

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

Centro de Ciências da Saúde

Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho

Laboratório de Cardiologia Celular e Molecular

CIBELE FERREIRA PIMENTEL

**ESTABELECIMENTO DE UM PROTOCOLO DE CULTIVO DE CÉLULAS EM MATRIZ
3D E ANÁLISE POR MICROSCOPIA CONFOCAL**

RIO DE JANEIRO

2019

CIBELE FERREIRA PIMENTEL

**ESTABELECIMENTO DE UM PROTOCOLO DE CULTIVO DE CÉLULAS EM MATRIZ
3D E ANÁLISE POR MICROSCOPIA CONFOCAL**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação do Mestrado Profissional: Formação para Pesquisa Biomédica do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Orientadoras: Dr^a. Grasiella Maria Ventura Matioszek

Dr^a. Isalira Peroba Rezende Ramos

Coorientadora: Prof^a. e Dr^a. Regina Coeli dos Santos Goldenberg

RIO DE JANEIRO

2019

Ficha Catalográfica

Pimentel, Cibele Ferreira.

Estabelecimento de um protocolo de cultivo de células em matriz 3D e análise por microscopia confocal./Cibele Ferreira Pimentel. – Rio de Janeiro: Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, 2019.

76 f.: il.; 30 cm.

Orientadoras: Grasiella Maria Ventura Matioszek e Isalira Peroba Rezende Ramos.

Coorientadora: Regina Coeli dos Santos Goldenberg.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Rio de Janeiro / Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Programa de Pós-Graduação em Pesquisa Biomédica, 2019.

Referências: f. 63-68.

1. Microscopia Confocal-métodos. 2. Colágeno Tipo I. 3. Carcinoma Hepatocelular. 4. Técnicas In Vitro. 5. Técnicas de Cultura de Células. 6. Pesquisa Biomédica-tese. I. Matioszek, Grasiella Maria Ventura . II. Ramos, Isalira Peroba Rezende. III. Goldenberg, Regina Coeli dos Santos. IV. Universidade Federal do Rio de Janeiro / Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Mestrado Profissional em Formação para Pesquisa Biomédica. V. Título.

Este trabalho foi desenvolvido no LABORATÓRIO DE CARDIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR do INSTITUTO DE BIOFÍSICA CARLOS CHAGAS FILHO do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio de Janeiro com auxílio das entidades: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) e Ministério da Saúde. Contou ainda com a colaboração do Centro Nacional de Biologia Estrutural e Bioimagem (CENABIO) da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

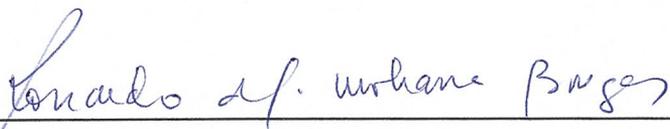
“ESTABELECIMENTO DE UM PROTOCOLO PARA ANÁLISE DO CULTIVO 3D
UTILIZANDO A MICROSCOPIA CONFOCAL”

CIBELE FERREIRA PIMENTEL

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO PROFISSIONAL DE FORMAÇÃO PARA A PESQUISA BIOMÉDICA
SUBMETIDA À UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO VISANDO A OBTENÇÃO DO
GRAU DE MESTRE EM FORMAÇÃO PARA A PESQUISA BIOMÉDICA.

APROVADA POR:

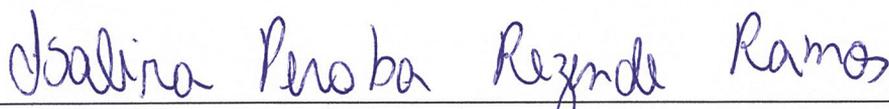
Rio de Janeiro, 21 de março de 2019.



DR. RONALDO DA SILVA MOHANA BORGES (DOUTOR – UFRJ)
(COORDENADOR DO CURSO DE MESTRADO PROFISSIONAL DE FORMAÇÃO PARA PESQUISA BIOMÉDICA)



DRA. GRASIELLA MARIA VENTURA MATIOSZEK (DOUTOR – UFRJ) – ORIENTADOR



DRA. ISALIRA PEROBA REZENDE RAMOS (DOUTOR – UFRJ) – 2º ORIENTADOR



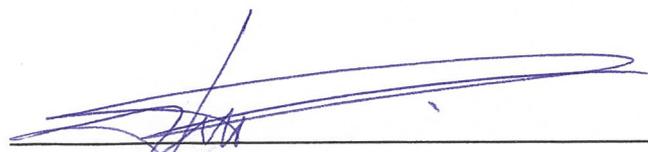
DRA. REGINA COELI DOS SANTOS GOLDENBERG (DOUTOR – UFRJ) - COORIENTADOR



DRA. FLAVIA FONSECA BLOISE (DOUTOR – UFRJ) – REVISOR



DRA. CHRISTINA MAEDA TAKIYA (DOUTOR – UFRJ)



DR. FÁBIO DA SILVA DE AZEVEDO FORTES (DOUTOR – UEZO)



DRA. KATIA CARNEIRO DE PAULA (DOUTOR – UFRJ)

“Que todo o meu ser louve ao Senhor, e que eu não esqueça nenhuma das suas bênçãos!” Salmos 103:2.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter me dado saúde e força para superar as dificuldades, pois sem ele eu não teria forças para essa longa jornada.

Aos meus pais e família, pelo amor, incentivo e apoio incondicional. Em especial à minha amada mãe Marinaura (*in memoriam*), que fortificou minha segurança e certeza de que não estou sozinha nessa caminhada. Amo vocês!

Ao meu amoroso, companheiro e amigo Márcio Lincoln, por todo carinho e paciência que tem me dedicado, sempre me apoiando nas minhas decisões e também por ser tão compreensivo. Seu apoio e ajuda foram muito importantes para a conclusão deste trabalho.

Às minhas amigas Josélia, Letícia e Rute, que mesmo à distância nunca deixaram de me apoiar e incentivar nas horas mais difíceis. Obrigada pelos conselhos e elogios “infalíveis”!

À minha mentora e doutora Regina Goldenberg, agradeço a oportunidade que me dispensou ao ter aberto as portas do laboratório e acreditar em meu desempenho e dedicação para que tudo que está aqui nesta presente dissertação fosse possível. Obrigada por todo o apoio!

Às minhas orientadoras Grasiella Ventura e Isalira Ramos. Sou grata pelo aprendizado e suporte que me proporcionaram durante todo o processo, pelas correções e incentivos. Obrigada pela amizade que construímos ao longo deste caminho, pelas conversas e atenção!

Um sorriso enorme, aos meus amigos Cherley, Marlon e Michelle que nas horas difíceis me fizeram descontraír! Vocês foram o máximo! Aproveito a oportunidade para agradecer também a Bruna, Karina e Raiana pela colaboração prestada nas técnicas desse trabalho e Lanuza pelas preciosas dicas para lidar com as células HepG2. Obrigada meninas!

À minha amiga Raphaela Ferreira, meu agradecimento especial pela ajuda prestada na estruturação desse trabalho, pelas suas correções e incentivos. Sempre que precisei paraste para me ouvir. Muito obrigada por tudo e pela sua amizade!

Ao meu amigo Miguel Larios, a quem agradeço muito por ter proporcionado meu sonho em realidade, pelos incentivos e por estar sempre orando por mim.

Um muito obrigada especial às minhas colegas de laboratório, incluindo Ana Célia, Cleusa, Cíntia, Julia Helena, Madellon e Terezinha pelo apoio e incentivo prestados. E a todos que direta ou indiretamente fizeram parte da minha formação, pelas discussões científicas e partilhas pessoais. O meu muito obrigada também aos professores Antonio Carlos Campos de Carvalho e Adriana Bastos Carvalho pelo apoio logístico prestado.

À professora e revisora Flavia Bloise. Obrigada pelas correções e incentivos prestados e pelo carinho que teve comigo! Expresso meu agradecimento especial, pois sem sua leitura atenta não seria esse trabalho tão rico em informações.

Em especial à minha querida professora e doutora Kátia Carneiro. Obrigada por toda a disponibilidade e atenção dispendidas durante todo esse percurso.

À minha banca de defesa: Christina Takiya, Fábio Fortes e Kátia Carneiro um muito obrigada especial pela participação nesse projeto!

À vocês todos, toda minha gratidão! Deus abençoe a todos!

RESUMO

PIMENTEL, CIBELE FERREIRA. **Estabelecimento de um protocolo de cultivo de células em matriz 3D e análise por microscopia confocal.** Rio de Janeiro, 2019. Dissertação (Mestrado Profissional em Pesquisa Biomédica). Laboratório de Cardiologia Celular Molecular, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2019.

Dentre as novas tecnologias desenvolvidas estão incluídos diferentes tipos de cultura 3D de células, as quais, ao contrário do cultivo tradicional em monocamadas, reproduzem de forma mais fidedigna o ambiente *in vivo*. Assim, desenvolveu-se um modelo de cultivo celular 3D, no qual uma base 3D de colágeno tipo I foi estabelecida, gerando um microambiente compatível e adequado, mimetizando o arcabouço hepático das células humanas. Todavia a análise de estruturas espessas: células arredondadas e tecidos, é um desafio. A difração da luz é uma das maiores limitações para se obter uma boa resolução de imagem. A microscopia confocal é altamente capacitada em realizar cortes ópticos que posteriormente possibilitam a análise do objeto nos seus 3 eixos espaciais: x, y e z, melhorando a resolução da imagem em amostras espessas. Para o desenvolvimento de um protocolo padrão de cultivo 3D se fez necessário escolher uma linhagem celular. Um modelo de cultivo bastante utilizado para estudos *in vitro*, são as células hepáticas derivadas de um Carcinoma Hepatocelular, as HepG2. Este projeto propõe a implantação de um protocolo de cultivo 3D para as HepG2, no qual as características morfofuncionais da linhagem celular de hepatócitos seriam analisadas por microscopia confocal e ELISA. As HepG2 foram cultivadas em placas plásticas, sem matriz (controle 2D), sobre (ON) e dentro (IN) de matrizes feitas de colágeno I. Para a condição IN foram testadas as concentrações finais de 0,5; 1,0 e 1,5 mg/mL, nas quantidades de soluções finais de colágeno I de 100 μ L e 200 μ L. Após os tempos de 24, 48, 72 e 96 hs, as células foram avaliadas por microscopia confocal utilizando a fluorescência e a imunofluorescência e, para avaliar a funcionalidade das HepG2 foi feito ELISA. Nos resultados, foi estabelecida a concentração final de colágeno I de 1,0 mg/mL e quantidade de solução final de colágeno de 100 μ L para as HepG2-3D-IN, nos tempos de 48 e 96 hs. As HepG2-2D mantiveram sua morfologia em *clusters*. As HepG2-3D-ON e HepG2-3D-IN apresentaram-se dispersas. Nos tempos de 48 e 96 hs as células em matriz 3D: ON/IN apresentaram muitos filopódios, sugerindo uma melhor capacidade de interação entre as HepG2 e a matriz de colágeno I em relação ao controle 2D. Na condição 3D-IN houve uma melhor distribuição das células ao longo do eixo Z da matriz, preenchendo os planos espaciais x, y e z, em relação ao controle 2D e a condição 3D-ON. Nas condições 3D-ON/3D-IN as

células apresentaram uma expressão diferenciada de vinculina, bem como uma morfologia diferente na tensão dos microfilamentos de actina do citoesqueleto celular, em relação à condição 2D. As HepG2 nas 3 condições de cultivo mantiveram sua funcionalidade no parâmetro de secreção de albumina pelos hepatócitos. Em suma, o cultivo de HepG2 dentro da matriz de colágeno I foi obtido com sucesso. A microscopia confocal foi eficaz nas análises das características morfológicas das HepG2 nas 3 condições de cultivo e tempos avaliados. Os protocolos gerados foram padronizados para utilização dos discentes do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho-UFRJ, bem como outras instituições de pesquisa.

Palavras chave: Microscopia confocal, HepG2, cultivo 3D, matriz colágeno tipo I, morfologia e adesão celular.

ABSTRACT

PIMENTEL, CIBELE FERREIRA. **Establishment of a protocol for cell culture in 3D matrix and analysis by confocal microscopy**. Rio de Janeiro, 2019. Dissertation (Professional Master's Degree in Biomedical Research). Laboratory of Molecular Cellular Cardiology, Institute of Biophysics Carlos Chagas Filho, Health Sciences Center, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2019.

New technologies developed include different types of 3D cell culture, which, unlike traditional monolayer culture, reproduce the environment in a more reliable way *in vivo*. Thus, a 3D cell culture model was developed in which a 3D base of type I collagen was established, generating a compatible and adequate microenvironment, mimicking the hepatic framework of human cells. However the analysis of thick structures: rounded cells and tissues, is a challenge. Light diffraction is one of the major limitations to obtaining good image resolution. Confocal microscopy is highly capable of performing optical cuts that later enable the analysis of the object in its 3 spatial axes: x, y and z, improving the resolution of the image in thick samples. For the development of a standard protocol of 3D cultivation it became necessary to choose a cell line. A widely used culture model for *in vitro* studies are liver cells derived from a Hepatocellular Carcinoma, the HepG2. This project proposes the implantation of a 3D culture protocol for HepG2, in which the morphofunctional characteristics of the hepatocyte cell line would be analyzed by confocal microscopy and ELISA. HepG2 was grown on plastic plates, without matrix (2D control), on (ON) and inside (IN) of matrices made of collagen I. For the IN condition, the final concentrations of 0.5, 1.0 and 1, 5 mg / mL, in the amounts of final solutions of collagen I of 100 μ L and 200 μ L. After the 24, 48, 72 and 96 hr times, the cells were evaluated by confocal microscopy using fluorescence and immunofluorescence and ELISA was performed to evaluate the functionality of HepG2. In the results, the final concentration of collagen I of 1.0 mg / mL and amount of final solution of collagen of 100 μ L was established for the HepG2-3D-IN, in times of 48 and 96 hours. The HepG2-2D maintained their morphology in clusters. HepG2-3D-ON and HepG2-3D-IN were dispersed. At 48 and 96 hs the cells in the 3D: ON / IN matrix presented many filopodia, suggesting a better interaction capacity between the HepG2 and the collagen I matrix in relation to the 2D control. In the 3D-IN condition there was a better distribution of the cells along the Z axis of the matrix, filling the spatial planes x, y and z, in relation to the 2D control and the 3D-ON condition. In the 3D-ON / 3D-IN conditions the cells had a differentiated expression of vinculin, as well as a different morphology in the actin microfilament tension of the cellular cytoskeleton, in relation to the 2D condition. HepG2 in

the 3 culture conditions maintained their functionality in the parameter of albumin secretion by hepatocytes. In summary, the culture of HepG2 within the collagen I matrix was successfully obtained. Confocal microscopy was effective in the analysis of the morphological characteristics of HepG2 in the 3 culture conditions and times evaluated. The protocols generated were standardized for use by the students of the Institute of Biophysics Carlos Chagas Filho-UFRJ, as well as other research institutions.

Key words: Confocal microscopy, HepG2, 3D culture, collagen matrix.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. REPRESENTAÇÃO DA ULTRAESTRUTURA DE UM HEPATÓCITO.	16
FIGURA 2. FOTOMICROGRAFIA DE UM CARCINOMA HEPATOCELULAR.	18
FIGURA 3. MICROSCOPIA DE CONTRASTE DE FASE DAS CÉLULAS HEPG2.....	19
FIGURA 4. MICROSCOPIA DE EPIFLUORESCÊNCIA CONVENCIONAL E CONFOCAL.	26
FIGURA 5. DESENHO ESQUEMÁTICO DO PRINCÍPIO DA MICROSCOPIA CONFOCAL.....	27
FIGURA 6. IMAGEM REPRESENTATIVA DOS PADRÕES DO DISCO DE AIRY.	28
FIGURA 7. RELAÇÃO DA ABERTURA NUMÉRICA E O TAMANHO DO DISCO DE AIRY	28
FIGURA 8. COMPONENTES BÁSICOS DE UM MICROSCÓPIO CONFOCAL DE VARREDURA A LASER (CLSM).	29
FIGURA 9. PRINCÍPIO DA MICROSCOPIA CONFOCAL DE ESCANEAMENTO À LASER.....	30
FIGURA 10. ESCANEAMENTO CONFOCAL.....	31
FIGURA 11. MICROGRAFIA ÓPTICA DE CONTRASTE DE FASE DAS CÉLULAS HEPG2.....	41
FIGURA 12. MICROGRAFIA ÓPTICA DE CONTRASTE DE FASE DAS CÉLULAS HEPG2-3D-ON NO TEMPO DE 48 HORAS.....	42
FIGURA 13. MICROSCOPIA CONFOCAL DAS CÉLULAS HEPG2-3D-IN NO TEMPO DE 48 HORAS.	44
FIGURA 14. MICROSCOPIA CONFOCAL DAS CÉLULAS HEPG2-2D E HEPG2-3D-IN NOS TEMPOS DE 48, 72 E 96 HORAS.....	46
FIGURA 15. MICROSCOPIA CONFOCAL DAS CÉLULAS HEPG2-2D, HEPG2-3D-ON E HEPG2-3D-IN NOS TEMPOS DE 48 E 96 HORAS.....	48
FIGURA 16. MICROSCOPIA CONFOCAL DA DISTRIBUIÇÃO NO EIXO Z DAS CÉLULAS HEPG2-2D, HEPG2-3D-ON E HEPG2-3D-IN NO TEMPO DE 48 HORAS.....	50
FIGURA 17. MICROSCOPIA CONFOCAL DAS CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DAS CÉLULAS HEPG2-2D, HEPG2-3D-ON E HEPG2-3D-IN NOS TEMPOS DE 48 E 96 HORAS.	52
FIGURA 18. REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DA ANÁLISE ESTATÍSTICA DAS CÉLULAS HEPG2 NAS CONDIÇÕES 2D, 3D-ON E 3D-IN QUE EMITEM PROLONGAMENTOS CITOPLASMÁTICOS NO TEMPO DE 48 HORAS.....	53
FIGURA 19. MICROSCOPIA CONFOCAL DA ANCORAGEM DAS CÉLULAS HEPG2-3D-IN NO SUBSTRATO NO TEMPO DE 48 HORAS.....	54
FIGURA 20. MICROSCOPIA CONFOCAL DA ANCORAGEM DAS CÉLULAS HEPG2-2D NO SUBSTRATO NO TEMPO DE 96 HORAS.....	55

FIGURA 21. MICROSCOPIA CONFOCAL DA ANCORAGEM DAS CÉLULAS HEPG2: 2D, 3D-ON E 3D-IN NOS SUBSTRATOS NOS TEMPOS DE 48 E 96 HORAS.....	57
FIGURA 22. MICROSCOPIA CONFOCAL DAS FIBRAS DE TENSÃO DO MICROFILAMENTO DE ACTINA DAS CÉLULAS HEPG2: 2D, 3D-ON E 3D-IN NOS DIFERENTES SUBSTRATOS, NOS TEMPOS DE 48 E 96 HORAS	59
FIGURA 23. GRÁFICO DE BARRAS REPRESENTANDO A SECREÇÃO DE ALBUMINA DAS CÉLULAS HEPG2: 2D, 3D-ON E 3D-IN NOS TEMPOS DE 48 E 96 HORAS.	60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Preparação da matriz de colágeno I.....	35
Tabela 2: Especificação e resolução das objetivas.....	36

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AOTF	Filtros atenuadores opto-acústicos (do inglês <i>Acousto-Optical Tunable Filter</i>)
BCRJ	Banco de Células do Rio de Janeiro
BSA	Albumina de soro bovino (do inglês <i>Bovine Serum Albumin</i>)
CCD	Dispositivo de carga acoplada (do inglês <i>charge-coupled device</i>)
CHC	Carcinoma Hepatocelular
CLSM	Microscópio confocal de varredura à laser (do inglês <i>confocal laser scanning microscope</i>)
DAPI	4-6-Diamino-2-fenolindol
DMEM	Meio Eagle modificado por Dulbecco (do inglês <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>)
DMSO	Dimetil sulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico (do inglês <i>Deoxyribonucleic Acid</i>)
2D	Duas dimensões (x = largura e y = altura) (monocamada) (bidimensional)
3D	Três dimensões ou tridimensional (x = largura, y = altura e z = espessura)
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético (do inglês <i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>)
ELISA	Ensaio imunoenzimático (do inglês <i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>)
HepG2	Células imortalizadas do fígado
IBCCF	Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho
IN	Cultivo de células hepáticas dentro da matriz de colágeno I
LCCM	Laboratório de Cardiologia Celular e Molecular
MEC	Matriz extracelular
NA	Abertura numérica (do inglês <i>Numerical aperture</i>)
NaOH	Hidróxido de sódio
ON	Cultivo de células hepáticas sobre a matriz de colágeno I
PBS	Tampão fosfato salino (do inglês <i>Phosphate-buffered saline</i>)
PMT	Tubo fotomultiplicador (do inglês <i>Photomultiplier</i>)
SA-HRP	Estreptavidina conjugada à peroxidase (do inglês <i>Streptavidin-conjugated Horseradish Peroxidase</i>)
SFB	Soro fetal bovino
TMB	3,3', 5,5' - tetrametilbenzidina
UFRJ	Universidade Federal do Rio de Janeiro

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
1.1	A IMPORTÂNCIA DO CULTIVO TRIDIMENSIONAL.....	15
1.2	HEPATÓCITOS.....	15
1.3	CULTURA DE CÉLULAS PRIMÁRIAS DE HEPATÓCITOS	17
1.4	USO DE LINHAGEM CELULAR IMORTALIZADA COMO MODELO DE ESTUDO	17
1.4.1	Células HepG2	17
1.4.2	Modelo de Cultivo em 2D	19
1.4.3	Modelo de Cultivo em 3D	21
1.4.4	Biomaterial para Modelo de Cultivo em 3D	24
1.5	MICROSCOPIA ÓPTICA – HISTÓRICO	24
1.5.1	Estudo das células hepáticas em cultivos 3D por microscopia confocal	25
1.5.2	Difração versus Resolução	27
1.5.3	O Princípio Óptico da Imagem Confocal	29
2	JUSTIFICATIVA	31
3	OBJETIVOS	32
3.1	OBJETIVO GERAL	32
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	32
4	MATERIAIS E MÉTODOS	33
4.1	LINHAGEM CELULAR	33
4.1.1	Cultivo Celular, Manutenção, Expansão e Criopreservação das HepG2	33
4.1.2	Condições experimentais	33
4.2	MARCADORES FLUORESCENTES	35
4.3	IMUNOFLUORESCÊNCIA.....	36
4.4	AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA POR MICROSCOPIA CONFOCAL.....	38
4.5	AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ALBUMINA POR ELISA.....	39

4.6	ESTATÍSTICA	40
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
5.1	CULTIVO E EXPANSÃO CELULAR – CONDIÇÃO 2D.....	41
5.2	CULTIVO – CONDIÇÃO 3D-ON	41
5.3	AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE COLÁGENO TIPO I DAS CÉLULAS HEPÁTICAS NA CONDIÇÃO 3D-IN.....	42
5.4	AVALIAÇÃO POR MICROSCOPIA CONFOCAL DA CONFLUÊNCIA DE CÉLULAS HEPÁTICAS MARCADAS COM FALOIDINA NA CONDIÇÃO 3D-IN NOS TEMPOS DE 48, 72 E 96 HORAS.....	45
5.5	AVALIAÇÃO POR MICROSCOPIA CONFOCAL DO CITOESQUELETO DAS CÉLULAS HEPÁTICAS NAS CONDIÇÕES DE CULTIVO 2D, 3D-ON E 3D-IN NOS TEMPOS DE 48 E 96 HORAS.....	47
5.6	AVALIAÇÃO POR MICROSCOPIA CONFOCAL DA DISTRIBUIÇÃO E MORFOLOGIA DAS CÉLULAS HEPÁTICAS NAS CONDIÇÕES DE CULTIVO 2D, 3D-ON E 3D-IN, NO EIXO Z (ESPESSURA DA MATRIZ) NO TEMPO DE 48 HORAS	49
5.7	AVALIAÇÃO POR MICROSCOPIA CONFOCAL DAS CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DAS CÉLULAS HEPÁTICAS NAS CONDIÇÕES DE CULTIVO 2D, 3D-ON E 3D-IN NOS TEMPOS DE 48 E 96 HORAS	51
5.8	QUANTIFICAÇÃO DAS CÉLULAS HEPÁTICAS QUE EMITEM PROLONGAMENTOS CITOPLASMÁTICOS NAS CONDIÇÕES 2D, 3D-ON E 3D-IN NO TEMPO DE 48 HORAS.....	53
5.9	AVALIAÇÃO POR MICROSCOPIA CONFOCAL DA ANCORAGEM DAS CÉLULAS HEPÁTICAS NAS CONDIÇÕES DE CULTIVO 2D, 3D-ON E 3D-IN NOS TEMPOS DE 48 E 96 HORAS.....	54
5.10	AVALIAÇÃO POR MICROSCOPIA CONFOCAL DAS FIBRAS DE TENSÃO Dos MICROFILAMENTOS DE ACTINA DAS CÉLULAS HEPÁTICAS NAS CONDIÇÕES DE CULTIVO 2D, 3D-ON E 3D-IN NOS TEMPOS DE 48 E 96 HORAS	58

5.11	AVALIAÇÃO DA SECREÇÃO DE ALBUMINA POR ELISA DAS CÉLULAS HEPÁTICAS (2D, 3D-ON E 3D-IN) NOS TEMPOS DE 48 E 96 HORAS	60
6	CONCLUSÃO	61
7	REFERÊNCIAS	62
8	ANEXOS	67
	ANEXO 1: PROTOCOLO PARA CULTIVO EM 3D	67
	ANEXO 2: ETAPAS PRÉ-PROTOCOLOS PARA FLUORESCÊNCIA E IMUNOFLUORESCÊNCIA	69
	ANEXO 3: PROTOCOLO PARA FLUORESCÊNCIA	71
	ANEXO 4: PROTOCOLO PARA IMUNOFLUORESCÊNCIA	72

1 INTRODUÇÃO

1.1 A IMPORTÂNCIA DO CULTIVO TRIDIMENSIONAL

Nos últimos anos o cultivo tridimensional (3D) vem crescendo com o objetivo de estimular os estudos *in vitro* e, desse modo, reduzir a dependência dos estudos *in vivo* (CASEY *et al.*, 2016). A mudança das culturas em monocamadas (2D) para culturas 3D é motivada pela necessidade de trabalhar com modelos celulares que mimitizem as funções dos tecidos vivos. Aspectos do comportamento celular, como a sinalização mecânica e bioquímica e a comunicação célula-matriz extracelular (MEC) são perdidas pelas culturas de células desenvolvidas em "placas de petri" (MAZZOLENI *et al.*, 2009). Isso limita seu potencial de prever as respostas celulares de organismos reais.

