

Estudos em Biologia: **avanços e perspectivas para o século 21**

Volume 1

Junielson Soares da Silva
Organizador



Estudos em Biologia: avanços e perspectivas para o século 21

Volume 1

Junielson Soares da Silva
Organizador



Junielson Soares da Silva
Organizador

Estudos em Biologia: avanços e perspectivas para o século 21

Volume 1

©2025 by Wissen Editora
Copyright © Wissen Editora
Copyright do texto © 2025 Os autores
Copyright da edição © Wissen Editora
Todos os direitos reservados

Direitos para esta edição cedidos pelos autores à Wissen Editora.



Todo o conteúdo desta obra, inclusive correção ortográfica e gramatical, é de responsabilidade do(s) autor(es). A obra de acesso aberto (Open Access) está protegida por Lei, sob Licença Creative Commons Atribuição-Não Comercial-Sem Derivações 4.0 Internacional, sendo permitido seu *download* e compartilhamento, desde que atribuído o crédito aos autores, sem alterá-la de nenhuma forma ou utilizá-la para fins comerciais.

Editores Chefe: Dr. Junielson Soares da Silva
Ma. Neyla Cristiane Rodrigues de Oliveira
Dra. Denise dos Santos Vila Verde
Dra. Adriana de Sousa Lima

Projeto Gráfico e Diagramação: Junielson Soares da Silva

Imagem da Capa: Canva

Edição de Arte: Junielson Soares da Silva

Revisão: Os autores
As Organizadoras

Informações sobre a Editora

Wissen Editora
Homepage: www.editorawissen.com.br
Teresina – Piauí, Brasil
E-mails: wisseneditora@gmail.com

Siga nossas redes sociais:



@wisseneditora

Estudos em Biologia: avanços e perspectivas para o século 21

Volume 1



<http://www.doi.org/10.52832/wed.173>

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
(Câmara Brasileira do Livro, SP, Brasil)

Estudos em Biologia [livro eletrônico]: avanços e perspectivas para o século 21: volume 1 / organização Junielson Soares da Silva. --1. ed. -- Teresina, PI: Wissen Editora, 2025

.PDF

Vários autores.

Bibliografia.

ISBN: 978-65-85923-79-8

DOI: 10.52832/wed.179

1. Biologia - Estudo e ensino I. Silva, Junielson Soares da.

25-309398.0

CDD-570.7

Índices para catálogo sistemático:

1. Biologia: Estudo e ensino 570.7

Aline Grazielle Benitez - Bibliotecária - CRB-1/3129

Informações sobre da Wissen Editora

Homepage: www.editorawissen.com.br

Teresina - Piauí, Brasil

E-mails: wisseneditora@gmail.com

Como citar ABNT: SILVA, J. S. **Estudos em Biologia: avanços e perspectivas para o século 21**. v. 1, Teresina-PI: Wissen Editora, 2025. DOI: <http://www.doi.org/10.52832/wed.179>

EQUIPE EDITORIAL

Editores-chefes

Dr. Junielson Soares da Silva
Ma. Neyla Cristiane Rodrigues de Oliveira
Dra. Denise dos Santos Vila Verde
Dra. Adriana de Sousa Lima

Equipe de arte e editoração

Neyla Cristiane Rodrigues de Oliveira

CONSELHO EDITORIAL

Ciências Agrárias e Multidisciplinar

Dr. Felipe Górski - Secretaria de Educação do Paraná (SEED/PR)
Dra. Patrícia Pato dos Santos - Universidade Anhanguera (Uniderp)
Dr. Jose Carlos Guimaraes Junior - Governo do Distrito Federal (DF)

Ciências Biológicas e da Saúde

Dra. Francijara Araújo da Silva - Centro Universitário do Norte (Uninorte)
Dra. Rita di Cássia de Oliveira Angelo - Universidade de Pernambuco (UPE)
Dra. Ana Isabelle de Gois Queiroz - Centro Universitário Ateneu (UniAteneu)

Ciências Exatas e da Terra e Engenharias

Dr. Allan Douglas Bento da Costa - Universidade Federal Rural da Amazônia (UFRA)
Dra. Vania Ribeiro Ferreira - Instituto Federal de Santa Catarina (IFSC)
Dr. Agmar José de Jesus Silva – Secretaria de Educação do Amazonas (Seduc/AM)

Linguística, Letras e Artes

Dra. Conceição Maria Alves de A. Guisardi - Universidade Federal de Uberlândia (UFU)

Ciências Humanas e Sociais Aplicadas

Dr. Isael de Jesus Sena - Culture, Education, Formation, Travail (CIRCEFT)
Dra. Mareli Eliane Graupe - Universidade do Planalto Catarinense (Uniplac)
Dr. Rodrigo Avila Colla - Rede Municipal de Ensino de Esteio, RS
Dr. Erika Giacometti Rocha Berribili - Universidade Federal de São Carlos (UFSCar)
Dr. Douglas Manoel Antonio De Abreu P. Dos Santos - Universidade de São Paulo (USP)
Dra. Aline Luiza de Carvalho - Fundação Hospitalar do Estado de Minas Gerais (FHEMIG)
Dr. José Luiz Esteves - Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUC/PR)
Dr. Claudemir Ramos - Pontifícia Universidade Católica de São Paulo (PUC/SP)
Dr. Daniela Conegatti Batista – Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)
Dr. Wilson de Lima Brito Filho - Universidade Federal da Bahia (UFBA)
Dr. Cleonice Pereira do Nascimento Bittencourt- Universidade de Brasília (UnB)
Dr. Jonata Ferreira de Moura - Universidade Federal do Maranhão (UFMA)
Dra. Renata dos Santos - Universidade Federal de Itajubá (UNIFEI)

Conselho Técnico Científico

- Me. Anderson de Souza Gallo - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ)
Ma. Antônia Alikaeene de Sá - Universidade Federal do Piauí (UFPI)
Ma. Talita Benedcta Santos Künast - Universidade Federal do Paraná (UFPR)
Ma. Irene Suelen de Araújo Gomes – Secretaria de Educação do Ceará (Seduc /CE)
Ma. Tamires Oliveira Gomes - Universidade Federal de São Paulo (Unifesp)
Ma. Aline Rocha Rodrigues - União Das Instituições De Serviços, Ensino E Pesquisa LTDA (UNISEPE)
Me. Mauricio Pavone Rodrigues - Universidade Cidade de São Paulo (Unicid)
Ma. Regina Katiuska Bezerra da Silva - Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)
Esp. Rubens Barbosa Rezende – Faculdade UniFB
Me. Luciano Cabral Rios – Secretaria de Educação do Piauí (Seduc/PI)
Me. Jhenys Maiker Santos - Universidade Federal do Piauí (UFPI0)
Me. Francisco de Paula S. de Araujo Junior - Universidade Estadual do Maranhão (UEMA)
Ma. Anna Karla Barros da Trindade - Instituto Federal do Piauí (IFPI)
Ma. Elaine Fernanda dos Santos - Universidade Federal de Sergipe (UFS)
Ma. Lilian Regina Araújo dos Santos - Universidade do Grande Rio (Unigranrio)
Ma. Luziane Said Cometti Lélis - Universidade Federal do Pará (UFPA)
Ma. Márcia Antônia Dias Catunda - Devry Brasil
Ma. Marcia Rebeca de Oliveira - Instituto Federal da Bahia (IFBA)
Ma. Mariana Moraes Azevedo - Universidade Federal de Sergipe (UFS)
Ma. Marlova Giuliani Garcia - Instituto Federal Farroupilha (IFFar)
Ma. Rosana Maria dos Santos - Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE)
Ma. Rosana Wichineski de Lara de Souza - Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG)
Ma. Simone Ferreira Angelo - Escola Família Agrícola de Belo Monte - MG
Ma. Suzel Lima da Silva - Universidade Federal de Santa Maria (UFSM)
Ma. Tatiana Seixas Machado Carpenter - Escola Parque
Me. Cássio Joaquim Gomes - Instituto Federal de Nova Andradina / Escola E. Manuel Romão
Me. Daniel Ordane da Costa Vale - Secretaria Municipal de Educação de Contagem
Me. Diego dos Santos Verri - Secretária da Educação do Rio Grande do Sul
Me. Fernando Gagno Júnior - SEMED - Guarapari/ES
Me. Grégory Alves Dionor - Universidade do Estado da Bahia (UNEB)/ Universidade Federal da Bahia (UFBA)
Me. Lucas Pereira Gandra - Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS); UNOPAR, Pólo Coxim/MS
Me. Lucas Peres Guimarães – Secretaria Municipal de Educação de Barra Mansa - RJ
Me. Luiz Otavio Rodrigues Mendes - Universidade Estadual de Maringá (UEM)
Me. Mateus de Souza Duarte - Universidade Federal de Sergipe (UFS)
Me. Milton Carvalho de Sousa Junior - Instituto Federal do Amazonas (IFAM)
Me. Sebastião Rodrigues Moura - Instituto Federal de Educação do Pará (IFPA)
Me. Wanderson Diogo A. da Silva - Universidade Regional do Cariri (URCA)
Ma. Heloisa Fernanda Francisco Batista - Universidade Federal de Uberlândia (UFU) e Universidade Federal de São Carlos (UFSCar)
Ma. Telma Regina Stroparo - Universidade Estadual do Centro Oeste (Unicentro)

Me. Sérgio Saraiva Nazareno dos Anjos - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
(Embrapa)

SOBRE O ORGANIZADOR

Junielson Soares da Silva   



Mestre e doutorando em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva (PPG-GCBEv), pelo Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA). Licenciado em Ciências Biológicas pela Universidade Federal do Piauí, onde participou do Pibid. Especialista em Saúde Pública, e em Educação Ambiental pelo Instituto Superior de Educação São Judas Tadeu-ISESJT. Vem estudando o efeito tóxico, citotóxico, genotóxico e mutagênico de substâncias derivadas de plantas em mosquitos vetores de arboviroses (*Aedes aegypti* e *Ae. albopictus*). Tem experiência em metodologia de Ensino de Ciências da Natureza (Ciências e Biologia) e Formação de Professores. É editor-chefe de revistas científicas (Journal of Education, Science and Health JESH, Journal of Research in Medicine and Health JORMED, Revista Ensinar - RENSIN e Revista Base Científica) e da Wissen Editora.

APRESENTAÇÃO

O e-book **“Estudos em Biologia: avanços e perspectivas para o século 21 – Volume 1”** reúne uma coletânea de trabalhos que refletem o dinamismo e a diversidade das pesquisas em Biologia no cenário contemporâneo. A obra surge como um espaço de divulgação científica voltado para estudantes, pesquisadores e profissionais interessados nas múltiplas áreas que compõem as Ciências Biológicas, promovendo o diálogo entre o conhecimento tradicional e as inovações que moldam o futuro da ciência.

O século XXI tem se mostrado um período de intensas transformações tecnológicas, ambientais e sociais. Nesse contexto, a Biologia assume papel central na compreensão e na busca de soluções para os desafios globais, desde a conservação da biodiversidade até o desenvolvimento de biotecnologias sustentáveis. Assim, os estudos apresentados neste volume abordam temáticas que vão desde a ecologia e a genética até o ensino de ciências e as práticas de educação ambiental, refletindo o caráter interdisciplinar e integrador da Biologia moderna.

Ao reunir contribuições de diferentes regiões e instituições, este e-book reforça a importância da pesquisa colaborativa e da disseminação do conhecimento científico de forma acessível e aberta. Espera-se que as discussões aqui apresentadas inspirem novas investigações e práticas que contribuam para o avanço da Biologia e para a formação de uma sociedade mais consciente e comprometida com a sustentabilidade do planeta.

Desejamos a todos uma excelente leitura!


Sumário

CAPÍTULO 1.....	13
MICROBIOTA FÚNGICA NO TRATO GASTROINTESTINAL DE ANIMAIS MONOGÁSTRICOS E POLIGÁSTRICO: UMA REVISÃO INTEGRATIVA	13
Mário Jeová dos Santos   	13
Maria Alice Ribeiro Alves   	13
Isabelly Guimarães Silva   	13
Julie Moraes de Lima   	13
Valéria Pereira da Silva   	13
Maria Daniela Silva Buonafina Paz   	13
Marcela Massaro Ribeiro da Silva   	13




CAPÍTULO 1

MICROBIOTA FÚNGICA NO TRATO GASTROINTESTINAL DE ANIMAIS MONOGÁSTRICOS E POLIGÁSTRICO: UMA REVISÃO INTEGRATIVA


FUNGAL MICROBIOTA IN THE GASTROINTESTINAL TRACT OF MONOGASTRIC AND POLYGASTRIC ANIMALS: AN INTEGRATIVE REVIEW

Mário Jeová dos Santos   




Mestrando em Biologia de Fungos, Universidade Federal do Pernambuco (UFPE), Recife-PE, Brasil

Maria Alice Ribeiro Alves   




Mestranda em Biologia de Fungos, Universidade Federal do Pernambuco (UFPE), Recife-PE, Brasil

Isabelly Guimarães Silva   

Doutoranda em Biologia de Fungos, Universidade Federal do Pernambuco (UFPE), Recife-PE, Brasil

Julie Moraes de Lima   

Doutoranda na Pós graduação em Medicina Tropical, Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Médicas, Recife-PE, Brasil.

Valéria Pereira da Silva   


Graduanda em Biomedicina, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife- PE, Brasil

Maria Daniela Silva Buonafina Paz   

Doutora em Biologia de Fungos, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife- PE, Brasil

Marcela Massaro Ribeiro da Silva   

Doutora em Entomologia e Acarologia, Universidade de São Paulo (USP), São Paulo- SP, Brasil

 10.52832/wed.179.1030



RESUMO

Os fungos intestinais presentes nos seres vivos monogástricos e poligástricos são de extrema relevância para manter a saúde da microbiota, mesmo em menor representatividade os fungos ainda participam de processos intestinais que melhora a digestão dos animais, como a degradação da celulose presente nos alimentos de origem vegetal. O presente trabalho tem como objetivo analisar e sintetizar o conhecimento científico disponível sobre a composição, diversidade da microbiota fúngica no trato gastrointestinal de animais monogástricos e poligástricos. Trata-se de uma revisão integrativa da literatura, abrangendo dados secundários dos últimos 20 anos. Foram utilizadas as bases de dados PubMed, SciELO e Google Acadêmico, com os seguintes descritores: “Fungos”, “Monogástricos”, “Poligástricos”, “Microbiota fúngica” e “Micobioma”. Os artigos incluídos na revisão seguiram os critérios de inclusão e exclusão baseados em protocolos de estudos de pesquisas sistematizadas. Os resultados revelaram que dos 124 artigos encontrados inicialmente, resultaram em 10 estudos que abordaram sobre o micobioma gastrointestinal de animais monogástricos e poligástricos, sendo encontrado uma ampla diversidade fúngica pluricelular, ou seja, fungos filamentosos. Além disso, os filos mais recorrentes foram Neocallimastigomycota, Ascomycota e Basidiomycota, e enquanto os gêneros mais predominantes nas pesquisas foram: *Neocallimastix*, *Aspergillus* e *Candida*. Conclui-se que o micobioma gastrointestinal desses animais podem possuir uma diversidade de fungos considerável dependendo das análises intestinais, mas é importante destacar a elaboração de estudos que subsidiem a alimentação de nutrição desses animais, para reforçar os dados dos pesquisadores sobre o micobioma.

Palavras-chave: Microbiota. Intestino. Fungos intestinais. Pluricelulares.

ABSTRACT

Intestinal fungi present in monogastric and polygastric animals are extremely relevant for maintaining the health of the microbiota. Although they are less representative in number, fungi still participate in intestinal processes that improve animal digestion, such as the degradation of cellulose found in plant-based foods. The present study aims to analyze and synthesize the available scientific knowledge on the composition and diversity of the fungal microbiota in the gastrointestinal tract of monogastric and polygastric animals. This is an integrative literature review, encompassing secondary data from the past 20 years. The databases used were PubMed, SciELO, and Google Scholar, with the following descriptors: “Fungi,” “Monogastric,” “Polygastric,” “Fungal microbiota,” and “Mycobiome.” The articles included in the review followed inclusion and exclusion criteria based on systematic research study protocols. The results revealed that, of the 124 articles initially identified, 10 studies focused on the gastrointestinal mycobiome of monogastric and polygastric animals. These studies reported a wide diversity of multicellular fungi, particularly filamentous fungi. Furthermore, the most commonly found phyla were *Neocallimastigomycota*, *Ascomycota*, and *Basidiomycota*, while the most predominant genera reported were *Neocallimastix*, *Aspergillus*, and *Candida*. It is concluded that the gastrointestinal mycobiome of these animals can present a considerable fungal diversity depending on the type of intestinal analysis. However, it is important to highlight the need for studies that support the nutritional feeding of these animals, in order to reinforce and expand the data available on the mycobiome.

