcional ao número de elétrons que são transmitidos através da amostra (Bozzola & Russel, 1999). O outro, o microscópio eletrônico de varrimento (SEM) produz imagens tridimensionais (3D) mas restritas apenas à superfície do objeto, a estrutura interna da amostra permanece oculta (Young & Heath, 2001). Este microscópio utiliza uma mancha 2 a 3 nm de elétrons para varrer a superfície da amostra e gerar elétrons secundários que são detetados depois por um sensor. Por isso, a imagem é produzida ao longo do tempo (assim como a amostra inteira é digitalizada) (Bozzola & Russel, 1999).

3.3.2. Princípios e procedimentos

Qualquer estrutura pode ser observada ao microscópio eletrônico de transmissão (TEM) (Figura 9) desde que o material seja devidamente preparado para o efeito.



Figura 9: Microscópio eletrônico de transmissão (TEM). Retirado de Junqueira & Carneiro, (2004).

Este aparelho (Figura 10) é constituído por uma coluna metálica longa, local onde é feito o vácuo (10^7 a 10^8 Pa (pascal)) através de bombas de vácuo. Na parte superior da coluna está presente um cátodo (filamento de tungsténio, de tungsténio aquecido ou de *lanthanum hexaboride* – LaB_6) que emite eletrões, e um ânodo que se encontra ligado à terra. A corrente elétrica de 220 V é transformada em corrente elétrica de alta voltagem (60 a 120 kV), através do transformador que o microscópio eletrônico tem acoplado, esta é conduzida até ao cátodo através de um cabo. Os eletrões são acelerados, pela diferença de potencial criada, entre o cátodo e o ânodo. Mas como estes circulam de forma desordenada, as lentes magnéticas presentes ao longo da coluna, alinham o seu trajeto. Os eletrões depois de emitidos pelo cátodo deslocam-se para o ânodo. Em seguida, os eletrões são agrupados num feixe estreito e paralelo, pelo condensador. O feixe passa por um diafragma (diafragma de iluminação) com abertura variável que regula a passagem dos eletrões. Depois este, atravessa o material a ser observado. A observação dos cortes ultrafinos (< 100 nm) do material ocorre, porque estes são colocados numa grelha metálica quadriculada, esta é colocada no porta-grelhas, que é introduzido na coluna. O feixe projetado atravessa os cortes, e depois passa através de um diafragma (diafragma de contraste), e vai ao encontro de uma lente de difração (objetiva), que permite a formação da imagem intermédia do objeto. Em seguida, existe um diafragma de

campo e uma lente intermediária, que permitem que a imagem seja ampliada ou reduzida. O feixe de elétrons atravessa as lentes projetoras, que projetam a imagem final num ecrã fluorescente e assim, a imagem eletrónica, que é invisível, transforma-se em luz visível, já que o olho humano não consegue detetar elétrons. O feixe eletrónico é desviado ou dispersa, quando atravessa estruturas que contêm átomos de elevado número atómico, sendo assim a sua projeção no ecrã é evitada, surgindo a imagem com zonas escuras, chamadas de eletrodensas (Junqueira & Carneiro, 2004; Alberts et al, 2008; Voutou & Stefanaki, 2008; FEI Company, 2010).

O microscópio eletrónico possui um painel de comando, que permite controlar a observação da amostra, que é onde se encontram os botões de focagem, de variação da ampliação e de variação da intensidade luminosa. Os botões de deslocação do porta-objetos entre outros. Junto ao ecrã de visualização está também uma lupa binocular que possibilita a ampliação 10 x da imagem.

Para impedir que o observador seja atingido pelas radiações libertadas pelos elétrons, o ecrã de visualização é revestido externamente por janelas de vidro especial, este para resistir ao vácuo do interior da coluna também possui uma elevada espessura (Junqueira & Carneiro, 2004; Alberts et al, 2008; Voutou & Stefanaki, 2008; FEI Company, 2010).

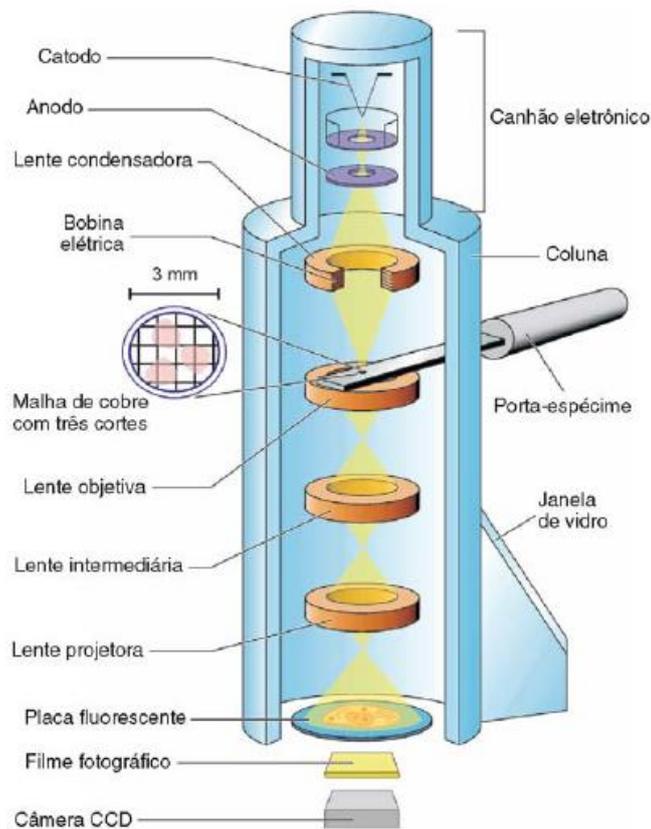


Figura 10: Microscópio eletrônico de transmissão.
Retirado de Junqueira & Carneiro, (2004).

Contudo o microscópio eletrônico também apresenta limitações. Em especial, impede a observação de material vivo porque devido ao baixo poder de penetração do feixe de elétrons só pode ser utilizado sob alto vácuo e com cortes muito finos. Já a alta aceleração dos elétrons também pode danificar o objeto, provocando alterações na estrutura deste (Alberts et al, 2008; FEI Company, 2010).

O funcionamento de um projetor e do microscópio eletrônico de transmissão pode ser comparado. Num projetor de diapositivos, a fonte de luz é transformada num feixe paralelo pela lente do condensador; este passa através do objeto e é focado como uma imagem ampliada na tela pela lente objetiva. No microscópio eletrônico, substitui-se a fonte de luz por uma fonte de elétrons, as lentes de vidro

por lentes magnéticas, e a tela de projeção é trocada por um ecrã fluorescente. O percurso desde a fonte até ao ecrã está sob vácuo e o objeto tem de ser muito fino, para permitir que os eletrões viajem através dele (FEI Company, 2010).