Em modelos 3D, umas das vantagens é a sobrevivência prolongada das células, podendo servir como alternativa ao uso de animais no desenvolvimento de fármacos para diversas terapias na medicina regenerativa (KOSTADINOVA, *et al.*, 2013). Estudos mostraram que há diferença da cultura celular 3D na predição da eficácia da droga que induz a hepatotoxicidade, comparada com a cultura 2D. As células hepáticas humanas, bem como de animais modelo cultivadas em 3D foram menos suscetíveis ao metotrexato (fármaco utilizado no tratamento de câncer), comprovando uma melhor confiabilidade para testes de drogas (YIN, *et al.*, 2009 e MENG, 2010). No entanto, o estabelecimento de culturas 3D como uma abordagem dominante requer o desenvolvimento de protocolos padrão, novas linhagens de células e métodos de análises qualitativos, que incluem técnicas de imagens 3D bem padronizadas.

Um modelo de cultivo bastante utilizado para estudos *in vitro* é o cultivo de células hepáticas derivadas de um Carcinoma Hepatocelular (CHC), as HepG2. Em pesquisa bibliográfica constatou-se que entre várias linhagens celulares humanas, a busca do termo "HepG2 cells" no *Pubmed* retornou (fevereiro de 2019) 33530 artigos, sendo mais de 2500 artigos/ano nos últimos cinco anos. A linhagem celular HepG2 é derivada de células humanas e conserva características morfológicas e funcionais de hepatócitos normais. Elas também apresentam uma fácil manutenção e estabilidade fenotípica em cultura, o que foi caracterizado em trabalho anterior da própria autora (PIMENTEL, 2017).

1.2 HEPATÓCITOS

O hepatócito é a célula mais versátil do organismo, com funções endócrinas e exócrinas, mas que também detoxifica, transporta e estoca diversas substâncias (Figura 1).

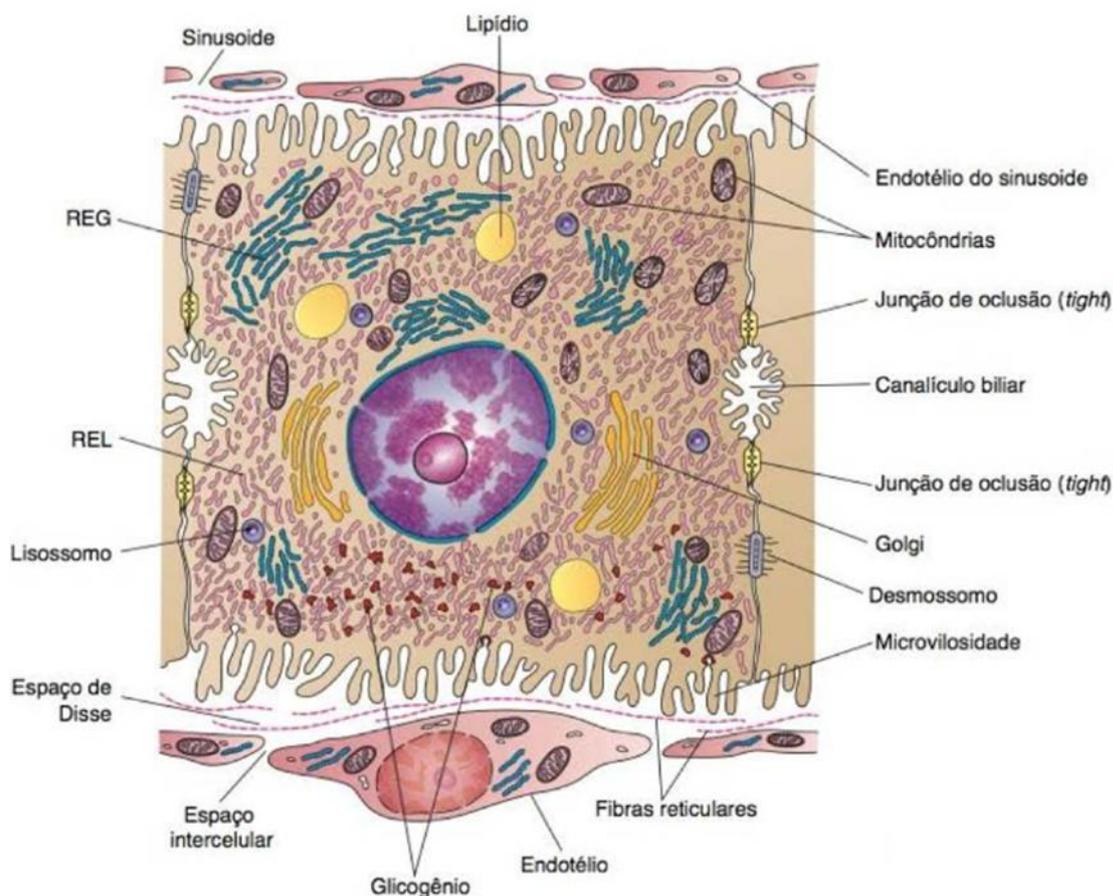


Figura 1. Representação da ultraestrutura de um hepatócito. A figura mostra o retículo endoplasmático granuloso (REG); retículo endoplasmático liso (REL). Células dos capilares sinusoides também estão demonstradas. Fonte: JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2013.

Hepatócitos são células poliédricas, com seis ou mais superfícies, e apresentam um ou dois núcleos arredondados, contendo um ou dois nucléolos. Alguns núcleos são poliplóides e são caracterizados pelo seu tamanho maior (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2013). O citoplasma é eosinofílico, principalmente devido ao grande número de mitocôndrias, que podem chegar até a 1000 por célula (ROSS e PAWLINA, 2012). A célula hepática contém abundante retículo endoplasmático, tanto liso quanto granuloso. O retículo endoplasmático liso (REL) é um sistema lábil, que reage prontamente às moléculas recebidas pelo hepatócito. Sob condições em que o hepatócito é desafiado por medicamentos, toxinas ou estimulantes metabólicos, o REL pode se tornar a organela predominante da célula, elevando assim a capacidade de detoxificação do órgão. Já o retículo endoplasmático rugoso (RER) é a organela responsável pelos processos de oxidação, metilação e conjugação requeridos para a inativação ou detoxificação de vários fármacos, drogas e substâncias antes de sua excreção pelo organismo. Além disso, os complexos de Golgi no hepatócito também são numerosos. As funções dessa organela incluem a formação de lisossomos e a secreção de proteínas

plasmáticas (albumina, proteínas do sistema complemento), glicoproteínas (transferrina), lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL), lipoproteínas de baixa densidade (LDL), lipoproteínas de alta densidade (HDL) e quilomícrons. Geralmente o hepatócito não armazena proteínas em grânulos de secreção no citoplasma, mas secreta continuamente para a circulação sanguínea (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2013; ROSS e PAWLINA, 2012).

1.3 CULTURA DE CÉLULAS PRIMÁRIAS DE HEPATÓCITOS

A cultura primária de hepatócitos ainda representa um desafio para o estudo *in vitro*. Diversos grupos já mostraram que essas células não são capazes de se manterem funcionais por mais de uma semana em cultura convencional. Além disso, seu potencial proliferativo *in vitro* também é reduzido (GUO *et al.*, 2011; FUKUDA *et al.*, 2017). A cultura de explantes constitui uma técnica promissora, porém apresenta algumas limitações, como o tempo de incubação do tecido, viabilidade celular e manutenção das condições existentes *in vivo*. Portanto, boa parte dos estudos com o modelo de explante busca aprimorar as técnicas de forma a superar essas limitações contribuindo em diversos ramos da ciência, com utilização de diferentes tecidos (BASSO e BRACARENSE, 2013). Já na cultura primária as células sofrem estresse, devido aos processos de isolamento, o que pode alterar os resultados obtidos (WILKENING *et al.*, 2003; ASTASHKINA *et al.*, 2012; UKAIRO *et al.*, 2013).

1.4 USO DE LINHAGEM CELULAR IMORTALIZADA COMO MODELO DE ESTUDO

1.4.1 Células HepG2

A linhagem celular hepática imortalizada HepG2 é constituída por células derivadas do tecido hepático humano. Ela foi obtida originalmente em 1975, a partir de uma biópsia de fígado de um indivíduo caucasiano, de 15 anos de idade, do sexo masculino e que possuía um CHC bem diferenciado (IHRKE *et al.*, 1993; WILKENING *et al.* 2003) (Figura 2).

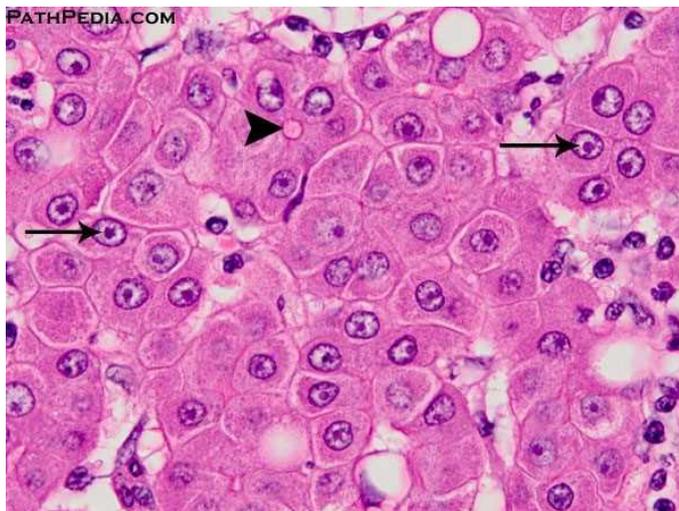


Figura 2. Fotomicrografia de um Carcinoma Hepatocelular. Este exemplo de CHC bem diferenciado mostra células hepáticas poligonais com semelhança aos hepatócitos normais, mas que mostram núcleos ampliados (alta relação núcleo/citoplasma), com nucléolos proeminentes (setas). Nota-se as membranas celulares distintas e a presença de um canalículo biliar dilatado (ponta de seta) rodeado pelos hepatócitos. Fonte: PATHPEDIA, 2016.

As HepG2 apresentam aspecto arredondado e crescem, geralmente, aderidas ao plástico de cultura, proliferam sobrepostas e formam aglomerados confluentes, conforme descrito pelo fabricante em sua folha de dados (catálogo: C3A [HepG2/C3A, *derivative of HepG2* (ATCC HB-8065)] (ATCC® CRL-10741™)) (Figura 3). A morfologia das células tumorais HepG2 é epitelial. Essa linhagem hepática apresenta morfologia semelhante à célula epitelial do fígado, além de manter a capacidade de sintetizar e secretar a maioria das proteínas plasmáticas características das células normais do fígado, como por exemplo, a albumina, protrombina e fibrinogênio (ROSS e PAWLINA, 2012). Ainda, essas células mantêm as atividades das enzimas das fases I e II na biotransformação que estão envolvidas na metabolização de genotóxicos ambientais (KNASMULLER *et al.*, 2004). Dessa forma, são um ótimo modelo de estudo para efeitos tóxicos e genotóxicos, já que apresentam vários marcadores de hepatotoxicidade *in vitro*, o que facilita a extrapolação de resultados (STONE *et al.*, 2009). Apesar das suas limitações metabólicas, é defendido que os estudos de citotoxicidade nas células HepG2 podem prever a hepatotoxicidade *in vivo* com 80% de sensibilidade e 90% de especificidade (O'BRIEN *et al.*, 2006; NOOR *et al.*, 2009).

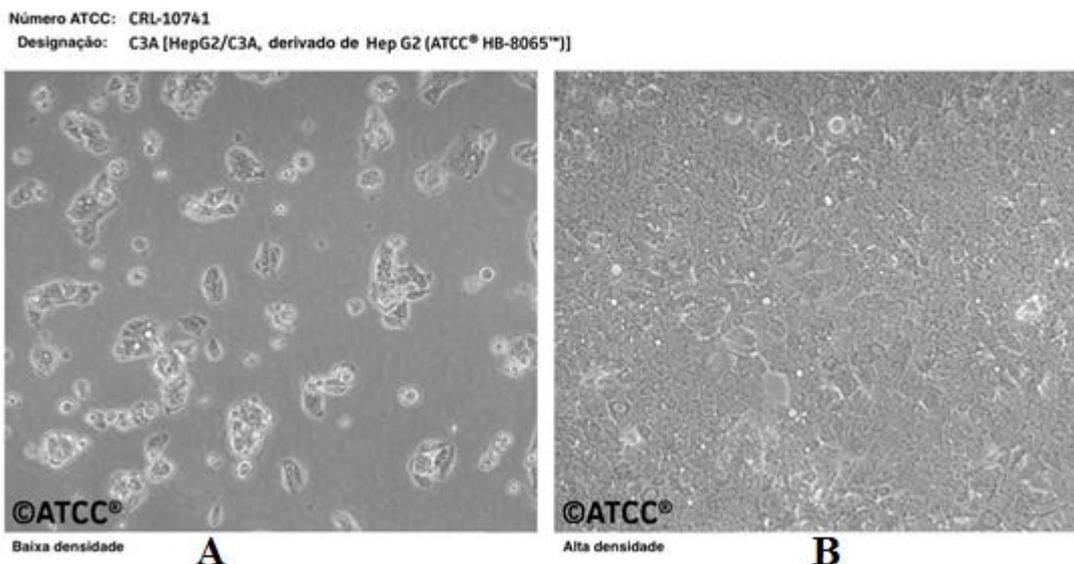


Figura 3. Microscopia de contraste de fase das células HepG2 em baixa (Figura 3A) e alta densidade (Figura 3B), conforme publicado pelo fabricante (ATCC) em sua folha de dados. Magnificação de 20x. Barra de escala de 100 μ m. Adaptado de: <https://www.atcc.org/Products/All/CRL-10741.aspx>.

1.4.2 Modelo de Cultivo em 2D

Por mais de um século, culturas de células 2D têm sido usadas como modelos *in vitro* para estudar as respostas celulares a estímulos biofísicos e bioquímicos. Embora essas abordagens sejam bem aceitas e tenham avançado significativamente a compreensão do comportamento das células, evidências crescentes mostram que, em algumas circunstâncias, os sistemas 2D podem resultar em bioatividades celulares que desviam sensivelmente a resposta *in vivo* (DUVAL *et al.*, 2017). Assim, a principal desvantagem nesse modelo de cultivo 2D é a variação no ambiente plano e rígido onde se encontram as células, aderentes à placa de plástico de forma unidirecional, impactando na sua forma (GODOY *et al.*, 2013). Além disso, as limitações das interações célula-célula e célula-matriz somadas a perda de morfologia nativa, podem induzir as culturas 2D a erros na predição de respostas do tecido específico (PAMPALONI *et al.*, 2007).

Ainda assim, o cultivo em 2D é um método tradicionalmente utilizado devido a seu baixo custo e fácil execução. As células são aderidas na superfície de placas, frascos de plásticos ou de vidro compondo um sistema estático (PAMPALONI *et al.*, 2007). Essas características tornam as plataformas 2D atraentes para pesquisadores, biomédicos, biólogos e usuários clínicos devido à simplicidade e eficiência. Essas culturas de células *in vitro* são frequentemente usadas para promover a compreensão dos mecanismos subjacentes ao comportamento celular *in vivo*. Esses comportamentos incluem diferenciação celular,

migração, crescimento e mecânica, todos impactados por seu microambiente bioquímico e biomecânico (HUH *et al.*, 2012). Decifrar os mecanismos por trás desses comportamentos é vital para a compreensão dos processos *in vivo* que resultam na formação e função de tecidos e órgãos. No entanto, o modelo de cultivo 2D não fornece controle da forma da célula, o que determina sinais biofísicos que afetam as bioatividades celulares *in vivo* induzindo uma polaridade apical-basal, que não é natural *in vivo*. Essa polaridade induzida pode alterar as funções das células nativas no que diz respeito à disseminação, migração e detecção de fatores solúveis e outros estímulos microambientais (IHALAINEN, *et al.*, 2015).

De acordo com Duval e colaboradores (2017), a expressão fenotípica também é alterada dependendo do método de cultura utilizado. Células cultivadas em poliestireno rígido de cultura de tecidos 2D apresentam mais alterações de expressão gênica do que culturas em 3D conduzidas em materiais menos rígidos, como colágenos e hidrogéis. Esse método 2D afeta a expressão dos genes do remodelamento da matriz, da contratilidade e do citoesqueleto (MABRY *et al.*, 2015). Além disso, Pineda e colaboradores (2013) mostraram que células crescidas em 2D expressaram níveis mais altos de elementos do citoesqueleto e proteínas da MEC em relação às cultivadas em culturas 3D. As combinações desses fatores influenciam a proliferação celular, a diferenciação e a expressão gênica (PINEDA *et al.*, 2013). Porém, a cultura de células tornou-se uma ferramenta indispensável para ajudar a descobrir os mecanismos biofísicos e biomoleculares fundamentais pelos quais as células se agrupam nos tecidos e órgãos, como esses tecidos funcionam e como essa função se desintegra na doença. Atualmente, a cultura de células é amplamente utilizada em pesquisa biomédica, engenharia de tecidos, medicina regenerativa e práticas industriais (DUVAL *et al.*, 2017).

Nesse contexto, embora as células HepG2 tenham uma boa estabilidade fenotípica e fácil gestão em cultura, em cultivo 2D elas apresentam uma expressão limitada de enzimas metabolizadoras de fármacos. A ausência ou baixa expressão das isoformas do sistema do citocromo P450 nessa linhagem humana dificultam a detecção de metabólitos (BRANDON *et al.*, 2003; WILKENING, 2003). Rodriguez-Antona e colaboradores (2002) atribuíram a baixa expressão do sistema citocromo P450, em linhagens de hepatocarcinoma humano, à redução da transcrição das CYPs e alterações na expressão de fatores de transcrição. Embora os mecanismos que levam à baixa expressão das enzimas P450 em linhagens celulares não tenham sido ainda totalmente elucidados, sabe-se que está relacionada ao processo de imortalização da linhagem celular, ou seja, ao longo do processo de adaptação e imortalização, que farão com que estas células se multipliquem indefinidamente, ocorre a

desdiferenciação celular, com perda das funções celulares específicas (HAHN, 2002). Devido à baixa expressão das enzimas do sistema citocromo P450 estudos têm sido desenvolvidos com intuito de aumentar a expressão destas enzimas, na tentativa de tornar as linhagens de hepatocarcinoma humano um modelo mais representativo da situação *in vivo*. Apesar de a cultura de células planas, modelo 2D ter predominado, pesquisas recentes mudaram para cultura que utilizam estruturas 3D e microambientes bioquímicos e biomecânicos mais realistas. Desta forma, novas técnicas de cultivo de linhagens celulares, que aumentem a expressão destas CYPs, têm sido propostas, como por exemplo, o desenvolvimento de técnicas de culturas 3D (ELKAYAM *et al.*, 2006; NAKAMURA *et al.*, 2011). Assim, em culturas 2D convencionais, as HepG2 não são competentes metabolicamente e, portanto, os resultados de seu cultivo não são amplamente extrapolados para estudos em humanos (GODOY *et al.*, 2013; RAMAIAHGARI *et al.*, 2014).

1.4.3 Modelo de Cultivo em 3D

O modelo de cultivo em 3D fornece um ambiente de sustentação às células, um sistema não estático que é análogo aos tecidos e aos órgãos. De acordo com Godoy e colaboradores (2013) esse sistema 3D pode mimetizar as propriedades bioquímicas e mecânicas dos tecidos promovendo interações célula-célula e célula-matriz extracelular, que são necessárias para o desenvolvimento funcional das células. Os primeiros relatos relacionados ao uso do cultivo celular 3D foram descritos por Bissell e colaboradores na década de 90. Inicialmente, os achados publicados já demonstravam um impacto positivo em muitos aspectos relacionados às células, como a disposição em colônias, morfologia celular, emissão de prolongamentos e migração, além de fornecer um método para avaliação do potencial tumorigênico de diferentes tipos celulares (DUVAL *et al.*, 2017). Desde então, a existência de uma camada mimética de MEC passou a marcar os estudos envolvendo cultivo de células humanas.

A partir deste momento, muitos estudos objetivaram a produção de diferentes miméticos de matriz à base de componentes de MEC, tais como colágeno e laminina, que atualmente são vendidos comercialmente (FISCHBACH *et al.*, 2007). A partir dos anos 2000, a literatura voltou-se a explorar o mundo 3D tornando o cultivo celular uma técnica proporcionadora de um ambiente mais próximo da realidade. Graças ao ambiente dinâmico proporcionado em 3D, diversos estudos propuseram diferentes formas e técnicas de cultivo 3D. A produção de esferoides trouxe diferentes possibilidades ao cultivo celular. Graças a capacidade de mimetizar eventos de embriogênese, organogênese e morfogênese, eles

passaram a ser utilizados como unidades morfofuncionais miméticas de um tecido vivo, podendo ser produzidos a partir de diferentes tipos celulares e assim utilizados em muitas estratégias de terapia celular e medicina regenerativa. Além dos esferoides, outras técnicas de cultivo celular foram produzidas, como a utilização de organoides celulares produzidos por bioimpressão 3D (ZHANG *et al.*, 2017).