Keywords: Microbiota. Intestine. Intestinal fungi. Multicellular.

1 INTRODUÇÃO

Os fungos intestinais em monogástricos e poligástricos, como suínos, humanos, bois, respectivamente, fazem parte da microbiota gastrointestinal, e são de grande relevância para a saúde e digestão desses seres vivos (Su *et al.*, 2023; Deng *et al.*, 2025). Nesse sentido, em animais monogástricos e poligástricos, o intestino representa uma região fundamental para a digestão e a absorção de nutrientes, mas cada um tem suas particularidades adaptativas de cada tipo de digestão, visto que esses seres vivos têm diferença anatômicas e fisiológicas no seu trato digestório. Nos monogástricos, o intestino delgado é o principal sítio de absorção, enquanto nos poligástricos, como os ruminantes, o intestino complementa a digestão iniciada nos pré-estômagos (Tardiolo *et al.*, 2025).

Vale ressaltar que em ambas as classificações, o intestino também representa um papel crucial para a defesa imunológica dos organismos, por meio de barreiras físicas e químicas, uma vez que essa junção do sistema imunológico inato e adaptativo fornece interações saudáveis com a microbiota intestinal (Chabit-Henrion *et al.*, 2021). Além disso, essas funções são essenciais para manter a integridade fisiológica e imunológica para proteger os seres vivos contra patógenos que possam afetar a qualidade de vida (Chabit-Henrion *et al.*, 2021).

A microbiota intestinal pode ser composta por diversas espécies de fungos que compartilham o habitat com bactérias e outros microrganismos. Porém os fungos representam uma população bem menor quando comparada a outros organismos da microbiota, como, por exemplo as bactérias, mas os fungos podem desempenhar funções importantes na digestão, e na regulação do sistema imunológico (Zhao *et al.*, 2023; Wei, 2024). A diversidade de fungos tem sido identificada como mais precisa com o avanço de técnicas moleculares, como o sequenciamento da região ITS (Internal Transcribed Spacer), que permite identificar os organismos do micobioma nos animais monogástricos e poligástricos (Bahram *et al.*, 2021; Tay *et al.*, 2022).

Os fungos no intestino são essenciais para o equilíbrio da microbiota intestinal. No entanto, alterações na microbiota dos seres vivos, podem contribuir para o desenvolvimento de doenças intestinais e oportunistas, comprometendo as barreiras epiteliais do intestino, fenômeno conhecido como disbiose (Garcia-bonete *et al.*, 2023). Pesquisadores anteriores já relataram em nível de gêneros algumas leveduras presentes no microbiota fúngica, como *Candida* spp. *Saccharomyces*, entre outras espécies fúngicas, e dependendo das condições às quais essas leveduras são expostas, podem se tornar patogênicas (Li *et al.*, 2022).

Muitos pesquisadores vêm estudando a microbiota gastrointestinal em animais, especialmente no que se refere à microbiota bacteriana destes animais (Li *et al.*, 2022; Mccallum, Tropini, 2024; Deng *et al.*, 2025). No entanto, os fungos que habitam o intestino, têm recebido atenção em alguns trabalhos, especialmente quando trata-se do seu impacto na digestão, no sistema imunológico e no desenvolvimento de doenças. Ademais, compreender as comunidades fúngicas no trato intestinal destes seres vivos, é fundamental para ampliar o conhecimento sobre o micobioma que compõe o intestino, de forma a promover estratégias de saúde, e contribuir para aprimorar as práticas nas áreas de medicina veterinária e zootecnia.

Diante da escassez de revisões integrativas sobre o tema, torna-se relevante analisar e sintetizar o conhecimento científico disponível sobre a composição, diversidade da microbiota fúngica no trato gastrointestinal de animais monogástricos e poligástricos, por meio de uma revisão da literatura com estudos dos últimos 20 anos.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Tipologia do estudo

Este estudo é uma revisão integrativa realizada de acordo com as diretrizes do Preferred Reporting Items for Systematic Review and Meta-Analyses (PRISMA) de 2020. De natureza qualitativa e exploratória, que sintetiza e revisa o conhecimento científico sobre um tema existente, gerando como resultado uma discussão sistematizada e crítica. Este estudo foi conduzido em seis etapas: I. definição da questão norteadora e dos objetivos da pesquisa; II. realização da busca bibliográfica; III. coleta dos dados; IV. análise crítica e categorização dos estudos selecionados; V. discussão dos resultados obtidos; e VI. elaboração e apresentação da revisão (Page *et al.*, 2020; Toronto e Remington, 2020).

2.2 Estratégia de busca

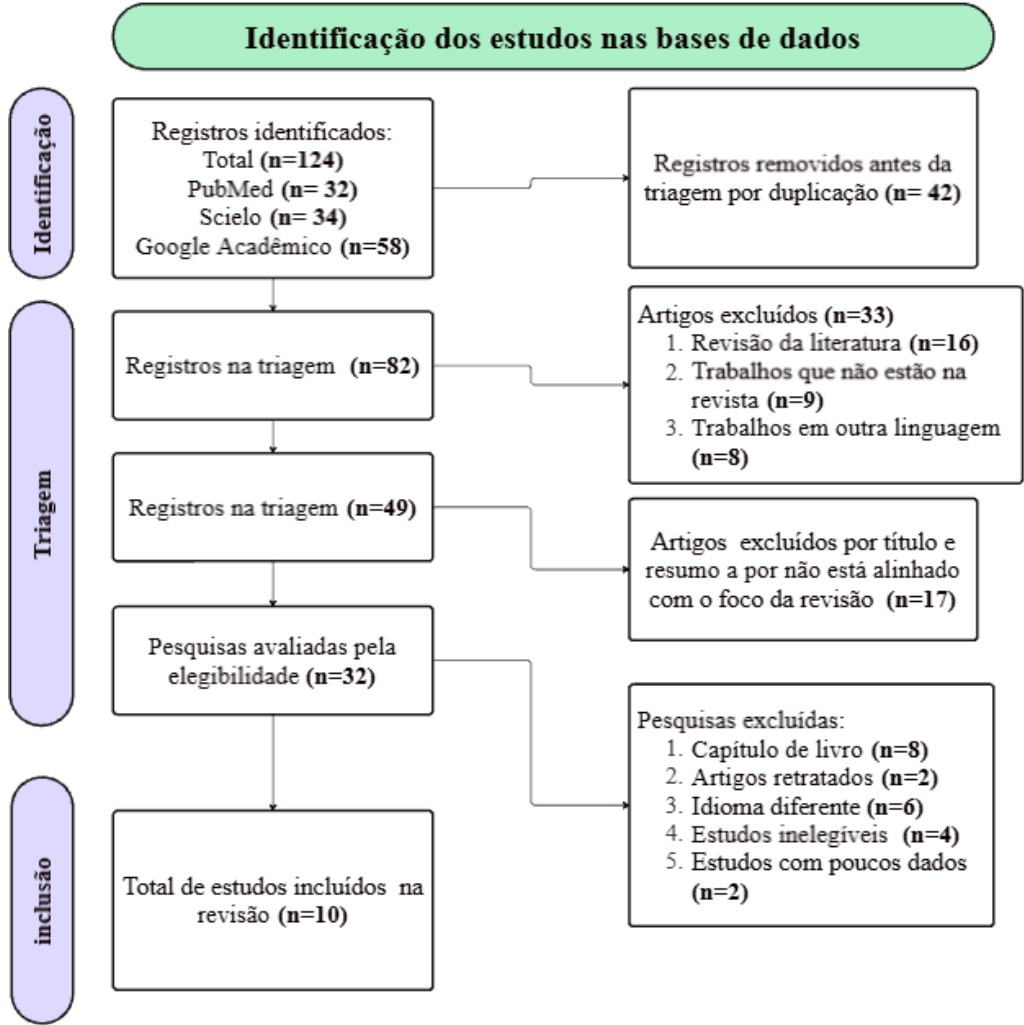
A busca de estudos foi realizada nas bases de dados Literatura Scientific Electronic Library Online (Scielo), Medical Literature Analysis and Retrieval System Online (Medline/PubMed), CAPES (Portal de Periódicos do Brasil) e Google Acadêmico. Considerando publicações de janeiro de 2004 a dezembro de 2024. Os principais descritores utilizados estão descritos na tabela 1, sendo eles pesquisados em inglês, português e espanhol. Todos os estudos identificados foram avaliados rigorosamente de acordo com os critérios de inclusão e exclusão, e estão apresentados na Figura 1.

Tabela 1. Descrição das palavras-chave utilizadas nas bases de dados para a revisão integrativa.

Bases de dados	Descritores/ Palavras-chaves
Scielo	(Fungos) AND Monogástricos AND Poligástricos
Pubmed	Flora fúngica OR Intestino OR Gastrointestinal AND Micobioma
Google acadêmico	(Fungos) AND Monogástricos AND Poligástricos; Flora fúngica OR Intestino OR Gastrointestinal AND Micobioma

Fonte: Elaborado pelos autores (2025).

Figura 1. Representação do fluxograma do Prisma dos estudos incluídos na revisão integrativa.



Fonte: Elaborado pelos autores, 2025, adaptado do Prisma (2020).

2.3 Critérios de inclusão

Foram incluídos na revisão estudos que atendiam aos seguintes critérios: pesquisas originais, com dados primários, diversidade ou função da flora fúngica no trato gastrointestinal de animais monogástricos e poligástricos. Foram considerados artigos que empregaram metodologias laboratoriais (como cultivo, isolamento e identificação fúngica por técnicas morfológicas e/ou moleculares), bem como estudos de relato de casos publicados entre o período definido no estudo. Além disso, revisões que contribuíssem de forma significativa para a compreensão e discussão do tema, foram incluídas para aprimorar e validar os dados do trabalho, bem como comparação com outros estudos.

2.4. Critérios de exclusão

Foram excluídos desta revisão artigos de revisão (exceto aqueles utilizados para embasamento teórico), capítulos de livros, estudos retratados, bem como trabalhos que abordavam exclusivamente aspectos taxonômicos ou bioquímicos dos fungos sem relação direta com sua ocorrência ou função no trato gastrointestinal de animais monogástricos e poligástricos. Também foram desconsideradas pesquisas que não apresentavam dados laboratoriais ou observacionais aplicáveis ao contexto gastrointestinal, além de monografias, dissertações, teses e outros trabalhos que não se enquadram com o estudo. Estudos com baixa qualidade metodológica, publicados em idiomas não especificados previamente ou fora do período, também foram excluídos da análise.

2.5 Análises dos estudos

A validação dos estudos selecionados foi realizada por meio da leitura integral dos textos, com base na aplicação rigorosa dos critérios de inclusão e exclusão previamente definidos. A qualidade metodológica dos artigos foi assegurada por um processo de triagem criterioso, alinhado à problemática central da revisão e à análise das abordagens metodológicas adotadas pelos autores dos estudos elegíveis. Em seguida, os títulos e resumos foram avaliados por outros pesquisadores, com base nos critérios de elegibilidade estabelecidos, a fim de garantir a seleção dos estudos mais relevantes para a temática investigada. Após o processo de validação por pares, os dados foram transferidos para o software Miro, utilizado na organização visual e elaboração da figura ilustrativa. Para facilitar a interpretação dos achados, os dados foram sistematizados no Quadro 1, que apresenta informações como espécie fúngica identificada, animal hospedeiro, segmento do trato gastrointestinal analisado, técnica de identificação empregada. Além disso, os dados foram

sintetizados contendo: autores, país de publicação, ano, metodologia utilizada e tipo de delineamento experimental.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A busca inicial resultou em 124 artigos, dos quais, após a triagem 10 artigos foram incluídos, entre os estudos selecionados, todos os trabalhos abordaram a caracterização do microbioma gastrointestinal de animais monogástricos e poligástricos, destacando os fungos unicelulares (leveduras) e pluricelulares (filamentosos). Os estudos incluídos na revisão foram feitos em diferentes países, destaque para a China, responsável por 50% dos estudos, ambas as pesquisas se caracterizam como estudos observacionais e experimentais.

Os trabalhos feitos no Brasil, envolveram principalmente animais poligástricos (bovinos e caprinos), destacando os filos Neocallimastigomycota, Ascomycota, Mucoromycota e Basidiomycota. Os gêneros mais frequentes incluíram *Neocallimastix* spp., *Orpinomyces* spp., *Anaeromyces* spp. e *Aspergillus* spp. com identificação de espécies como *N. variabilis*, *A. elegans* e *A. terreus*.

Na China os trabalhos focaram em diversos animais, incluindo poligástricos (bisões, Vacas e gamos) e monogástricos (suínos, equinos, pandas, ratos), onde vários filos de fungos foram encontrados, em especial Ascomycota, Basidiomycota, Neocallimastigomycota. Entre as espécies destacam-se: *Candida telluris* e *Neocallimastix variabilis*. Nos Estados Unidos, a diversidade fúngica em ruminantes selvagens e domésticos abrangeu principalmente o filo Neocallimastigomycota. Por fim, na Áustria, estudos com cães e gatos revelaram fungos dos filos Ascomycota e Basidiomycota, com ocorrência de *Saccharomyces* sp., *Aspergillus* sp., *Candida* sp.

Tabela 2. Microbiota fúngica intestinal em animais monogástricos e poligástricos, e a classificação dos fungos conforme seu filo, gênero e espécie.

Referências	País	Tipo de estudo	Animais		Filos	Gêneros	Espécies	
			Monogástricos	Poligástricos			Leveduras	Filamentosos
Abrão, Barreto, Duarte, (2010)	Brasil	Observacional experimental	-	Bovinos	Neocallimastigomycota	<i>Neocallimastix</i> spp.	-	<i>N. variabilis</i>
				Caprinos		<i>Orpinomyces</i> spp. <i>Anaeromyces</i> spp.	-	<i>A. elegans</i> -
Abrão <i>et al.</i> , (2014)	Brasil	Observacional experimental	-	Bovinos	Ascomycota	<i>Aspergillus</i> spp.	<i>C. Laurentii</i>	<i>A. terreus</i>
					Mucoromycota	<i>Lichtheimia</i> spp.		<i>L. ramosa</i>
Gupta <i>et al.</i> , (2022)	Alemanha	Observacional experimental	Ratos	-	Ascomycota	<i>Trichoderma</i> spp.	<i>C. albicans</i> - - <i>M. restricta</i>	<i>T. longibrachiatum</i>
					Basidiomycota	<i>Cryptococcus</i> sp.		-
					Ascomycota	<i>Candida</i> spp. <i>Penicillium</i> spp. <i>Aspergillus</i> spp.		<i>P. spathulatum</i> <i>A. nidulans</i>
					Basidiomycota	<i>Malassezia</i> sp.		-
Wang <i>et al.</i> , (2023)	China	Observacional experimental	Suínos	-	Ascomycota	<i>Candida</i> sp	<i>C. telluris</i>	-
					Mucoromycota	<i>Mucor</i> sp		<i>N. variabilis</i>
					Neocallimastigomycota	<i>Anaeromyces</i> spp		-

Hanafy <i>et al.</i> , (2019)	EUA	Observacional experimental		Veados Bovinos Ovelha Cabra	Neocallimastigomycota	<i>Agriosomyces</i> sp. <i>Akaiosbomyces</i> sp. <i>Capellomyces</i> sp. <i>Ghaazallomyces</i> sp.	- - - -	<i>A. longus</i> <i>A. papillarum</i> <i>C. foraminis</i> <i>G. constrictus</i>
Lan <i>et al.</i> , (2022)	China	Observacional experimental	Equinos	-	Ascomycota Basidiomycota Neocallimastigomycota	<i>Aspergillus</i> sp. <i>Coprinellus</i> sp. <i>Piromyces</i> sp.	- - -	- - -
Yang <i>et al.</i> , (2018)	China	Observacional experimental	Pandas	-	Ascomycota Basidiomycota Glomeromycota	<i>Fusarium</i> sp. <i>Brettanomyces</i> sp. <i>Oidiodendro</i> sp.	- - -	<i>F. oxysporum</i> <i>F. proliferatum</i> <i>B. custersianus</i>
Ma <i>et al.</i> , (2023)	China	Observacional experimental	Ratos	-	Ascomycota Basidiomycota	<i>Microascus</i> <i>Sporobolomyces</i> sp.		<i>M. trigonosporus</i> <i>S. lactosus</i>
Su <i>et al.</i> , (2024)	China	Observacional experimental	-	Bisão Vaca Gamo	Ascomycota Basidiomycota	- -	- -	- -
Handl <i>et al.</i> , (2011)	Áustria	Observacional experimental	Cachorro Gato	-	Ascomycota Basidiomycota	<i>Saccharomyces</i> sp. <i>Aspergillus</i> sp. <i>Candida</i> sp.	<i>Candida castellii</i>	-

Fonte: Elaborado pelo autor (2025).