3.3.3. Aspetos das células

A imagem obtida no TEM é a preto e branco, pois é produzida pelo balanço da quantidade de eletrões que atingiram o detetor e eletrões que foram retidos no tubo do microscópio. Uma micrografia eletrónica apresenta áreas com tons mais escuros e áreas com tons mais claros, estas costumam ser denominadas eletro-densas e eletro-transparentes /lucentes, respetivamente (Junqueira & Carneiro, 2004).

Os cortes observados ao ME são corados com metais pesados (sais de urânio e de chumbo), que se ligam aos componentes celulares e teciduais, em vários graus, se não os cortes aparecem quase sem características. Uma estrutura com quantidades significativas de metal ligadas a si, não permite a transmissão do feixe de eletrões através da amostra, logo, naquele ponto a estrutura aparecerá em cinza escuro ou negro (eletro-densa), a passagem de eletrões não acontece, pois é muito densa. Já estruturas com pouca ou nenhuma afinidade pelo corante aparecerão em cinza-claro ou branco (eletro-lucentes), uma vez que a transmissão do feixe de eletrões é permitida (Young & Heath, 2001).

3.3.4. Protocolos gerais

No protocolo para microscopia eletrónica de transmissão, deve-se preparar uma amostra estável e pequena (cerca de 3 milímetros de diâmetro) que permita a sua introdução na coluna de vácuo do microscópio, e deve ser fina o suficiente para permitir a transmissão de eletrões. Mas a espessura das amostra varia consoante a aplicação que esta terá. Uma amostra não deve ser mais espessa que 20 nm se

for utilizada no estudo de materiais de resolução elevada, já para a pesquisa em biologia a amostra pode ter uma espessura entre 300 a 500 nm. Os métodos de preparação de uma amostra para microscopia eletrónica são diferentes, tendo em conta o ramo de pesquisa. Por exemplo, em biologia pode ocorrer primeiro um tratamento químico para remover a água e preservar o tecido, tanto quanto possível no seu estado original, depois sofrem uma inclusão numa resina de endurecimento e, após a resina estar endurecida, fazem-se secções com uma espessura média de 0,5 μm . Estas secções são colocadas em grelhas com 3 mm de diâmetro, que podem ser formadas por diversos materiais, mas geralmente são de cobre e revestidas com uma película de carbono (Junqueira & Carneiro, 2004; FEI Company, 2010).

Na preparação das amostras para TEM, cada passo do procedimento afeta a qualidade final da micrografia. Por isso, o processamento deve ser planificado o mais cuidadosamente possível e com atenção a cada detalhe.

Em microscopia eletrónica de transmissão, o procedimento de preparação de tecidos pode ser dividida em oito grandes passos, fixação primária, lavagem, fixação secundária, desidratação, infiltração com solventes de transição, infiltração com resina, inclusão, corte (Figura 11) (Bozzola & Russel, 1999).

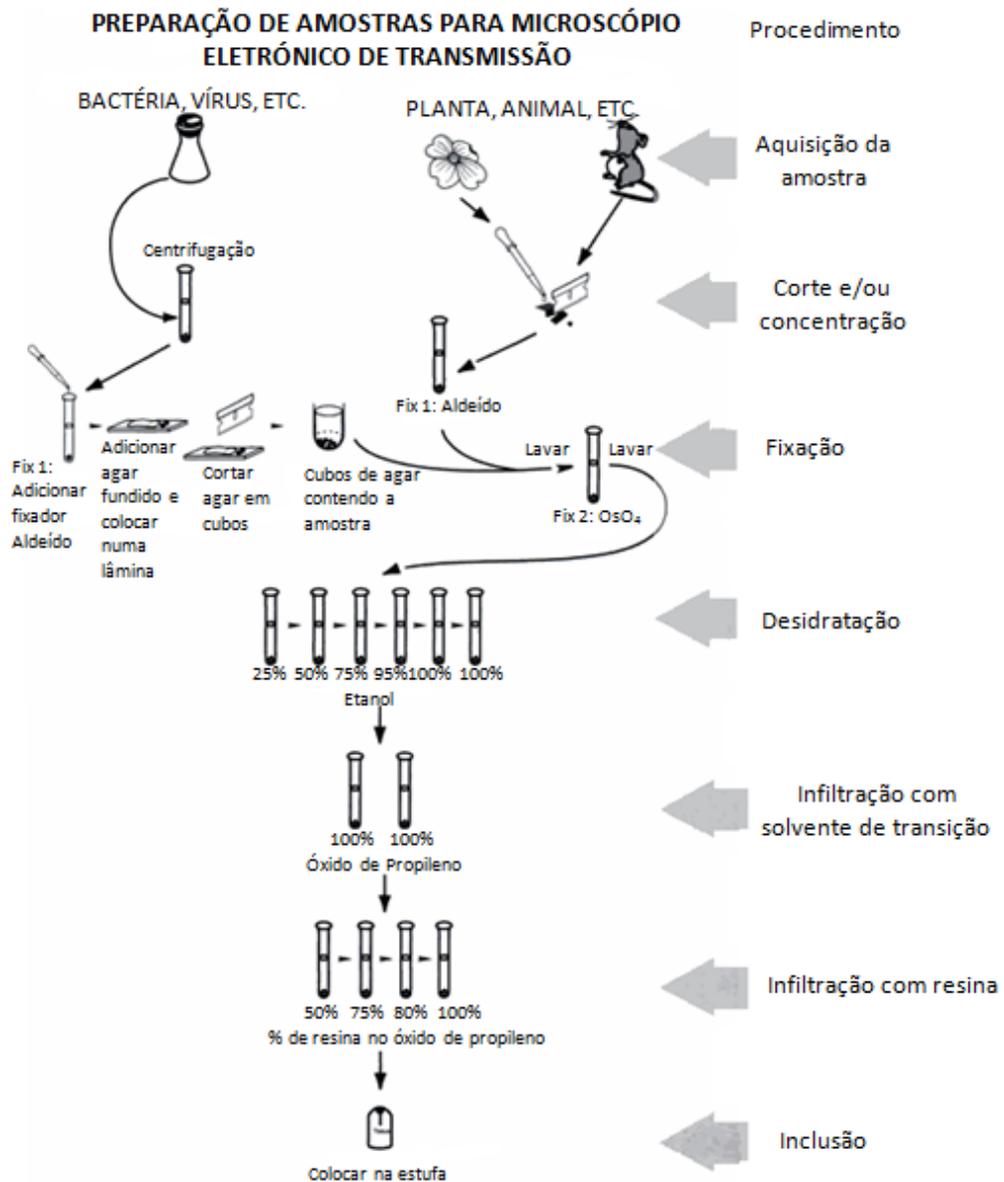


Figura 11: Procedimento geral para microscopia eletrônica de transmissão. Adaptado de Bozzola & Russel, (1999).