Os organoides já foram utilizados em muitos estudos envolvendo cultivo celular possibilitando avanços potenciais em diferentes áreas da ciência, como a neurologia, nos estudos de infecções gestacionais que levam a danos neurais no paciente e no feto (LANCASTER *et al.*, 2013), além de produzir eficientes resultados em outras áreas. Pesquisadores da Universidade de Harvard, em parceria com outras universidades, também utilizaram, por exemplo, células do coração: cardiomiócitos derivados de células-tronco pluripotentes induzidas (iPSCs) para a obtenção de músculo cardíaco (ou miocárdio). No estudo, realizou-se a bioimpressão de um hidrogel contendo células epiteliais. Cardiomiócitos foram então associados ao biomaterial impresso, dando origem a um miocárdio endotelizado. A chamada endotelização é importante para ajudar na formação de vasos sanguíneos, promovendo a vascularização do tecido formado. O método criado para gerar os organoides endotelizados pela técnica de bioimpressão 3D pode ser útil na medicina regenerativa, não só na obtenção de substitutos de miocárdio afetado, mas também para outros tipos de tecidos, estendendo-se para outras aplicações, como análise de toxicidade de fármacos a fim de melhorar a eficácia de tratamentos existentes para doenças cardiovasculares em geral (ZHANG *et al.*, 2016).

Em paralelo à bioimpressão 3D, grandes avanços da microfluídica possibilitaram a produção de dispositivos, como *chips*, que podem ser utilizados para mimetizar órgãos e tecidos específicos, conhecidos como *organ-on-chip* (BALIJEPALLI e SIVARAMAKRISHAN, 2017). Até o presente momento, esse tipo de cultivo celular 3D já foi utilizado para mimetizar o pulmão, fígado, rim e placenta, além de outros órgãos. Além dos *organ-on-chips*, a própria MEC dos órgãos passou a ser utilizada como uma técnica de cultivo em 3D (HUH *et al.*, 2012, WILMER *et al.*, 2016, LEE *et al.*, 2016).

Os tecidos dos organismos vivos são compostos de células e MEC (colágenos, elastina, fibronectina, laminina, glicosaminoglicanas, proteoglicanas, etc.) (SMETANA, 1993). A MEC de fígados adultos é dominada por fibronectina, seguido de grande proporção de colágenos tipo I e III, além de proteoglicanos sulfatados. Apresenta ainda, em menor proporção, laminina, ácido hialurônico e colágeno do tipo IV. A MEC hepática proporciona elasticidade e rigidez ao órgão e facilita a troca de fluidos e a distribuição destes através dos

tecidos. Tais funções como suavidade, elasticidade e resistência são adquiridas pela interação dinâmica das células hepáticas e da MEC (ARIAS *et al.*, 2009). Além disso, a MEC por ser constituída por várias proteínas, dentre elas, os colágenos, pode orientar a manutenção do fenótipo dos hepatócitos, bem como sua diferenciação e proliferação, tanto *in vitro* como *in vivo* (MARTINEZ-HERNANDEZ e AMENTA, 1995).

Para isso, toma-se como exemplo o colágeno I que é a principal proteína constituinte da MEC em diversas estruturas dos tecidos; a sua manutenção e degradação podem influenciar diretamente as funções biológicas, bem como o crescimento, proliferação, diferenciação e migração das células (ARIAS *et al.*, 2009).

Dentro do contexto do cultivo em 3D, um dos componentes intracelulares bastante estudado para analisar a morfologia celular, é o citoesqueleto, uma vez que é uma rede dinâmica e intrincada de filamentos proteicos e túbulos, sendo composto por três tipos de estruturas. O primeiro tipo, os microfilamentos, são constituídos por monômeros de actina e proteínas associadas. Exercem muitas funções nas células como, locomoção celular, transporte intracelular, etc, processos esses bastante dinâmicos. Já o segundo tipo, os microtúbulos, são estruturas cilíndricas formadas por subunidades α e β da proteína tubulina e sua organização é estável (como cílios, flagelos, etc) e lábel (citoesqueleto citoplasmático). Por fim, o terceiro tipo, os filamentos intermediários, que são os mais abundantes do citoesqueleto e conferem resistência mecânica às células (DE SOUZA *et al.*, 2010).

Além do mais, a junção entre os hepatócitos e a MEC é realizada na forma de adesões focais. Elas são relevantes na comunicação da MEC com o meio intracelular, pois essas junções ancoram os microfilamentos de actina do citoesqueleto à membrana basal, sinalizando variações de tensão. Essas estruturas são responsáveis pela interação entre os microfilamentos de actina com os receptores transmembranares que se ligam aos componentes da MEC. A proteína vinculina permite visualizar os pontos de ancoragem das células nos substratos. Ela é uma proteína de ligação dos microfilamentos de actina associada com as interações célula-célula e célula-matriz (ALBERTS *et al.*, 2010). Assim, as adesões focais criam uma ligação dinâmica e estrutural entre o citoesqueleto e as proteínas da MEC (ROSS e PAWLINA, 2012). Ao contrário do cultivo 2D, o cultivo em 3D mantém a funcionalidade, a polaridade e a morfologia de células hepáticas (GODOY *et al.*, 2013). De acordo com Pampaloni e colaboradores (2007) o cultivo 3D preenche a lacuna entre a cultura celular e o tecido *in vivo*, ou seja, é o que mais se aproxima do ambiente natural da célula. Já na cultura celular convencional 2D a célula fica delimitada no plano apical e basal, podendo alterar sua morfologia. O diferencial da cultura 3D é permitir que as células explorem as três

dimensões do espaço (eixos x, y e z), potencializando as interações entre o ambiente e as células. Dessa forma, pode ser estabelecido uma rede de comunicação em 3D, que mantém a especificidade e homeostasia do tecido (PAMPALONI *et al.*, 2007).

1.4.4 Biomaterial para Modelo de Cultivo em 3D

O cultivo 3D utilizando um suporte ou matriz mimetiza o tecido *in vivo*. Os materiais destacados para suporte são agarose, colágeno, gelatina, laminina, fibronectina e polímeros sintetizados (RAVI *et al.*, 2015). Dependendo da natureza do estudo, existem requisitos para a escolha do suporte, cujo material não pode ser citotóxico e deve proporcionar a morfologia e comportamento fisiológico apropriados às células cultivadas. Portanto, as características como a porosidade, elasticidade, permeabilidade e estabilidade da matriz 3D são essenciais para criar um microambiente adequado para a proliferação e aderência das células (AAMODT e GRAINGER, 2016). O colágeno I é um biomaterial derivado de tecidos orgânicos e tem como característica a considerável força de tensão, alta afinidade com a água, baixa antigenicidade (TOMIZAWA, 2005). Além disto, o colágeno tipo I é abundante no organismo como um todo e é parte integrante da MEC do fígado (ARIAS *et al.*, 2009).

1.5 MICROSCOPIA ÓPTICA – HISTÓRICO

A microscopia é definida como um conjunto de técnicas que possibilitam a investigação científica por meio de um microscópio (MICHAELIS, 2019). A invenção deste equipamento foi propulsionada pelo anseio em se observar estruturas cada vez menores, principalmente aquelas que não são visíveis ao olho humano. Isso garantiu o avanço científico e tecnológico em diversas áreas, mas permitiu, em especial, o estabelecimento de um campo da ciência atualmente conhecido como citologia. O estudo das células, de sua morfologia, estrutura e composição molecular, bem como de suas organelas e seu funcionamento só foi possível devido ao advento do microscópio.

Este instrumento despertou grande interesse e levou ao surgimento de muitos modelos, com crescente escala de complexidade. Do ponto de vista histórico, foi marcante os trabalhos de Anton Van Leeuwenhoek, o qual se interessou pela montagem de microscópios e implementou relevantes observações de organismos, sobretudo de microrganismos presentes na natureza; Marcelo Malpighi produziu importantes exposições microanatômicas utilizando um microscópio rudimentar, tornando-se assim, o pai da Histologia; Robert Hooke conhecido pela famosa descrição da célula, fez observações sobre um grande número de organismos e os

estudos iniciais de Ernest Abbe, em 1877, que consolidou o conceito de resolução, dando origem a uma fase que perdura até os dias atuais (MURPHY, 2001; DE SOUZA *et al.*, 2010).

Assim, a partir desses trabalhos, efetivamente pode-se considerar a microscopia como uma área bem definida (DE SOUZA *et al.*, 2010) e que passou a estimular profissionais interessados no seu crescimento bem como outros especialistas que iriam manipular os instrumentos existentes para revelar ao mundo científico novos detalhes sobre a organização e composição dos sistemas biológicos.

Atualmente existem muitos tipos de microscopia de luz: de contraste de fase e de contraste interferencial, de polarização, de fluorescência, confocal e multifotônica e pinças ópticas (DE SOUZA *et al.*, 2010). Um microscópio moderno pode realizar inúmeras funções através de uma enorme gama de métodos e arranjos ópticos relacionados, como por exemplo, a microscopia confocal a laser. A microscopia de luz tornou-se cada vez mais importante, em grande parte devido ao desenvolvimento de métodos para a marcação específica e a obtenção de imagens dos constituintes celulares individuais, assim como a reconstrução da sua arquitetura tridimensional (ALBERTS, 2010).

A utilização da microscopia de luz para o estudo das células tem como objetivo a observação de detalhes finos que não poderiam ser vistos ao olho nu. No entanto, há limitações físicas que determinam uma distância mínima entre dois pontos que permita distingui-los como objetos distintos. Esta distância denomina-se limite de resolução, ou seja, é o que determina a riqueza de detalhes da imagem fornecida por um sistema óptico de luz, e um aumento maior não revelará nenhum detalhe adicional da estrutura. Assim, quanto menor for essa distância, maior é a resolução da imagem (MANNHEIMER, 2002). E a busca por uma melhor resolução de imagem tem levado a um grande avanço na microscopia.

1.5.1 Estudo das células hepáticas em cultivos 3D por microscopia confocal

No campo das ciências biológicas, um desafio é a análise de estruturas espessas, como células arredondadas e tecidos (DIASPRO *et al.*, 2008). Uma das soluções inicialmente propostas para superar esse empecilho foi o corte do tecido em camadas muito finas, com espessura de micrômetros. No entanto, isso levou ao surgimento de um novo problema: a perda da sua estrutura 3D durante o processamento. E isso só foi solucionado com o desenvolvimento da microscopia confocal, que ao invés de requisitar cortes físicos da amostra, são feitos cortes ópticos, preservando, desse modo, a ultraestrutura do espécime. (SEMWOGERERE e WEEKS, 2005).

Assim, corte histológico ou qualquer amostra espessa apresenta dificuldades para a análise por microscopia de fluorescência convencional, pois quanto maior a profundidade (Z), mais difícil é a observação de imagens nítidas e focadas nesse tipo de microscópio. A epifluorescência implica em uma iluminação da amostra de forma homogênea, ou seja, é a mesma no plano focal e nos planos fora de foco (luz difratada). Dessa forma, todas as moléculas de fluorescência deste volume são excitadas e os fótons emitidos são coletados ao mesmo tempo (MURPHY, 2001 e DIASPRO *et al.*, 2008). A imagem final é conseqüentemente uma superposição de luz proveniente dos planos em foco e fora de foco, podendo causar assim, uma redução dramática no contraste final da imagem (Figura 4).

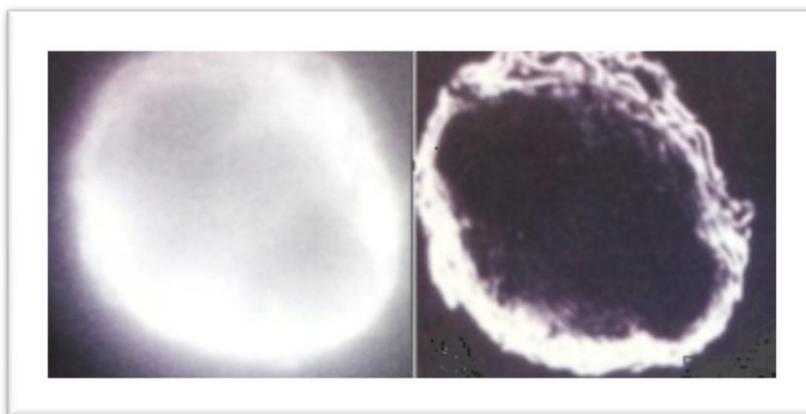


Figura 4. Microscopia de epifluorescência convencional e confocal. Imagem de uma célula de plasmocitoma marcada para retículo endoplasmático. Direita: imagem de epifluorescência. Esquerda: imagem confocal. O efeito de seccionamento permite que detalhes estruturais do retículo celular sejam vistos. Fonte: DIASPRO *et al.*, 2008.

O princípio da microscopia confocal foi descrito em 1955 por Marvin Minsky, no qual ele visava solucionar uma das maiores limitações para se obter uma boa resolução de imagem: a difração da luz – relevante especialmente em amostras espessas. Para isso, ele desenvolveu o *pinhole*, um anteparo com um orifício (Figura 5) que bloqueia toda a luz fora de foco, ou seja, a luz difratada (fora de foco). Dessa forma, com a seleção de um único plano focal há uma melhoria na resolução da imagem, bem como a obtenção de cortes ópticos que posteriormente possibilitam a análise do objeto nos seus três eixos espaciais (x, y e z). Portanto, a microscopia confocal baseia-se na iluminação por varredura de uma fonte de luz puntiforme, o laser, ou seja, ponto-a-ponto, de um espécime biológico normalmente tratado ou marcado com compostos fluorescentes. A luz refletida pela amostra (usualmente sob a forma de fluorescência) atravessa uma abertura mecânica (*pinhole*) que bloqueia feixes provenientes de pontos acima e abaixo do plano focal (Figura 5Z). Esse conceito proposto por

Minsky é utilizado nos microscópios confocais desde a década de 80 (MURPHY, 2001 e DE SOUZA, *et al.*, 2010).

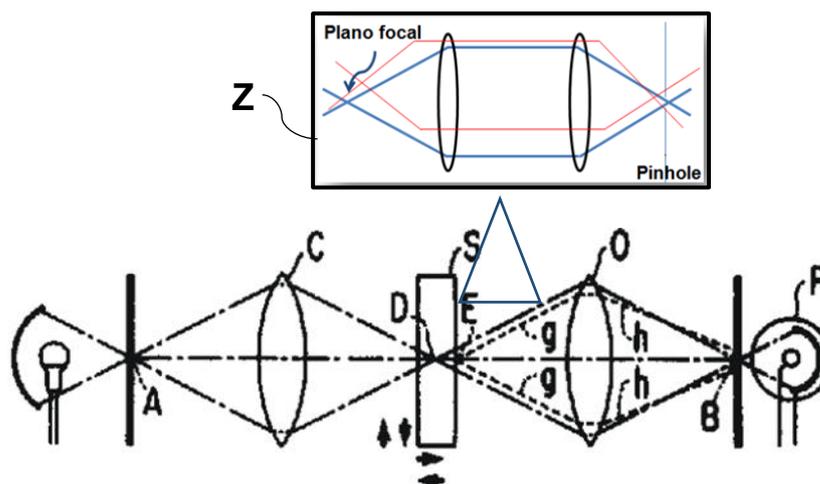


Figura 5. Desenho esquemático do princípio da microscopia confocal. Em (A) há a captação da luz, a mesma passa por um orifício capaz de filtrar vários raios de luzes; a luz divergente encontra uma lente convergente (C), a qual vai focalizar a luz no espécime que pode ser na objetiva (S). Desta forma, a luz que chegou no ponto de foco da objetiva (D) chega no detector, tendo uma imagem completamente em foco. A luz gerada no ponto D vai divergir e encontrar uma lente de tubo que tem um foco (O), onde a segunda lente (B) focaliza a luz que vai divergir em direção a câmera. O ponto E está sendo iluminado, mas está fora de foco, esse sinal (luz) pontilhado vai ser coletado pela objetiva e será condensado e focalizado em outro ponto, contudo a estrutura B é uma chapa preta que não deixa nada passar. Então a luz que está fora de foco não passa por B. A luz em foco passa pelo objeto preto pois no centro de B tem um orifício, o *pinhole*, que permite somente o que está na profundidade de foco da objetiva possa passar por ele. Já a Figura 5Z é o esquema ilustrativo do *pinhole*. A luz de um único plano focal (linha azul) incide através de uma pequena abertura nesse anteparo (*pinhole* confocal). Os raios de luz que vêm de outros planos focais não são corretamente alinhados com o *pinhole* (linha vermelha) e assim são eliminados da imagem. Fonte: SEMWOGERERE e WEEKS, 2005.

1.5.2 Difração *versus* Resolução

A resolução na microscopia óptica é limitada pela difração da luz. Difração é a dispersão da luz que ocorre quando um feixe de luz interage com um objeto. Esse fenômeno físico em um ponto é representado pelos chamados discos de Airy ou padrões de Airy, que são discos rodeados de anéis concêntricos (DE SOUZA *et al.*, 2010).

Assim, moléculas fluorescentes quando são excitadas sequencialmente em pequenas áreas, como no microscópio confocal, produzem cada uma um padrão de Airy (Figura 6) – O diâmetro do disco é definido pela abertura numérica (NA) da objetiva e pelo comprimento de onda da luz de excitação (DIASPRO *et al.*, 2008). A NA é um número que indica o ângulo com o qual a luz entra na lente, ou seja, é o produto do índice de refração (n) do meio imerso e o seno da abertura do ângulo da lente ($\text{sen}\alpha$), a fórmula do físico Abbe é definida como: $NA = n \cdot \text{sen}\alpha$. Pela fórmula pode-se interpretar o papel da NA do sistema, na resolução: quanto maior NA, melhor é a resolução, Figura 7 (DE SOUZA *et al.*, 2010). A resolução de uma

objetiva se determina pela capacidade de separação entre os discos Airy (Figura 6), ou seja, os picos dos mesmos (Figura 7) precisam estar a uma distância mínima para que dois pontos possam ser vistos distintamente, e não a fusão deles. Essa distância (d) é a distância mínima que o microscópio confocal diferencia um objeto do outro: o limite de resolução. Desse modo, enquanto as dimensões do objeto forem menores que o limite de difração, a imagem dessas estruturas sempre será representada como padrão de Airy (DIASPRO *et al.*, 2008). Há uma relação entre o diâmetro do *pinhole* e o diâmetro do centro disco de Airy: quando ambos se coincidem, há a melhor relação entre a resolução e o sinal obtido e é isto que acontece no microscópio confocal (DE SOUZA *et al.*, 2010).

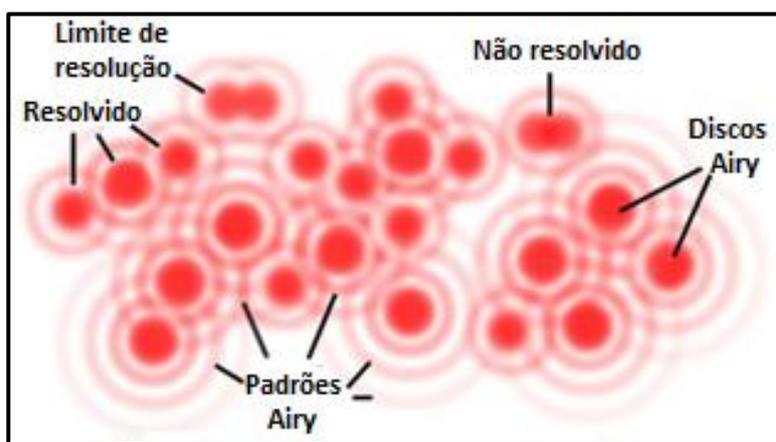


Figura 6. Imagem representativa dos padrões do disco de Airy. As imagens são geradas por difração do objeto. Observa-se vários discos (vermelho escuro) rodeados de anéis concêntricos (vermelho claro). Fonte: Adaptado de DIASPRO *et al.*, 2008.

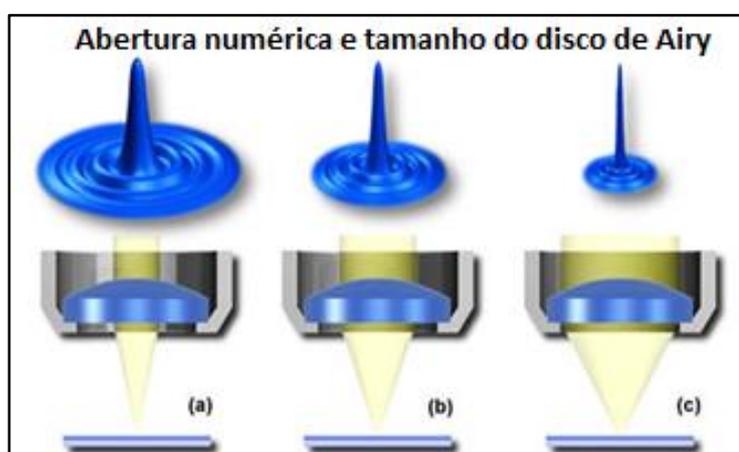


Figura 7. Relação da abertura numérica e o tamanho do disco de Airy. As imagens (a, b e c) dos objetos são limitadas pela resolução que é dada pela fórmula de Abbe e coincide com a distribuição de Airy. Observa-se que o diâmetro do disco (azul) varia de acordo com a relação: quanto maior NA melhor é a resolução da imagem, isto é, o padrão do anel é definido pela NA da objetiva e pelo comprimento de onda da luz. Fonte: Adaptado de DIASPRO *et al.*, 2008.

1.5.3 O Princípio Óptico da Imagem Confocal

O microscópio confocal é um sistema integrado composto por: um microscópio de fluorescência, várias fontes de luz à laser, um escâner de varredura, um computador e monitores para exibição (Figura 8), além de um programa para aquisição, processamento e análises de imagens (MURPHY, 2001). O escâner de varredura é um dos principais componentes do microscópio confocal, no qual são gerados e detectados os sinais de fótons necessários para construção da imagem confocal e, contém os seguintes dispositivos:

- Entradas de uma ou mais fontes de excitação luminosas (lasers);
- Conjuntos de filtros de fluorescência (filtros de emissão e espelhos dicróicos);
- Mecanismo de escaneamento óptico da imagem (par de espelhos: x e y);
- Uma ou mais aberturas variáveis (*pinhole*) para gerar a imagem confocal;
- Um ou mais fotomultiplicadores (PMT) para detecção dos fótons emitidos.

Dessa forma, para gerar a imagem confocal de um espécime (Figura 8), o feixe de laser escaneia o objeto por um mecanismo de varredura, através de um par de espelhos vibratórios de alta velocidade. Um espelho oscila para a esquerda e para a direita enquanto o outro se move para cima e para baixo. Os fótons fluorescentes emitidos de um ponto excitado no espécime são coletados pela objetiva. A luz fluorescente passa então por um espelho dicróico e fica focada no orifício confocal.

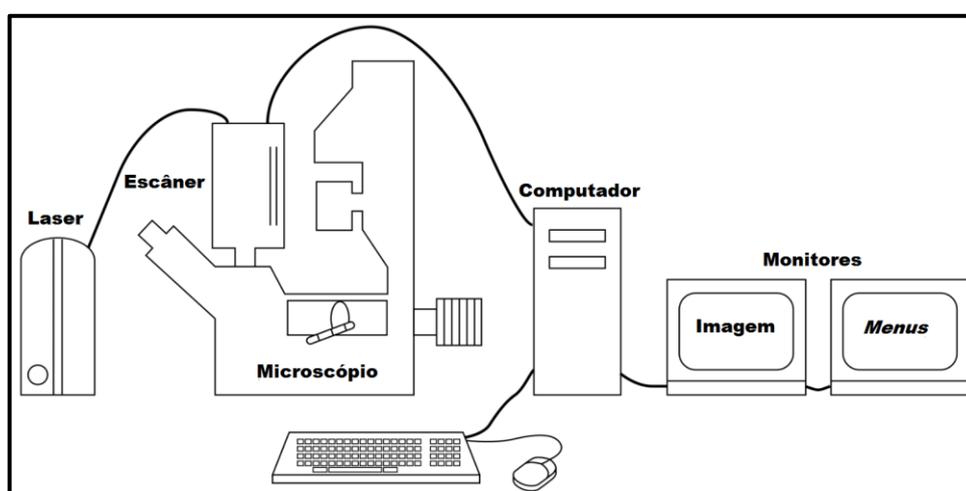


Figura 8. Componentes básicos de um microscópio confocal de varredura a laser (CLSM). Um laser fornece um feixe de luz que varre a amostra pelo escâner de digitalização sob o controle de um computador. O escâner de varredura também direciona os sinais de fluorescência da amostra para o *pinhole* e o PMT. O computador mantém a imagem em uma placa de memória até que ela seja processada e exibida em um monitor de computador. Um segundo monitor exibe menus de programa para aquisição e processamento de imagens. É importante perceber que uma imagem confocal nunca é gerada no microscópio. Em vez disso, a imagem é construída eletronicamente, ponto por ponto ao longo do tempo, a partir de sinais fluorescentes recebidos pelo PMT e acumulados na placa de memória de imagem do computador. Fonte: Adaptado de MURPHY, 2001.