A presente revisão revelou que a diversidade do microbioma gastrointestinal em animais monogástricos e poligástricos possui resultados bastantes pertinentes para a literatura científica, porém notou-se que ainda é um campo de pesquisa com poucos trabalhos, sendo também uma temática subexplorada, especialmente no que se refere aos fungos intestinais.

Nesse sentido, os principais trabalhos incluídos nesta revisão discutiram resultados bastante promissores, como na pesquisa de Abrão *et al.* (2014), realizada no Brasil, investigaram a diversidade e a composição da microbiota ruminal em bovinos de corte da raça Nelore, com idades distintas (bezerros, novilhos e vacas), além disso, o estudo destaca a predominância de fungos aeróbios, especialmente do gênero *Aspergillus*, e revela variações significativas na composição fúngica entre distintas em cada fase de crescimento dos bovinos. No que concerne, a microbiota da microbiota, os pesquisadores destacaram que os filos mais predominantes foram Ascomycota, Mucoromycota e Basidiomycota, e com a identificação de espécies que possuem potencial celulolítico ou ligninolítico.

O estudo de Abrão *et al.* (2010) investigou a presença de fungos anaeróbios do rúmen de bovinos e caprinos de corte criados em pastagens tropicais no norte de Minas Gerais, Brasil. A pesquisa revelou alta prevalência desses microrganismos, com estruturas fúngicas detectadas em 77,8% dos caprinos e 73,9% dos bovinos. A frequência de fungos monocêntricos foi significativamente maior nos bovinos (56,5%) em comparação aos caprinos (26,1%), sugerindo diferenças na composição da microbiota ruminal entre as espécies. Esses achados destacam a importância dos fungos anaeróbios na digestão de fibras vegetais em ruminantes criados em sistemas tropicais extensivos, além disso, discutem também sobre a dieta e como a genética influencia na composição da microbiota intestinal, resultado descrito na pesquisa de Gupta e colaboradores (2023).

A análise dos resultados na revisão revelou diferenças distintas na composição fúngica de cada animal, por exemplo no Trabalho de Wang *et al.*, (2023) analisando a microbiota fúngica de porcos Taoyuan e Duroc, indicando que a genética influencia significativamente a diversidade fúngica intestinal dos suínos. Ademais, observaram que os fungos intestinais são passados de geração a geração, e discutiram também a patogenicidade destes fungos.

Por outro lado, Hanafy *et al.* (2020) demonstram que o filo Neocallimastigomycota é mais diversos na microbiota intestinal de animais monogástricos e poligástricos, foi feita análise de cinco animais selvagens (veado-axis, veado-de-cauda-branca, cabra-boer selvagem, muflão e tahr-de-nilgiri), um animal de zoológico, a zebra, três domesticados (cavalo, ovelha e cabra). Vale destacar que os autores avaliaram animais de diferentes regiões: Texas e Oklahoma (EUA), País de Gales

(Reino Unido) e Kerala e Haryana (Índia), reforçando a abrangência geográfica e ecológica do levantamento. Nesse contexto, a análise dos pesquisadores reforça a importância de explorar uma variedade de animais, para que se possa obter uma comparação precisa e para compreender melhor os fungos do trato digestivo de ambos animais.

Lan et al. (2022), analisando cavalos com diarreia e normais, observaram em equinos com diarreia apresentaram disbiose fúngica intestinal significativa associada com alguns alimentos fibrosos ingeridos por esses animais, além disso, houve alterações na microbiota e os principais filos envolvidos na disbiose filos (Neocallimastigomycota, Ascomycota e Basidiomycota), além disso, houve uma perda acentuada de 74 gêneros fúngicos da microbiota dos cavalos com diarreia. Nesse sentido, mudanças na microbiota, quebra a carga fúngica intestinal, que acaba comprometendo algumas funções digestivas e imunológicas dos animais acometidos com a disbiose (Lan *et al.*, 2022).

Em síntese, os resultados da revisão e integrando com a discussão apontam para uma considerável diversidade do micobioma gastrointestinal entre diferentes espécies animais e regiões geográficas. A presença recorrente de certos filos, como Ascomycota e Neocallimastigomycota, sugere que esses grupos fúngicos exercem papel-chave na digestão e no equilíbrio da microbiota intestinal. No entanto, ainda são necessários mais estudos, com maior abrangência geográfica, para compreender plenamente a composição e o papel funcional do micobioma fúngico nos diversos tipos de trato gastrointestinal animal.

4 CONCLUSÃO

A microbiota descrita nos estudos incluídos na revisão, trouxeram uma diversidade fúngica bastante diversas, os principais filos em destaque encontrados nos artigos foram Ascomycota, Basidiomycota, Neocallimastigomycota. O micobioma encontrado nos animais monogástricos e poligástricos, a maior parte dos fungos tiveram como características ser filamentosos, isto é, pluricelulares. Esses achados reforçam a importância da micobiota como componente funcional do microbioma animal e destacam a necessidade de mais estudos que explorem sua interação com a saúde desses animais, bem como estudos que abordam também a nutrição destes seres vivos.

Agradecimentos e Financiamento

A Faculdade Metropolitana de São Paulo (FAMESP), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de

Pernambuco (FACEPE), e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo financiamento da pesquisa.

REFERÊNCIAS

- ABRÃO, F. O. *et al.* Fungos anaeróbios do rúmen de bovinos e caprinos de corte criados em pastagens tropicais. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 62, p. 757-760, 2010.
- ABRÃO, Flávia Oliveira *et al.* Characterization of fungi from ruminal fluid of beef cattle with different ages and raised in tropical lignified pastures. **Current microbiology**, v. 69, p. 649-659, 2014.
- BAHRAM, Mohammad *et al.* Metagenomic assessment of the global diversity and distribution of bacteria and fungi. *Environmental Microbiology*, v. 23, n. 1, p. 316-326, 2021.
- CHARBIT-HENRION, Fabienne *et al.* Intestinal immunoregulation: lessons from human mendelian diseases. **Mucosal Immunology**, v. 14, n. 5, p. 1017-1037, 2021.
- DENG, Xiaofeng *et al.* Composition, Influencing Factors, and Effects on Host Nutrient Metabolism of Fungi in Gastrointestinal Tract of Monogastric Animals. **Animals**, v. 15, n. 5, p. 710, 2025.
- GARCIA-BONETE, Maria José *et al.* A subestimada microbiota intestinal: helmintos, bacteriófagos, fungos e arqueas. **Life**, v. 13, n. 8, p. 1765, 2023.
- GUPTA, Yask *et al.* Impact of diet and host genetics on the murine intestinal mycobiome. **Nature Communications**, v. 14, n. 1, p. 834, 2023.
- HANAFY, Radwa A. *et al.* Seven new Neocallimastigomycota genera from wild, zoo-housed, and domesticated herbivores greatly expand the taxonomic diversity of the phylum. **Mycologia**, v. 112, n. 6, p. 1212-1239, 2020.
- HANDL, Stefanie *et al.* Massive parallel 16S rRNA gene pyrosequencing reveals highly diverse fecal bacterial and fungal communities in healthy dogs and cats. **FEMS microbiology ecology**, v. 76, n. 2, p. 301-310, 2011.
- LAN, Yanfang *et al.* Dynamic changes of gut fungal community in horse at different health states. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 9, p. 1047412, 2022.
- LI, Xin V. *et al.* Immune regulation by fungal strain diversity in inflammatory bowel disease. **Nature**, v. 603, n. 7902, p. 672-678, 2022.
- MA, Jie *et al.* Clec7a drives gut fungus-mediated host lipid deposition. **Microbiome**, v. 11, n. 1, p. 264, 2023.

MCCALLUM, Giselle; TROPINI, Carolina. The gut microbiota and its biogeography. **Nature Reviews Microbiology**, v. 22, n. 2, p. 105-118, 2024.

Page, M. J., Moher, D., Bossuyt, P. M., Boutron, I., Hoffmann, T. C., Mulrow, C. D., Shamseer, L., Tetzlaff, J.M., Akl, E.A., Brennan, S.E., Chou, R., Glanville, J., Grimshaw, J.M., Hróbjartsson, A., Lalu, M.M., Li, T., et al. (2021). PRISMA 2020 explanation and elaboration: updated guidance and exemplars for reporting systematic reviews. *bmj* 372.

SU, Lei *et al.* Metagenomic analysis reveals the composition and function of intestinal microbiota were affected by different sampling methods and digestive tract segments in monogastric and polygastric animals. 2023.

SUN, Xingzhao *et al.* Microbial community composition in the dung of five sympatric European herbivore species. **Ecology and Evolution**, v. 14, n. 3, p. e11071, 2024.

TARDIOLO, Giuseppe *et al.* Microbiota intestinal de ruminantes e animais monogástricos: Uma visão geral. **Animais**, v. 15, n. 5, p. 758, 2025.

TAY, Darren Dean *et al.* ITS1 amplicon sequencing of feline gut mycobiome of Malaysian local breeds using Nanopore Flongle. **Archives of Microbiology**, v. 204, n. 6, p. 314, 2022.

TORONTO, Coleen E. *et al.* (Ed.). A step-by-step guide to conducting an integrative review. 2020.

WANG, Tao *et al.* Combined effects of host genetics and diet on porcine intestinal fungi and their pathogenic genes. **Frontiers in Microbiology**, v. 14, p. 1192288, 2023.

WEI, Guanyue. Insights into gut fungi in pigs: A comprehensive review. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 109, n. 1, p. 96-112, 2025.

YANG, Shengzhi *et al.* Metagenomic analysis of bacteria, fungi, bacteriophages, and helminths in the gut of giant pandas. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 1717, 2018.

ZHAO, Yiping *et al.* Diversity and functional prediction of fungal communities in different segments of mongolian horse gastrointestinal tracts. **BMC microbiology**, v. 23, n. 1, p. 253, 2023.




CAPÍTULO 2

PALETA MOLECULAR: ANÁLISE COMPARATIVA DE CINCO CORANTES CITOLÓGICOS EM CÉLULAS DE MELANOMA MURINO B16F10


MOLECULAR PALETTE: COMPARATIVE ANALYSIS OF FIVE CYTOLOGICAL
STAINS IN MURINE MELANOMA B16F10 CELLS

Pedro Henrique Doleski   

Doutor em Bioquímica Toxicológica, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria-RS,
Brasil

Rafaella Pereira da Silveira   

Estudante de Graduação em Bacharelado em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa
Maria (UFSM), Santa Maria-RS, Brasil

 DOI: 10.52832/wed.179.1039



RESUMO

Este capítulo apresenta uma análise comparativa de cinco corantes citológicos com diferentes especificidades moleculares os quais podem ser aplicados ao estudo de células tumorais de melanoma murino B16F10 e esfregaços tumorais de melanoma. Os corantes selecionados representam diferentes classes químicas e mecanismos de ação: *Coomassie Blue* R-250, um corante proteico clássico que permite quantificação celular e identificação de estruturas ricas em proteínas; *Oil Red O*, específico para lipídeos neutros, útil na detecção de acúmulo lipídico intracelular; *Ponceau S*, corante proteico reversível que preserva a integridade das amostras para análises posteriores; Azul de Bromofenol, indicador de pH com afinidade proteica, capaz de revelar variações no microambiente celular; e Curcumina, corante natural de alta afinidade lipídica. Através de protocolos padronizados, demonstramos como cada corante revela aspectos únicos da biologia tumoral, desde estimativas quantitativas do número de células até a identificação de processos complexos como divisão celular, diferenciação morfológica e distinção entre tipos celulares no microambiente tumoral. A análise comparativa considera não apenas a especificidade molecular de cada corante, mas também fatores práticos como toxicidade, compatibilidade com outras técnicas analíticas e custo-benefício. Através de imagens das colorações evidenciamos que a escolha adequada do corante resulta em análises que auxiliam na defesa dos objetivos clínico-laboratoriais, maximizando as informações extraídas das amostras biológicas em avaliação.

Palavras-chave: Corantes. B16F10. Tumor. Melanoma. Flavonoide.

ABSTRACT

This chapter presents a comparative analysis of five cytological stains with different molecular specificities that can be applied to the study of B16F10 murine melanoma tumor cells and melanoma tumor smears. The selected dyes represent different chemical classes and mechanisms of action: Coomassie Blue R-250, a classic protein stain that allows cell quantification and identification of protein-rich structures; Oil Red O, specific for neutral lipids, useful in detecting intracellular lipid accumulation; Ponceau S, a reversible protein stain that preserves sample integrity for subsequent analysis; Bromophenol Blue, a pH indicator with protein affinity, capable of revealing variations in the cellular microenvironment; and Curcumin, a natural dye with high lipid affinity. Using standardized protocols, we demonstrate how each dye reveals unique aspects of tumor biology, from quantitative estimates of cell number to the identification of complex processes such as cell division, morphological differentiation, and distinction between cell types in the tumor microenvironment. Comparative analysis considers not only the molecular specificity of each dye, but also practical factors such as toxicity, compatibility with other analytical techniques, and cost-effectiveness. Through images of the stains, we demonstrate that the appropriate dye selection results in analyses that help achieve clinical and laboratory objectives, maximizing the information extracted from the biological samples under evaluation.

Keywords: Dyes. B16F10. Tumor. Melanoma. Flavonoid.

1 INTRODUÇÃO

A coloração citológica representa uma ferramenta fundamental na caracterização morfológica e bioquímica de células e tecidos, sendo indispensável tanto na pesquisa básica quanto

no diagnóstico clínico. Os corantes citológicos atuam através de interações específicas com diferentes componentes celulares como as proteínas, lipídeos, ácidos nucleicos ou carboidratos. A interação dos corantes com estas biomoléculas permite a visualização e diferenciação de estruturas celulares na microscopia óptica. A escolha adequada do corante depende não apenas do alvo molecular de interesse, mas também de fatores práticos como toxicidade, reversibilidade, compatibilidade com outros métodos analíticos e o custo-benefício. Neste contexto, a diversidade de corantes disponíveis reflete a complexidade das demandas analíticas modernas, desde a simples quantificação celular até a caracterização detalhada de alterações morfológicas e bioquímicas associadas a processos patológicos.

Este capítulo apresenta uma análise comparativa de cinco corantes com diferentes especificidades moleculares e aplicações práticas no estudo de células tumorais de melanoma murino B16F10 e esfregaços tumorais de melanoma induzido experimentalmente em murinos. Os corantes selecionados: *Coomassie Blue R-250*, *Oil Red O*, *Ponceau S*, Azul de Bromofenol e Curcumina representam diferentes classes químicas e mecanismos de ação, oferecendo cada um colorações e resultados únicos, os quais detalhamos. Através de protocolos padronizados e análise crítica dos resultados obtidos, demonstraremos como cada corante pode revelar aspectos únicos da biologia celular tumoral, desde a simples estimativa do número de células até a identificação de processos como divisão celular, acúmulo lipídico e diferenciação entre tipos celulares distintos presentes no microambiente tumoral.