Fixação

Os fixadores permitem preservar a estrutura celular e as relações moleculares. Os fixadores químicos são utilizados diluídos em soluções tampão. Esta etapa é dividida em fixação primária e pós-fixação.

O fixador primário, geralmente um aldeído (como o glutaraldeído ou uma mistura de paraformaldeído com glutaraldeído), penetra muito rapidamente nas células, e estabiliza as moléculas, estabelecendo as ligações covalentes cruzadas com as proteínas e as moléculas vizinhas (Bozzola & Russel, 1999; Dykstra & Reuss, 2003; Kuo, 2007).

Os tampões, onde os fixadores são diluídos, têm de ser escolhidos consoante o tipo de material a fixar, mas de um modo geral, utilizam-se a pH 7,0 – 7,4. Existem diferentes tipos de soluções tampão que podem ser usadas durante a fixação. Os mais utilizados são o tampão de cacodilato, fosfato e os tampões orgânicos como o PIPES, este tem a vantagem de não ser tóxico, fácil de preparar e preservar melhor os microtubos e os microfilamentos.

Como segundo fixador, ou pós-fixador, regra geral é utilizado o tetróxido de ósmio, comparado com o primeiro, é mais lento a penetra e reagir com a mostra, contudo é melhor fixador para os lípidos, uma vez que são osmiofílicos. Dado que o ósmio é um metal pesado, as estruturas às quais se liga ficam ligeiramente contrastadas.

A utilização da dupla fixação tem como objetivo aproveitar as vantagens de cada um dos fixadores, que são cumulativas. Os fixadores são substâncias irritantes, devem ser manuseados em hottes e com toda a atenção. Ter cuidado particular com o tetróxido de ósmio, que é tóxico e os fumos voláteis são muito corrosivos, em especial para as membranas mucosas (Bozzola & Russel, 1999; Dykstra & Reuss, 2003; Kuo, 2007).

Desidratação

Após a fixação e pós-fixação, as células preservadas sofrem desidratação. Nesta etapa retira-se a água celular que a amostra contém, substituindo-a por um etanol e, seguidamente pelo solvente da resina. Assim, o material deve passar gradualmente por uma serie ascendente de álcoois ou acetona até à concentração de 100%, seguindo-se depois o solvente que permite a passagem

para a resina, geralmente o óxido de propileno, também pode ser utilizada a acetona (Bozzola & Russel, 1999; Dykstra & Reuss, 2003; Kuo, 2007).

Impregnação

Esta fase, permite obter cortes suficientemente finos que possam ser observados ao microscópio. Assim, a amostra é embebida numa substância de consistência firme, as resinas (geralmente do tipo epoxy). As peças são introduzidas em misturas do solvente de transição (um dos mais usados, o óxido de propileno) com uma resina.

Como na desidratação pode ser usada acetona em vez de etanol, e esta é miscível com as resinas do tipo epoxy (e. g., Epon) não há necessidade de passar o material pelo solvente de transição, utiliza-se logo a mistura com a resina e acetona (Bozzola & Russel, 1999; Dykstra & Reuss, 2003; Kuo, 2007).

Inclusão

As amostras são inseridas em moldes horizontais de borracha, devidamente identificados. Em seguida os moldes são enchidos com a resina, e colocam-se os blocos na estufa a 40 °C durante um dia ou “over night” e depois a 60 °C durante 1 a 2 dias. Como são substâncias viscosas as resinas polimerizam a esta temperatura, ficando por isso os blocos duros. Os espaços intra e extracelulares da amostra são preenchidos por uma resina suficientemente dura que permitirá que se realize a etapa seguinte, o corte. Depois de polimerizados os blocos podem ser guardados indefinidamente.

Pode-se utilizar outro tipo de resina, para além das do tipo epoxy (e. g., Epon ou araldite), pode-se usar do tipo Spurr. Os dois tipos de resinas são híper-alérgicos e as do tipo Spurr são carcinogénicas, recaindo por isso a maior parte das vezes a escolha pelas do tipo epoxy (Bozzola & Russel, 1999; Dykstra & Reuss, 2003; Kuo, 2007).

Corte

Nesta etapa o operador corre alguns riscos, por isso requer algum treino. Antes do corte, o bloco é talhado, manualmente com o auxílio de uma lâmina ou então num aparelho específico de talhe, esta operação permite reduzir a superfície de corte. Só depois é que os cortes são efetuados, num aparelho específico, o ultramicrotomo, onde se regula a espessura de corte desejada (Bozzola & Russel, 1999; Kuo, 2007).

Habitualmente começa-se por efetuar cortes semi-finos (espessura entre 1 - 2 micrómetros (μm) ou 800 nm) com uma faca de vidro. Estes cortes permitem uma visualização preliminar da amostra ao microscópio ótico (depois de corados com azul de metileno, azure II, ou mistura dos dois), para se identificar as zonas de maior interesse e também para reduzir a superfície de corte.

Depois de selecionada a zona desejada, volta-se a talhar o bloco, com a ajuda de uma lâmina fina mas forma-se uma pirâmide menor. Seguidamente efetuam-se os cortes ultrafinos, geralmente entre 40 a 100nm de espessura. Dada a reduzida espessura do corte, para realizar com perfeição recorre-se à utilização de uma faca de diamante. Os cortes depois são colocados em grelhas metálicas, às quais se fixam facilmente (Bozzola & Russel, 1999; Junqueira & Carneiro, 2004; Kuo, 2007; Alberts et al, 2008).

Contraste

Para melhor observação ao microscópio os cortes sofrem contrastação. Os contrastantes são soluções aquosas (citrato de chumbo) ou alcoólicas (acetato de uranilo) de metais pesados. Quando entram em contacto com moléculas orgânicas, depositam-se sobre elas, na superfície dos cortes. As estruturas celulares surgem com contraste ao TEM, uma vez que são eletro-densas. Esta etapa que consiste na colocação da grelha numa gota de contrastante, decorre no escuro e à temperatura ambiente. Quando se utiliza o citrato de chumbo, para diminuir aos riscos do contrastante precipitar por oxidação, coloca-se também na placa um recipiente com lentilhas de hidróxido de sódio, que fixam a humidade do ar (Bozzola & Russel, 1999; Kuo, 2007).

Observação

Os cortes depois de contrastados estão preparados para serem observados e / ou fotografados ao TEM (Bozzola & Russel, 1999; Kuo, 2007).

O procedimento para microscopia eletrônica de transmissão, começa com tecidos hidratados vivos e termina com tecidos preservados num estado estático numa matriz de resina plástica, virtualmente sem água. A resina infiltra o tecido, substituindo toda a água no interior da célula o que torna a célula firme o suficiente para serem efetuados cortes (Bozzola & Russel, 1999).