Assim, na microscopia óptica confocal, o componente em destaque é o *pinhole*, que recebe fótons do ponto focal iluminado durante o escaneamento, e exclui os fótons de pontos acima e abaixo do plano focal, ou seja, fora de foco. Assim, a combinação de varredura pontual pelo laser e o uso do *pinhole* como filtro espacial no plano de imagem conjugado é essencial para produzir a imagem confocal (Figura 10). Feixes de ondas fluorescentes são emitidos do ponto excitado no espécime, coletados pela mesma lente objetiva e alinhados ao *pinhole*, localizado na frente de um fotodetector sensível – PMT (Figura 9). Dessa forma, o PMT não “vê” uma imagem, mas recebe uma constante mudança do fluxo de fótons, que é convertido em sinal elétrico; o computador, por sua vez, detecta um sinal de tensão (voltagem) em constante mudança do PMT, o digitaliza e exibe o sinal no monitor na forma de imagem.

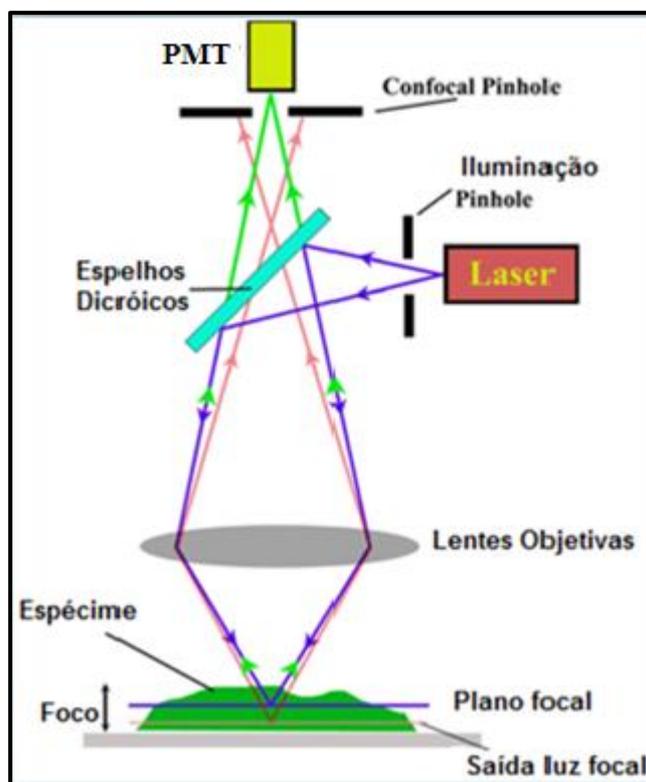


Figura 9. Princípio da microscopia confocal de escaneamento à laser. O comprimento de onda de excitação do laser está alinhado no mesmo plano focal da amostra. Ao ser excitados, os comprimentos de onda fluorescentes emitidos pela amostra são alinhados no orifício do detector (*pinhole*). A luz fluorescente emitida em pontos acima e abaixo do plano de foco da lente objetiva não são alinhadas com o orifício (linhas rosas). Apenas a fração de luz em foco chega ao detector (linhas verdes) (confocal), a informação fora de foco é dessa forma, excluída da imagem final. Os espelhos dicróicos e filtro de barreira (não estão representados) executam as mesmas funções que em um microscópio de epifluorescência convencional. Fonte: Adaptado de MURPHY, 2001.

De acordo com Diaspro e colaboradores (2008) a reconstrução 3D de um objeto requer uma sequência de etapas:

1. Iluminação de uma área pontual na amostra seguida de passagem pelo *pinhole* e de coleta do sinal através do PMT (coleta de *pixels*);
2. Repetição da primeira etapa para formar uma grade de pontos no plano (escaneamento do plano focal) (formação de imagem - Figura 10);
3. Movimento do plano focal no objeto ao longo do eixo óptico (geralmente eixo Z da espessura) e replicação das etapas anteriores (*stack* – coleta em pilha).

No microscópio confocal, cada *pixel* é atribuído a uma determinada posição do laser na grade digitalizada (Figura 10). O tamanho de cada *pixel* é controlado pela ampliação da objetiva e pelo movimento dos espelhos de varredura (DIASPRO *et al.*, 2008 e DE SOUZA *et al.*, 2010).

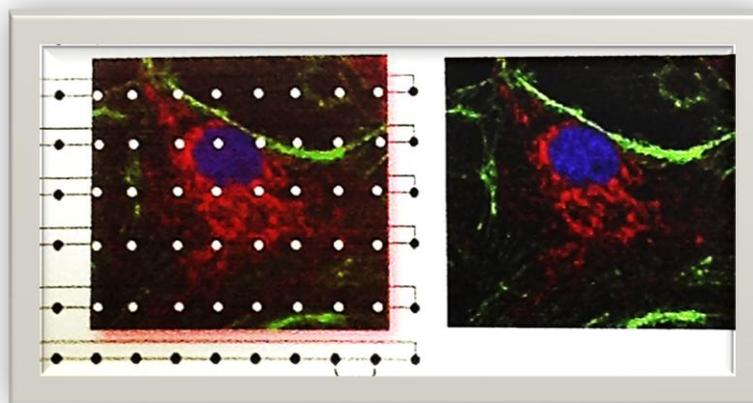


Figura 10. Escaneamento confocal. A aquisição de imagens em um microscópio de escaneamento confocal é realizada pela iluminação sequencial de áreas, em forma de ponto (uma matriz de pontos) com um laser focalizado e registro sucessivo do sinal de fluorescência induzida. Fonte: Adaptado por DIASPRO *et al.*, 2008.

Durante a digitalização o sinal do fóton é exibido em tons de cinza, variando de preto (sem sinal) a branco (sinal máximo de saturação) no monitor do computador, isto é, a imagem adquirida é mostrada em tons de cinza os quais estão relacionados com a intensidade do fóton detectado (MURPHY, 2001).

2 JUSTIFICATIVA

Mediante tudo o que foi explanado sobre o cultivo 3D e a microscopia confocal, torna-se relevante estabelecer um modelo de cultivo celular 3D utilizando como

base de sustentação uma matriz de colágeno I, que possa gerar um microambiente compatível e adequado que mimetize o nicho hepático das células HepG2, utilizando a microscopia confocal para analisar as características morfológicas das células HepG2 nessa matriz 3D. Essa técnica imagiológica ao produzir os cortes ópticos propicia a análise em 3D com alta resolução (DE SOUZA *et al.*, 2010).

Avaliar a funcionalidade das células HepG2 através da análise da secreção de albumina na matriz 3D, por meio do ensaio imunoenzimático ELISA.

O estabelecimento do cultivo 3D das células HepG2 e a validação de sua análise pela técnica de microscopia confocal poderão contribuir futuramente para o estudo padronizado de testes de novos fármacos, reduzindo assim, o uso de animais na pesquisa científica.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Estabelecer um protocolo de cultivo em matriz 3D e análise por microscopia confocal, da linhagem celular hepática – (HepG2).

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Cultivar e expandir a linhagem de células HepG2 na condição 2D (sem matriz);
- Cultivar as células HepG2 na condição ON (sobre a matriz de colágeno I);
- Estabelecer a concentração final de colágeno I para obtenção da cultura 3D das células HepG2 dentro (IN) da matriz de colágeno I;
- Determinar os tempos de cultivo das células HepG2 dentro (IN) da matriz de colágeno I;
- Estabelecer e documentar protocolos para detecção dos microfilamentos de actina através da faloidina (por fluorescência); vinculina e colágeno I (por imunofluorescência) nas células HepG2 nas três condições de cultivo: 2D, ON e IN, a fim de padronizar e minimizar a imprecisão na execução dos procedimentos;
- Validar a microscopia confocal como ferramenta de análise das características morfológicas das células HepG2 nas três condições de cultivo;
- Avaliar a funcionalidade das células HepG2 nas três condições de cultivo por ELISA.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 LINHAGEM CELULAR

A linhagem de células hepáticas HepG2 encontra-se disponível no Banco de Células do Rio de Janeiro e foi adquirida pelo Laboratório de Cardiologia Celular e Molecular da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) no dia 20/05/2014 – BCRJ:0103; Lote:001038; Passagem:10⁶. O Formulário do Produto encontra-se disponível em <https://www.atcc.org/Products/All/HB8065.aspx#characteristics>.

4.1.1 Cultivo Celular, Manutenção, Expansão e Criopreservação das HepG2

Após o descongelamento das HepG2, as células foram cultivadas em meio Dulbecco's Modified Eagle Medium – DMEM low glicose contendo 25 mM de glicose (LGC Biotecnologia) com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) (Gibco), 100 U/mL de penicilina (Gibco) e 100 µg/mL de estreptomicina (Gibco). A troca do meio foi feita a cada 2 dias. As culturas foram mantidas em estufas (SOTELAB-modelo 3130) à 37°C e 5% de CO₂, em uma atmosfera úmida, em placas de cultura aderentes de 100 mm², até que uma confluência de 70% fosse atingida. Quando atingido este estágio, foi feita a dissociação enzimática das células com solução de tripsina - EDTA 0,25% (Gibco), para um número maior de placas de cultura (2 x 10⁶ células com uma área de 100 mm²), para que ocorresse a expansão celular.

Após a expansão, a viabilidade celular foi avaliada utilizando *Trypan Blue* 0,4% (Sigma) (em câmara de *Neubauer*) e as células viáveis contadas e cultivadas em três situações experimentais: HepG2-2D, HepG2-3D-IN e HepG2-3D-ON. Elas foram então avaliadas nos tempos de 24, 48, 72 e 96 horas após o plaqueamento nas três condições.

Para o congelamento, as células foram ressuspensas em solução de 10% de DMSO (dimetil sulfoxido, Sigma) em SFB. A concentração de 2 x 10⁶ células foram criopreservadas em cada criotubo. Os criotubos foram colocados em recipiente propício para o congelamento lento, que proporciona o resfriamento celular na taxa de 1°C por minuto (Mr Frosty® - ThermoFisher), e este acondicionado no freezer a - 80°C.

4.1.2 Condições experimentais

→ HepG2-2D (monocamada – situação controle): Em um fluxo laminar vertical (*Pachane*-modelo PA 340), uma lamínula de vidro (esterilizada) de 13 mm de diâmetro (área de 1,33 cm²) foi colocada (com o auxílio de uma pinça estéril) dentro de uma placa de 24 poços (diâmetro dos poços: 15,4 mm) e com uma área de superfície por poço de 1,86 cm² de plástico

aderente. Em seguida, 2×10^4 células foram ressuspensas em 1 mL de meio de cultivo e colocados na área da placa sobre a lamínula e mantidas em estufa (SOTELAB-modelo 3130) à 37°C e 5% de CO₂, nos tempos estabelecidos de 24, 48, 72 e 96 horas.

→HepG2-3D-ON (cultivo sobre a matriz de colágeno tipo I) - Em um fluxo laminar vertical (*Pachane*-modelo PA 340), a matriz foi feita (utilizando a Tabela 1 como referência das quantidades em µL dos componentes da matriz e suas respectivas concentrações finais de colágeno I) em um tubo cônico (*falcon*) de 15 mL e foi composta por: PBS (do inglês, *phosphate buffered saline*, tampão fosfato salina, LGC Biotecnologia), NaOH (*Reagen* -1 N), água destilada e colágeno tipo I (*Corning*, 354249, em concentração final de 1,0 mg/mL – adaptados da literatura, ROCHA-AZEVEDO, 2013). Dentro desse fluxo laminar vertical, em uma placa com área de superfície de 1,86 cm² (15,4 mm de diâmetro) de plástico, foi desenhado um *scratch* (círculo) de 8 mm de diâmetro (0,8 cm) com auxílio de um compasso (esterilizado). Esse círculo foi feito para controlar a distribuição da solução nessa área definida (0,50 cm²), além de evitar desperdício de produto. A placa foi deixada na luz ultravioleta por 20 minutos. Após esse período, 100 µL da solução final de colágeno tipo I (concentração final: 1,0 mg/mL) foi colocada na placa, dentro desse círculo, e deixada à 37°C por 1 hora para polimerização desta matriz. Após esse período, 2×10^4 de células foram ressuspensas em 1 mL de meio de cultivo e colocados no poço da placa sobre a matriz (HepG2-3D-ON), deixando as células por cima da matriz de colágeno, e sendo mantidas em estufa (SOTELAB-modelo 3130) à 37°C e 5% de CO₂, nos tempos estabelecidos de 24, 48, 72 e 96 horas.

→HepG2-3D-IN (cultivo dentro da matriz de colágeno tipo I) - Em um fluxo laminar vertical (*Pachane*-modelo PA 340), a matriz foi feita (utilizando o Tabela 1 como referência das quantidades em µL dos componentes da matriz e suas respectivas concentrações finais de colágeno I) em um tubo cônico (*falcon*) de 15 mL, com a seguinte composição: PBS (do inglês, *phosphate buffered saline*, tampão fosfato salina, LGC Biotecnologia), NaOH (*Reagen* - 1 N), água destilada, 2×10^4 de células e colágeno tipo I (*Corning*, 354249, em concentrações finais de 0,5; 1,0 e 1,5 mg/mL. Dentro desse fluxo laminar vertical, em uma placa com área de superfície de 1,86 cm² (15,4 mm de diâmetro) de plástico, foi desenhado um *scratch* (círculo) de 8 mm de diâmetro (0,8 cm) com auxílio de um compasso (esterilizado). Esse círculo foi feito para controlar a distribuição da solução nessa área definida (0,50 cm²), além de evitar desperdício de produto. A placa foi deixada na luz ultravioleta por 20 minutos. Após esse período, 100 µL da solução de colágeno tipo I (para todas as concentrações finais: 0,5; 1,0 e 1,5 mg/mL e já contendo as células misturadas e

homoginizadas à matriz na concentração de 2×10^4 mg/mL) foi colocada na placa, dentro desse círculo, e deixada à 37°C por 1 hora para polimerização desta matriz. Após esse período, 1 mL de meio de cultivo foram colocados no poço da placa sobre a matriz (HepG2-3D-IN) e mantidas em estufa (SOTELAB-modelo 3130) à 37°C e 5% de CO₂, nos tempos estabelecidos de 24, 48, 72 e 96 horas.

Tabela 1: Preparação da matriz de colágeno I

Volume (mL)	PBS 10x (µL)	NaOH 1N (µL)	H ₂ O destilada (µL) *	[] Colágeno I (µL) 0,5 mg/mL	[] Colágeno I (µL) 1,0 mg/mL	[] Colágeno I (µL) 1,5 mg/MI
1	100	2,6	786,4	55,5	111	166,5

*para os experimentos das matrizes na condição IN (cultivo dentro da matriz de colágeno tipo I), esse valor é descontado do valor do cálculo final do número de células (2×10^4 células / mL).

4.2 MARCADORES FLUORESCENTES

Protocolo 1:

- As amostras HepG2-2D, HepG2-3D-ON e HepG2-3D-IN foram fixadas em 4% de paraformaldeído (VETEC) diluído em PBS por 20 minutos à temperatura ambiente;
- Após esse período as amostras foram lavadas 3 vezes em PBS, por 5 minutos cada;
- Em seguida, foram incubadas, por 10 minutos, à temperatura ambiente, com *Triton* a 0,2% (Sigma) diluído em PBS (LGC Biotecnologia);
- Logo após as 3 lavagens com PBS, por 5 minutos cada, foi feito um pré-bloqueio de sítios inespecíficos por meio de uma solução com 2% de soro de albumina bovina (BSA - Sigma) e 1% do aminoácido Glicina (Gibco) diluída em PBS. As células foram incubadas e deixadas nessa solução por 20 minutos;
- Em seguida foram realizadas 3 lavagens em PBS, por 5 minutos cada;
- Para a marcação dos microfilamentos de actina, foi utilizada a proteína faloidina já conjugada com o fluoróforo *Alexa Fluor® 488* (A12379 – *Life Technologies*) diluída 1:500 em PBS e incubada por 1 hora com as células;
- Em seguida as amostras foram lavadas por 2 vezes em PBS, por 5 minutos cada;

- Após essa etapa foi adicionado corante fluorescente, o reagente DAPI (4-6-Diamino-2-fenolindol - *Life Technologies*-catálogo D1306), e incubado por 15 minutos;
- Logo depois, foram realizadas 2 lavagens em PBS, por 5 minutos cada, depois com água destilada por 3 segundos;
- Foi retirado o excesso de água em papel absorvente;
- Finalmente, foram adicionados 10 µL de meio de montagem, (*Fluoromount* TM, Sigma catálogo F4680), sobre as amostras e montadas com lamínulas de vidro;
- Após a secagem das lâminas, elas foram seladas com esmalte; Posteriormente, foram adquiridas imagens de alta resolução com aumento de 20x, 40x e 63x no microscópio confocal *Leica* TCS SPE (Tabela 2), através do programa LAS X.

Tabela 2: Especificação e resolução das objetivas

Objetiva	Modelo Objetiva / Abertura Numérica	Resolução XY	Resolução Z
20x	ACS APO 20x / 0,6 NA – imersão à óleo	(488 nm) 325 nm	(488 nm) 1776 nm
40x	ACS APO 40x / 1,15 NA – imersão à óleo	(488 nm) 169,7 nm	(488 nm) 416,6 nm
63x	ACS APO 63x / 1,3 NA – imersão à óleo	(488 nm) 150 nm	(488 nm) 299 nm

Modelo Objetiva ACS APO=Apocromática, NA=Abertura Numérica, nm=nanômetro

4.3 IMUNOFLUORESCÊNCIA

Protocolo 1

- HepG2-2D, HepG2-3D-ON e HepG2-3D-IN (marcação das proteínas vinculina ou colágeno I), foram fixadas primeiramente no paraformaldeído (VETEC) à 4%, por 20 minutos;
- Após esse período as amostras foram lavadas 3 vezes em PBS, por 5 minutos cada;
- Triton à 0,2% em PBS por 10 minutos e as amostras foram lavadas 3 vezes em PBS, por 5 minutos cada;
- Em seguida, foram incubadas em uma solução de BSA à 5% diluída em PBS por 30 minutos;

- Após esse tempo, para as marcações das proteínas vinculina ou colágeno I foram utilizados os anticorpos primários: anti-vinculina (V9131 – Sigma) diluído 1:1000 e anti-colágeno I (Abcam – catálogo ab292) diluído 1:200, ambos em PBS, misturados com o BSA à 1%, diluído em PBS e incubados com as células *overnight* em câmara úmida à 4°C;
- Após esse período, as amostras foram lavadas por 3 vezes em PBS, por 5 minutos cada;
- Em seguida, foi feita a incubação com o anticorpo secundário, o fluoróforo Cy3® (catálogo ab97035) para ambas proteínas, diluídos 1:500 (vinculina) ou 1:400 (colágeno I) por 1 hora. Essa incubação também foi feita com a mistura do BSA 1% + anticorpo secundário (Cy3), ambos diluídos em PBS;
- Após esta etapa, as amostras foram lavadas por 3 vezes em PBS, por 5 minutos cada;
- Em seguida foi realizada a marcação por fluorescência, com o corante DAPI (*Life Technologies*-catálogo D1306), este foi incubado por 15 minutos;
- Posteriormente, foram realizadas 2 lavagens em PBS, por 5 minutos cada, depois com água destilada, por 3 segundos;
- Foi retirado o excesso de água em papel absorvente;
- Finalmente, as lâminas foram devidamente preparadas para posteriores análises por microscopia confocal;
- Foram adicionados 10 µL de meio de montagem (*Fluoromount*™, Sigma catálogo F4680), sobre as amostras e montadas com lamínulas de vidro;
- Após a secagem das lâminas elas foram seladas com esmalte e armazenadas em freezer -20 °C;
- Posteriormente, foram realizadas as imagens de alta resolução com objetivas de 40x e 63x no microscópio confocal Leica TCS SPE (Tabela 2), através do programa LAS X.

Protocolo 2:

Por conta do problema no protocolo 1 foram realizadas 2 alterações no protocolo 2 (marcação da proteína vinculina ou colágeno I). Na etapa da diluição entre os anticorpos primário e secundário: a diluição para o anticorpo primário (anti-vinculina) passou a ser 1:500 e a diluição do anticorpo secundário (CY3) foi 1:1000; aumentou o tempo de incubação do anticorpo secundário (fluoróforo Cy3) para 2 horas.

Protocolo 3:

Para solucionar o entrave do protocolo 2 foi necessário fazer mais 3 alterações no protocolo 3 (marcação da proteína vinculina ou colágeno I). Na etapa de fixação da amostra com paraformaldeído: primeiramente utilizou-se à 2%, por 5 minutos e depois à 4%, por 15 minutos; a outra alteração foi na etapa da permeabilização, onde aumentou o tempo de incubação do reagente Triton em PBS à 2%: de 10 para 30 minutos, com agitação; por fim, a última alteração foi na etapa das incubações dos anticorpos primários (anti-vinculina ou anti-colágeno I) e secundário (fluoróforo Cy3), onde foi acrescentado nestas incubações o reagente Triton à 0,2% diluído em PBS;

4.4 AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA POR MICROSCOPIA CONFOCAL

Uma vez prontas as amostras, o material foi levado para análises para a visualização das marcações nas células HepG2 no microscópio confocal Leica TCS SPE.