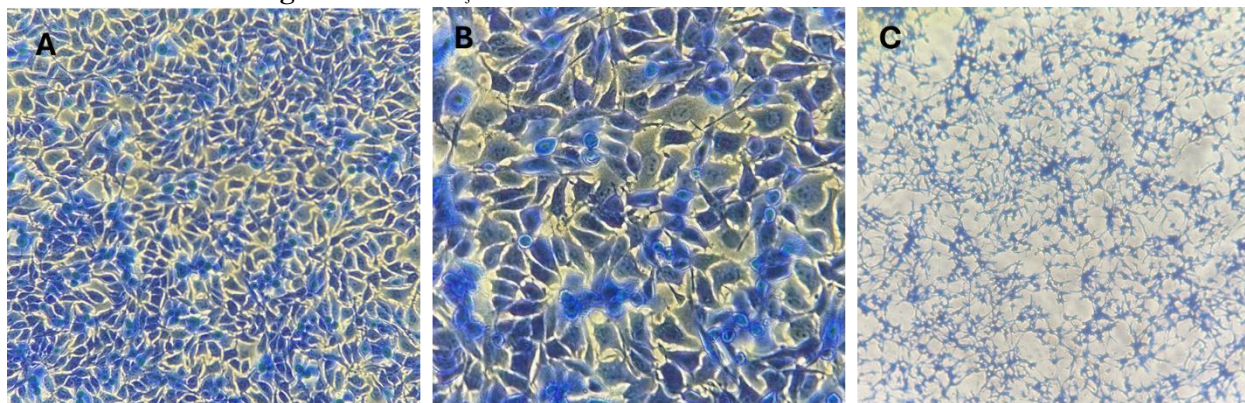
2 COOMASSIE B BLUE

O corante Azul de *Coomassie*, ou *Coomassie Brilliant Blue R-250*, tem nomenclatura química (IUPAC): ácido [4-[α -[4-(dietilamino)fenil]-2,4-dissulfobenzilideno]-2,5-ciclo-hexadien-1-ilideno]dietilamônio ($C_{45}H_{44}N_3NaO_7S_2$). Apresenta grupos sulfônicos, grupos amino terciários, dois grupos dietilaminos associados a um sistema aromático robusto. É um corante aniônico de proteínas, onde os grupos sulfônicos negativos reagem com aminoácidos básicos protonados (ex: lisina e arginina), o sistema aromático reage com aminoácidos aromáticos (ex: fenilalanina e tirosina), e reação dos grupos dietilaminos com a parte carboxi de aminoácidos gerais. O Azul de *Coomassie* é um ótimo corante de proteínas e utilizado em diversas técnicas laboratoriais. Por ser um corante aniônico, atua sobre proteínas quando em pH ácido, onde atua mais fortemente em proteínas com alta carga de aminoácidos aromáticos. Porém tende a ser menos sensível para proteínas nativas, ou proteínas fosforiladas e glicosiladas (evitam a ligação do corante com os

aminoácidos). Em geral é utilizado na quantificação de proteínas em amostras biológicas, mas pode ser usado para análises qualitativas como citologia e análises de biologia molecular. É um corante irreversível e apresenta toxicidade moderada, podendo causar irritação quando em contato com a pele, não sendo classificado como um forte agente carcinogênico (Ferreira *et al.*, 2016).

Para o uso deste corante em células aderidas ou esfregaços tumorais o *Coomassie B Blue* R-250 (Peso molecular: 825,97 g/mol) deve ser dissolvido em solução 45% de metanol e 10% de ácido acético na concentração final de 0,1% de corante. As células devem de ser fixadas com PFA 5% antes da coloração, uma vez que a concentração de metanol (fixador) é moderada e pode ocorrer perda de amostra. A solução corante é adicionada sobre as células por 10 minutos a temperatura ambiente. Após o tempo de coloração é realizada a remoção do excesso de corante por lavagem com PBS (pH 7,2) por duas vezes. Algumas lâminas podem apresentar excessiva coloração azul, neste caso pode ser feita a lavagem mais duas vezes com PBS para a remoção do excesso de corante. Lembrando que a reação do *Coomassie B Blue* com proteínas da amostra é irreversível, logo lavagens adicionais com PBS não causa remoção da coloração, mas sim remoção do excesso de corante na lâmina.

A coloração de células B16F10 ou de esfregaços tumorais com *Coomassie B Blue* R-250 gera células coradas intensamente de azul. A coloração é tão intensa que por vezes é difícil distinguir a morfologia celular e dos núcleos. A maior aplicabilidade desta coloração é a de estimar o número de células presentes na amostra, mas não a diferenciação morfológica das células coradas. Por exemplo, em células em cultivo celular que recebem tratamento com agente citotóxico é possível observar a redução do número de células. Na Figura 1-A e B demostramos células B16F10 aderidas em placa de 48 poços após coloração, já na Figura 1-C é possível ver a redução no número de células como também da intensidade da coloração azul em células B16F10 sob efeito citotóxico de peróxido de hidrogênio.

Figura 1 – Colorações de células B16F10 com *Coomassie B. Blue*

Fonte: autores (Doleski; Silveira, 2025).

3 OIL RED O

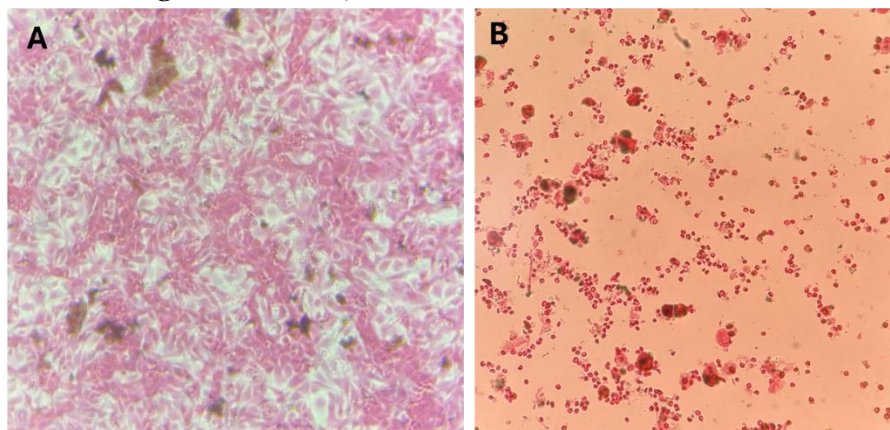
O *Oil red-O*, ou *Sudan Red 5B*, tem nomenclatura química (IUPAC): 1-[(2,5-dimetil-4-[(2,5-dimetilfenil)diazenil]fenil)diazenil]naftalen-2-ol. A molécula apresenta dois grupos azo (nitrogênicos em dupla ligação), três anéis aromáticos associados ao grupo naftol com quatro grupos metil substituintes. Tem forte caráter lipofílico, sendo um excelente corante de diversos lipídeos devido suas propriedades químicas. Os grupos azo em geometria trans reagem com lipídeos insaturados, o grupo naftol reage com o grupo carbonila dos fosfolipídeos e com grupo éster de triglicerídeos, os anéis aromáticos reagem com esteróis (como o colesterol) e com a membrana plasmática celular, enquanto os grupos metis levam a uma estabilidade da reação com os lipídeos. Logo, o corante *Oil Red O* é muito utilizado para a observação de lipídeos em técnicas histológicas. Além disso, é capaz de revelar lipídeos armazenadas por adipócitos, gotículas lipídicas presente em células estimuladas, como hepatócitos e macrófagos esponjosos. Entretanto, interage de forma leve com a membrana plasmática das células em avaliação (Bumrah *et al.*, 2019; Mehlem *et al.*, 2013; Ramírez-Zacarias *et al.*, 1992).

Devido sua alta lipofilicidade o *Oil Red O* é dissolvido em Isopropanol, na concentração final de 0,5% de corante. O corante apresenta coloração vermelha intensa, corando as células em análise em tons de rosa a vermelho. A coloração com *Oil Red O* é bem adaptada para células fixadas em PFA 5% por 10 minutos, sejam células aderidas em placa de cultivo ou em esfregaço tumoral. A coloração das células se dá pela adição do corante por 10 minutos a temperatura ambiente. O corante irá reagir com os lipídeos das células de forma irreversível, assim após o tempo de coloração é possível limpar o excesso de corante com PBS (pH 7,2) de forma abundante.

O resultado da coloração com *Red Oil O* são células de coloração vermelha intensa obviamente devido a reação com os lipídeos celulares, por vezes sendo possível ver agregados

lipídicos (gotículas ou grânulos celulares) avermelhados nas células em análise. Interessantemente, o corante pode ser removido das células coradas com Isopropanol e posteriormente feita a quantificação do corante por espectrofotometria (em 518 nm), elevando o impacto dos resultados. Na Figura 2-A é possível observar células B16F10 aderidas e coradas com *Red Oil O*, já na Figura 2-B observamos as células tumorais coradas em vermelho.

Figura 2 – Colorações de células B16F10 com *Red Oil O*



Fonte: autores (Doleski; Silveira, 2025).

4 *PONCEAU S*

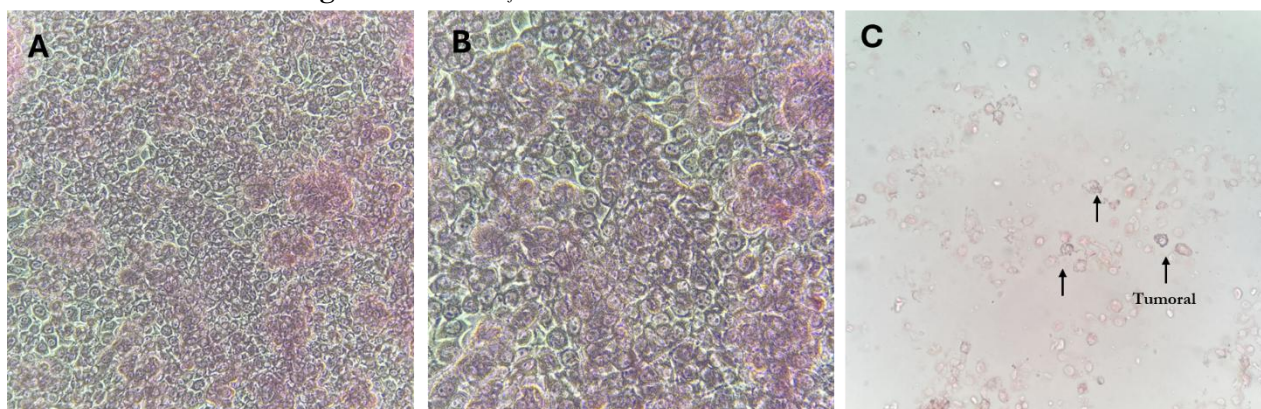
O *Ponceau S*, ou vermelho ácido 112, tem nomenclatura química (IUPAC): ácido 3-hidroxi-4-[2-sulfo-4-(4-sulfonatofenilazo)fenilazo]-2,7-naftalenodissulfônico ($C_{22}H_{12}N_4Na_4O_{13}S_4$). Apresenta dois grupos azo (nitrogênios em dupla ligação) e quatro grupos sulfônicos associados a uma molécula naftalénica central, sendo assim um corante da classe dos Azodiazólicos. É um corante aniônico que interage fortemente com proteínas, mais especificamente: 1) a estrutura naftalénica (aromática) reage com aminoácidos aromáticos (ex: fenilalanina e triptofano); 2) os grupos azo reagem com as hidroxilas de aminoácidos como a serina e a treonina; 3) os grupos sulfônicos (aniônicos) reagem com aminoácidos básicos (ex: lisina e a histidina). Reage fracamente com outras biomoléculas, e atua sem especificidade em proteínas gerais. Por ser um corante aniônico reage com proteínas apenas em pH ácido (aproximadamente pH: 3.0). A coloração é fraca e facilmente reversível. Como corante tem atuação limitada, podendo ser utilizado no corante Tricromo de Masson modificado, onde pode atuar em conjunto ou até substituir a fucsina ácida geralmente presente neste corante histológico. Apresenta baixo grau de toxicidade devido a seu efeito reversível sobre as proteínas. Quando comparado a outros corantes que reagem com

proteínas apresenta baixa sensibilidade, ou seja, necessita uma solução concentrada para que reaja com as proteínas da amostra (Goldman *et al.*, 2016; Ghalkhani *et al.*, 2022; Salinovich *et al.*, 1986).

Por ser um corante aniônico, o *Ponceau S* (Peso Molecular: 760,57 g/mol) necessita ser dissolvido em solução ácida, realizando uma solução com 1% do corante com 5 mL de ácido acético absoluto em 45 mL de água destilada. A solução corante apresentará coloração vermelha, como também irá corar em vermelho as amostras celulares. É essencial a fixação das células previamente com PFA 5% por 10 minutos. Após fixação, é adicionado o corante sobre as células aderidas em placa de cultivo ou em esfregaço tumoral em lâmina por 10 minutos. Após o tempo estipulado o excesso de corante é removido e após feito a limpeza das colorações com água destilada ou com PBS (pH 7,2), dando preferência a água destilada uma vez que o pH neutro do PBS pode resultar em menor intensidade de cor vermelha da coloração.

A coloração de células com *Ponceau S* é muito instável e por vezes pouco nítida devido ao processo de limpeza da coloração. Resulta em células vermelhas, não sendo útil na diferenciação morfológica das células, mas sim na quantificação das células presentes na amostra. Como no caso do Tricromo de Masson seu uso como co-corante é bem-vindo, porém devido a necessidade de pH ácido acaba sendo incompatível com outras colorações. Além disso, seu baixo custo e baixa toxicidade podem ser pontos positivos como corante. Na Figura 3-A e B é possível observar células B16F10 aderidas coradas com *Ponceau S*, enquanto na Figura 3-B é possível diferenciar células tumorais (acinzentadas) das outras células presentes no microambiente tumoral.

Figura 3 – Colorações de células B16F10 com *Ponceau S*



Fonte: autores (Doleski; Silveira, 2025).

5 AZUL DE BROMOFENOL

O Azul de Bromofenol, ou tetrabromofenol de sulfonftaleína, tem nomenclatura química (IUPAC): 3',3'',5',5''-tetrabromofenolsulfonftaleína ($C_{19}H_{10}Br_4O_5S$). A presença de quatro

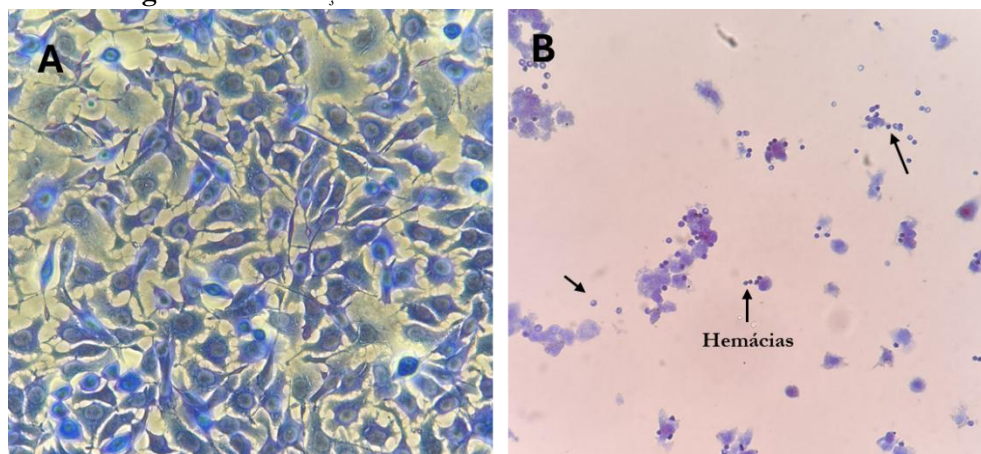
átomos de Bromo ligados ao grupo fenol da molécula, como também do grupo sulfônico, enquadra este composto como um corante de sulfonoftaleína. Tal grupo de corantes, do qual também se enquadra o vermelho de fenol (usado em meios de cultivo celular), são ótimos indicadores visuais de pH. O azul de bromofenol quando em meio ácido apresenta coloração avermelhada e conforme se eleva o valor de pH (ao básico) vai modificando para uma coloração azulada. Em altas concentrações o Azul de Bromofenol é capaz de interagir com proteínas, mais especificamente quando o grupo sulfônico desprotonado acaba por reagir com aminoácidos básicos, como por exemplo a arginina e a lisina. Não reage com outras biomoléculas como os lipídeos, membranas celulares ou DNA/RNA, não sendo capaz de acessar a parte interna de células viáveis. Inclusive, tal característica de não permeabilidade celular que leva o vermelho de fenol ser utilizado como indicador do pH dos meios de cultivo celular. O Azul de Bromofenol é hidrossolúvel, não sendo necessário solventes orgânicos para sua solubilização, um fato relevante uma vez que a maior parte dos corantes citológicos são dissolvidos em solventes orgânicos como o álcool metílico que apresenta efeito tóxico para os operadores (Flores *et al.*, 1978; Sambrook *et al.*, 2001).

Para o uso como corante celular o Azul de Bromofenol (peso molecular: 669,96 g/mol) deve ser preparado a uma concentração de 0,5% (ex: 0,5 g em 100mL), dissolvido em água destilada. Onde se recomenda que a solução seja filtrada com filtro de papel para remover cristais e outras possíveis impurezas. Por ser um corante diluído em água, as células que serão coradas necessitarão de fixação prévia. Células aderidas em placa de cultivo celular podem ser fixadas inicialmente com PFA 5% por 10 minutos, já para esfregaços celulares em lâmina de vidro recomenda-se a imersão da lâmina em Etanol 95% para que ocorra a plena fixação das células. O processo de fixação é essencial para que não se perca amostra entre os procedimentos de coloração. A solução de Azul de Bromofenol de coloração avermelhada é adicionada sobre as células por 10 minutos, após é realizada a remoção do excesso do corante e para realizar a completa remoção do corante é adicionado PBS (pH 7,2) e realizada sua remoção, repetindo a operação por duas vezes. Com a mudança de pH causada pelo PBS a lâmina troca de coloração avermelhada para azulada. Após secagem da lâmina a mesma pode ser analisada com auxílio de óleo de imersão em microscópio ótico.