3.3.5. Protocolos para TEM usando células em cultura

Uma vez que as células cultivadas *in vitro* para análise ao TEM podem ser produzidas quer em suspensão num meio líquido, ou sobre um substrato. Por isso, os métodos de execução para o tratamento das células variarão. Contudo os passos básicos para análise no TEM são os mesmos: fixação num aldeído tamponado, pós-fixação em tetróxido de ósmio, desidratação em etanol, inclusão numa resina plástica, corte, coloração e observação ao TEM (Kuo, 2007).

Existem então, vários métodos para iniciar e desenvolver o processamento de amostras de culturas celulares *in vitro* para TEM (Sebring et al, 1988; Dykstra, 1993; Bozzola & Russel, 1999; Kuo, 2007; Taupin, 2008).

Quando as células crescem em suspensão podem ser consolidadas só no início, ou então também durante o processamento para TEM, através de centrifugação . Pode-se iniciar o processamento colocando as células em microtubos, e realiza-se uma centrifugação para formar um pellet. Deve-se evitar uma centrifugação excessiva, para não danificar as células, mas deve ser a necessária para formar um pellet compacto. Depois da centrifugação retira-se cuidadosamente o sobrenadante e coloca-se o fixador inicial, em seguida efetua-se o restante

procedimento, sempre com cuidado para não desfazer o pellet nem perder material durante cada etapa (Kuo, 2007).

Em alternativa, no início do processamento para TEM, as células em suspensão podem ser colocadas num gel como o agar, agarose ou gelatina. Depois da centrifugação e primeira fixação, remove-se o fixador e colocam-se pequenas porções do pellet num gel. Após polimerização do gel, colocam-se os fragmentos do gel com as células em microtubos e continua-se o processamento normal para TEM. A concentração de gel utilizada não deve ser em excesso (entre 1% e 10%), caso contrário a observação ao microscópio fica comprometida. Com este método evita-se a perda de material durante os seguintes passos e as células deixam de ser consideradas suspensões e passam a ser manipuladas como fragmentos (Kuo, 2007; Taupin, 2008).

Se as células crescem sobre um substrato, pode-se realizar o procedimento para TEM de diferentes formas. Pode-se realizar o processamento usual no recipiente onde as células crescem, tendo o cuidado de após o passo de impregnação separar a resina polimerizada contendo as células do recipiente: nesta etapa pressiona-se firmemente uma superfície dura contra a resina polimerizada, esta separa-se completamente do recipiente, ficando assim um fragmento de resina com células.

Outro método é colocar as células que crescem num substrato em suspensão, e depois desenvolver o processamento de duas formas, consolidar as células num pellet ou coloca-las num gel, como referido anteriormente para o processamento de células em suspensão (Sebring et al, 1988; Dykstra, 1993; Bozzola & Russel, 1999; Kuo, 2007; Taupin, 2008).

4. Enquadramento e objetivo do trabalho

As amostras processadas para microscopia eletrónica geralmente são, tecidos animais ou fragmentos de plantas. Por isso, o processamento de células ou partículas isoladas permanece ainda um desafio pelas particularidades únicas que uma população de células/partículas apresenta em suspensão. A microscopia eletrónica fornece detalhes da estrutura, organização e interação das células, dentro dos tecidos. Permite também a caracterização da ultraestrutura de estruturas subcelulares, de células isoladas e / ou purificadas, e de organismos, como vírus, bactérias e leveduras. Esta informação microscópica pode ter múltiplas aplicações nas ciências da vida (Taupin, 2008). Como exemplo disso, o TEM tem sido uma ferramenta importante no estudo do impacto de nanopartículas e nanocompostos na célula. A nanotecnologia tem sido usada na pesquisa biomédica, no entanto ainda é limitada a compreensão da absorção intracelular, transporte e distribuição subcelular de materiais nanoestruturados bem como as informações sobre o seu impacto na saúde humana (Chithrani et al, 2009; Ng et al, 2010; Moaddab et al, 2011). Para caracterizar a estrutura das nanopartículas, a sua localização intracelular, bem como para avaliar a morfologia das amostras de tecido ou células, o TEM é uma ferramenta indispensável (Mühlfeld et al, 2007).

O principal objetivo deste trabalho consistia em estabelecer/alcançar um protocolo que permita analisar/estudar células cultivadas *in vitro* (osteoblastos), ao microscópio eletrónico de transmissão (TEM).

5. Material e métodos

Cultura de células

Foram utilizadas células de osteossarcoma MG-63 (ATCC - EUA) cultivadas em meio Alpha MEM com GlutaMAX™ (α -MEM) (Life Technologies, Carlsbad EUA), com 10% de Soro Fetal Bovino (FBS) (Life Technologies, Carlsbad, EUA), Penicilina/Estreptomicina (10000u/mL) (Life Technologies, Carlsbad, EUA) e Gentamicina (10 mg/mL) (Life Technologies, Carlsbad, EUA). A linha de células foi mantida e incubada a 37°C numa atmosfera húmida contendo 5% de CO₂.

Uma vez que esta linha celular cresce em monocamada aderente, para a sua subcultura (passagem) é necessário proceder à dissociação das células quer da matriz quer entre células adjacentes. Neste caso foi utilizada uma enzima proteolítica, a tripsina, que digere as adesões célula-célula e também dissocia as células do frasco de cultura. Após a lavagem das células com solução de PBS, foi adicionada uma solução de tripsina – ácido etilenodiamina tetracético (EDTA) (0,25% tripsina, 1mM EDTA) (Life Technologies, Carlsbad, EUA), e quando todas as células se apresentavam em suspensão, a enzima foi inativada com meio de cultura. Uma alíquota de suspensão celular foi colocada num novo frasco com meio de cultura numa razão de 1:10.

Microscopia eletrónica

O processamento de material para o TEM envolve substâncias perigosas, por isso durante cada etapa devem ser seguidas todas as normas de higiene e segurança no laboratório, quer individuais ou coletivas (Bozzola & Russel, 1999; Kuo, 2007).

Realizaram-se dois procedimentos, num deles as células foram colocadas num gel de agar, no outro procedimento não.

Procedimento A

No primeiro procedimento (Figura 12), células de osteossarcoma MG-63 (ATCC - EUA) foram colhidas para microtubos e centrifugadas a 300 g (rcf) durante 5 minutos. Retirou-se o sobrenadante, com cuidado para não danificar o pellet formado (quando se pipeta as amostras estas podem sofrer alterações se a pipetagem for muito vigorosa) e colocou-se o fixador.

O procedimento (Anexo 1) consistiu em colocar as células a fixar numa solução de glutaraldeído a 2,5% (v/v) preparada em tampão Pipes (1,25%) (Anexo 3) a pH 7,4, durante 1 hora à temperatura ambiente. As células sofreram quatro lavagens em tampão Pipes, 15 minutos cada.