A seguir as principais etapas para aquisição de imagem por microscopia confocal no equipamento utilizado neste trabalho:

- Ligar todo o equipamento do microscópio *LEICA TCS SPE*, conforme manual do usuário disponível na Unidade Multiusuária de Microscopia Confocal (ICB-UFRJ);
- Abrir o programa *LASX*;
- Configurar os parâmetros de captura separadamente para cada fluoróforo (diferentes sequências);
- Ajustar os lasers sólidos estáveis no programa de acordo com as amostras:
 - laser Diodo 405: excita no comprimento de onda de 405 nm (potência: 20 a 25%)
 - laser Diodo 488: excita no comprimento de onda de 488 nm (potência: 20 a 25%)
 - laser Diodo 532: excita no comprimento de onda de 532 nm (potência: 20 a 25%);
- Definir a faixa de emissão a ser detectada para cada fluoróforo;
- Determinar o ganho, para cada fluoróforo;
- Escolher uma cor para representar cada fluoróforo;
- Regulagem do *pinhole* e disco de Airy;
- Ajustando o microscópio – Preparação da amostra:
 - selecionar a objetiva; pingar o óleo de imersão entre a lamínula (amostra) e a objetiva e colocar a lâmina invertida no microscópio, aproximando a objetiva na lâmina;

- Iniciar escaneamento para visualização das marcações nas sequências correspondentes, uma vez que este aparelho só possui um único PMT;
- Ajustes dos PMTs:
 - ganho e *Offset* (para retirar ruído de fundo);
- Para uma série em Z, definir os limites superior e inferior a serem observados na amostra, define-se o *step-size*, ou seja a distância entre os planos focais:
 - *step-size* de 3 μm : objetiva de 20x;
 - *step-size* de 1 μm : objetiva de 40x;
 - *step-size* de 0,7 μm : objetiva de 63x;
 - *step-size* de 0,35 μm : objetiva de 63x(imagens com colágeno para uma melhor resolução do eixo Z);
- Adquirir a sequência de imagem;
- Salvar a imagem final em extensão .tiff

4.5 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ALBUMINA POR ELISA

- Foi realizado o ensaio imunoenzimático ELISA do tipo sanduíche, utilizando o Kit de ELISA de albumina bovina (*Bethyl Laboratories*, catálogo E88-129);
- O sobrenadante das culturas de células foi coletado nos tempos de 48 e 96 horas de cultivo e congelados em freezer a -80°C até a realização do teste; as amostras foram feitas em triplicatas;
- O procedimento iniciou-se com a diluição, em tampão de diluição C (próprio do kit) 1:2 das amostras a serem testadas;
- Foram adicionados 100 μL das amostras (em duplicata) por poço da placa de ELISA para incubação à temperatura ambiente por 1 hora;
- Para a curva padrão, a albumina integrante do kit foi diluída nas seguintes concentrações: 500; 167; 55,6; 18,5; 6,17; 2,06; 0,69 ng/mL;
- Passado este período, a placa foi lavada por 4 vezes com a solução de lavagem contida no kit;
- Depois, foram adicionados 100 μL do anticorpo de detecção anti-albumina (previamente diluído conforme instruções do fabricante) e incubou-se por 1 hora à temperatura ambiente;
- Em seguida, a placa passou por 4 lavagens com a solução de lavagem do kit;

- Foram adicionados 100 μL da solução de *streptavidina* conjugada com peroxidase (SA-HRP) em cada poço;
- O período de incubação desta etapa foi de 30 minutos, seguido por 4 lavagens com a solução própria do kit;
- Adicionou-se, então, 100 μL de TMB (3,3', 5,5' - tetrametilbenzidina) e a placa foi incubada ao abrigo da luz por 10 minutos;
- Esta reação foi paralisada pela adição de 100 μL da solução de parada em cada poço;
- Para a realização da leitura das amostras no espectrofotômetro (equipamento *SpectraMax M3*), foi utilizado o comprimento de onda de 450 nm, correspondente à cor azul;
- A curva padrão foi construída utilizando os valores fornecidos na leitura do espectrômetro em função da concentração de albumina, que variou de 0,69 a 500 ng/mL, com fator de diluição de 3, proporcionando desta forma a leitura de 7 pontos para construção da mesma;
- Foi realizada a regressão linear da curva no programa *GraphPad Prism*, onde foi calculada a equação da reta;
- Para determinar os valores das concentrações de albumina das amostras, foi utilizada a equação da reta colocando os valores obtidos da leitura do espectrofotômetro para cada condição analisada.

4.6 ESTATÍSTICA

Os dados referentes a quantidade de prolongamentos citoplasmáticos nas células hepáticas HepG2 foram plotados em média e desvio-padrão com 95% de intervalo de confiança. Foi utilizada a versão não paramétrica do ANOVA (*Kruskal-Wallis* com Teste de *Dunn* para múltiplas comparações). O teste de *Kruskal-Wallis* (KW) é uma extensão do teste de *Wilcoxon-Mann-Whitney*. É um teste não paramétrico utilizado para comparar três ou mais populações. Ele é usado para testar a hipótese nula de que todas as populações possuem funções de distribuição iguais contra a hipótese alternativa de que ao menos duas das populações possuem funções de distribuição diferentes (KRUSKAL, 1952).

Já os dados referentes a concentração de albumina nas HepG2 foram representados como média, com comparações entre três grupos. Os cálculos foram realizados no computador utilizando o programa *GraphPad Prism*® versão 7.0.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CULTIVO E EXPANSÃO CELULAR – CONDIÇÃO 2D

Nesta técnica de microscopia de contraste de fase, as HepG2-2D apresentaram aspecto arredondado e cresceram aderidas ao plástico de cultura, proliferaram e formaram aglomerados confluentes, conforme descrito pela ATCC (Figura 2). Foi possível notar uma colonização de células sobrepostas com maior concentração na região central do aglomerado celular (Figura 10), quando as células hepáticas atingiram um estágio de maior confluência.

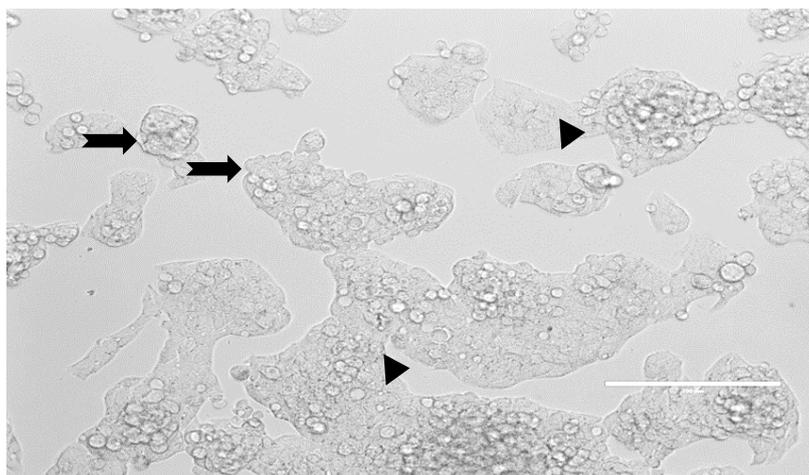


Figura 11. Micrografia óptica de contraste de fase das células HepG2. A imagem ilustra as HepG2 aderidas ao plástico de cultura (seta preta) com aglomerados (cabeça de seta preta). A morfologia das células condiz com a dos dados do fabricante. Objetiva de 20x. Barra de calibração de 100 µm. Imagem realizada por PIMENTEL, C no microscópio (Thermo Fisher Scientific AMG AME-3302-G2210-1515-040; NA, USA) do LCCM.

5.2 CULTIVO – CONDIÇÃO 3D-ON

Com intuito de colaboração para o estabelecimento de um protocolo para análises das HepG2 dentro da matriz de colágeno I (condição 3D-IN), a condição 3D-ON foi referenciada (PIMENTEL, 2017). Nesse trabalho, foi utilizada a microscopia de contraste de fase para avaliar a confluência das HepG2-3D-ON no tempo de 48 horas. Foi observado que as células ficaram dispersas e menos aglomeradas sobre a matriz, sugerindo que elas foram capazes de crescer neste ambiente 3D (Figura 12). Portanto, as células HepG2-3D-ON se adaptaram tanto quanto as HepG2-2D (situação controle), corroborando que o arcabouço de colágeno tipo I pode ser um ambiente propício para o crescimento celular (PIMENTEL, 2017). Em acordo com Park e Robinson (1984), os fatores de hidratação de um polímero de ampla difusão podem influenciar na preparação de uma matriz 3D. A biocompatibilidade é ponto de destaque, pois é a qualidade importante do ponto de vista biológico de um biomaterial. A

biofuncionalidade é observada quando a biocompatibilidade é adequada. Na preparação da matriz de colágeno tipo I, um dos componentes da matriz, o reagente NaOH (hidróxido de sódio), só teve funcionalidade à matriz quando diluído em água destilada, pois outros tipos de água, por exemplo a Milli-Q ou deionizada, não favoreceram o equilíbrio termodinâmico da solução da matriz de colágeno I, isto é, não proporcionaram a característica adequada e favorável de viscoelasticidade e tensão necessárias para sua polimerização (PIMENTEL, 2017).

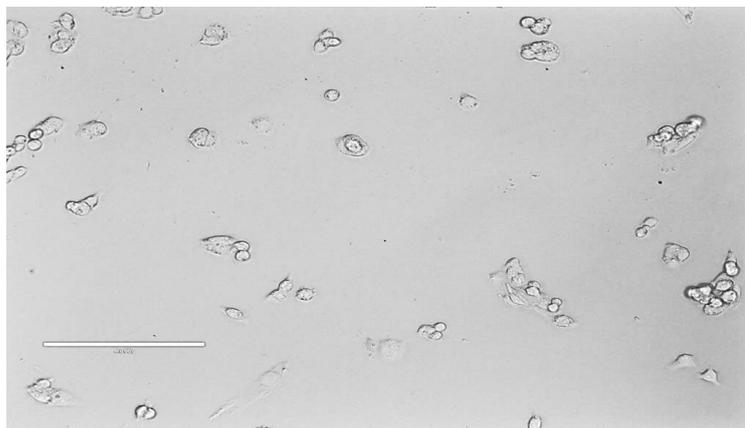


Figura 12. Micrografia óptica de contraste de fase das células HepG2-3D-ON no tempo de 48 horas. A imagem ilustra as HepG2-3D-ON mais espalhadas e menos aglomeradas sobre a matriz de colágeno I. A morfologia arredondada das células na condição 3D-ON condiz com a dos dados do fabricante. Objetiva de 20x. Barra de calibração de 100 µm. Imagem realizada por PIMENTEL, C no microscópio (Thermo Fisher Scientific AMG AME-3302-G2210-1515-040; NA, USA) do LCCM.

5.3 AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE COLÁGENO TIPO I DAS CÉLULAS HEPÁTICAS NA CONDIÇÃO 3D-IN

Nesse trabalho foram estabelecidos protocolos específicos para análises de células HepG2 em cultivo 3D por microscopia confocal, com o objetivo de ter reprodutibilidade. Quando se utilizam marcadores fluorescentes que se ligam diretamente a amostra, como a faloidina e o DAPI, não foi necessário realizar alterações consideráveis no protocolo padrão, pois não houve dificuldade com a técnica para marcar as células HepG2 dentro da matriz de colágeno tipo I.

Nesse experimento definiu-se a melhor concentração final e as quantidades finais de solução de colágeno tipo I para a produção da matriz para a cultura de células na condição 3D-IN, nos tempos de 24 e 48 horas. No tempo de 24 horas não foi observada marcação de células para análises. Foram testadas três concentrações finais de colágeno I para as matrizes: 0,5, 1,0 e 1,5 mg/mL. Dentre as concentrações de colágeno citadas acima, nosso grupo já

havia estabelecido a concentração final de 1,0 mg/mL para a condição 3D-ON (PIMENTEL, 2017). Por esse motivo, decidiu-se testar uma concentração final de colágeno acima e outra abaixo desta para a condição 3D-IN, visto que a porosidade da matriz poderia influenciar a marcação por fluorescência. Era preciso saber se a proteína faloidina iria penetrar a matriz na condição de cultivo 3D-IN. Com relação a quantidade final de solução de colágeno I, foram testadas as de 100 μ L e 200 μ L para cada concentração testada (Figuras 13A a 13F). Assim, foi observado que nas concentrações finais de 0,5 e 1,0 mg/mL tanto para a quantidade de 100 μ L (Figuras 13A e 13B) quanto para a de 200 μ L, (Figuras 13D e 13E), houve marcação de faloidina nas células. Com relação à concentração de 1,5 mg/mL, foi observado menos células com marcação de faloidina nas duas quantidades finais de solução de colágeno: 100 μ L (Figura 13C) e 200 μ L (Figura 13F), em relação às concentrações e quantidades finais anteriores (Figuras 13A a 13E). Esse fato corrobora MIRON-MENDOZA (2010) e colaboradores. Foi demonstrado que aumentar a concentração de colágeno aumenta a rigidez do substrato e também diminui o espaçamento entre os locais potenciais de adesão ao colágeno, resultando em uma diminuição da concentração de células aderidas à matriz. Assim, nos experimentos subsequentes esta concentração de colágeno não foi mais utilizada. Foi verificado também que não houve diferença na marcação de células com faloidina entre as matrizes produzidas com quantidades de solução final de colágeno de 200 μ L, Figuras 13D e 13E em relação a de 100 μ L, Figuras 13A e 13B. A avaliação por microscopia confocal foi possível para as matrizes feitas com as duas quantidades finais de solução de colágeno tipo I. Isso, demonstra que a espessura da matriz nessas duas quantidades não influenciou a visualização das células nessa técnica confocal. Porém, por motivo de redução de custos, para os experimentos seguintes utilizou-se a quantidade de 100 μ L de solução final de colágeno tipo I.

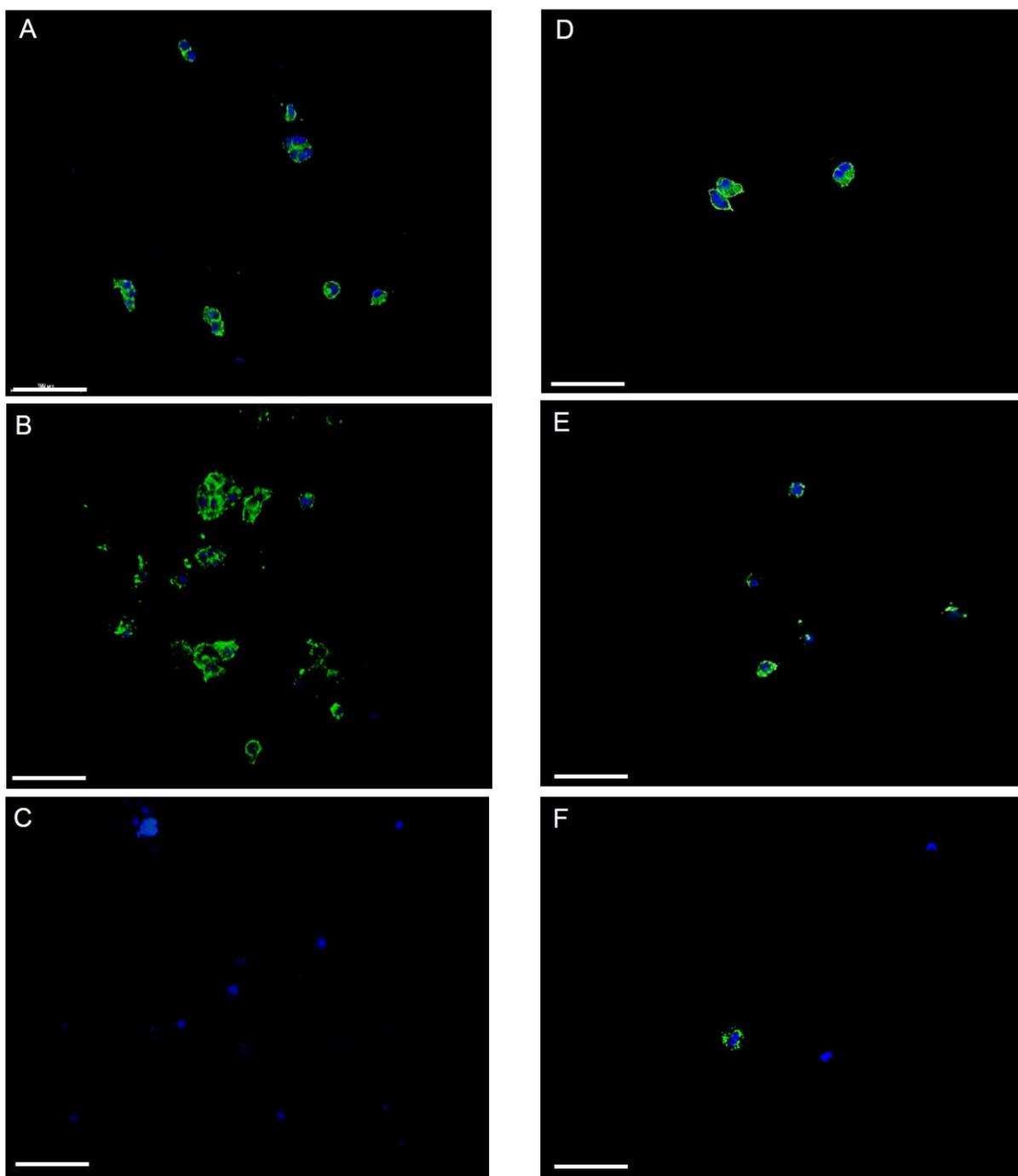


Figura 13. Microscopia confocal das células HepG2-3D-IN no tempo de 48 horas. Marcação para faloidina (marcador de microfilamentos de actina - verde) e DAPI (azul). Foi observado que nas concentrações de colágeno de 0,5 (Figuras 13A e 13D) e 1,0 mg/mL (Figuras 13B a 13E), nas quantidades de solução de 100 uL (Figuras 13A, 13B e 13C) e 200 µL (Figuras 13D, 13E e 13F) houve marcação de faloidina nas células. Já na concentração de 1,5 mg/mL (Figuras 13C e 13F), há pouca visualização da marcação de faloidina em ambas quantidades finais de solução de colágeno: 100 µL e 200 µL, (Figuras 13C e 13F). Verifica-se também que não houve grande diferença de células marcadas com faloidina entre as quantidades finais de solução de colágeno de 200 µL (Figuras 13D e 13E) em comparação a de 100 µL (Figuras 13A e 13B). Objetiva de 20x. Barra de escala de 100 µm.

5.4 AVALIAÇÃO POR MICROSCOPIA CONFOCAL DA CONFLUÊNCIA DE CÉLULAS HEPÁTICAS MARCADAS COM FALOIDINA NA CONDIÇÃO 3D-IN NOS TEMPOS DE 48, 72 E 96 HORAS

Para estabelecer o tempo de cultivo das células HepG2-3D-IN, avaliou-se a confluência de células marcadas com faloidina na condição 3D-IN ao longo dos tempos determinados de 48, 72 e 96 horas. Esses tempos foram baseados em trabalhos anteriores com as HepG2 (PIMENTEL, 2017). Foi observado que na condição 2D, a marcação de células foi proporcional ao estágio de confluência da cultura nos tempos de 48, 72 e 96 horas (Figuras 14A, 14B e 14C) e na condição 3D-IN nas concentrações finais de colágeno I de 0,5 e 1,0 mg/mL, Figuras 14D a 14I, as células marcadas apresentaram-se mais dispersas, com menos aglomerados que o controle 2D (Figuras 14A, 14B e 14C), corroborando com Godoy e colaboradores (2013) quando relatam que o cultivo 3D proporciona uma maior área de superfície para ancoragem das células. Foi observado que na concentração final de colágeno de 1,0 mg/mL, a condição 3D-IN (Figuras 14G e 14I) apresentou uma confluência de células marcadas mais condizente com os tempos de cultivo, isto é, nessa concentração de colágeno as células encontraram uma condição mais favorável para sua proliferação. Além disto, com a microscopia confocal as células HepG2 puderam ser rastreadas espacialmente em três dimensões com grande precisão, nas escalas de tempos determinados (PRASAD *et al.*, 2007). Entretanto, na concentração final de colágeno de 0,5 mg/mL houve uma dificuldade no manuseio das amostras para a preparação das lâminas. Então, foi utilizado a concentração final de colágeno de 1,0 mg/mL na quantidade de 100 µL de solução final de colágeno tipo I para os próximos experimentos.

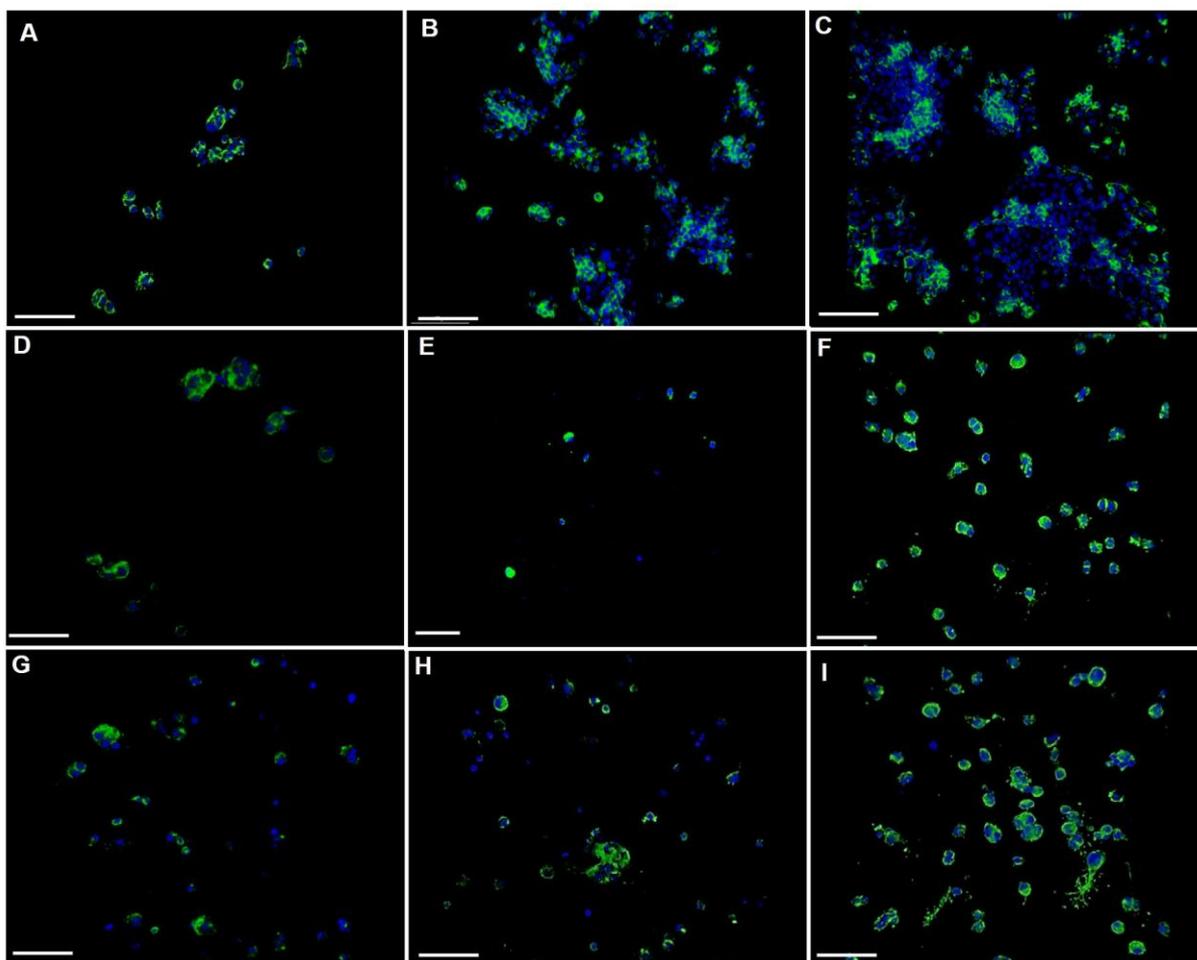


Figura 14. Microscopia confocal das células HepG2-2D e HepG2-3D-IN nos tempos de 48, 72 e 96 horas. Marcação para faloidina (marcador de microfilamentos de actina - verde) e DAPI (azul). Na condição 2D, as células marcadas com faloidina e DAPI foram proporcionais ao estágio de confluência da cultura nos tempos de 48, 72 e 96 horas (Figuras 14A, 14B e 14C) e na condição 3D-IN nas concentrações de 0,5 mg/mL (Figuras 14D, 14E e 14F) e 1,0 mg/mL (Figuras 14G, 14H e 14I) a distribuição das células marcadas apresentaram-se diferentes ao controle 2D no decorrer dos tempos determinados, aparentaram-se mais dispersas e menos aglomeradas que o controle 2D (Figuras 14A a 14C). Na concentração de 1,0 mg/mL a condição 3D-IN aparentou uma maior confluência de células marcadas com faloidina e DAPI nos tempos de 48 e 96 horas, visto nas Figuras 14G e 14I. Objetiva de 20x. Barra de escala de 100 μ m.

5.5 AVALIAÇÃO POR MICROSCOPIA CONFOCAL DO CITOESQUELETO DAS CÉLULAS HEPÁTICAS NAS CONDIÇÕES DE CULTIVO 2D, 3D-ON E 3D-IN NOS TEMPOS DE 48 E 96 HORAS

Neste experimento foi avaliado o crescimento das células HepG2 marcadas para microfilamentos de actina nas condições 2D, 3D-ON e 3D-IN, nos tempos de 48 e 96 horas. A importância dessa avaliação foi baseada no conceito da arquitetura dos tecidos, que é definida pela organização e interação entre células e o ambiente extracelular (ALBERTS *et al.*, 2010). Verificou-se que nas três condições de cultivo, a confluência das células marcadas estava proporcional aos tempos de cultura estabelecidos. Entretanto, as células HepG2-3D-ON e HepG2-3D-IN, Figuras de 15C a 15F, apresentaram-se mais dispersas, diferentes da condição controle 2D (Figuras 15A e 15B), o que pode influenciar na sua capacidade de crescimento celular (ALBERT *et al.*, 2010; GODOY *et al.*, 2013). De acordo com Green e Yamada (2007), em uma matriz 2D, uma polaridade celular artificial é criada entre as superfícies superior e inferior da célula e, tal domínio não existe dentro da matriz 3D, uma vez que as células são completamente envolvidas por proteínas da matriz. Isso, poderia explicar o comportamento das células HepG2 em matrizes de colágeno tipo I 3D (ON e IN), as quais apresentaram-se como uma colonização proporcional de células, mais dispersas e menos aglomeradas, comparadas com as células HepG2-2D.