Na coloração de células B16F10 aderidas em placas de cultivo celular, seu uso é relativo, pois se assemelha a outros corantes que interagem com proteínas como o *Coomassie B blue* ou a Anilina, resultando em células coradas fortemente de azul. Já para esfregaços de tumores de melanoma a coloração apresenta um ponto diferencial pois é possível diferenciar claramente hemácias de outras células presentes do homogeneizado tumoral. Esse efeito não é visível, ou pelo

menos nítido, quando se utiliza outros corantes que interagem com proteínas celulares. Na Figura 4-A demonstramos a coloração das células B16F10 aderidas a placa de 48 poços, enquanto na Figura 4-B é possível visualizar a morfologia das hemácias em esfregaço de tumor.

Figura 4 – Colorações de células B16F10 com Azul de Bromofenol



Fonte: autores (Doleski; Silveira, 2025).

6 CURCUMINA

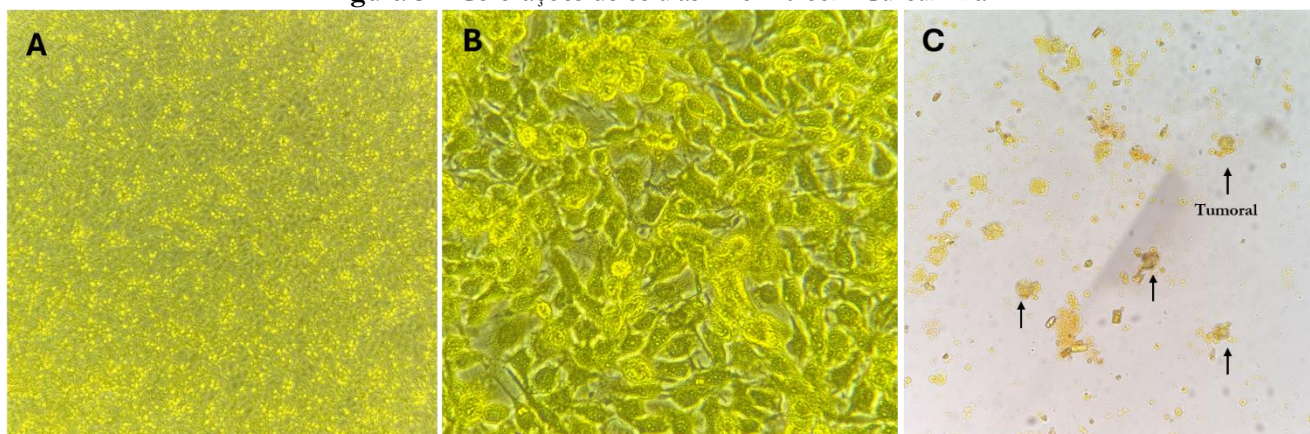
A curcumina, ou *Natural Yellow 3* (CI 75300), de nomenclatura química (IUPAC): (1E,6E)-1,7-bis(4-hidroxi-3-metoxifenil)-1,6-heptadieno-3,5-diona ($C_{21}H_{20}O_6$). É um flavonoide natural, de grupo polifenólico com dois anéis aromáticos conectados por uma cadeia de sete carbonos contendo dois grupos cetona conjugados (dicetona α,β -insaturada). É altamente lipofílica podendo interagir com proteínas, lipídios e o DNA das células. Em geral reage com grupos Sulfidrila (-SH) tióis de proteínas, e por ter caráter anfipático interage com membranas celulares. A curcumina pode ser utilizada como corante histológico específico para a coloração de placas amiloides em tecido cerebral, e para a deposição de lipídios. Interessantemente, a curcumina é fluorescente, e consequentemente pode ser utilizada em testes de fluorimetria como por exemplo a citometria de fluxo. Por ser um flavonoide de origem natural (extraída do açafrão: *Curcuma longa*) apresenta relevância científica e ecológica quando comparada com corantes clássicos que apresentam toxicidade de manuseio e toxicidade ambiental. Por não apresentar efeitos tóxicos importantes é também um corante alimentar e um importante nutraceutico (Aggarwal *et al.*, 2007; Priyadarsini, 2014)

A curcumina é altamente lipofílica, e para manter sua classificação de corante de baixa toxicidade pode ser diluída em Etanol 95% na concentração de 1% de corante. Mesmo sem grande toxicidade é capaz de corar intensamente a pele e materiais de laboratório, sendo necessário o uso

de equipamento de segurança. Por ser dissolvida em Etanol 95%, não necessita a fixação prévia com PFA 5%, porém se as células estiverem fixadas não ocorre nenhuma incompatibilidade na coloração com curcumina. Para a coloração de células é adicionado à solução corante por 10 min a temperatura ambiente. Após o tempo de coloração é necessário remover o excesso de corante, devido à alta lipofilicidade da curcumina é necessário a limpeza com Etanol 50% afim de evitar a precipitação de cristais de curcumina na amostra. Após é realizado a limpeza com PBS (pH 7,2) por duas vezes para a remoção de impurezas da amostra.

O resultado da coloração de células B16F10 aderidas em placa são células coradas de amarelo intenso. Um ponto interessante desta coloração é a facilidade de ver células em processo de divisão celular, onde a célula aderente apresenta forma arredondada e o corante consegue revelar facilmente este processo na microscopia ótica. Este processo é visto com outros corantes de forma leve a razoável, levando a coloração com curcumina como um marcador destas células em proliferação em cultivo celular. Já em lâmina de esfregaço tumoral, o corante facilita a diferenciação de células tumorais de melanoma as quais apresentam coloração acinzentada. Na figura 4-A e B demonstramos as células B16F10 aderidas e as células redondas em processo de proliferação celular, já na Figura 4-C é possível observar a diferença entre células do estroma e as células tumorais em si (acinzentadas).

Figura 5 – Colorações de células B16F10 com Curcumina



Fonte: autores (Doleski; Silveira, 2025).

7 CONCLUSÃO

A análise comparativa dos cinco corantes revela perfis distintos de especificidade e aplicabilidade na caracterização de células tumorais B16F10. O *Coomassie Blue R-250* demonstra-se ideal para quantificação celular e análises morfológicas detalhadas devido à sua forte ligação

irreversível a proteínas, enquanto o *Oil Red O* uma especificidade única para gotículas lipídicas, porém sem grandes resultados ao avaliar as células de melanoma. O *Ponceau S*, apesar da menor intensidade de coloração, ofereceu algumas vantagens como a observação de células tumorais em esfregaços tumorais. O Azul de Bromofenol é útil para detectar heterogeneidade das células de homogeneizado tumoral, principalmente por determinar as hemácias presentes. Por fim, a Curcumina destaca-se pela baixa toxicidade e pelas imagens as quais podem ser observadas o processo de proliferação das células tumorais em crescimento em placa de cultivo, e a diferenciação das células tumorais das outras células do estroma tumoral. Essa diversidade de propriedades demonstra que a inúmeros corantes podem ser escolhidos uma vez que alinhados aos objetivos experimentais ou clínicos. Considerando não apenas a especificidade molecular, mas também a viabilidade econômica e a redução do uso de corantes de grande toxicidade celular e ecológica.

REFERÊNCIAS

- BUMBRAH, G. S.; SODHI, G. S.; KAUR, J. Oil Red O (ORO) reagent for detection of latent fingerprints: a review. **Egyptian Journal of Forensic Sciences**, [S. l.], v. 9, n. 1, p. 3, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1186/s41935-018-0107-1>
- GOLDMAN, A.; HARPER, S.; SPEICHER, D. W. Detection of proteins on blot membranes. **Current Protocols in Protein Science**, v. 86, n. 1, p. 10.8.1-10.8.11, 2016. DOI: 10.1002/cpps.15
- GHALKHANI, M. et al. Recent advances in Ponceau dyes monitoring as food colorant substances by electrochemical sensors and developed procedures for their removal from real samples. **Food and Chemical Toxicology**, [S. l.], v. 161, p. 112830, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fct.2022.112830>
- FERREIRA, L. G. B. et al. Brilliant Blue Dyes in daily food: How could purinergic system be affected?. **International journal of food science**, [S. l.], v. 2016, n. 1, p. 7548498, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1155/2016/7548498>
- SALINOVICH, O.; MONTELARO, R. C. Reversible staining and peptide mapping of proteins transferred to nitrocellulose after separation by sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. **Analytical Biochemistry**, v. 156, n. 2, p. 341-347, 1986. DOI: 10.1016/0003-2697(86)90263-0
- SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. 3. ed. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- FLORES, R. A rapid and reproducible assay for quantitative estimation of proteins using bromophenol blue. **Analytical Biochemistry**, v. 88, n. 2, p. 605-611, 1978. DOI: 10.1016/0003-2697(78)90462-1

PRIYADARSINI, K. I. The chemistry of curcumin: from extraction to therapeutic agent. *Molecules*, **Basel**, v. 19, n. 12, p. 20091-20112, 2014.

AGGARWAL, B. B. et al. **Curcumin: the indian solid gold. In: Advances in Experimental Medicine and Biology**. New York: Springer, 2007. v. 595, p. 1-75.

MEHLEM, A.; HAGBERG, C. E.; MUHL, L.; ERIKSSON, U.; FALKEVALL, A. Imaging of neutral lipids by oil red O for analyzing the metabolic status in health and disease. **Nature Protocols**, London, v. 8, n. 6, p. 1149-1154, jun. 2013. DOI: 10.1038/nprot.2013.055.

RAMÍREZ-ZACARÍAS, J. L.; CASTRO-MUÑOZLEDO, F.; KURI-HARCUCH, W. Quantitation of adipose conversion and triglycerides by staining intracytoplasmic lipids with oil red O. **Histochemistry**, Berlin, v. 97, n. 6, p. 493-497, 1992. DOI: 10.1007/BF00316069.

CAPÍTULO 3

MECANISMOS DE MOTILIDADE CELULAR SOB ÓTICA DIMENSIONAL

CELL MOTILITY MECHANISMS FROM A DIMENSIONAL PERSPECTIVE

Giovanna de Souza Maciel   


Estudante de Graduação em Bacharel em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL), Alfenas - MG, Brasil

João Marcos Oliveira da Silva   

Mestre em Biociências Aplicadas à Saúde pela Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL), Alfenas-MG, Brasil

Angel Mauricio Castro Gamero   

Doutor em Genética pela Universidade de São Paulo (USP), Docente do Instituto de Ciências da Natureza (ICN), Laboratório de Genética Humana, Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL), Alfenas MG, Brasil

 DOI: 10.52832/wed.179.1040



RESUMO

A motilidade celular, que inclui os processos de migração e invasão, desempenha papéis centrais em diversos eventos fisiológicos e patológicos, como a formação de tecidos durante o desenvolvimento embrionário, a cicatrização de feridas e a metástase tumoral. Esses fenômenos envolvem mecanismos complexos nos quais a célula coordena alterações morfológicas, adesão ao substrato, reorganização do citoesqueleto e resposta a estímulos químicos e mecânicos do microambiente. A análise da motilidade celular pode variar conforme a perspectiva dimensional adotada, evidenciando a complexidade das interações entre as células e seu entorno. Sob uma perspectiva unidimensional, observa-se a predominância da interação célula-matriz, permitindo compreender como a força de tração, a polaridade celular e a remodelação do citoesqueleto direcionam a passagem da célula por barreiras restritas. Em contextos bidimensionais, as células estabelecem simultaneamente interações célula-célula e célula-matriz, destacando a importância da adesão cooperativa, da comunicação intercelular e da remodelação da matriz na promoção da migração e invasão coletiva. Na perspectiva tridimensional, que reflete mais fielmente o microambiente *in vivo*, barreiras físicas, sinais químicos, propriedades topográficas e a heterogeneidade celular modulam diretamente a plasticidade e a direção da migração, incluindo estratégias adaptativas como a migração lobopodial e o pistão nuclear. Com o objetivo de aprofundar a compreensão desses processos, este trabalho realizou uma revisão de estudos recentes, enfatizando a relevância das interações célula-célula e célula-matriz na regulação da motilidade e da invasão. Os resultados ressaltam a importância de considerar as diferentes dimensões desses fenômenos, destacando suas implicações na progressão tumoral, na disseminação metastática e no desenvolvimento de estratégias terapêuticas capazes de modular de forma precisa a migração e a invasão celular em contextos patológicos.

Palavras-chave: Motilidade celular. Invasão e migração. Metástase.

ABSTRACT

Cell motility, which encompasses migration and invasion processes, plays a central role in several physiological and pathological events, including tumor metastasis, tissue formation during embryonic development, and wound healing. These processes represent complex mechanisms in which the cell must coordinate morphological changes, adhesion to the substrate, cytoskeletal reorganization, and response to chemical and mechanical stimuli from the microenvironment. The analysis of these phenomena can vary depending on the dimensional perspective adopted, highlighting the complexity of the interactions between cells and the microenvironment during migration and invasion. From a one-dimensional perspective, cell-matrix interactions predominate, allowing us to understand how traction force, cell polarity, and cytoskeletal remodeling direct cell passage through restricted barriers. In two-dimensional contexts, cells simultaneously establish cell-cell and cell-matrix interactions, highlighting the importance of cooperative adhesion, intercellular communication, and matrix remodeling in promoting collective migration and invasion. The three-dimensional perspective reflects the *in vivo* microenvironment, in which physical barriers, chemical and topographical signals, and cellular heterogeneity directly influence plasticity and the direction of migration, including adaptive strategies such as lobopodial migration and the nuclear piston. To deepen our understanding of these dimensions, this work reviewed recent studies, emphasizing the relevance of cell-cell and cell-matrix interactions in regulating motility and invasion. Finally, this review highlights the importance of considering the different dimensional aspects of these processes, highlighting their implications for tumor progression, metastatic spread, and the

development of targeted therapeutic strategies capable of precisely modulating cell migration and invasion in pathological contexts.

Keywords: Cell motility. Invasion and migration. Metastasis.

1 INTRODUÇÃO

A migração e a invasão celular são processos biológicos fundamentais que desempenham papéis cruciais na formação, reparação e manutenção de tecidos. Durante o desenvolvimento embrionário, as células migram para formar estruturas específicas; na cicatrização de feridas, deslocam-se para reparar tecidos danificados; e, na homeostase tecidual, substituem células mortas ou comprometidas. Entretanto, esses mesmos processos, quando desregulados, estão intimamente relacionados à progressão tumoral, especialmente à metástase, em que células cancerígenas se disseminam do tumor primário para tecidos distantes, originando novos focos malignos (Kenney *et al.*, 2023; Merino-Casallo *et al.*, 2022).

Do ponto de vista molecular, mutações em genes supressores tumorais constituem eventos-chave para a iniciação e evolução das neoplasias, uma vez que promovem proliferação celular desregulada e impactam diretamente a motilidade celular (Liu *et al.*, 2024). Nesse cenário, a invasão tumoral configura a etapa inaugural da cascata metastática, possibilitando que células atravessem a membrana basal e se infiltrem em tecidos adjacentes. Esse processo pode ocorrer por dois padrões principais: a migração individual ou a migração coletiva (Novikov *et al.*, 2021).

A progressão para metástase, considerada uma das marcas registradas do câncer, está fortemente associada à perda de E-caderina, uma glicoproteína essencial para a adesão célula-célula (Hanahan; Weinberg, 2011). A redução dessa molécula desencadeia alterações fenotípicas que favorecem a transição epitélio-mesenquimal (EMT), processo no qual células epiteliais adquirem características mesenquimais, o que amplia sua capacidade invasiva, confere resistência à apoptose e potencializa a disseminação tumoral (Fares *et al.*, 2020).

À luz dessas evidências, diversos estudos experimentais têm se dedicado à investigação da motilidade celular, buscando elucidar os mecanismos que regulam a metástase. As interações dinâmicas que ocorrem durante os processos de migração e invasão podem ser exploradas em diferentes contextos dimensionais — unidimensionais (1D), bidimensionais (2D) e tridimensionais (3D). Nesse sentido, o presente trabalho propõe-se a realizar uma revisão bibliográfica com o objetivo de sintetizar e discutir os parâmetros celulares e as barreiras microambientais que modulam a migração e a invasão em diferentes dimensões, oferecendo, assim, uma compreensão integrada desses fenômenos biológicos complexos.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho adota a metodologia de revisão bibliográfica narrativa, cujo objetivo principal é reunir, analisar e discutir acerca das perspectivas dimensionais da invasão e migração, sob a ótica das células tumorais e suas interações. A busca dos artigos foi realizada em plataformas de dados científicos reconhecidos, *PubMed* e *SciELO* abrangendo publicações dos últimos cinco anos (2020-2025). Para a pesquisa, empregaram-se os descritores: “*cell migration and invasion dimensions*”, “*1D cell migration and invasion*”, “*2D cell migration and invasion*”, “*3D cell migration and invasion*”.