A pós-fixação ocorreu com tetróxido de ósmio (OsO_4) a 1% (w/v) preparado em tampão Pipes (Anexo 3), durante 1 hora à temperatura ambiente; em seguida efetuaram-se quatro lavagens em tampão Pipes, 5 minutos cada.

Para a desidratação utilizou-se uma escala ascendente de acetona: acetona a 30%, 50%, 70%, 80% e 90%; 15 minutos cada, e acetona a 100%, 20 minutos com 2 renovações por mais 20 minutos cada.

Na impregnação, usou-se um conjunto de soluções de acetona e Epon (EMS) (Anexo 3) em concentrações crescentes neste último – nas proporções de 3:1, 1:1 e 1:3; 1 hora cada no frio. As células foram colocadas nos blocos contendo Epon (100%) e deixou-se à temperatura ambiente 1 hora. Os blocos foram colocados na estufa a 40°C “over night” depois passaram-se os blocos para uma estufa a 60°C onde permaneceram 1 a 2 dias até polimerizarem.

Procedimento B

No segundo procedimento (Figura 12), células de osteossarcoma MG-63 (ATCC - EUA) foram colhidas para microtubos e centrifugadas a 300 g durante 5 minutos. Retirou-se o sobrenadante, com cuidado para não danificar o pellet formado e colocou-se o fixador.

O procedimento (Anexo 1) consistiu em colocar as células a fixar numa solução de glutaraldeído a 2,5% (v/v) preparada em tampão Pipes (1,25%) (Anexo 3) a pH 7,4, durante 1 hora à temperatura ambiente. As células foram colocadas em agar 10% (Anexo 3), após este polimerizar cortaram-se pequenos fragmentos. Os pedaços de agar, contendo as células, sofreram quatro lavagens em tampão Pipes, 15 minutos cada.

A pós-fixação ocorreu com tetróxido de ósmio (OsO₄) a 1% (w/v) preparado em tampão Pipes (Anexo 3), durante 1 hora à temperatura ambiente; em seguida efetuaram-se quatro lavagens em tampão Pipes, 5 minutos cada.

Para a desidratação utilizou-se uma escala ascendente de acetona: acetona a 30%, 50%, 70%, 80% e 90%; 15 minutos cada, e acetona a 100%, 20 minutos com 2 renovações por mais 20 minutos cada.

Na impregnação, usou-se um conjunto de soluções de acetona e Epon (EMS) (Anexo 3) em concentrações crescentes neste último – nas proporções de 3:1, 1:1 e 1:3; 1 hora cada no frio. As peças foram orientadas em blocos contendo Epon (100%) e deixou-se à temperatura ambiente 1 hora. Os blocos foram colocados na estufa a 40°C “over night” depois passaram-se os blocos para uma estufa a 60°C onde permaneceram 1 a 2 dias até polimerizarem.

Os blocos de Epon foram talhados em forma de pirâmide com o auxílio de uma lâmina; estes foram direcionados no ultramicrotomo (Reicher Super-Nova) e efetuaram-se cortes semi-finos. Os cortes foram colocados em lâminas de vidro com acetona a 20% (1 gota) e após secagem na estufa, procedeu-se à coloração

com azul de toluidina (Anexo 2). As preparações foram montadas com uma resina sintética e posteriormente observadas ao microscópio ótico.

Este procedimento também foi realizado só com fragmentos de agar a 2% (Anexo 3) sem células, a partir da desidratação.

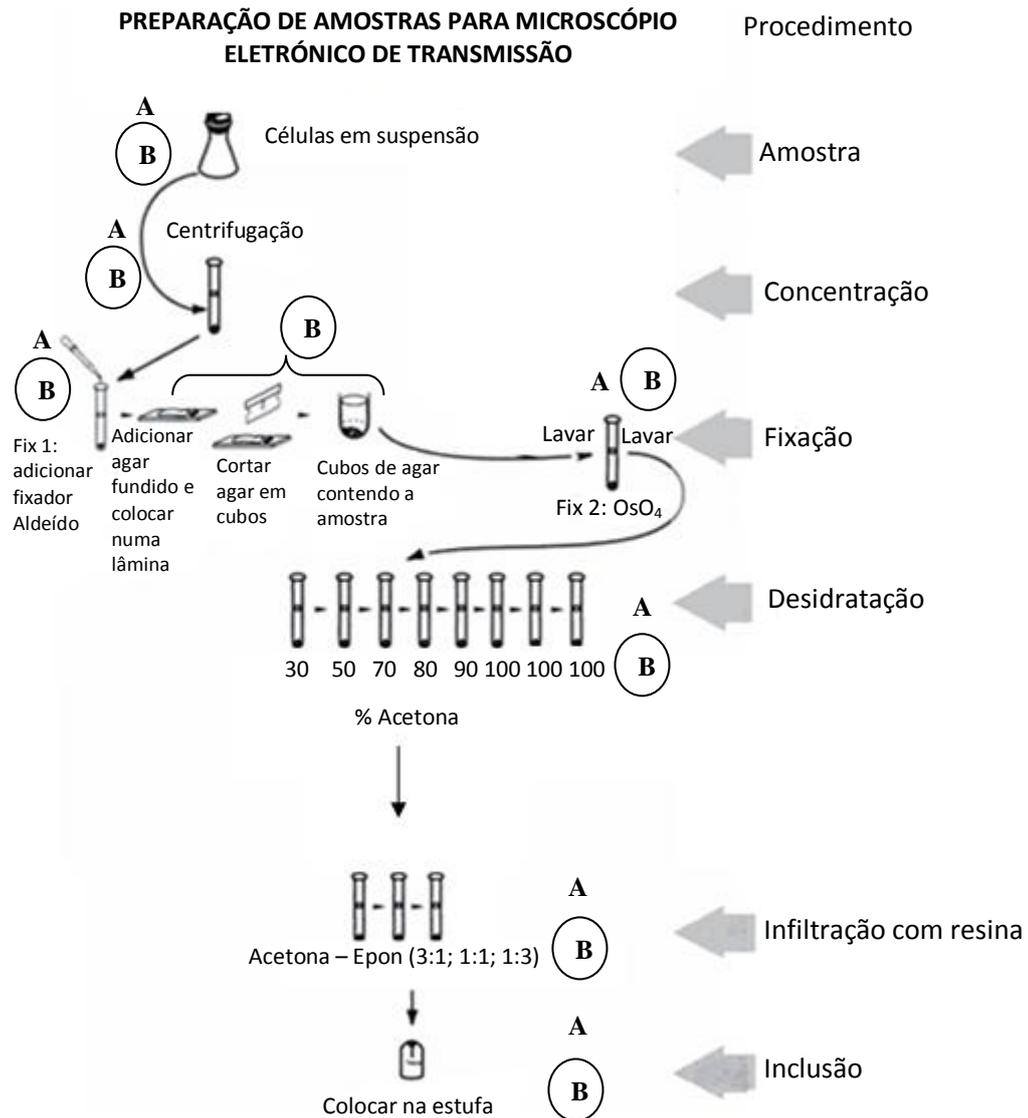


Figura 12: Esquema dos procedimentos (A e B) realizados. Adaptado de Bozzola & Russel, (1999).