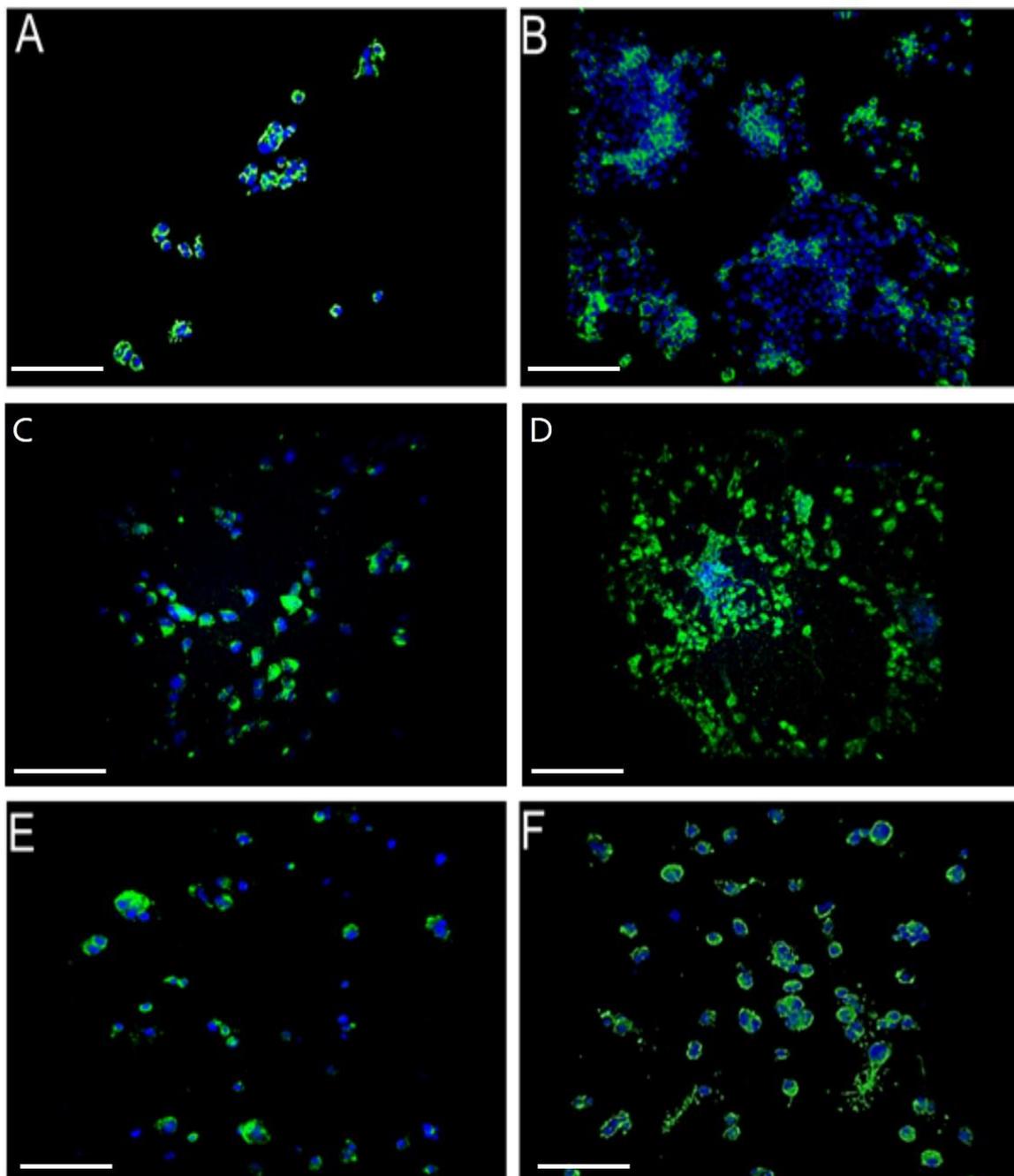


Figura 15. Microscopia confocal das células HepG2-2D, HepG2-3D-ON e HepG2-3D-IN nos tempos de 48 e 96 horas. Marcações para faloidina (marcador de microfilamentos de actina - verde) e DAPI (azul). Observou-se que nas três condições de cultivo, a confluência das células marcadas com faloidina foi proporcional aos tempos de cultura estabelecidos. As células HepG2 nas condições 3D-ON (Figuras 15C e 15D) e 3D-IN (Figuras 15E e 15F), apresentaram-se mais dispersas, diferentes da condição controle 2D (Figuras 15A e 15B). Objetiva de 20x. Barra de escala de 100 μm .

5.6 AVALIAÇÃO POR MICROSCOPIA CONFOCAL DA DISTRIBUIÇÃO E MORFOLOGIA DAS CÉLULAS HEPÁTICAS NAS CONDIÇÕES DE CULTIVO 2D, 3D-ON E 3D-IN, NO EIXO Z (ESPESSURA DA MATRIZ) NO TEMPO DE 48 HORAS

Para analisar a distribuição e morfologia das células HepG2 nas condições 3D-ON e 3D-IN ao longo do eixo de Z da matriz de colágeno tipo I e comparar com o controle 2D, o nosso grupo optou pela marcação também do colágeno I da matriz (Figuras 16A, 16B e 16C) e assim averiguar as diferenças encontradas em cada tipo de cultivo e seus substratos. Não houve dificuldade para marcar essa proteína nas células HepG2 e/ou na matriz. Provavelmente por essa proteína estar muito exposta, não há dificuldade para o anticorpo chegar até ela na matriz ou penetrar a célula e ligar-se à proteína endógena. O colágeno tipo I faz parte da MEC e é secretado pelas células hepáticas (ARIAS *et al.*, 2009). Além disso, de acordo com Green e Yamada (2007), a MEC pode ser depositada pelas células epiteliais para criar um ambiente mais adequado à sua função. Na condição 2D, (Figura 16A), que é um meio rígido e plano, as células HepG2 apresentaram-se aderidas e aglomeradas, em um plano linear na superfície aderente, não foi observada a distribuição celular ao longo do eixo Z. Na Figura 16B, a condição 3D-ON, verificou-se que as células hepáticas estavam à montante sobre a superfície da matriz, com uma distribuição no eixo Z maior, comparando-se com o controle 2D (Figura 16A). Já na condição 3D-IN, Figura 16C, as células HepG2 se apresentaram mais distribuídas ao longo do eixo de Z comparadas ao seu controle 2D (Figura 16A) e a condição 3D-ON (Figura 16B). Esses resultados corroboram com Green e Yamada (2007) quando estes relatam que há uma série de diferenças morfológicas, de sinalização e comportamentais entre cultura de tecidos em 2D e 3D, bem como o perfil morfológico nos diferentes substratos, onde as células parecem estar interagindo mais com a matriz nos três eixos espaciais: x, y e z (PAMPALONI *et al.*, 2007; GODOY *et al.*, 2013 e CASEY *et al.*, 2016). Portanto, sugere-se que as matrizes de colágeno I poderiam ter influenciado essas mudanças na morfologia, bem como na sua dispersão, em comparação ao substrato 2D.

Além disto, a técnica de microscopia confocal permitiu a observação dessa distribuição das células HepG2 no eixo de Z em um sistema coloidal de tamanho micrométrico. Uma das grandes vantagens do escaneamento do confocal a laser é a sua capacidade de produzir fatias ópticas (0,1 a 1,5 μm) de materiais de diferentes espessuras (cerca de 50 μm). Tal seccionamento óptico não está restrito ao plano x-y, mas também podem ser coletados em planos transversos, verticais nos planos x-z e y-z, podendo ser produzidos por programas específicos do equipamento confocal (DIASPRO *et al.*, 2008 e DE SOUZA *et al.*, 2010).

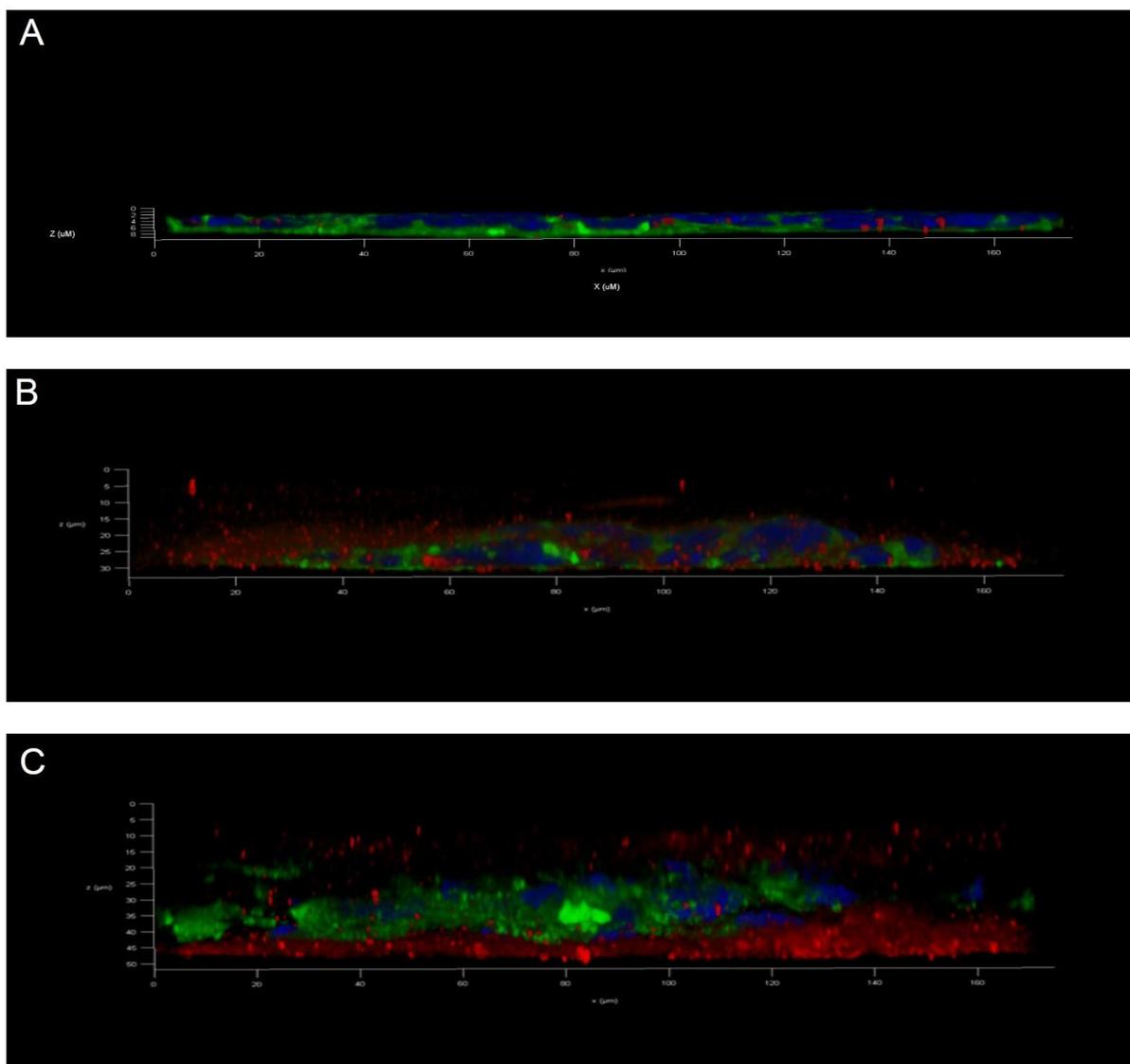


Figura 16. Microscopia confocal da distribuição no eixo Z das células HepG2-2D, HepG2-3D-ON e HepG2-3D-IN no tempo de 48 horas. Marcações para faloidina (marcador de microfilamentos de actina - verde), colágeno I (vermelho) e DAPI (azul). Identificou-se na Figura 16A que as células se apresentaram aglomeradas, em um plano linear na superfície aderente, não foi observado distribuição celular ao longo do eixo Z. Na Figura 16B, a condição 3D-ON, verificou-se que as células sobre a superfície da matriz apresentaram o eixo Z maior, comparando-se com o controle 2D (Figura 16A). Já na Figura 16C, a condição 3D-IN, as células apresentaram-se mais distribuídas ao longo do eixo de Z comparadas ao seu controle 2D, bem como a condição 3D-ON. Objetiva de 40x. Barra de escala de 50 μm .

5.7 AVALIAÇÃO POR MICROSCOPIA CONFOCAL DAS CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DAS CÉLULAS HEPÁTICAS NAS CONDIÇÕES DE CULTIVO 2D, 3D-ON E 3D-IN NOS TEMPOS DE 48 E 96 HORAS

Para confirmar as alterações encontradas na morfologia celular de cada substrato, foram avaliadas as características morfológicas das células HepG2 nos diferentes tipos de cultivos testados. Foi observado que em ambos os tempos de 48 e 96 horas, nas condições 3D-ON (Figuras 17C e 17D) e 3D-IN (Figuras 17E e 17F), as células hepáticas emitem um número maior de prolongamentos citoplasmáticos, em relação ao controle 2D, Figuras 17A e 17B. As células emitem esses prolongamentos para explorarem o território, através desses filopódios (ALBERTS *et al.*, 2010). Sugere-se que na matriz de colágeno I as células emitem mais prolongamentos por terem mais mobilidade celular, por não ser um ambiente rígido. A presença desse colágeno I na matriz pode ter favorecido essa mobilidade das células HepG2 nas condições 3D-ON e 3D-IN. Em relação à condição 2D o perfil morfológico pode ter sido impactado pela falta dessa mobilidade, devido ao ambiente rígido e plano que não mimetiza a arquitetura do tecido *in vivo*, corroborando com PAMPALONI (2009) e GODOY (2013), quando relatam que é importante levar em consideração as diferenças na rigidez do substrato em relação ao microambiente 3D. Para isto, a microscopia confocal foi uma ferramenta importante para diferenciar com particularidade a morfologia das células HepG2 em suas diferentes condições de cultivo. Ela permitiu através dos cortes ópticos a visualização profunda do espécime, bem como foi fundamental para eliminar a luz fora de foco pela ação do pinhole em Airy 1, com uma melhor resolução da imagem (PRASAD *et al.*, 2007).

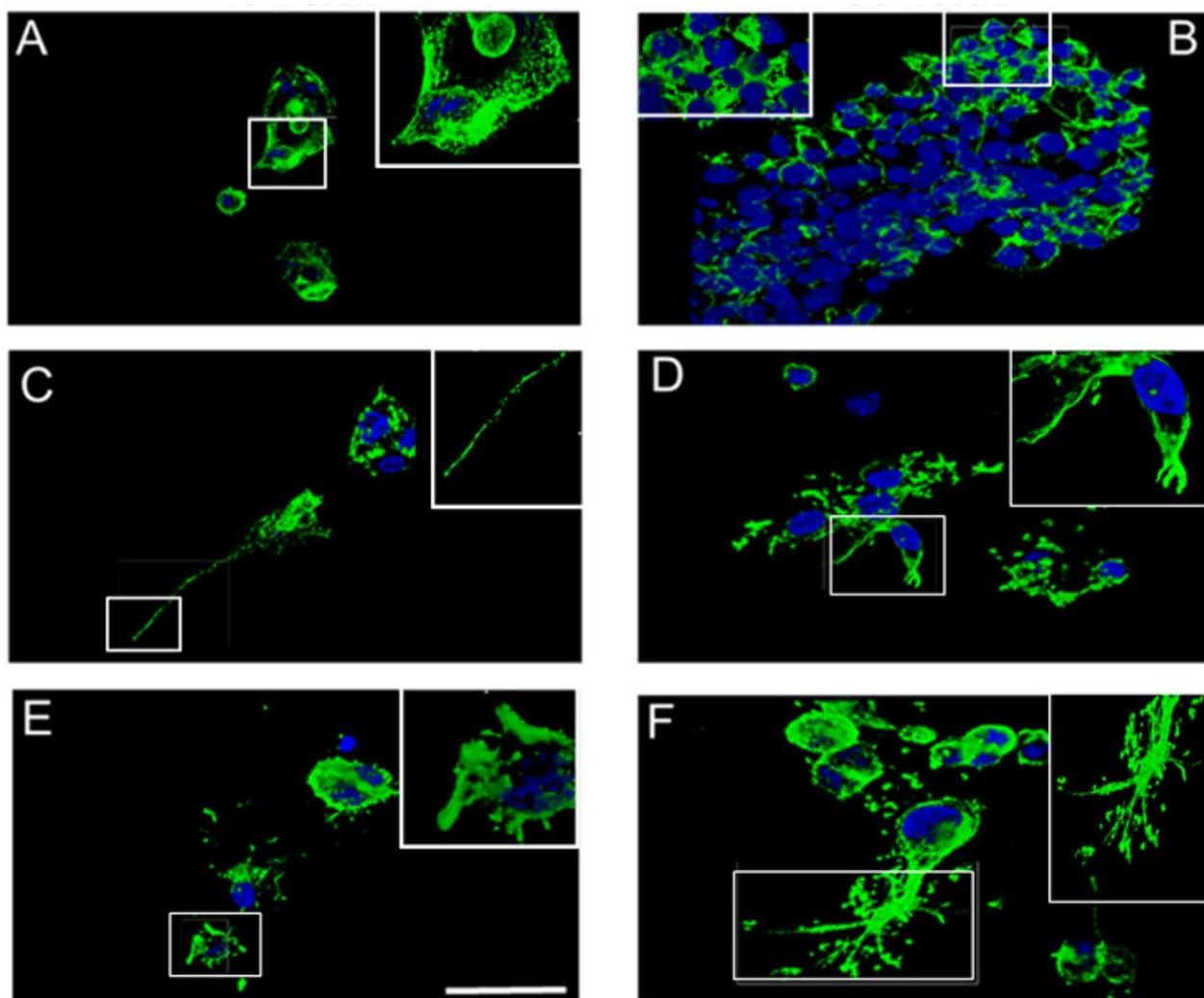


Figura 17. Microscopia confocal das características morfológicas das células HepG2-2D, HepG2-3D-ON e HepG2-3D-IN nos tempos de 48 e 96 horas. Marcações para faloidina (marcador de microfilamentos de actina - verde) e DAPI (azul). Identificou-se nas Figuras 17A e 17B que as células não apresentaram prolongamentos citoplasmáticos, em relação às condições 3D-ON (Figuras 17C e 17D) e 3D-IN (Figuras 17E e 17F), que emitiram muitos filopódios. Os detalhes das imagens estão indicados pelas caixas de inserts com bordas brancas, representando os aumentos das figuras. Objetiva de 63x. Barra de escala de 20 μm .

5.8 QUANTIFICAÇÃO DAS CÉLULAS HEPÁTICAS QUE EMITEM PROLONGAMENTOS CITOPLASMÁTICOS NAS CONDIÇÕES 2D, 3D-ON E 3D-IN NO TEMPO DE 48 HORAS

Para quantificar a emissão de prolongamentos nas três condições de cultivo no tempo de 48 horas, foi feito um gráfico em forma de barras (Figura 18). Observou-se que foi significativo o aumento do percentual de prolongamentos nas condições 3D-ON e 3D-IN em relação a condição 2D. Os resultados mostraram que a presença de colágeno I nas matrizes, das condições 3D-ON e 3D-IN, pode ter favorecido esse aumento de filopódios nas células em comparação ao controle 2D. No caso do cultivo 2D a comunicação entre célula-MEC, bem como a sinalização bioquímica e mecânica são perdidas (MAZZOLENI *et al.*, 2009). Portanto, sugere-se que esses prolongamentos nas células HepG2 em cultivo 3D (ON e IN) podem estar proporcionando uma maior interação entre elas e a matriz de colágeno I, onde este ambiente pode estar mimetizando a arquitetura hepática.

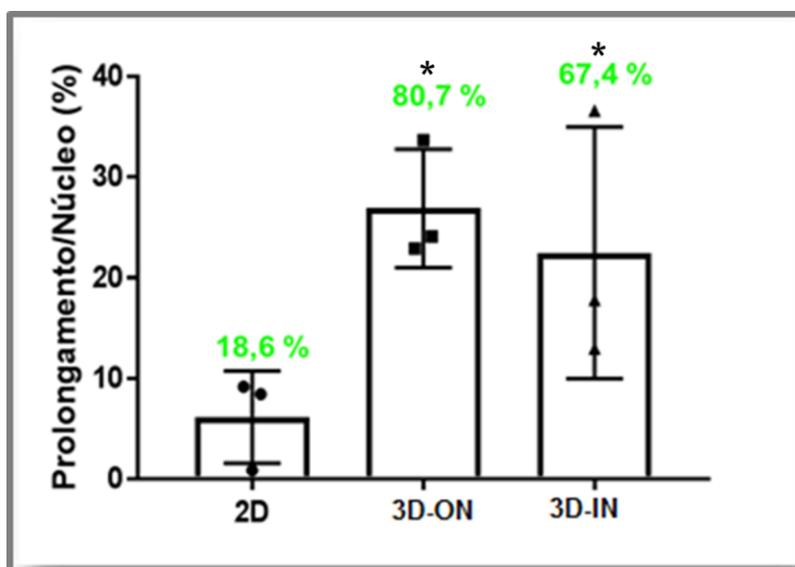


Figura 18. Representação gráfica da análise estatística das células HepG2 nas condições 2D, 3D-ON e 3D-IN que emitem prolongamentos citoplasmáticos no tempo de 48 horas. No eixo das abcissas são as condições de cultivo 2D, 3D-ON e 3D-IN e no eixo das coordenadas a relação do número de prolongamentos por núcleo (%). Observou-se que as células HepG2 nas condições 3D-ON (80,7%) e 3D-IN (67,4%) apresentaram um percentual significativamente maior de prolongamentos citoplasmáticos, em comparação a condição controle 2D (18,6%). *($p < 0,05$ GraphPad Prism® versão 7.0).

5.9 AVALIAÇÃO POR MICROSCOPIA CONFOCAL DA ANCORAGEM DAS CÉLULAS HEPÁTICAS NAS CONDIÇÕES DE CULTIVO 2D, 3D-ON E 3D-IN NOS TEMPOS DE 48 E 96 HORAS

Para avaliação da ancoragem das células HepG2 nos diferentes substratos foi observada a detecção da proteína vinculina. Assim, para o estabelecimento de um protocolo específico para esse experimento de imunofluorescência (marcação da proteína vinculina), várias modificações no protocolo padrão foram necessárias, pois houve grande dificuldade para marcar esta proteína nas células HepG2 em matriz de colágeno tipo I. Como a visualização por microscopia confocal dessa proteína nas células hepáticas tornou-se uma problemática nessas condições, se fez necessário uma busca e pesquisa em literatura para encontrar a melhor forma de solucionar a questão e assim, estabelecer o protocolo devido. No protocolo 1, a marcação da proteína vinculina nas HepG2-3D-IN foi inespecífica com efeito de *background* (Figura 19). Foi visto que, quando os anticorpos são utilizados (marcações indiretas) é preciso ter uma preocupação maior com as interações hidrofóbicas e iônicas de sítios inespecíficos de anticorpos primários e secundários e componentes teciduais da amostra. No caso, pode ter ocorrido uma atividade de peroxidase endógena em hepatócitos. As peroxidases endógenas, citocromo oxidase e catalase produzem produtos de reação. Além disso, o efeito do *background* pode ter havido pela presença de biotina endógena. A biotina é vitamina e coenzima encontrada em diversos tecidos, particularmente no fígado, bem como a fosfatase alcalina endógena que está amplamente distribuída nos tecidos humanos.