Para assegurar a relevância metodológica, uma seleção criteriosa de artigos foi realizada. Excluiu-se trabalhos não indexados, resumos de conferências, relatórios de instituições e materiais de divulgação. Também não foram incluídos textos de caráter secundário ou de escopo tangencial ao tema, a exemplo de monografias, dissertações, capítulos de livros, editoriais e comentários. Foram priorizados estudos originais e revisões que abordassem especificamente os mecanismos celulares e as interações com barreiras microambientais no processo de invasão e migração tumoral, excluindo trabalhos voltados unicamente para o desenvolvimento de modelos experimentais.

Inicialmente, foram identificados 821 artigos, os quais passaram por uma análise criteriosa de títulos e resumos. Em seguida, foram selecionados aqueles que abordavam de forma direta as perspectivas dimensionais da migração e invasão celular. Finalmente, após leitura integral e avaliação de relevância, 20 artigos foram considerados adequados e compuseram o corpo de evidências desta revisão, sendo utilizados como base para a discussão e elaboração do presente trabalho. A plataforma de design Canva foi utilizada para a confecção da figura anexada.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As interações que ocorrem durante os processos de migração e invasão celular podem ser analisadas sob uma perspectiva dimensional, considerando tanto a quantidade quanto a complexidade das relações entre a célula e o microambiente. Esse microambiente envolve interações célula-célula, célula-matriz e as barreiras físicas e químicas presentes nos tecidos (Le; Mayor, 2023). Sob uma perspectiva unidimensional (1D), em que a célula interage exclusivamente com a matriz extracelular (MEC), seu deslocamento é restrito a uma única direção espacial (Louis *et al.*, 2020).

A avaliação da motilidade celular em condições unidimensionais representa, portanto, uma estratégia essencial para caracterizar tanto a velocidade de deslocamento quanto a força de tração exercida diante de barreiras físicas. O confinamento em 1D, conforme discutido por Heyn, Radler e Falcke (2024), constitui um modelo experimental simplificado que possibilita a análise detalhada

da morfologia e dos padrões dinâmicos de movimento. Nessa configuração, as células concentram a aplicação de forças de tração nas regiões anterior e posterior, refletindo uma adaptação específica ao ambiente restrito e permitindo compreender as bases mecânicas da migração celular.

Contudo, a invasão em condições unidimensionais não deve ser entendida como um evento binário, limitado à transposição ou não da barreira. Trata-se, antes, de um processo dinâmico e contínuo, em que células individuais — ou mesmo populações celulares — direcionam energia e mecanismos adaptativos para modificar progressivamente a estrutura da barreira, tornando-a gradualmente permeável ao deslocamento (Azimzade, 2022).

À medida que se avança para uma perspectiva bidimensional (2D), a célula deixa de interagir exclusivamente com a matriz extracelular e passa a estabelecer conexões adicionais com células vizinhas e com o microambiente em sentido mais amplo. Essa maior complexidade reflete-se na integração de múltiplos sinais intra e extracelulares, muitos dos quais mediados por receptores acoplados à proteína G. Esses receptores desencadeiam a polarização de mensageiros secundários e a ativação espacialmente restrita de pequenas GTPases da família Rho. Entre elas, Rac e Cdc42 desempenham papel central na indução da polimerização de actina na borda anterior da célula, promovendo a formação de lamelipódios, enquanto RhoA atua na região posterior, regulando a contratilidade actomiosínica necessária para a retração e progressão do movimento (Pawluchin; Galic, 2022).

Nesse contexto, as interações célula-célula durante a migração coletiva asseguram a manutenção de conexões intracelulares e favorecem o movimento coordenado. Essa cooperação funcional depende da integração entre o citoesqueleto, a adesão ao substrato e a remodelação da MEC, fatores indispensáveis para a invasão em grupo (Wu *et al.*, 2021).

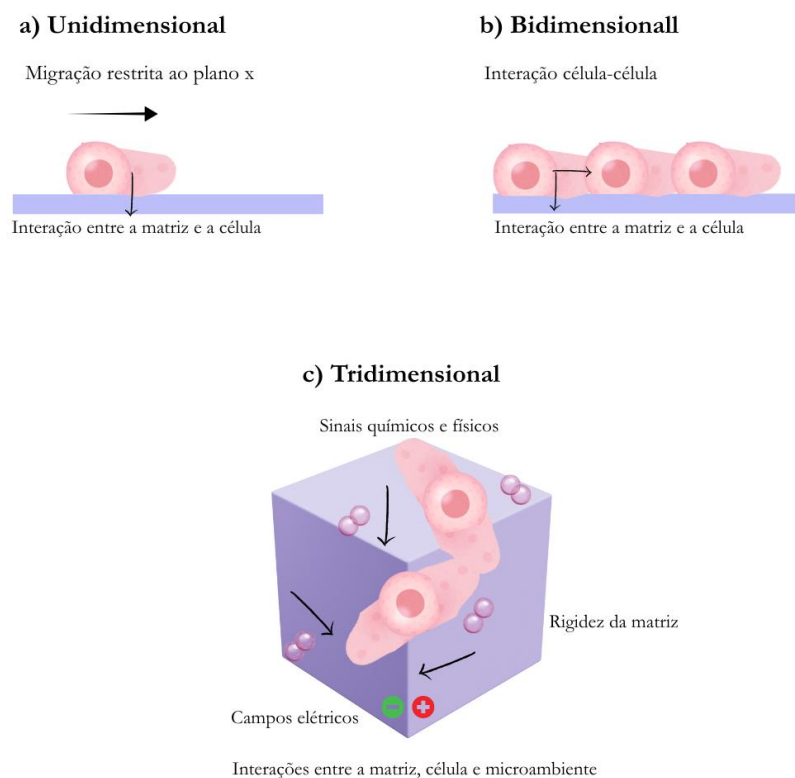
Já a perspectiva tridimensional (3D) aproxima-se mais do ambiente *in vivo*, onde barreiras físicas e sinais químicos atuam simultaneamente e de forma integrada ao longo do processo migratório. No organismo, as células não se movem ao longo de trilhas simples ou superfícies planas, mas encontram-se imersas em uma matriz extracelular densa e heterogênea. Nessa condição, exibem heterogeneidade fenotípica e estabelecem interações complexas com a MEC, sendo a ausência de uniformidade estrutural um fator determinante para a eficiência e o padrão de migração. Além disso, tecidos adjacentes, compostos por diferentes tipos celulares, regiões vascularizadas e proteínas de sinalização, desempenham papel fundamental na comunicação intercelular e na integração com o microambiente, modulando as respostas migratórias e invasivas (Mierke, 2020).

No ambiente *in vivo*, os tecidos estão frequentemente confinados, exigindo que a célula se deforme para atravessar barreiras. Nesse processo, o núcleo pode ser deslocado para a região anterior pela contratilidade actomiosínica, gerando pressão intracelular suficiente para impulsionar a célula adiante — um mecanismo denominado pistão nuclear. Além de atuar como força motriz, o núcleo funciona como sensor mecânico, detectando deformações da matriz e ativando vias de sinalização e respostas epigenéticas que modulam a polaridade e a direção migratória. Esse tipo de migração, conhecido como lobopodial, ocorre exclusivamente em ambientes tridimensionais e é caracterizado pela formação de protrusões celulares que avançam pelo microambiente (Yamada *et al.*, 2022).

Importante destacar que a orientação da migração celular não depende apenas de sinais quimiotáticos. Como ressaltado por SenGupta, Parent e Bear (2021), outros fatores microambientais exercem papéis fundamentais, incluindo a haptotaxia (estímulos químicos presentes na superfície do substrato), a durotaxia (variações de rigidez da MEC), a topotaxia (características geométricas e espaciais do microambiente) e até mesmo campos elétricos, todos capazes de modular a direção do movimento celular.

Entre esses mecanismos, a durotaxia se relaciona intimamente com a preparação pré-migratória da célula, mediada pela capacidade de perceber variações na rigidez da MEC. Esse reconhecimento mecânico pode atuar como estímulo para a transição epitélio-mesenquimal (EMT), conferindo propriedades motoras adicionais e maior plasticidade. Como consequência, as células passam a migrar por meio da formação de protrusões de actina que estabelecem adesões dinâmicas ao substrato (Ventura; Sedzinski, 2022).

Além disso, no ambiente tridimensional, a comunicação intercelular ocorre não apenas pela liberação parácrina de citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento, mas também pela secreção de moléculas associadas à resposta ao estresse celular, capazes de modular as células-alvo de maneira direta ou indireta (Zhang *et al.*, 2024). Dessa forma, as células no organismo precisam enfrentar, de forma simultânea, desafios químicos, mecânicos e topográficos que influenciam diretamente sua capacidade migratória.

Figura 1 – Esquema ilustrativo das dimensões de motilidade celular.

Fonte: Os autores, 2025.

4 CONCLUSÃO

A migração e a invasão constituem processos dinâmicos e altamente regulados, sendo fundamentais tanto na fisiologia quanto na patologia, principalmente na progressão tumoral. A análise sob perspectivas dimensionais permite uma melhor compreensão dos mecanismos que governam a motilidade celular e suas interações com o microambiente.

Na perspectiva unidimensional, a célula interage predominantemente com a matriz extracelular, revelando como a força de tração e a polaridade direcionam a passagem por barreiras restritas. Em duas dimensões, a migração envolve simultaneamente interações célula-célula e célula-matriz, destacando a importância da adesão cooperativa, comunicação intercelular e remodelação da matriz para a invasão coletiva. Por fim, a perspectiva tridimensional reflete o microambiente in vivo, no qual barreiras físicas, heterogeneidade celular e sinais químicos e topográficos atuam de maneira integrada, modulando diretamente a capacidade migratória, a plasticidade celular e a eficácia do processo invasivo.

A compreensão dessas distintas perspectivas dimensionais é fundamental para a identificação de potenciais alvos terapêuticos no tratamento do câncer, uma vez que possibilita a

intervenção estratégica em mecanismos que regulam diretamente a invasão e a disseminação de células tumorais.

REFERÊNCIAS

AZIMZADE, Y. Invasion front dynamics of interactive populations in environments with barriers. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 12, n. 1, p. 826, 2022. DOI: 10.1038/s41598-022-04806-x. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-022-04806-x>.

FALCKE, M. *et al.* Mesenchymal cell migration on one-dimensional micropatterns. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, [s. l.], v. 12, p. 1352279, 2024. DOI: 10.3389/fcell.2024.1352279. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fcell.2024.1352279>.

FARES, J. *et al.* Molecular principles of metastasis: a hallmark of cancer revisited. **Signal Transduction and Targeted Therapy** [s. l.], v. 5, n. 1, p. 28, 2020. DOI: 10.1038/s41392-020-0134-x.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell** [s. l.], v. 144, n. 5, p. 646–674, 2011. DOI: 10.1016/j.cell.2011.02.013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>.

HEYN, J. C. J.; RÄDLER, J. O.; FALCKE, M. Mesenchymal cell migration on one-dimensional micropatterns. **Frontiers in Cell and Developmental Biology** [s. l.], v. 12, p. 1352279, 2024.

KENNEY, R. M. *et al.* Cellular Invasion Assay for the Real-Time Tracking of Individual Cells in Spheroid or Tumor-like Mimics. **Analytical Chemistry** [s. l.], v. 95, n. 5, p. 3054–3061, 2023. DOI: 10.1021/acs.analchem.2c05201.

LE, H. A.; MAYOR, R. Cell-matrix and cell-cell interaction mechanics in guiding migration. **Biochemical Society Transactions**, [s. l.], v. 51, n. 4, p. 1733–1745, 2023. DOI: 10.1042/BST20230211. Disponível em: <https://doi.org/10.1042/BST20230211>.

LIU, Z. *et al.* Multi-stage mechanisms of tumor metastasis and therapeutic strategies. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, [s. l.], v. 9, n. 1, p. 270, 2024. DOI: 10.1038/s41392-024-01955-5.

MERINO-CASALLO, F. *et al.* Unravelling cell migration: defining movement from the cell surface. **Cell Adhesion & Migration** [s. l.], v. 16, n. 1, p. 25–64, 2022. DOI: 10.1080/19336918.2022.2055520.

MIERKE, C. T. Mechanical cues affect migration and invasion of cells from three different directions. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, [s. l.], v. 8, p. 583226, 2020. DOI: 10.3389/fcell.2020.583226.

NOVIKOV, N. M. *et al.* Fatores mutacionais da migração e invasão de células cancerígenas. **British Journal of Cancer**, [s. l.], v. 124, p. 102–114, 2021. DOI: 10.1038/s41416-020-01149-0.

PAWLUCHIN, A.; GALIC, M. Moving through a changing world: Single cell migration in 2D vs. 3D. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, [s. l.], v. 10, p. 1080995, 2022. DOI: 10.3389/fcell.2022.1080995.

PRAHL, L. S. *et al.* Predicting Confined 1D Cell Migration from Parameters Calibrated to a 2D Motor-Clutch Model. **Biophysical Journal** [s. l.], v. 118, n. 7, p. 1709-1720, 2020. DOI: 10.1016/j.bpj.2020.01.048.

RON, J. E. *et al.* Polarization and motility of one-dimensional multi-cellular trains. **Biophysical Journal**, [s. l.], v. 122, n. 23, p. 4598–4613, 2023. DOI: 10.1016/j.bpj.2023.11.003.

SENGUPTA, S.; PARENT, C. A.; BEAR, J. E. The principles of directed cell migration. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, [s. l.], v. 22, n. 8, p. 529-547, 2021. DOI: 10.1038/s41580-021-00366-6.

VENTURA, G.; SEDZINSKI, J. Emerging concepts on the mechanical interplay between migrating cells and microenvironment in vivo. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, [s. l.], v. 10, p. 961460, 2022. DOI: 10.3389/fcell.2022.961460.

WU, J. S. *et al.* Plasticity of cancer cell invasion: Patterns and mechanisms. **Translational Oncology**, [s. l.], v. 14, n. 1, p. 100899, 2021. DOI: 10.1016/j.tranon.2020.100899.




YAMADA, K. M. *et al.* Interações célula-matriz 3D: avanços e oportunidades recentes. **Tendências em Biologia Celular**, [s. l.], v. 32, n. 10, p. 883-895, 2022.

ZHANG, X. *et al.* The Tumor Microenvironment: Signal Transduction. **Biomolecules**. [s. l.], v. 14, n. 4, p. 438, 2024. DOI: 10.3390/biom14040438.




CAPÍTULO 4

ESPECIFICAÇÕES TÉCNICAS DOS CORANTES AZUL DO NILO, AMIDO BLACK, LEISHMANN, MG-GIEMSA, VERDE DE MALAQUITA E VERMELHO NEUTRO EM CULTIVO CELULAR


TECHNICAL SPECIFICATIONS OF THE DYES NILE BLUE, AMIDO BLACK, LEISHMANN, MG-GIEMSA, MALACHITE GREEN AND NEUTRAL RED IN CELL CULTURE.

Pedro Henrique Doleski   

Doutor em Bioquímica Toxicológica, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria-RS, Brasil

Rafaella Pereira da Silveira   

Estudante de Graduação em Bacharelado em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria-RS, Brasil.

 DOI: 10.52832/wed.179.1041



RESUMO

Inúmeros corantes celulares são empregados em técnicas laboratoriais como: citologia, histologia, imunohistoquímica, genética, entre outras. O uso destes corantes, ou determinado conjunto de corantes, estão atrelados a quais informações o laboratório clínico ou de pesquisa necessita obter de suas amostras. No geral, colorações apresentam protocolos e POP's bem estabelecidos na literatura, ou no dia a dia dos laboratórios. Tais colorações podem ser adaptadas e utilizadas também para a avaliação de células mantidas em cultivo celular. Tais técnicas são menos descritas quando comparadas as clássicas técnicas, como a histologia de tecidos parafinizados ou coloração de esfregaços sanguíneos. Assim a intenção deste capítulo de livro é de explorar as interações químicas de seis corantes (*Azul do Nilo*, *Amido Black 10B*, *Leishmann*, *May Grünwald-Giemsa*, *Verde de Malaquita* e *Vermelho Neutro*) com determinadas biomoléculas ou estruturas celulares, e a finalidade de cada corante como também a metodologia para coloração de células aderidas em placa de poços ou garrafas mantidas em cultivo celular. Também exploramos a quantificação dos corantes por técnica espectrofotometria. A fim de deixar o capítulo mais didático apresentamos imagens de células de melanoma murino (B16F10) após coloração com os seis corantes descritos.