6. Resultados e Discussão

6.1. Resultados

No procedimento A, as células ficaram dispersas no bloco, tornando impossível localizar e definir uma região ideal para talhar uma pirâmide e fazer cortes. Para além disso, verificou-se uma grande perda de amostra biológica durante o procedimento.

No procedimento B houve menor perda de material, tendo sido possível realizar cortes semi-finos e observar as células ao MO. A utilização de agar a 10% não mostrou ser o ideal, uma vez que não possibilitou uma boa impregnação na resina. Embora tenha permitido a análise e visualização das células, o talhe e corte dos blocos também foi mais difícil. De forma a minimizar este efeito procedeu-se à utilização de agar a 2%. Esta alteração permitiu uma obtenção de cortes com melhor impregnação e com mais qualidade.

6.2. Discussão

As células cultivadas *in vitro* para análise ao TEM podem ser produzidas quer em suspensão num meio líquido, ou sobre um substrato. Não obstante, os passos básicos para análise no TEM são os mesmos: fixação num aldeído tamponado, pós-fixação em tetróxido de ósmio, desidratação em etanol, inclusão numa resina plástica, corte, coloração e observação ao TEM (Kuo, 2007).

Existem então, vários métodos para iniciar e desenvolver o processamento de amostras de culturas celulares *in vitro* para TEM (Sebring et al, 1988; Dykstra, 1993; Bozzola & Russel, 1999; Kuo, 2007; Taupin, 2008).

Uma forma de iniciar o protocolo, é como descrito para o procedimento A, ou seja colocar as células em microtubos, e realizar uma centrifugação para formar um

pellet (Bozzola & Russel, 1999; Kuo, 2007). Esta centrifugação não deve ser excessiva, para não danificar as células, mas deve ser a necessária para formar um pellet compacto. Neste trabalho a velocidade de centrifugação utilizada foi 300 g. Em diferentes estudos, as células de mamíferos são centrifugadas a diferentes velocidades, sendo referido entre 300 a 2500 g (Sebring et al, 1988; Dykstra, 1993; Kuo, 2007).

Durante o decorrer do procedimento, em alguns microtubos foi-se perdendo material e noutros perdeu-se por completo. Em particular na fase da desidratação, não foi possível manter o pellet, as células dispersaram. Nos microtubos que não se perdeu material, quando se procedeu à colocação das células nos moldes com Epon, para formar os blocos, as células dispersaram pela resina. Esta situação não permitiu talhar os blocos e muito menos a realização de cortes semi-finos. A alternativa seria realizar uma centrifugação em cada passo, como alguns estudos referem (Dykstra, 1993).

Em suma, o procedimento A não apresentou resultados satisfatórios, que permitam a análise das células de osteossarcoma MG-63, ao microscópio.

Uma alternativa ao procedimento A seria colocar as células que se encontram em suspensão num gel (Sebring et al, 1988; Dykstra, 1993; Bozzola & Russel, 1999; Kuo, 2007; Taupin, 2008) como realizado no procedimento B. Com este método evita-se a perda de material durante os diferentes passos do protocolo, e pode-se tratar a amostra de células em suspensão com um fragmento de um tecido.

Neste trabalho o gel utilizado foi o agar, mas outros tipos de géis podem ser utilizados como a agarose, gelatina e albumina de soro bovino (BSA) (Sebring et al, 1988; Dykstra, 1993; Bozzola & Russel, 1999; Kuo, 2007; Taupin, 2008). Depois do gel polimerizar, cortaram-se pequenos fragmentos do gel com as células, que foram colocados em microtubos e desenvolveu-se o processamento normal para TEM. O gel utilizado não deve comprometer a observação ao microscópio, por isso a concentração deste não deve ser em excesso. A concentração utilizada foi 10%, mas os resultados não foram os melhores, as

células não se infiltraram bem no gel, o talhe e corte dos blocos foi mais difícil e após coloração o gel fica muito corado. A concentração do gel pode colocar dificuldades na desidratação, infiltração, incorporação e polimerização das amostras (Taupin, 2008). Vários estudos sugerem a utilização do gel, agar, a diferentes concentrações, desde a 1% (Relucenti et al, 2010), 2% (Sebring et al, 1988; Bozzola & Russel, 1999), 3% - 4% (Dykstra, 1993) e 10% (Kuo, 2007). Assim, como alternativa ao agar a 10% repetiu-se o procedimento B com agar a 2%. Com esta alteração foi possível obter uma impregnação, inclusão e cortes satisfatórios.

A colocação das células no gel é uma etapa que uns protocolos referem a seguir ou com o fixador primário (Sebring et al, 1988; Dykstra, 1993; Bozzola & Russel, 1999; Kuo, 2007; Koh et al, 2008; Taupin, 2008) ou então a seguir à pós-fixação (Relucenti & et al, 2010). Mas é referido que as células que sofrem pós-fixação com tetróxido de ósmio são muito mais propensas a danos, uma vez que são mais quebradiças do que as células fixadas num aldeído (Dykstra, 1993). Neste estudo, as células foram colocadas a seguir ao primeiro fixador.

A forma de colocar as células no gel é diferente em vários trabalhos, uns sugerem uma centrifugação do gel com as células para formar um pellet “agarizado” (Sebring et al, 1988; Dykstra, 1993; Kuo, 2007; Koh et al, 2008). Outros protocolos não utilizam a centrifugação, referem que as células são colocadas no gel, e depois deste polimerizar, cortam-se pequenos fragmentos do gel com as células, colocam-se nos microtubos e segue-se o procedimento normalmente (Bozzola & Russel, 1999; Kuo, 2007; Taupin, 2008). Neste trabalho, esta etapa foi realizada sem recurso à centrifugação.

Estudos anteriores revelam que, pela observação de cortes semi-finos ao MO, as células em suspensão colocadas no gel, infiltram-se bem no bloco formado pela resina plástica. Células bem distribuídas dentro do gel são evidenciadas na análise de cortes semi-finos de amostras com suspensões de células. A observação de cortes ultra-finos ao TEM, mostra células individuais, com ultraestruturas bem preservadas (Taupin, 2008). Foi demonstrado que, tanto a gelatina como o agar ou agarose podem ser utilizados para a incorporação de

suspensões de células para o processamento de TEM (Sebring et al, 1988;Kuo, 2007;Taupin, 2008).

Esta técnica, torna possível o estudo da ultraestrutura de partículas em suspensão, pode ser aplicada não só células mas também estruturas subcelulares, a vários tipos de organismos, como bactérias, vírus, leveduras, e a tecidos desagregados (Dykstra, 1993; Kuo, 2007;Taupin, 2008).