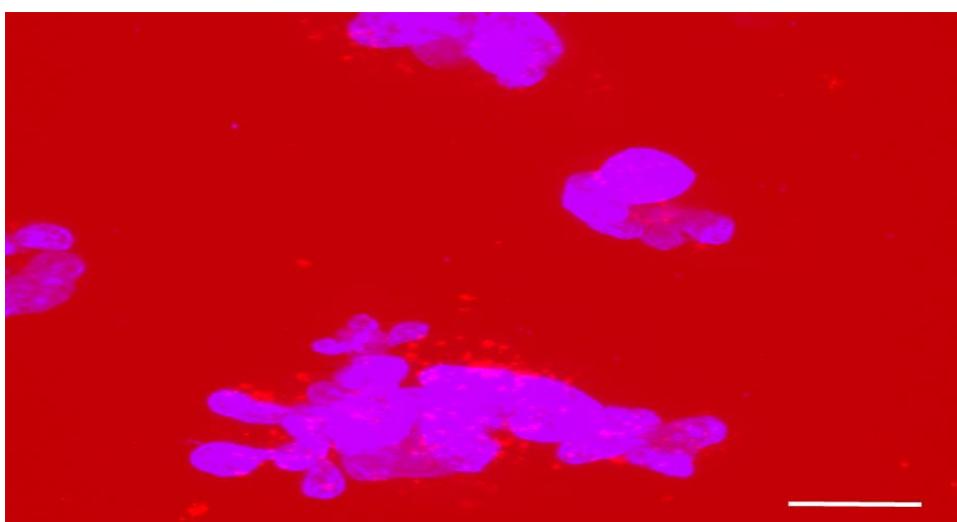


Figura 19. Microscopia confocal da ancoragem das células HepG2-3D-IN no substrato no tempo de 48 horas. Marcações para vinculina (vermelho) e DAPI (azul). Observou-se na condição 3D-IN uma marcação inespecífica da vinculina com um efeito de background. Objetiva de 63x. Barra de escala de 20 µm.

Já no protocolo 2, ainda não tendo sucesso na visualização nítida da vinculina nas condições de matrizes (3D-ON e 3D-IN), as alterações realizadas ajudaram no processo para chegar no protocolo padrão, pois no cultivo 2D houve marcação de células (Figura 20). Sugere-se que a mudança na concentração da diluição dos anticorpos favoreceu a visualização da vinculina na condição 2D.

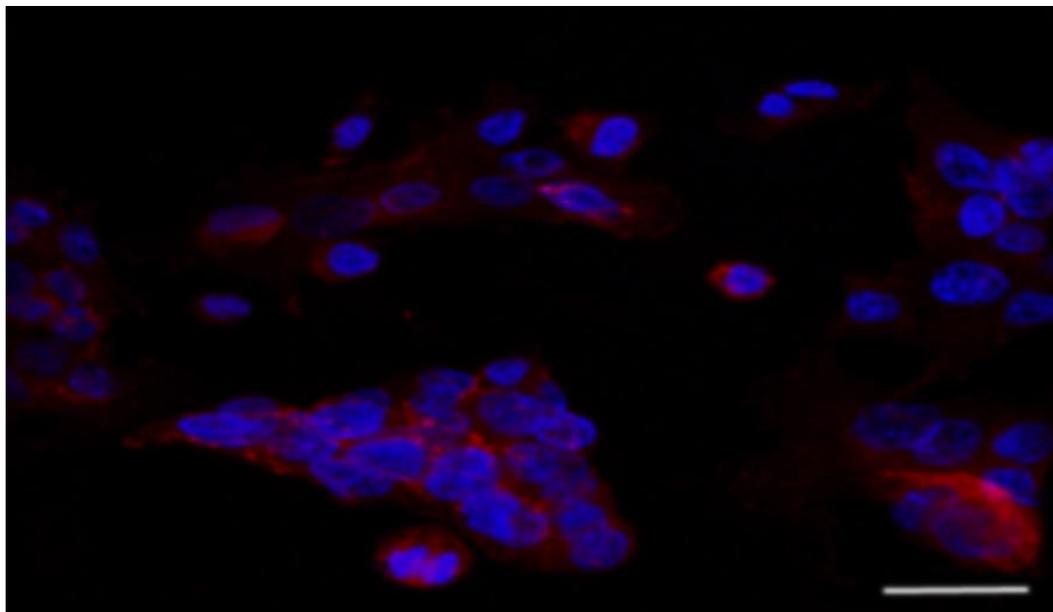


Figura 20. Microscopia confocal da ancoragem das células HepG2-2D no substrato no tempo de 96 horas. Marcações para vinculina (vermelho) e DAPI (azul). Observou-se na condição 2D que houve marcação da vinculina sem o efeito de *background*. Objetiva de 63x. Barra de escala de 20 μm .

Por fim, as últimas mudanças feitas no protocolo 3, evidenciaram a “sensibilidade” da proteína à reagentes muito fortes e necessita de intervalos de tempos maiores, no que diz respeito a incubação dos anticorpos primários e secundários, para que possa então penetrar nas células em matrizes. As alterações feitas na etapa de fixação, para preservar a ultraestrutura celular da amostra, foram determinantes para evitar a desintegração total da vinculina. Em adição, a alteração feita na etapa da permeabilização, na qual a presença do reagente Triton e o uso do aparelho “Shaker (Agitador Kline-série 0304067)” podem ter potencializado a abertura dos poros das membranas das células, deixando-as mais acessíveis para a penetração dos anticorpos (BIOGEN, 2018).

Pode-se observar que na condição 2D ficaram evidentes os pontos de ancoragem na lamínula (Figuras 21A e 21B), um plano rígido, conforme caixas de insertos com bordas brancas representando a ampliação das figuras. Já nas condições 3D-ON e 3D-IN essa proteína de ancoragem ficou dispersa no citoplasma celular, Figuras 21C a 21F, sugerindo que houve uma maior área de superfície de interação da célula na matriz, sem pontos de

ancoragem quando comparadas com o controle 2D. Ademais, a aderência matricial 3D quando comparadas com a aderência focal, podem ter efeitos diferentes em várias vias de transdução de sinal, como podem alterar a morfologia, proliferação, migração e diferenciação celular (GREEN e YAMADA, 2007). Nesse contexto, várias classes de fatores dos microambientes podem ter afetado a distribuição da proteína vinculina. O primeiro parâmetro é a composição bioquímica da MEC (SMETANA, 1993, GREEN e YAMADA; PAMPALONI, 2007, ALBERTS *et al.*, 2010 e GODOY, 2013). O segundo, o parâmetro físico da matriz, especificamente a sua flexibilidade, pode ter efeito importante nas respostas celulares, como por exemplo, a adesão celular em diferentes substratos. O terceiro parâmetro envolve sinais espaciais relativos a polaridade que são particularmente diferentes entre uma matriz 2D e 3D.

Assim, sugere-se que a característica de flexibilidade proporcionada pela matriz de colágeno I pode ter influenciado a resposta diferenciada de aderência matricial, comparada com a característica rígida da lamínula que proporcionou às células uma aderência mais focal.

Além disto, a microscopia confocal permitiu de forma efetiva visualizar com detalhes a disposição da proteína vinculina (tamanho micrométrico) em um sistema em 3D, em particular as matrizes de colágeno I, bem como as células HepG2 na condição 2D. Outra vantagem da técnica confocal é o contraste, uma vez que, há na imagem uma eficiente redução de marcação de fundo (*background*), levando a melhora na relação sinal-ruído (DE SOUZA, *et al.*, 2010).

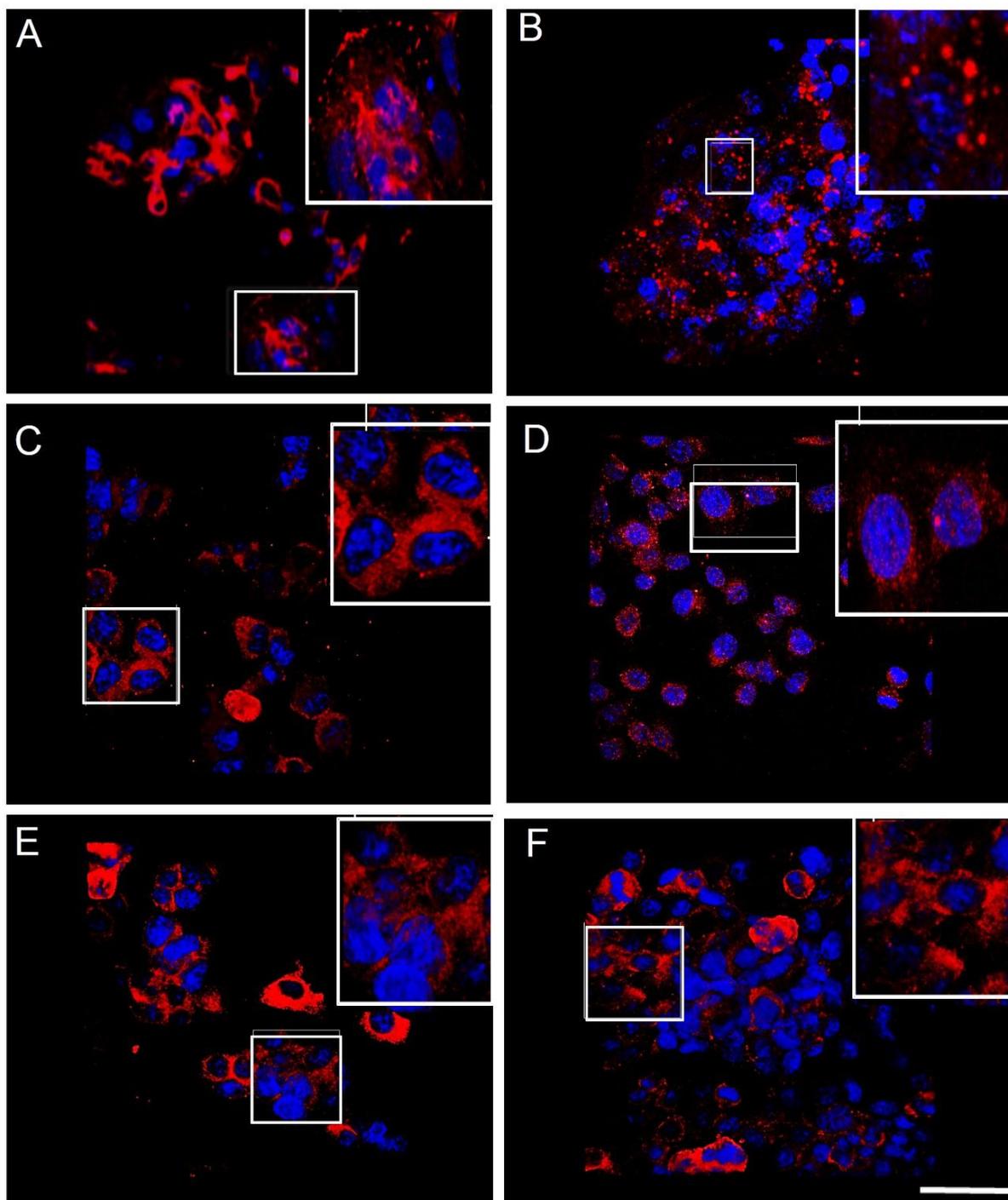


Figura 21. Microscopia confocal da ancoragem das células HepG2: 2D, 3D-ON e 3D-IN nos substratos nos tempos de 48 e 96 horas. Marcações para vinculina (vermelho) e DAPI (azul). Observou-se na condição 2D a evidência dos pontos de adesão na lamínula (Figuras 21A e 21B), conforme as caixas de insertos com bordas brancas para uma melhor visualização. Já nas condições 3D-ON e 3D-IN essa proteína de adesão ficou dispersa no citoplasma celular, Figuras 21C a 21F. Objetiva de 63x. Barra de escala de 20 μm .

5.10 AVALIAÇÃO POR MICROSCOPIA CONFOCAL DAS FIBRAS DE TENSÃO DOS MICROFILAMENTOS DE ACTINA DAS CÉLULAS HEPÁTICAS NAS CONDIÇÕES DE CULTIVO 2D, 3D-ON E 3D-IN NOS TEMPOS DE 48 E 96 HORAS

Esse experimento teve como objetivo dar sequência ao processo de análises da arquitetura do citoesqueleto das células HepG2 em diferentes condições de cultivo e tempos estabelecidos. Foi possível averiguar com detalhes, através da marcação da faloidina, as fibras de tensão de estresse dos microfilamentos de actina em cada substrato estudado. Na condição controle 2D, Figuras 22A e 22B, as fibras de tensão do microfilamento de actina mostraram-se mais evidentes, tanto no tempo de 48 horas como em 96 horas, conforme as figuras ampliadas com bordas brancas. Já nas condições 3D-ON e 3D-IN, Figuras 22C a 22F, nos tempos de 48 e 96 horas, verificou-se que o citoesqueleto das células HepG2 não apresentava fibras de estresses como a condição controle (Figuras 22A e 22B). Todavia, evidenciou-se a presença de prolongamentos citoplasmáticos, características essas já demonstradas em experimentos anteriores, Figuras 17C a 17F. De acordo com Scheiwea e colaboradores (2015), *in vivo*, as células são expostas a forças mecânicas de muitas maneiras diferentes. Essas forças podem influenciar fortemente as funções celulares ou podem até levar a doenças. Através de seu mecanismo de detecção, as células são capazes de perceber a informação física da MEC e traduzi-la em sinais bioquímicos, resultando em respostas celulares. Então, sugere-se que em um ambiente mais rígido como o cultivo 2D, pode sofrer alterações no seu perfil morfológico, corroborando a literatura no que se refere à um sistema estático que não mimetiza o nicho natural da célula (PAMPALONI *et al.*, 2007). Em contraste, a morfologia diferenciada das condições 3D-ON (Figuras 22C e 22D) e 3D-IN (Figuras 22E e 22F), pode ser explicada pela elasticidade da matriz de colágeno I. Para isso, a microscopia confocal mostrou-se uma ferramenta eficaz para a observação da ordenação das fibras de tensão do microfilamento de actina das células em um sistema coloidal. De acordo com van Blaaderen e Wiltzius (1995), essa técnica permite estudar estruturas, em modelos coloidais fluorescentes, em um espaço micrométrico com alta precisão.

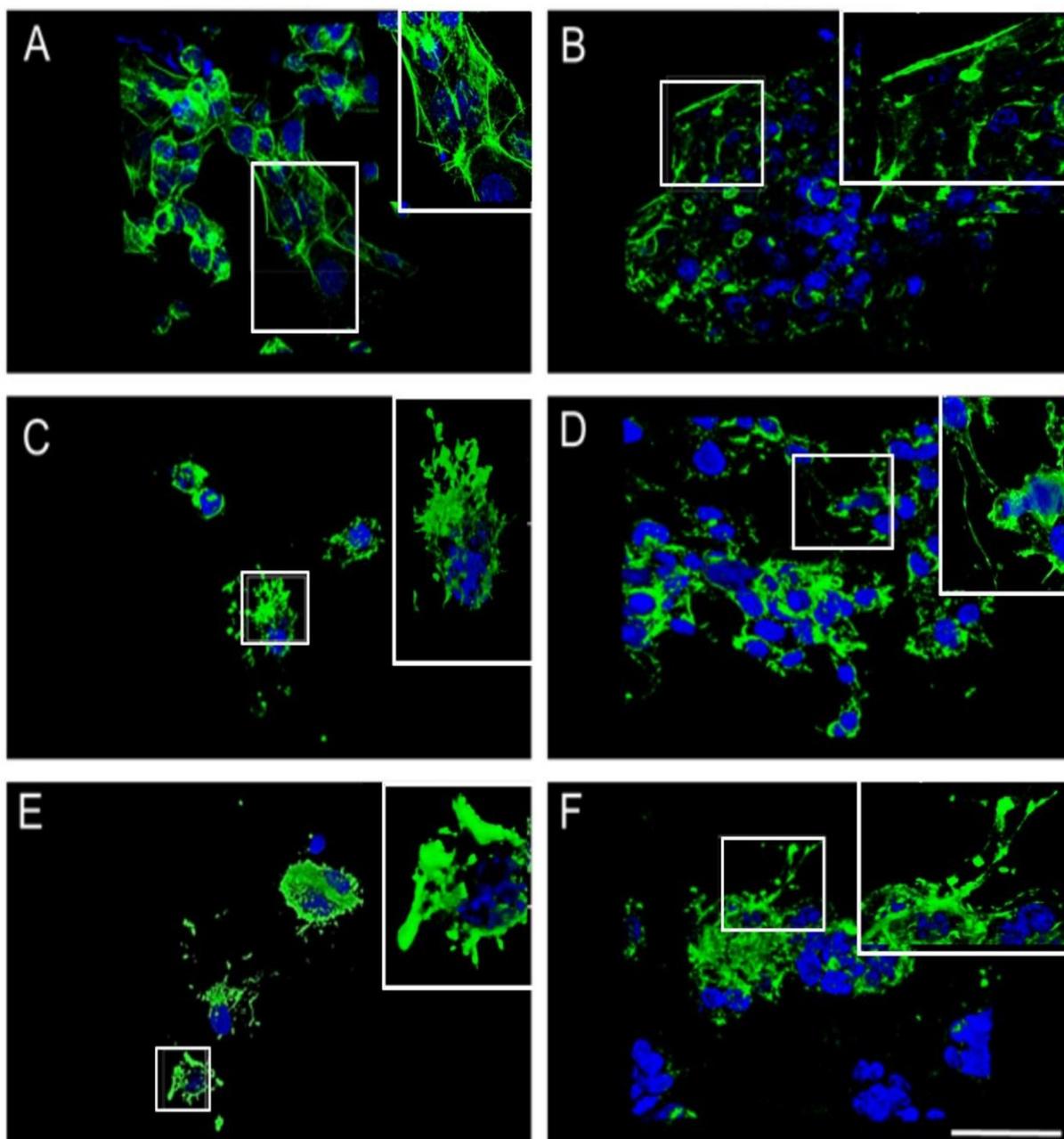


Figura 22. Microscopia confocal das fibras de tensão do microfilamento de actina das células HepG2: 2D, 3D-ON e 3D-IN nos diferentes substratos, nos tempos de 48 e 96 horas. Marcações para faloidina (marcador de microfilamentos de actina - verde) e DAPI (azul). Os detalhes das imagens estão nas caixas de insertos com bordas brancas, representando os aumentos das figuras. Observou-se na condição 2D que as fibras de tensão da actina mostraram-se mais evidentes, tanto no tempo de 48 horas como em 96 horas, (Figuras 22A e 22B). Todavia, nas condições 3D-ON e 3D-IN, Figuras 22C a 22F, em ambos os tempos de 48 e 96 horas, evidenciou-se a expressão de prolongamentos citoplasmáticos. Objetiva de 63x. Barra de escala de 20 μm .

5.11 AVALIAÇÃO DA SECREÇÃO DE ALBUMINA POR ELISA DAS CÉLULAS HEPÁTICAS (2D, 3D-ON E 3D-IN) NOS TEMPOS DE 48 E 96 HORAS

Para complementar os resultados deste trabalho, foi utilizado o protocolo do laboratório LCCM para a realização do ensaio ELISA do tipo sanduíche, utilizando o kit ELISA de albumina humana (Bethyl Laboratories, catálogo E88-129).

O procedimento analítico por espectrofotometria permitiu determinar com eficácia a concentração de albumina mediante absorção de luz. Uma solução, quando iluminada por luz branca, apresenta uma cor que é resultante da absorção relativa dos vários comprimentos de onda que a compõem. O resultado final da reação é uma solução amarela, o que significa que a cor absorvida é o azul, sua cor complementar. Assim, para a realização da leitura no espectrofotômetro foi utilizada a luz absorvida e não a refletida, por esse motivo foi realizada a leitura a 450 nm, comprimento de onda correspondente à cor azul. Foi observado que houve secreção de albumina em todas as condições e tempos avaliados e que estas concentrações correspondem aos níveis descritos em literatura, como observado em BOUMA (1989) e ANDREWS (2003). Sugere-se que a presença da matriz de colágeno tipo I não alterou a funcionalidade das células HepG2, elas mantiveram sua atividade metabólica nesse parâmetro (Figura 23).

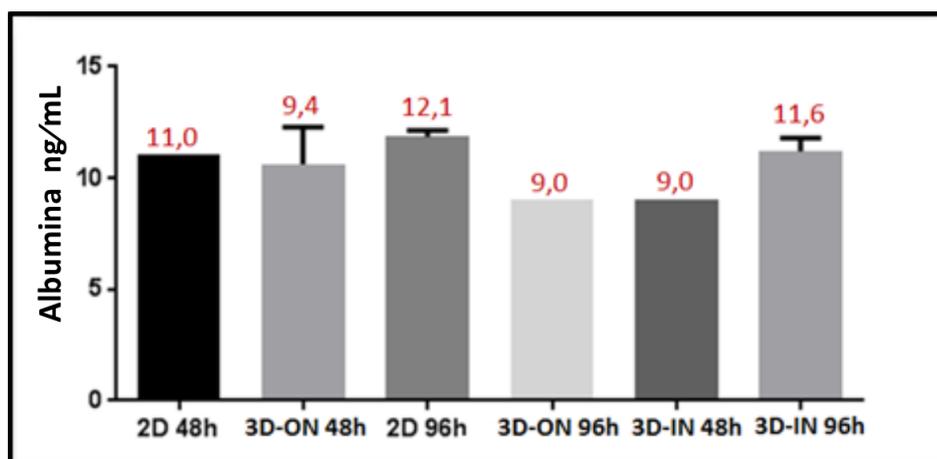


Figura 23. Gráfico de barras representando a secreção de albumina das células HepG2: 2D, 3D-ON e 3D-IN nos tempos de 48 e 96 horas. No gráfico, o eixo das abscissas representa as 3 condições de cultivo das células tumorais nos tempos de 48 e 96 horas e o eixo das coordenadas a concentração de albumina em ng/mL. Cada coluna corresponde ao sobrenadante coletado em três diferentes cultivos das células HepG2 em condições basais, nos tempos de 48 e 96 horas após a troca de meio. Observou-se que nas três condições de cultivo e tempos determinados houve secreção de albumina. O n amostral para cada condição do experimento foi de 3 triplicatas.

6 CONCLUSÃO

Neste trabalho foi estabelecido com sucesso um protocolo de produção de matriz 3D de colágeno tipo I para cultivo das células hepáticas HepG2.

Os resultados mostram que o cultivo destas células nessa matriz 3D proporciona um ambiente mais próximo ao ambiente do arcabouço hepático. Assim, pode-se concluir que o cultivo das células HepG2, dentro da matriz de colágeno tipo I, foi obtido com sucesso.

O manuseio técnico das matrizes é mais eficaz na concentração final de colágeno de 1,0 mg/mL e quantidade de solução final de colágeno tipo I de 100 μ L para a preparação de cada matriz. Nessa concentração de colágeno foi observada uma boa penetrância dos anticorpos e fluoróforos para marcação das proteínas nas células.

Os protocolos gerados pelo grupo nesse trabalho (Anexos: cultura em 3D, fluorescência direta e imunofluorescência indireta) são reprodutíveis e foram padronizados para utilização dos discentes do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho-UFRJ, bem como outras instituições de pesquisa.

Os resultados aqui demonstrados foram avaliados com alta eficiência, tomando como base a utilização da microscopia confocal. A utilização da microscopia confocal se mostrou uma eficiente ferramenta de análise das células HepG2 nessa matriz de colágeno I. A técnica confocal gerou imagens 2D e 3D nítidas e detalhadas, em alta resolução, além de permitir a coleta de informações nas três dimensões espaciais.

Deve ser ressaltada a aplicabilidade futura dos protocolos estabelecidos nesse trabalho, que poderão ser úteis para análise de outros tipos celulares, como por exemplo, seguindo o estudo de células hepáticas, as células estreladas que muito têm-se referenciado em literatura.

7 REFERÊNCIAS

AAMODT, J. M.; GRAINGER, D. W. Extracellular matrix-based biomaterial scaffolds and the host response. *Biomaterials*, 86, 68-82, 2016.