Palavras-chave: Corantes. Citologia. Cultivo Celular. B16F10. Viabilidade Celular.

ABSTRACT

Numerous cellular stains are used in laboratory techniques such as cytology, histology, immunohistochemistry, genetics, and others. The use of these dyes, or a particular set of dyes, is tied to the information that clinical or research laboratory needs to obtain in its samples. In general, stains have well-established protocols in literature or in daily laboratory practice. These stains can also be adapted and used to evaluate cells maintained in cell culture. These techniques are less well-described than classic techniques, such as the histology of paraffin-embedded tissues or staining of blood smears. Therefore, the intention of this book chapter is to explore the chemical interactions of six dyes (*Nile Blue*, *Amido Black 10B*, *Leishmann*, *May Grünwald-Giemsa*, *Malachite Green*, and *Neutral Red*) with specific biomolecules or cellular structures, as well as the purpose of each dye, as well as the methodology for staining cells adhered to well plates or bottles maintained in cell culture. We also explored the quantification of dyes using spectrophotometry. To make the chapter more educational, we present images of murine melanoma cells (B16F10) after staining with the six dyes described.

Keywords: Dyes. Cytology. Cell Culture. B16F10. Cell Viability.

1 INTRODUÇÃO:

A quantidade de reagentes químicos que são capazes de interagir com biomoléculas celulares é muito diversa. Estes reagentes corantes podem interagir com proteínas, lipídeos, ácidos nucleicos, metais, entre outras biomoléculas ou estruturas celulares. O resultado final da coloração são células com seus compartimentos corados, facilitando assim sua identificação e observação em microscopia ótica ou fluorescente. Cada corante reage quimicamente de forma a gerar colorações

únicas as quais podem destacar o núcleo, retículos endoplasmáticos, mitocôndrias, grânulos, membranas entre outras estruturas. A particularidade química de cada reagente corante nos permite avaliar qualitativamente as estruturas celulares, a viabilidade celular e a formação de agregados ou colônias de células mantidas em cultivo celular. Em geral pouco empregada, está a técnica de quantificação destes corantes através de espectrofotometria. Este processo de quantificação da viabilidade ou número de células se deve ao fato que o reagente corante, que interage com as células, é capaz de ser eluído em solvente apropriado e posteriormente ser medido espectrofotometricamente.

Entre os mais diversos corantes laboratoriais citaremos os que apresentam resultados significativos em cultivo celular, o qual é relativamente diferente que as colorações citológicas ou histológicas de tecidos. Dentre os corantes citaremos: o *Azul do Nilo*, o *Amido Black 10B*, *Leishmann*, *May Grünwald-Giemsa*, *Verde Brilhante de Malaquita* e *Vermelho Neutro*, como também Co-colorações de Leishmann seguido de Azul do Nilo. Para melhor compreensão e observação das colorações traremos: a descrição do mecanismo de reação de cada corante e qual sua finalidade, especificações técnicas de como proceder a coloração de células aderidas em garrafas ou placas de poços de cultivo celular, a quantificação espectrofotométrica dos corantes. como também apresentamos imagens de células B16F10 observadas em microscopia ótica após coloração.

2 AZUL DO NILO (*NILE BLUE*)

O corante Azul do Nilo, com nomenclatura química (IUPAC): 9-(dietilamino)benzo[a]fenoxazin-5-ona ($C_{20}H_{18}N_2O_2$), é uma benzofenoxazina capaz de interagir com lipídios. Sendo assim, considerado um corante catiônico básico, utilizado na histologia para identificar e localizar depósitos lipídicos em células e tecidos (MARTINEZ *et al.*, 2016). Como seu próprio nome já diz, ao interagir com lipídeos de células acaba por gerar uma intensa coloração azul real. Interessantemente, devido sua configuração química (estrutura tricíclica, grupo dietilamino e grupo cetona), ao interagir com biomoléculas é capaz de emitir fluorescência. Mais especificamente em células, o Azul do Nilo interage com deposições lipídicas internas ou com as membranas celulares. Quando em concentrações baixas (aproximadamente 0,01%) em células vivas, o corante pode distinguir células viáveis das células inviáveis. Isto se deve ao fato de células inviáveis facilitar a entrada do corante, enquanto as células viáveis apresentam mecanismos de evitar a entrada completa do corante, o qual se localiza em estruturas específicas dentro da célula (LIN *et al.*, 1991). Já em células fixadas o corante perde sua função na avaliação da viabilidade celular, mas pode ser útil para estipular o número de células presentes em um poço de placa de cultivo celular.

A técnica que aqui descrevemos é exatamente para células aderentes (B16F10) fixadas com paraformaldeído (PFA) a 4% por 10 minutos, para células mantidas em placa de 24 poços são adicionados 400 µL por poço. O PFA 4% é removido e sobre as células fixadas é adicionado 1 mL do corante a 0,1% previamente diluído em 100 mL de etanol a 20%. O corante reage com as células aderidas e fixadas por 15 minutos em temperatura ambiente. Após este período é realizada a remoção do excesso de reagente que não reagiu com as células, assim é adicionado 1 mL de tampão PBS (pH: 7,4) e removido, sendo essa etapa de limpeza repetido por quatro vezes até que o excesso de reativo seja abolido. Após esta etapa as células já podem ser analisadas qualitativamente em microscopia ótica (conforme apresentado na Figura 1-A). Para a realização da quantificação do reagente que interagiu com as células do poço, são adicionados 750 µL da solução de eluição (Etanol e Ácido Clorídrico na proporção de 1:1) o qual é gentilmente homogeneizado em cada poço. A solução de eluição remove o corante que interagiu com as células e se torna colorida em tom azulado, a qual é analisada em espectrofotômetro previamente zerado com a solução de eluição (Branco) no comprimento de onda de 635 nm.

Como previamente citado, por se tratar de células fixadas o corante Azul do Nilo auxilia na análise de células por microscopia ótica, como também na quantificação do número de células presentes em cada poço. Considerando que muitos tratamentos realizados em cultivo celular (*in vitro*) são capazes de levar a redução da replicação celular ou a própria morte celular, tais tratamentos podem reduzir o número de células no poço a qual pode ser quantificada pela técnica espectrofotométrica citada acima. Na Figura 1B damos um exemplo com peróxido de hidrogênio (H₂O₂) a 1 mM, o qual é capaz de causar dano oxidativo e reduzi o número de células B16F10 em cultivo celular.

3 AMIDO BLACK 10B

O corante Amido Black 10B, com nomenclatura química (IUPAC): ácido 4-amino-5-hidroxi-3,6-bis[(4-nitrofenil)azo]-2,7-naftalenodissulfônico (C₂₂H₁₄N₆Na₂O₉S₂), é um corante azo-diazoico capaz de interagir com os aminoácidos das proteínas (NETTLETON *et al.*, 1986). Os grupamentos sulfônicos da molécula da a habilidade do Amido Black 10B de interagir com o grupo amino dos aminoácidos das proteínas, com baixíssima interação com lipídeos e ácidos nucleicos. Entretanto, pode interagir com proteínas básicas as quais estão altamente presentes nas proteínas nucleares. Sendo assim, em células o corante tende a corar o citoplasma celular (alto conteúdo proteico), o núcleo de forma intensa (alta concentração de histonas), e as membranas celulares que

apresentam proteínas acopladas a membrana (SCHULZ *et al.*, 1994). Em análises histológicas de tecidos este corante é utilizado para a observação de depósitos proteicos. Uma vez que interage com proteínas desenvolve uma coloração azul-esverdeada.

A técnica de coloração com Amido Black 10B em células previamente fixadas em PFA 4% (10 minutos) se inicia pela adição de 1 mL de corante na concentração de 0,1% (diluído em solução a 45% de metanol, 10% ácido acético, diluídos em água destilada). O corante reage com as células por 15 minutos a temperatura ambiente. Após este período é realizada as etapas de lavagem do excesso do corante pela adição de 1 mL de PBS (pH: 7,4) repetindo por quatro vezes para a remoção de corante que não interagiu com as células. Logo após as etapas de lavagens as células já podem ser observadas em microscopia ótica de forma qualitativa (conforme apresentado na Figura 2B). Para a realização da quantificação do corante que reagiu com as proteínas celulares é adicionado em cada poço de cultivo 750 µL de solução de eluição (Etanol a 70%) o qual é gentilmente homogeneizado para a remoção do corante das células. A solução de eluição vai adquirir uma fraca tonalidade azul, a qual pode ser quantificada em espectrofotômetro, zerado previamente apenas com a solução de eluição, no comprimento de onda de 625 nm.

Semelhante ao Azul do Nilo, o Amido Black 10B pode ser utilizado para estipular os níveis celulares presentes no poço/garrafa de cultivo. Entretanto, não podemos esquecer que proteínas extracelulares secretadas pelas células, como também restos de proteínas depositadas proveniente de células mortas podem se manter no poço da placa de cultivo celular. Neste sentido, para a estipulação de número de células por poço, o Azul do Nilo apresenta vantagens. Por outro lado, na avaliação geral de proteínas no poço o Amido Black 10B é uma ótima técnica quando utilizada como apoio de outras técnicas. Na Figura 1-B apresentamos as células B16F10 coradas com Amido Black 10B.

4 LEISHMANN

O corante de Leishmann na realidade é uma mistura de dois componentes sendo eles: (1) a Eosina Y, de nomenclatura química (IUPAC): 2',4',5',7'-tetrabromofluoresceína ($C_{20}H_6Br_4Na_2O_5$); e (2) o Azul de Metileno, de nomenclatura química (IUPAC): 3,7-bis(dimetilamino)fenotiazin-5-io ($C_{16}H_{18}ClN_3S$), podendo conter alguns produtos de oxidação como as moléculas Azure A, Azure B e Azure C (GAJENDRA *et al.*, 2015). Em tese a Eosina age como componente acidófilo, assim interagindo com estruturas básicas (catiônicas), levando a formação da coloração roseada do citoplasma e grânulos eosinófilos (avermelhados). Já o Azul de Metileno age como componente basófilo, interagindo com estruturas ácidas (aniônicas), formando

a coloração azulada dos núcleos e dos grânulos basofílicos. O corante de Leishmann é muito utilizado para a coloração de esfregaços sanguíneos e a identificação e diferenciação dos leucócitos sanguíneos, como também para a identificação de parasitas (protozoários), sendo o padrão ouro para a análise de *Plasmodium* sp. (malária), e para a Leishmaniose e Tripanossomíase. Interessantemente, o corante de Leishmann apresenta efeito metacromático, podendo assim interagir com diferentes moléculas celulares e formar um diferente espectro de cores diferentes (SIDHARTHAN *et al.*, 2025). Células B16F10 apresentam grânulos de melanina, uma vez que são uma linhagem de melanoma (câncer de melanócitos), podem tais grânulos não de difícil observação em microscopia ótica. Neste sentido, o corante de Leishmann, por apresentar este efeito metacromático é capaz de corar as células B16F10 de forma clássica, mas também ser possível a observação dos grânulos de melanina na coloração acinzentada.

Para a realização da coloração de Leishmann, as células são previamente fixadas nos poços ou garrafas de cultivo celular com PFA a 4% por 10 minutos. Um ponto positivo da coloração de Leishmann é sua rapidez quando comparado com outros corantes semelhantes como MG/Giemsa (a qual necessita de duas a três vezes mais tempo de coloração). Assim, 0,1g do corante de Leishmann é dissolvido em 100 mL de metanol. Sobre as células em placa de 24 poços, são adicionados sobre cada poço 1 mL da solução corante por 15 minutos a temperatura ambiente. Após o tempo de coloração, cada poço é lavado com PBS (pH 7,4) por quatro vezes para a remoção do excesso de corante. Ao remover o excesso de corante, as células coradas já podem ser observadas diretamente, ou com auxílio de óleo de imersão, no microscópio ótico. Apresentado na Figura 1-C, estão as células B16F10 coradas, podendo ser observado os grânulos citoplasmáticos corados de acinzentado. A observação da presença de grânulos de melanina em células de melanoma é de interesse uma vez que a concentração de melanina pode estar relacionada com a malignidade das células de melanoma em investigação.

5 MAY GRÜNWALD-GIEMSA

Semelhante ao corante Leishmann, o corante MGG consiste em duas colorações subsequentes sendo elas inicialmente o May Grünwald (MG) e posteriormente o Giemsa (G). Quimicamente o corante MG é constituído de: Eosina Y (2',4',5',7'-tetrabromofluoresceína) e Azul de Metileno (3,7-bis(dimetilamino)fenotiazin-5-io). Já o corante Giemsa é mais complexo, sendo uma mistura de: Azure A (3-amino-7-(dimetilamino)fenotiazin-5-io), Azure B (3-(dimetilamino)-7-aminofenotiazin-5-io), na proporção de 35% e 65%, respectivamente. Além disso, contém Glicerol, o qual atua como estabilizante da solução (evita a sedimentação de grânulos do reagente), e aumenta

a penetração do corante nas células (GUNAWARDENA *et al.*, 2022). Em relação as biomoléculas, segue o raciocínio do corante de Leishmann, com corantes acidófilos e basófilos (GAJENDRA *et al.*, 2015). Porém os corantes Leishmann e MG-Giemsa apresentam diferenças importantes, o primeiro é o tempo necessário para a coloração onde o Leishmann despende menos tempo de coloração quando comparado com a coloração de MG-Giemsa. A segunda diferença é os detalhes revelados pela coloração de MGG a qual é mais sensível para pequenas modificações celulares como inclusões internas, imaturidade celular, diferenciando com maior facilidade precursores hematopoiéticos. Porém tais efeitos positivos em geral estão relacionados a análise de esfregaços sanguíneos ou de medula óssea, não sendo necessariamente observados em outras células como é o caso das células B16F10 mantidas em cultivo celular. Mas utilizamos ele principalmente como comparativo a análise do Leishmann.

Para a coloração de MGG em células aderidas em placas de cultivo celular (24 poços), não é necessário a realização de fixação com PFA a 4%, uma vez que o corante MG já tem forte habilidade de fixar células. Porém, a realização da fixação previa com PFA 4% não altera a coloração com MGG. Assim, nas células aderidas são adicionados 0,5 mL do corante MG por 3 minutos, e a seguir é adicionado 0,5 mL de PBS (pH 7,4) por mais 3 minutos. O corante é removido do poço, e a seguir é adicionado 1 mL do corante Giemsa o qual reage com as células por 15 min a temperatura ambiente. Após a coloração é realizado quatro lavagens com PBS (pH: 7,4) para a remoção do excesso ou precipitados de corante dos poços. As células já podem ser analisadas em microscopia ótica com ou sem auxílio de óleo de imersão. Na Figura 1-D apresentamos a coloração por MGG das células B16F10 mantidas em placas de 24 poços.

6 VERDE DE MALAQUITA

O corante Verde de Malaquita, pode representar o Cloreto de Verde de Malaquita (com peso molecular de 364,91 g/mol) ou o Oxalato de Verde de Malaquita (com peso molecular de 927,02 g/mol). Aqui citaremos o Oxalato de Verde de Malaquita, com nomenclatura química (IUPAC) Bis[4-[[4-(dimetilamino)fenil]fenilmetileno]ciclohexa-2,5-dien-1-ilideno] dimetilamônio oxalato ((C₂₃H₂₅N₂)₂·C₂H₂O₄), sendo um corante da classe dos trifenilmetanos. Uma vez em solução este corante pode interagir com proteínas de caráter ácido (alta concentração de aminoácidos como glutamato e aspartato), polissacarídeos ácidos (glicosaminoglicanos e mucinas), e moléculas de DNA ou RNA devido aos grupamentos fosfatos carregados negativamente. O corante também tem a característica de interagir com moléculas hidrofóbicas, como membranas celulares (fosfolipídicas), organelas e proteínas hidrofóbicas (YERRAMILI; KIM, 2018). Mais

especificamente em células, o corante desenvolve uma coloração verde intensa, levando a núcleos, nucléolos e mitocôndrias bem evidenciadas em verde, além disso mucos intracelulares ou extracelulares podem ser corados também. Importante de nota está a toxicidade deste corante, o qual até pode ser utilizado como antimicrobiano e antiparasitário veterinário, porém com uso restrito devido ao perigo de bioacumulação em tecidos. Sua toxicidade pode levar a dano de membranas, DNA, e disfuncionalidade das organelas responsáveis pela respiração celular (CULP et al., 1996; FARHADIAN et al., 2022).