Em conclusão, o procedimento B fornece fragmentos de células, partículas/materiais em suspensão contendo agar, permitindo assim a sua manipulação de forma semelhante a pedaços de tecidos durante os passos seguintes do processamento.

6.3. Conclusões gerais

Neste trabalho, otimizou-se um método para o processamento de células que se encontram em suspensão para análise ao microscópio eletrónico de transmissão.

A técnica é baseada na incorporação das células num gel – agar. O que permite que possam ser manipulados de forma semelhante a pedaços de tecidos durante os passos seguintes do processamento

Este protocolo apresenta também a vantagem de poder ser utilizado para o estudo de outras partículas em suspensão, não só células, mas também por exemplo estruturas subcelulares e organismos, como leveduras, vírus e bactérias.

7. Perspetivas futuras

O protocolo definido pode ser aplicado na análise de osteoblastos *in vitro*, mas também pode ser utilizado como auxílio noutros estudos, técnicas e com outro tipos de material a ser analisado, como outro tipo de células ou outros organismos.

- Uma obtenção fácil e em quantidade suficiente de células osteoblásticas bem caracterizadas é uma ferramenta útil para estudar as interações biomaterial – célula, na engenharia do tecido ósseo (Declercq et al, 2004).

Os materiais sintéticos convencionais não têm servido como implantes satisfatórios. As respostas celulares que apresentam não são adequadas para regenerar osso suficiente para permitir que possam ser bem-sucedidos por longos períodos de tempo. Já os nano materiais, (materiais com dimensões constituintes e / ou características de superfície associadas inferior a 100 nm, em pelo menos uma direção) devido à sua capacidade para, imitar as dimensões dos componentes constituintes do osso natural (como proteínas e hidroxiapatita), podem ser uma alternativa bem sucedida no implante de material ortopédico. Estes materiais, podem ser sintetizados, em dimensões semelhantes em nanómetros com os componentes de osso natural para promover a formação de osso novo, um critério essencial para o sucesso do implante ortopédico (Balasundaram & Webster, 2006).

- Na nanotecnologia, que tem sido usada para fornecer ferramentas avançadas de pesquisa biomédica no diagnóstico de imagem, terapia e na pesquisa de drogas, o que requer a segmentação de nanopartículas para células individuais e compartimentos subcelulares. A compreensão completa da absorção intracelular, transporte e distribuição subcelular de materiais nanoestruturados permanece limitada, assim como a informação sobre o seu impacto na saúde humana (Chithrani et al, 2009; Ng et al, 2010; Moaddab et al, 2011).

Devido ao seu diâmetro (não excede os 100 nm), as nanopartículas são capazes de penetrar nas células e interferir com vários mecanismos subcelulares. Estudos revelam que algumas podem penetrar no núcleo das células e portanto, podem interferir diretamente com a estrutura e função do genoma do DNA (Trouiller et al, 2009). Na pesquisa de nanopartículas, o TEM pode ser utilizado para caracterizar a estrutura das partículas, para demonstrar a localização intracelular e para avaliar a morfologia das amostras de tecido ou células (Mühlfeld et al, 2007).

8. Bibliografia

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, k., & Walter, P. (2008). *Molecular Biology of the Cell*. 5 ed. Garland Scienc, New York.

Balasundaram, G., & Webster, T. J. (2006). A perspective on nanophase materials for orthopedic implant applications. *Journal of Materials Chemistry* 16: 3737-3745.

Bozzola, J. J., & Russel, L. (1999). *Electron Microscopy*. 2 ed. Jones and Bartlett Publishers.

Broadhead, M. L., Clark, J., Myers, D., Dass, C., & Choong, P. (2011). *The Molecular Pathogenesis of Osteosarcoma: A Review*. Sarcoma. Hindawi Publishing Corporation.

Chithrani, B. D., Stewart, J., Allen, C., & Jaffray, D. (2009). Intracellular uptake, transport, and processing of nanostructures in cancer cells. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine* 5: 118–127.

Declercq, H., Van den Vreken, N., De Maeyer, E., Verbeeck, R., Schacht, E., De Ridder, L., & Cornelissen, M. (2004). Isolation, proliferation and differentiation of osteoblastic cells to study cell/biomaterial interactions: comparison of different isolation techniques and source. *Biomaterials* 25: 757–768 .

Dykstra, M. (1993). *A Manual of Applied Techniques*. Plenum Press, NY.

Dykstra, M. J., & Reuss, L. E. (2003). *Biological Electron Microscopy: Theory, Techniques, and Troubleshooting*. 2 ed. Springer.

Dokland, T. (2006). *Techniques in Microscopy for Biomedical Applications*. Manuals in Biomedical Research Vol 2. World Scientific.

European Collection of Cell Cultures (ECACC). (2012). *Fundamental Techniques in Cell Culture Laboratory Handbook* . 2 ed. Cook Book Vol 12. Acedido a 9 de março 2012. Disponível em: <http://www.hpacultures.org.uk/promotions/labhandbook.jsp>.

Eraut, M., & Snook, R. K. (1975). *Light Microscopy*. Basic biology course. *Microscopy and its application to biology - Basic Biology Course Unit 1*. Vol 1. CUP Archive.

FEI Company. (2010). *An Introduction To Electron Microscopy*. 4 ed. Acedido a 22 de março 2012. Disponível em: <http://www.fei.com/resources/student-learning/>

Freshney, R. I. (2010). *Culture of Animal Cells - a manual of basic technique and specialized applications*. 6 ed. Wiley-Blackwell.

Helgason, C. D., & Miller, C. L. (2005). *Basic Cell Culture Protocols*. 3 ed. Vol 1. Humana Press.

Invitrogen. *Gibco® Cell Culture Basics Companion Handbook*. Invitrogen & Gibco by Life Technologies Corporation. Acedido a 9 de março 2012. Disponível em: <http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/References/gibco-cell-culture-basics.html>.

Jones, S., & Boyde, A. (1976). Morphological changes of osteoblasts in vitro. *Cell and Tissue Research* 166, 1: 101-107.

Junqueira, L. C., & Carneiro, J. (2004). *Histologia Básica*. 10 ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro.

Koh, A. L., Shachaf, C., Elchuri, S., Nolan, G., & Sinclair, R. (2008). Electron microscopy localization and characterization of unfunctionalized composite organic - inorganic SERS nanoparticles on leukemia cells. *Ultramicroscopy* 109, 111–121.

Kuo, J. (2007). *Electron Microscopy - Methods and Protocols*. 2 ed. Humana Press Totowa, New Jersey.

Moaddab, S., Ahari, H., Shahbazzadeh, D., Motallebi, A., Anvar, A., Rahman-Nya, J., & Shokrgozar, M. (2011). Toxicity Study of Nanosilver (Nanocid®) on Osteoblast Cancer Cell Line. *Int. Nano Lett.* Vol 1, 1: 11-16.

Mühlfeld, C., Rothen-Rutishauser, B., Vanhecke, D., Blank, F., Gehr, P., & Ochs, M. (2007). Visualization and quantitative analysis of nanoparticles in the respiratory tract by transmission electron microscopy. *Particle and Fibre Toxicology*.

Ng, C., Li, J., Perumalsamy, R., Watt, F., Yung, L., & Bay, B. (2010). Localizing cellular uptake of nanomaterials in vitro by transmission. *Microscopy: Science, Technology, Applications and Education*. Formatex.

Pautke, C., Schieker, M., Tischer, T., Kolk, A., Neth, P., Mutschler, W., & Milz, S. (2004). Characterization of Osteosarcoma Cell Lines MG-63, Saos-2 and U-2 OS in Comparison to Human Osteoblasts. *Anticancer Research* 24: 3743 – 3748.

Relucenti, M., Petruziello, L., Familiari, G., & Heyn, R. (2010). A simple and reliable method to prepare semen for transmission electron microscopy. *Microscopy: Science, Technology, Applications and Education - A. Méndez-Vilas and J. Díaz (Eds.)*. Formatex.

Roche Diagnostics. (2009). Culture and monitoring of animal cells Basic techniques. Roche Diagnostics GmbH.

Rubin, E., Gorstein, F., Rubin, R., Schwarting, R., & Strayer, D. (2006). Rubin Patologia: Bases Clinicopatológicas da Medicina. 4 ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro.

Ryan, J. A. (2008a). Introduction to Animal Cell culture - Technical Bulletin. Corning Incorporated Life Sciences.

Ryan, J. A. (2008b). Understanding and Managing Cell Culture Contamination - technical bulletin. Corning Incorporated Life Sciences.

Sebring, R., Johnson, N., & Spa, W. (1988). Transmission Electron Microscopy of Small Numbers of Sorted Cells. Cytometry 9: 88-92.

Stevens, A., Lowe, J., & Young, B. (2003). Wheater Histopatología Básica. Atlas y texto en color. 4 ed. Elsevier Churchill Livingstone.

Stewart, N. T., Byrne, K. M., Hosick, H. L., Vierck, J. L., & Dodson, M. V. (2000). Traditional and emerging methods for analyzing cell activity in cell culture. Methods in Cell Science 22: 67–78.

Taupin, P. (2008). Electron Microscopy of Cell Suspension. Annals of Microscopy Vol 8.

Tognon, M., Morelli, C., Ciannilli, A., Campioni, K., Di Bona, C., Boriani, S., & Barbanti-Brodano, G. (2008). A Novel Genetically Engineered Human Osteoblasts for the in Vitro Study of Biomaterials. Topics in Tissue Engineering Vol. 4. N Ashammakhi, R Reis, & F Chiellini ©.

Trouiller, B., Reliene, R., Westbrook, A., Solaimani, P., & Schiestl, R. (2009). Titanium Dioxide Nanoparticles Induce DNA Damage and Genetic Instability In vivo in Mice. Cancer Res 69, 22: 8784 – 8789.

Voutou, B., & Stefanaki, E.C. (2008). Electron Microscopy: The Basics. Physics of Advanced Materials Winter School.

Yadav, P., & Tyagi, R. (2006). Biotechnology Of Animal Tissues. Discovery Publishing House.

Young, B., & Heath, J. W. (2001). Wheater Histologia Funcional. 4 ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro.

Anexos

Anexo 1: Procedimento utilizado para TEM.

Fase	Composto	Tempo
Fixação	Gluteraldeído 2,5% preparado em tampão Pipes 1,25% pH 7,4	1 hora
	Lavagem tampão Pipes	15 minutos
	Lavagem tampão Pipes	15 minutos
	Lavagem tampão Pipes	15 minutos
Pós-fixação	Tetróxido de Ósmio 1% preparado em tampão Pipes	1 hora
	Lavagem tampão Pipes	5 minutos
	Lavagem tampão Pipes	5 minutos
	Lavagem tampão Pipes	5 minutos
Desidratação	Acetona 30%	15 minutos
	Acetona 50%	15 minutos
	Acetona 70%	15 minutos
	Acetona 80%	15 minutos
	Acetona 90%	15 minutos
	Acetona 100%	20 minutos
	Acetona 100%	20 minutos

	Acetona 100%	20 minutos
Impregnação	Acetona + Epon (3:1)	1 hora no frio
	Acetona + Epon (1:1)	1 hora no frio
	Acetona + Epon (1:3)	1 hora no frio
Inclusão	Epon (100%)	1 hora temperatura ambiente
		Estufa 40°C "over night"
		Estufa 60°C 1 a 2 dias (até polimerizar)

Anexo 2: Procedimento da coloração dos cortes semi-finos.

Composto / Fase	Tempo
Azul de Toluidina 1% + Azur 1% + Bórax 1%	2 minutos
Água	Lavagem
Secagem (ao ar ou estufa)	
Montar preparação com resina sintética	

Anexo 3: Preparações / Soluções.

- **Tampão Pipes 1,25% pH 7,4**

2,5g de solução base de tampão Pipes

Adicionar água ultra pura

Acertar pH a 7,4 com NaOH (solução de hidróxido de sódio – lentilhas dissolvidas em água)

Perfazer com água ultra pura até 200mL

Guardar a 4°C

- **Gluteraldeído 2,5%**

0,1mL de solução stock de gluteraldeído

1,9mL de tampão Pipes

- **Agar 10%**

0,5g de agar

4,5mL de tampão Pipes

- **Agar 2%**

0,1g de agar

4,9mL de tampão Pipes

- **Tetróxido de Ósmio 1%**

Ampola de 1g de tetróxido de ósmio (altamente tóxico e irritante, em especial para as membranas mucosas) colocar dentro de um frasco, partir a ampola com a ajuda de uma vareta

Adicionar 1,5mL de tampão Pipes

Guardar em frasco hermético, no escuro a 4°C

- **Epon**

- **Epon A**

- 25mL de Eppikate embebed

- 40,32mL de DDSA

- Misturar no agitador magnético ao longo de um dia

- **Epon B**

- 35mL de Eppikate embebed

- 31,15mL de NMA

- Misturar no agitador magnético ao longo de um dia

Epon

65mL de Epon A

65mL de Epon B

Adicionar 3,12mL DMP₃₀

Misturar lentamente no agitador magnético durante cerca de 1 hora

Guardar em seringas a -20°C

- **Azul de Toluidina 1% + Azur 1% + Bórax 1%**

- Dissolver 0,5g de azul de toluidina em água

- Dissolver 0,5g de bórax em água

- Dissolver 0,5g de azur em água

- Perfazer até 50mL com água

- Guardar em frasco escuro, filtrar antes de usar