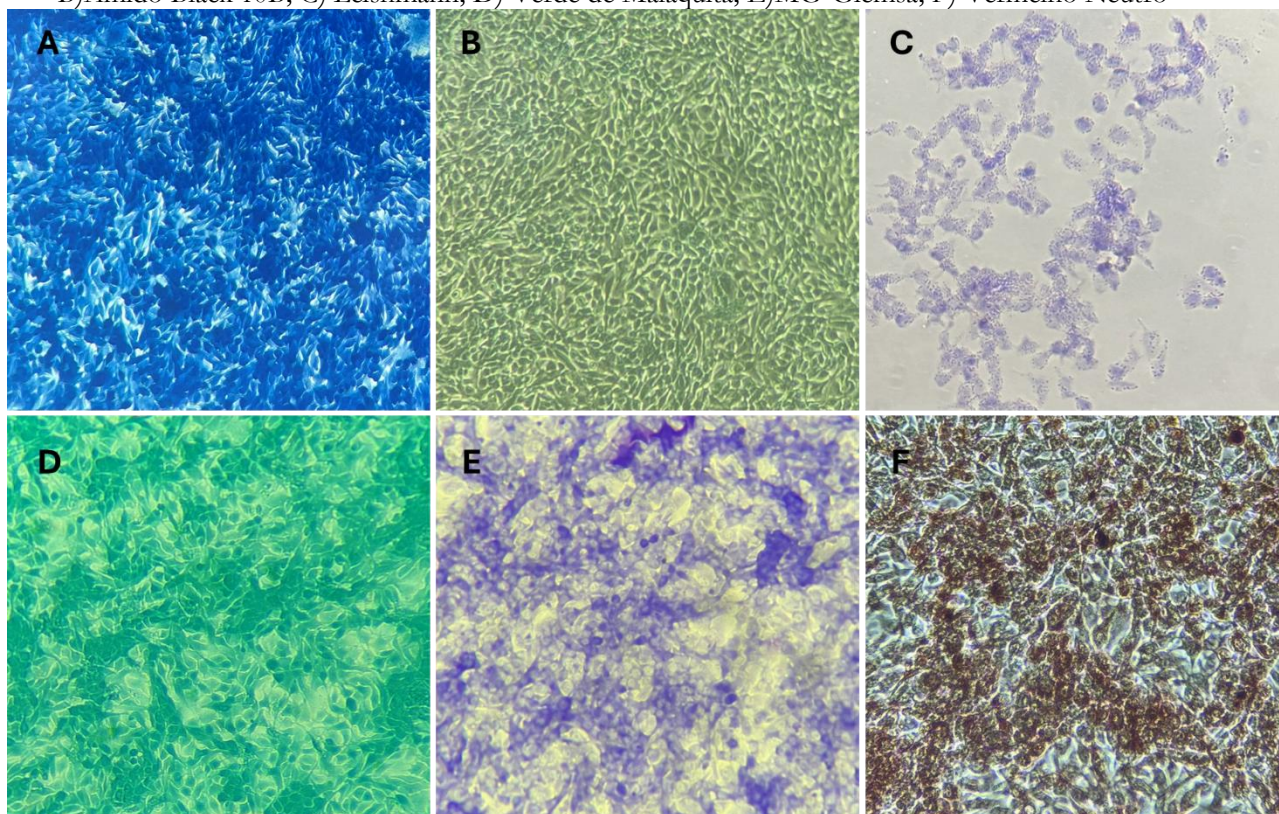
O Verde de Malaquita como corante pode ser útil na investigação de células produtoras de mucos como também na investigação de viabilidade celular ou número celular. Para avaliação de mucos ou número celular total apenas se avalia a coloração com o reagente, já para a determinação de viabilidade celular é importante que o corante seja dissolvido em tampão ou meio de cultivo apropriado a células a serem avaliadas. Descreveremos aqui a técnica básica para avaliação de mucos ou número celular: 0,5g do corante é dissolvido em 100 mL de água destilada (para melhor dissolução do corante é recomendável manter em agitação de 30 minutos a 1 hora). Acima de células fixadas com PFA 4% são adicionados 1 mL do corante solubilizado por 15 minutos a temperatura ambiente. A seguir é realizada a remoção do corante e seguido o processo de lavagem de excessos com quatro repetições com PBS (pH 7,4). As células podem ser observadas em microscopia com ou sem óleo de imersão. Na Figura 1-E apresentamos células B16F10 coradas com Verde de Malaquita.

7 VERMELHO NEUTRO

O corante Vermelho Neutro tem nomenclatura química (IUPAC): 3-amino-7-dimetilamino-2-metilfenazina ($C_{15}H_{17}ClN_4$). É um corante catiônico, da classe das fenazinas. O corante tem a habilidade de interagir fortemente com biomoléculas de caráter ácido, corando assim levemente os núcleos celulares, mas intensamente organelas ácidas como é o caso dos lisossomos ou vacúolos ácidos (ATES et al., 2017). Mais especificamente, nas moléculas ácidas presentes dentro dos lisossomos, o corante fica protonado e consecutivamente não escapa da organela. Este corante pode ser utilizado em forma concentrada para destacar tais estruturas em células fixadas, ou diluído em tampão ou meio de cultivo celular para avaliar a viabilidade celular (principalmente via viabilidade lisossomal, como de outras organelas). Entre os corantes que avaliam a viabilidade celular o Vermelho Neutro apresenta alta relevância, sendo utilizado para a avaliação da toxicidade de compostos e fármacos *in vitro* (REPETTO et al., 2008).

Descreveremos a técnica para avaliação da viabilidade celular pelo corante Vermelho Neutro em células B16F10 mantidas em placa de 24 poços. Assim o corante Vermelho Neutro é diluído em meio de cultivo DEMEM com 10% de soro fetal bovino a uma concentração final de 0,4% de Vermelho Neutro. O meio de cultivo das células aderidas em cada poço é removido completamente, e acima destas é adicionado o corante diluído em meio de cultivo. As células são mantidas a 37°C em incubadora de cultivo celular por 4 a 5 horas. Neste período células viáveis captam e retêm o corante em suas organelas ácidas, como os lisossomos, enquanto células inviáveis (ou em disfunção celular) não retêm completamente o corante. Após o período de incubação, o corante é removido e as células são lavadas gentilmente (pois não são células fixadas, mas sim aderidas) duas vezes com PBS (pH 7,4). As células podem ser observadas em microscópio ótico, onde se observam as organelas ácidas em coloração avermelhada. A quantificação da viabilidade ocorre pela avaliação espectrofotométrica do corante retido nas células viáveis, o qual é eluído com adição de 1 mL da solução de Etanol/Ácido Acético na proporção 1:10 e gentilmente homogeneizado por 10 minutos. A solução eluída é quantificada em espectrofotômetro zerado com solução de eluição pura no comprimento de onda de 540 nm. Na figura 1-F apresentamos as células B16F10 após 5 horas de incubação com corante Vermelho Neutro.

Figura 1 – Colorações de células B16F10 previamente mantidas em cultivo celular. A) Azul do Nilo; B) Amido Black 10B; C) Leishmann; D) Verde de Malaquita; E) MG-Giemsa; F) Vermelho Neutro



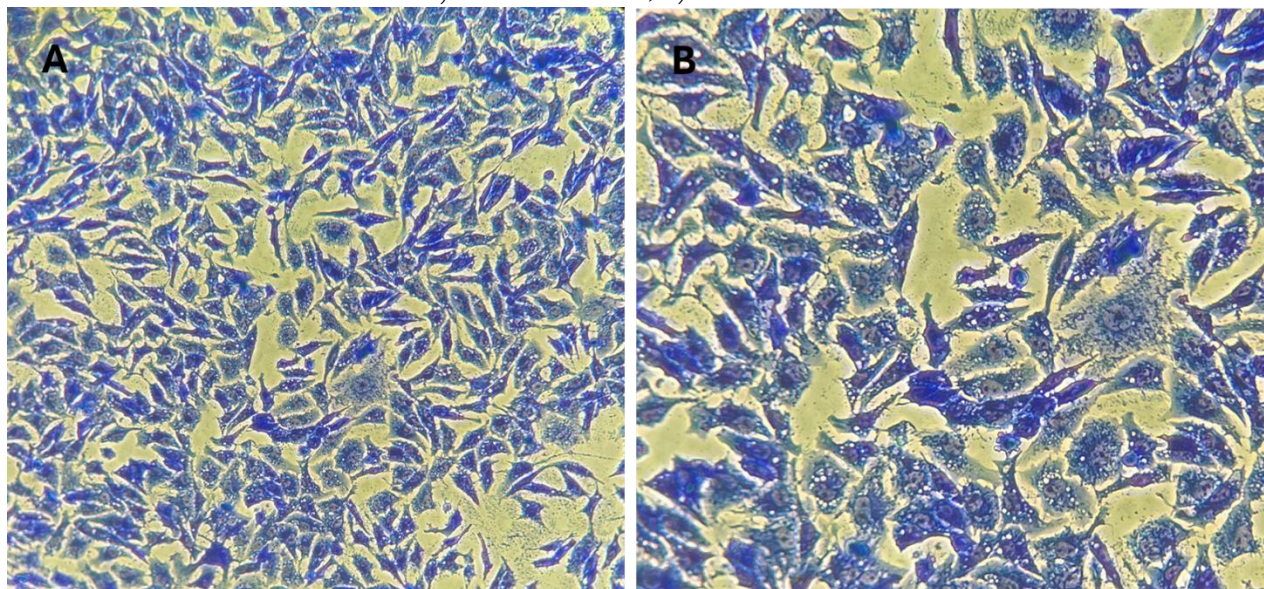
Fonte: autores (DOLESKI e SILVEIRA, 2025).

8 LEISHMANN SEGUIDO DE AZUL DO NILO

A coloração de Leishmann seguido de co-coloração com Azul do Nilo serve para a facilitação na identificação das células, ou mais especificamente das organelas destas células. Enquanto o Leishmann demarca as células aderidas em garrafa de cultivo celular o Azul do Nilo intensifica a essa demarcação, como também destaca células inviáveis ou em estresse celular. Células mortas podem ficar fixadas junto com células viáveis no processo de fixação por PFA ou outros fixadores. Porém, células inviáveis e viáveis se tornam indistinguíveis sem colorações específicas, neste sentido a coloração de Leishmann seguido do Azul do Nilo pode ser de grande auxílio. Além disso, entre as células viáveis incluem-se células saudáveis e células danificadas ou em estresse celular. Nesta co-coloração, fica mais fácil de observar alterações celulares presentes em células estressadas, como por exemplo inclusões nucleares ou a alta presença de vacúolos citoplasmáticos.

Para a realização desta técnica, as células aderidas e fixadas com PFA 4% por 10 minutos inicialmente são coradas com 1 mL do corante Leishmann por 15 minutos a temperatura ambiente, o corante é removido e em seguida é adicionado 1 mL do corante Azul do Nilo por 10 minutos a temperatura ambiente. Após o período de coloração, as células são lavadas para a remover o excesso de corantes por quatro lavagens consecutivas com PBS (pH 7,4). As células podem ser analisadas ao microscópio com ou sem auxílio de óleo de imersão. Na Figura 2 -A apresentamos as células B16F10 cultivadas em ambiente estressante (sem renovação de meio de cultivo e com pH ácido) coradas com Leishmann seguido de Azul do Nilo, onde se observa células inviáveis (azul claro) e células viáveis (azul escuro). A Figura 2-B se observa inúmeros vacúolos citoplasmáticos e pigmentação de cromatina, achados comuns de células sob estresse ou dano celular.

Figura 2 – Colorações de células B16F10 mantidas em cultivo celular em microambiente de estresse celular. A) Aumento de 20x; B) Aumento de 50x.



Fonte: autores (DOLESKI e SILVEIRA, 2025).

9 CONCLUSÕES FINAIS

Diversos corantes com diferentes mecanismos de interação com biomoléculas são encontrados na literatura científica. Esta gama de corantes auxilia a identificar diferentes estruturas celulares nas avaliações citológicas. Aqui descrevemos especificamente cinco corantes diferentes, os quais apresentam relevância na avaliação de células aderidas ao fundo dos poços de placas ou garrafas utilizadas em cultivo celular. Destacamos aqui que o uso de uma, ou mais de uma, das técnicas aqui descritas reforçam a observação de resultados de induções ou tratamentos testados *in vitro* no cultivo celular. A ideia de quantificar espectrofotometricamente os corantes que reagem com as células acabam por dar resultados mais confiáveis do que apenas as imagens microscópicas qualitativas. Levando a resultados com maior fator de impacto, uma vez que habilitam os pesquisadores a realizarem estatística com as absorbâncias obtidas. As técnicas aqui citadas são simples e de bom custo-benefício quando comparadas com técnicas fluorescentes, por exemplo. Entretanto, é importante salientar que tais técnicas necessitam de cuidados técnicos devido seus possíveis efeitos tóxicos aos profissionais e ao meio ambiente, sendo imprescindível o descarte químico consciente.

REFERÊNCIAS

- ATES, G. *et al.* Assaying cellular viability using the neutral red uptake assay. **Cell Viability Assays: Methods and Protocols**, [S. l.], p. 19-26, 2017. DOI: https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6960-9_2.
- CULP, S. J.; BELAND, F. A. Malachite green: a toxicological review. **Journal of the American College of Toxicology**, [S. l.], v. 15, n. 3, p. 219-238, 1996. DOI: <https://doi.org/10.3109/10915819609008715>.
- FARHADIAN, S. *et al.* Malachite Green, the hazardous materials that can bind to Apo-transferrin and change the iron transfer. **International Journal of Biological Macromolecules**, [S. l.], v. 194, p. 790-799, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.11.126>.
- GAJENDRA, S. *et al.* Leishman and Giemsa stain: a new reliable staining technique for blood/bone marrow smears. **International Journal of Laboratory Hematology**, [S. l.], v. 37, n. 6, p. 774-782, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1111/ijlh.12408>.
- GUNAWARDENA, D. *et al.* Modified Giemsa Stain: A solution to improve the quality of hypercellular bone marrow smears. **International Journal of Laboratory Hematology**, [S. l.], v. 44, n. 3, p. 504-509, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1111/ijlh.13824>.
- LIN, C. W. *et al.* Lysosomal localization and mechanism of uptake of Nile blue photosensitizers in tumor cells. **Cancer research**, [S. l.], v. 51, n. 10, p. 2710-2719, 1991. PMID: 2021950.
- MARTINEZ, V.; HENARY, M. Nile red and nile blue: applications and syntheses of structural analogues. **Chemistry—A European Journal**, [S. l.], v. 22, n. 39, p. 13764-13782, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1002/chem.201601570>.
- NETTLETON, G. S.; JOHNSON, L. R.; SEHLINGER, T. E. Thin layer chromatography of commercial samples of amido black 10B. **Stain Technology**, [S. l.], v. 61, n. 6, p. 329-336, 1986. DOI: <https://doi.org/10.3109/1052029860911358>.
- REPETTO, G.; DEL PESO, A.; ZURITA, J. L. Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. **Nature protocols**, [S. l.], v. 3, n. 7, p. 1125-1131, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.75>.
- SCHULZ, J. *et al.* The amido black assay: a simple and quantitative multipurpose test of adhesion, proliferation, and cytotoxicity in microplate cultures of keratinocytes (HaCaT) and other cell types growing adherently or in suspension. **Journal of immunological methods**, [S. l.], v. 167, n. 1-2, p. 1-13, 1994. DOI: [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(94\)90069-8](https://doi.org/10.1016/0022-1759(94)90069-8).
- SHERWOOD, A. R. *et al.* A malachite green-based assay to assess glucan phosphatase activity. **Analytical biochemistry**, [S. l.], v. 435, n. 1, p. 54-56, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ab.2012.10.044>.
- SIDHARTHAN, S. *et al.* Comparative Study between Conventional and Modified Leishman Stain in Peripheral Smear. **European Journal of Cardiovascular Medicine**, [S. l.], v. 15, p. 428-

432, 2025. DOI: <https://healthcare-bulletin.co.uk/article/comparative-study-between-conventional-and-modified-leishman-stain-in-peripheral-smear-3634/>.

YERRAMILI, V. S.; KIM, K. H. Labeling RNAs in live cells using malachite green aptamer scaffolds as fluorescent probes. **ACS synthetic biology**, [S. l.], v. 7, n. 3, p. 758-766, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1021/acssynbio.7b00237>.