ALBERTS, B. *et al.* *Biologia Molecular da Célula*, 5a. ed. Editora: Artmed, 2010.

ANDREWS E; FELDHOFF P; FELDHOFF R; LASSITER H. Comparative effects of cytokines and cytokine combinations on complement component C3 secretion by HepG2 cells. *Elsevier. Cytokine* 23 164-169, 2003.

ARIAS, I. et al *Organizational Principles of the Liver*. In: *The Liver: Biology and Pathobiology*. 5. Ed. New York: Wiley-Blackwell, 2009.

ASTASHKINA, A; MANN, B; GRAINGER, DW. A critical evaluation of in vitro cell culture models for high-throughput drug screening and toxicity. *Pharmacology & therapeutics*, v. 134, n. 1, p. 82-106, 2012.

ATCC. Banco de Células. Disponível em:

<https://www.atcc.org/Products/All/HB8065.aspx#characteristics>. Acesso em: 05 julho. 2017.

BASSO, K.M.; BRACARENSE, A.P.F.R.L.; Tissue explants: a model rediscovered in animal experiments. *Semina: Ciências Agrárias, Londrina*, v. 34, n. 6, suplemento 2, p. 3951-3958, 2013.

Balijepalli, A and Sivaramakrishan, V. Organs-on-chips: research and commercial perspectives. *Drug Discov.* 22(2):397–403, 2017.

BIOGEN Científica. Catálogos Biogen. Disponível em:

<https://www.biogen.es/catalogos/591686-catalogo-original-bmg-2018.html>. Acesso em: 06 fev 2019.

BOUMA M-E; ROGIER E; VERTHIER N; LABARRE C; FELDMANN G. Further Cellular Investigation of the Human Hepatoblastoma derived Cell Line HepG2: Morphology and Immunocyto Chemical Studies of Hepatic-secreted proteins. *In Vitro Cellular & Developmental Biology*. Volume 25, Number 3, Part I, 1989.

CASEY, A; GARGOTTI M; BONNIER F; BYRNE H. J. Chemotherapeutic efficiency of drugs in vitro: Comparison of doxorubicin exposure in 3D and 2D culture matrices. *Elsevier Toxicology in Vitro* 33: 99-104. 2016

DE SOUZA, W. et al. *Microscopia Óptica: Fundamentos e Aplicações às Ciências Biomédicas*, 1a. ed. SBMM, 2010.

DIASPRO, A; FARETTA, M e SAPUPPO, P. *Confocal Microscopy*. Leica Microsystems, 2008.

DUVAL, K; GROVER, H; HAN, LH; MOU, Y; PEGORARO, AF; FREDBERG, J; CHEN, Z. Modeling Physiological Events in 2D vs 3D Cell Culture. 32(4):266–277. 2017.

ELKAYAM, T.; AMITAY-SHAPRUT, S.; DVIR-GINZBERG, M.; HAREL, T.; COHEN, S. Enhancing the drug metabolism activities of C3A – a human hepatocytes cell line – by tissue engineering within alginate scaffolds. Tissue Engineering, v.12, p.1357-1368, 2006.

FISCHBACH, C; CHEN, R; MATSUMOTO, T; SCHMELZLE, T; BRUGGE, JS; POLVERINI, PJ; MOONEY DJ. Engineering tumors with 3D scaffolds. Nat Methods. 4(10):855-60. 2007

FUKUDA, T. et al. Isolation and expansion of human pluripotent stem cell-derived hepatic progenitor cells by growth factor defined serum-free culture conditions. Experimental Cell Research, v. 352, n.2, p. 333-345. 2017.

GODOY, P. et al. Recent advances in 2D and 3D in vitro systems using primary hepatocytes, alternative hepatocyte sources and non-parenchymal liver cells and their use in investigating mechanisms of hepatotoxicity, cell signaling and ADME. Arch Toxicol, 87 (8): 1315-530, 2013.

GREEN, JA; YAMADA, KM. Three-Dimensional Microenvironments Modulate Fibroblast Signaling Responses. PMC Adv Drug Deliv Rev. 59(13): 1293–1298, 2007.

GUO, L. et al. Similarities and differences in the expression of drug metabolizing enzymes between human hepatic cell lines and primary human hepatocytes. Drug Metabolism and Disposition, v. 39, n.3, p. 528-538. 2011.

HAHN, W.C. immortalization and transformation of human cells. Molecules and Cells, v.13, n.3, p.351-361, 2002.

HUH, D; LESLIE, DC; MATTHEWS, BD et al., A Human Disease Model of Drug Toxicity – Induced Pulmonary Edema in a Lung-on-a-Chip Microdevice. 4(159), 2012.

IHALAINEN TO, Aires L, HERZOG FA, SCHWARTLANDER R, Moeller J, VOGEL V. Differential basal-to-apical accessibility of lamin A/C epitopes in the nuclear lamina regulated by changes in cytoskeletal tension. Nat Mater 14: 1252–1261. DOI: 10.1038/nmat4389, 2015.

IHRKE, G. et al. WIF-B Cells: An In Vitro Model for Studies of Hepatocyte Polarity. The Journal of Cell Biology, 123(6): 1761-75, 1993.

JUNQUEIRA, LC; CARNEIRO, J. Histologia Básica. 12. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013.

LANCASTER, MA; RENNER, M; MARTIN, CA *et al.*, Cerebral organoids model human brain development and microcephaly. Nature, 501(7467):373–379. 2013.

LEE, JS; ROMERO, R; HAN, YM; KIM, HC; KIM, CJ; HONG, JS; HUH, D. Placenta-on-a-chip: a novel platform to study the biology of the human placenta. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 29(7):1046-54, 2016.

KNASMULLER, S. et al. Use of human-derived liver cell lines for the detection of environmental and dietary genotoxicants; current state of knowledge. *Toxicology*, 198(1-3):315-328, 2004.

KOSTADINOVA, R. *et al.* A long-term three dimensional liver co-culture system for improved prediction of clinically relevant drug-induced hepatotoxicity. *Toxicology and Applied Pharmacology* 268, 1-16, 2013.

KRUSKAL, WILLIAM H.; WALLIS, W. Allen. «Use of Ranks in One-Criterion Variance Analysis». *Journal of the American Statistical Association.* 47 (260): 583-621. ISSN 0162-1459. DOI: 10.1080/01621459.1952.10483441, 1952.

MABRY KM, PAYNE SZ, ANSETH KS. Microarray analyses to quantify advantages of 2D and 3D hydrogel culture systems in maintaining the native valvular interstitial cell phenotype. *Biomaterials* 74: 31-41, 2016. DOI: 10.1016/j.biomaterials.09.035, 2015.

MANNHEIMER, WA. Microscopia dos materiais: uma introdução. Colaboração de P. F. Schmidt, G. F. Vander e D. B. Williams. Rio de Janeiro: E-papers, 2002. 221 p. ISBN 8587922548, 2002.

MARTINEZ-HERNADEZ, A; AMENTA, PS. The extracellular matrix in hepatic regeneration. *FASEB J*; 9 (14):1401-10, 1995.

MAZZOLENI, G; DI LORENZO, D; STEIMBERG, N. Modelling tissues in 3D: the next future of pharmaco-toxicology and food research? *Genes Nutr* 4:13-22, 2009.

MENG, Q. Three-dimensional culture of hepatocytes for prediction of drug-induced hepatotoxicity. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, 6, 733-746, 2010.

MICHAELIS. *Moderno Dicionário da Língua Portuguesa*. Disponível em: <<http://michaelis.uol.com.br/moderno/portugues/index.php>>. Acesso em: 23 jan. 2019.

MIRON-MENDOZA, M; SEEMANN, J; GRINNELL, F. The differential regulation of cell motile activity through matrix stiffness and porosity in three dimensional collagen matrices. *Biomaterials*; 31:6425-35, 2010.

MURPHY, DOUGLAS B. *Fundamentals of Light Microscopy and Electronic Imaging*/Douglas B. Murphy. Department of Cell Biology, Johns Hopkins University School of Medicine – Wiley-Liss, ISBN 0-471-25391-X QH211.M87, 2001.

NAKAMURA, K.; KATO, N.; AIZAWA, K.; MIZUTANI, R.; YAMAUCHI, J.; TANOUE, A. Expression of albumin and cytochrome P450 enzymes in HepG2 cells cultured with nanotechnology-based culture plate with microfabricated scaffold. *Journal of Toxicological Sciences*, v.36, n.5, p.625-633, 2011.

NOOR F; NIKLAS J; MULLER-VIEIRA U; HEINZLE E. An integrated approach to improved toxicity prediction for the safety assessment during preclinical drug development using Hep G2 cells. *Toxicol Appl Pharmacol*; 237(2):221-31, 2009.

O'BRIEN PJ, IRWIN W, DIAZ D, HOWARD-COFIELD E, KREJSA CM, SLAUGHTER MR, et al. High concordance of drug-induced human hepatotoxicity with in vitro cytotoxicity measured in a novel cell-based model using high content screening. *Arch Toxicol. Sep*; 80(9):580-604, 2006.

PAMPALONI, F; REYNAUD, EG; STELZER, EH. The third dimension bridges the gap between cell culture and live tissue. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 8, 839-845, 2007.

PAMPALONI, F; STELZER, EH. Three-Dimensional Cell Cultures in Toxicology. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, 26,117-13826:1, 117-138, 2009.

PARK, K; ROBINSON, JR. Bioadhesive polymers as platforms for oral-controlled drug delivery: method to study bioadhesion. *Elsevier International Journal of Pharmaceutics*. 19(2):107-27, 1984.

PATHPEDIA, LLC. Pathpedia SERVICES & PRODUCTS. Disponível em: e-Atlas > [Histopathology > Liver & bile ducts. Histopathology of Liver & bile ducts. NEOPLASMS. Hepatocellular carcinoma.](#) Acesso em jan, 2016.

PIMENTEL, F. C. Interação dos Hepatócitos Humanos na Matriz Tridimensional de Colágeno Tipo I. 2017. Monografia (Ciências Biológicas – Modalidade Médica) – Instituto de Biofísica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

PINEDA ET, NEREM RM, AHSAN T. Differentiation patterns of embryonic stem cells in two- versus three-dimensional culture. *Cells Tissues Organs* 197: 399–410. DOI: 10.1159/000346166, 2013.

PRASAD V; SEMWOGERERE D; WEEK RE. Confocal microscopy of colloids. *Journal of Physics: Condensed Matter*.113102. DOI:10.1088/0953-8984/19/11/113102, 2007.

RAMAIAHGARI, SC. et al. A 3D in vitro model of differentiated HepG2 cell spheroids with improved liver-like properties for repeated dose high-throughput toxicity studies. *Arch Toxic*, 88 (5): 1083-95, 2014.

RAVI, M. et al. 3D Cell Culture Systems: Advantages and Applications. *Journal of Cellular Physiology*, 230, 16-26, 2015.

ROCHA-AZEVEDO, B; GRINNELL, F. Fibroblast Morphogenesis on 3D Collagen Matrices: The Balance between Cell Clustering and Cell Migration. *Exp Cell Res*. 319(16): 2440–2446. 2013.

RODRIGUEZ-ANTONA, C.; DONATO, M.T.; BOOBIS A.; EDWARDS, R.J.; WATTS,

P.S.; VICENTE CASTELL, J.; GÓMEZ-LECHÓN, M.J. Cytochrome P450 expression in human hepatocytes and hepatoma cell lines: molecular mechanisms that determine lower expression in cultured cells. *Xenobiotica*, v.32, p.505-520, 2002.

ROSS, M H; PAWLINA, W. *Histologia Texto e Atlas em correlação com Biologia Celular e Molecular*. Sexta edição. Editora: Guanabara Koogan. Rio de Janeiro, 2012.

SEMWOGERERE D; WEEKS ER. Confocal Microscopy. Emory University, Atlanta, Georgia, U.S.A. *Encyclopedia of Biomaterials and Biomedical Engineering* DOI: 10.1081/E-EBBE-120024153, 2005.

SCHEIWEA, CA et al. Subcellular stretch-induced cytoskeletal response of single fibroblasts within 3D designer scaffolds. *Elsevier-Biomaterials* Volume 44, Pages 186-194. DOI.org/10.1016/j.biomaterials.2014.12.018, 2015.

SMETANA Jr., K. Cell biology of hydrogels. Department of Anatomy, First Faculty of Medicine, Charles University, U nemocnice 3, 128 00, Prague 2, Czech Republic. *Biomaterials*, 14(14):1-10, 1993.

STONE V, JOHNSTON H, SCHINS RP. Development of in vitro systems for nanotoxicology: methodological considerations. *Crit Rev Toxicol*. 39(7):613-26, 2009.
TOMIZAWA Y. Clinical benefits and risk analysis of topical hemostats: a review. *J Artif Organs*; 8(3):137-42, 2005.

UKAIRO, O. et al. Long-Term Stability of Primary Rat Hepatocytes in Micropatterned Cocultures. *J Biochem Mol Toxicol*, 27 (3): 204-12, 2013.

VAN BLAADEREN A; WILTZIUS P. Real-Space Structure of Colloidal Hard-Sphere Glasses. *Science*. 270 (5239):1177-1179. 1995.

WILKENING, S; STAHL, F; BADER, F. Comparison of Primary Human Hepatocytes and Hepatoma Cell Line Hepg2 With Regard To Their Biotransformation Properties. *Drug Metabolism and Disposition*. Vol. 31, No. 8. 2003.

WILMER, MJ; NG, CP; LANZ, HL; VULTO, P; SUTER-DICK, L; MASEREEUW, R. Kidney-on-a-Chip Technology for Drug-Induced Nephrotoxicity Screening. *Trends Biotechnol*. 34(2):156-170, 2016.

YIN, J.; MENG, Q.; ZHANG, G.; SUN, Y. Differential methotrexate hepatotoxicity on rat hepatocytes in 2-D monolayer culture and 3-D gel entrapment culture. *Chemico-Biological Interactions*, 180, 368-375, 2009.

ZHANG, YS; YUE, K; ALEMAN, J *et al.*, 3D Bioprinting for Tissue and Organ Fabrication. *Ann. Biomed. Eng.*, 45(1):148–163. 2017.

ZHANG, Y.S. *et al.* Bioprinting 3D microfibrinous scaffolds for engineering endothelialized myocardium and heart-on-a-chip. *Biomaterials* 110 (45 e 59), 2016.

8 ANEXOS

ANEXO 1: PROTOCOLO PARA CULTIVO EM 3D

Plaqueamento das células: Condições 2D, 3D-ON e 3D-IN

- Tripsinizar as células HepG2 em estágio de confluência de 70% e
- Centrifugar por 5 minutos à 1200 rpm;
- Cultivar 20000 céls/cm² em lamínulas de 13 mm (área de 1,33 cm²) e em matrizes de solução de colágeno I de aprox. 8 mm (área de 0,50 cm²), nas condições 3D-ON (cultivo sobre a superfície da matriz) e 3D-IN (cultivo dentro da matriz):
 - Pipetar a suspensão de células (*pelet*) em quantidade necessária de meio DMEM *Low* glicose + 10% SFB, sobre as áreas da lamínula e matriz 3D-ON;
 - Pipetar 1000 µL de meio DMEM *Low* glicose + 10% SFB na área da matriz 3D-IN;
- Deixar na estufa 37°C e 5% de CO₂ nos tempos estabelecidos para estudos;
- A troca do meio deve ser feita a cada 2 dias;
- Pipetar 1000 µL para manutenção dos cultivos na placa de 24 poços.

Preparo das matrizes de colágeno I: cultivo em 3D

- Preparar soluções frescas para as matrizes de colágeno I (ver Tabela anexa);
 - o reagente NaOH é exotérmico, preparar em gelo dentro da capela de exaustão;
- Preparar o fluxo laminar com a luz UV ligada por 20 minutos;
- Higienizar com álcool 70% toda a superfície do fluxo com papel descartável, bem como o material a ser utilizado: compasso, placa de 24 poços;
- Realizar com o compasso o *scratch* (círculo) de 0,8 cm (8 mm) no meio da área de 1,86 cm² da placa;
- Deixar a placa destampada, na luz UV por 20 minutos para esterilização, junto ao material a ser utilizado posteriormente: placa de petri destampada contendo as lamínulas já limpas, pipetas graduadas e a pinça;
- Preparar o material a ser utilizado na matriz:
 - colocar em um isopor com gelo os tubos *falcons* contendo: PBS 10x, NaOH 1N, água destilada e o frasco de colágeno tipo I;
 - separar o meio DMEM *Low* glicose à 10% SFB;
- Separar 2 tubos *falcons* para cada condição de matriz 3D identificando em cada tubo: ON e IN;
- Utilizar a Tabela em anexo para a preparação da matriz de colágeno I;
- Pipetar e ressuspender em cada tubo já identificado as concentrações dos produtos descritos na Tabela pela ordem;
- Prestar atenção quando pipetar a água destilada no tubo IN, descontar o valor de 2×10^4 células/mL do valor da tabela: 786,4 µL
- Prestar atenção que cada vez que utilizar o frasco contendo colágeno I, tampar e voltar ao isopor com gelo (produto isotérmico), para que possa manter suas características adequadas para polimerização;
- Pipetar e ressuspender no tubo *falcon* com identificação IN a quantidade de células para o experimento: 2×10^4 células/mL;
- Pipetar 100 µL de cada solução preparada de colágeno I (ON e IN) no meio do *scratch*;

- Colocar na estufa à 37°C (com muita atenção) por 1 hora para polimerização, sem agitação;
- Completar com o meio DMEM *Low* glicose à 10% SFB:
 - condição 3D-ON (1 mL de meio + 2×10^4 células/mL sobre a matriz);
 - condição 3D-IN (1 mL de meio sobre a matriz com células);
- Manter a placa nessas condições em estufa à 37°C e 5% de CO₂.

Preparo da Condição 2D:

- colocar com a ajuda de uma pinça uma lamínula na área do poço da placa;
- colocar 1 mL de meio + 2×10^4 células/mL sobre a lamínula;
- manter a placa nessa condição em estufa à 37°C e 5% de CO₂.

Especificação do Colágeno:

- Tipo I de cauda de rato;
- Concentração inicial: 10,08 mg/mL;
- Concentração final: 1 mg/mL.

Tabela: Preparação da matriz de colágeno tipo I

Volume (mL)	PBS 10x (μL)	NaOH 1N (μL)	H ₂ O destilada (μL) *	[] Colágeno I (μL) 0,5 mg/mL	[] Colágeno I (μL) 1,0 mg/mL	[] Colágeno I (μL) 1,5 mg/mL
1	100	2,6	786,4	55,5	111	166,5

*para os experimentos das matrizes na condição IN (cultivo dentro da matriz de colágeno tipo I), esse valor é descontado do valor do cálculo final do número de células (2×10^4 células / mL).

ANEXO 2: ETAPAS PRÉ-PROTOCOLOS PARA FLUORESCÊNCIA E IMUNOFLUORESCÊNCIA

Preparo das lamínulas:

- Mergulhar as lamínulas circulares de vidro, 13 mm, em água e detergente *Dextran*;
- Enxaguar com água corrente até sair totalmente o detergente;
- Mergulhar no álcool 70% e deixar *overnight*;
- Colocar as lamínulas para secar em estufa utilizando uma pinça. Não utilizar nenhum tipo de papel para realizar a secagem;
- Deixar em luz UV por 30 min;
- Armazenar em placa de petri de 100 mm²;
- Colocar na placa de 24 poços com auxílio de uma pinça.

Preparo de uma plataforma de parafina para colocar as lamínulas:

- Separar uma tampa de uma placa de 24 poços;
- Derreter a parafina e colocar na parte interna da tampa da placa;
- Deixe secar e endurecer;
- Utilizar essa plataforma para colocar as lamínulas contendo as células já fixadas em Paraformaldeído (PFA).

Etapas dos Protocolos para Fluorescência e Imunofluorescência:

- Retirar meio das células;
- Lavar 3x as células em PBS por 5 minutos cada;
- **OBS:** Todas as soluções até a etapa de fixação devem estar à 37°C;
Preparar soluções frescas;
Utilizar tampão fosfato salino (PBS) diluído 1 vez;
Fazer o PFA na hora, acertar o pH e utilizar por 4 dias.

Montagem (*Fluoromount*™, Sigma catálogo F4680) e Selagem da Lamínula

- Limpar todas as lâminas com álcool 70% e secar com papel absorvente;
- Sobre uma lâmina limpa, pingue uma gota (10 µL) do meio de montagem;
- Retirar da plataforma de parafina com a ajuda de uma pinça a lamínula, com cuidado e coloque-a invertida sobre a gota de forma que o lado das células fique entre o meio de montagem e a lâmina;
- Soltar a matriz da placa com a ajuda de uma ponteira de 200 µL;
- Retirar da placa com a ajuda de uma pinça a matriz de colágeno I, com cuidado (pegar pela borda da matriz, não pelo meio) e coloque-a sobre a gota;
- Colocar uma lamínula retangular sobre a matriz e deixar aderir de forma que a matriz fique entre o meio de montagem e lamínula retangular;
- Evitar a formação de bolhas entre a lâmina e a lamínula;
- Secar o excesso de meio de montagem com auxílio de um papel absorvente;
- Deixe secar por aproximadamente 15 minutos;

- Selar a lamínula (redonda e/ou retangular) com esmalte, preenchendo toda a borda. Não passar esmalte por cima da lamínula, apenas nas bordas;
- Deixar secar completamente;
- As lâminas estão prontas para serem observadas no microscópio;

ANEXO 3: PROTOCOLO PARA FLUORESCÊNCIA

Fixação Paraformaldeído

- Fixar com PFA 4% em PBS (1:1 v/v - 200µL/poço) por 20 minutos (concentração final: 2%);
- Desprezar fixador;
- Lavar 3x com PBS por 5 minutos cada.

Permeabilização e Bloqueio

- Permeabilizar com 0,2% Triton x-100 em PBS por 10 minutos;
- Lavar 2x com PBS por 5 minutos cada;
- Pré-bloquear com 0,2 % BSA + 1% de glicina com PBS por 20 minutos;
- Lavar 3x com PBS por 5 minutos cada;

Marcações com faloidina conjugada com Alexa Fluor® 488 – A12379 (Invitrogen) produzida em *mouse* e DAPI (*Life Technologies*-catálogo D1306)

- Diluir a faloidina (1:500) em PBS e deixar por 60 minutos;
 - 100 µL (lamínulas)
 - 200 µL (matrizes de colágeno I);
- Lavar 2x em PBS por 5 minutos cada;
- Adicionar da solução de estoque de DAPI (*Life Technologies*-catálogo D1306) 1 mg/mL em PBS - Concentração final de uso: 1µg/mL por 15 minutos;
- Lavar 2x com PBS por 5 minutos cada;
- Mergulhar (rapidamente) as lamínulas com o auxílio de uma pinça na água destilada;
- Escorrer o excesso de água em papel absorvente;
- Seguir o item: Montagem e Selagem da Lamínula.

ANEXO 4: PROTOCOLO PARA IMUNOFLUORESCÊNCIA

Primeira Etapa

Fixação Paraformaldeído

- Fixar com PFA 2% em PBS (1:1 v/v - 200µL/poço) por 5 minutos (concentração final: 1%);
- Desprezar fixador;
- Fixar com PFA 4% em PBS (1:1 v/v - 200µL/poço) por 15 minutos (concentração final: 2%);
- Desprezar fixador;
- Lavar 3x com PBS por 5 minutos cada.

Permeabilização e Bloqueio

- Permeabilizar com 0,2% Triton x-100 em PBS por 30 minutos;
- Bloquear com 5 % BSA com PBS por 30 minutos em agitação; utilizar o Shaker (Agitador Kline-série 0304067);
- **Diluições dos anticorpos primários: anti-vinculina 1:500 (V9131-Sigma) produzido em rato ou anti-colágeno I 1:200 (Abcam – catálogo ab292) produzido em coelho**
 - Diluir anticorpo primário em PBS + 1% BSA + 0,2% Triton x-100;
- **Incubação do anticorpo primário *overnight***
 - Colocar a solução diluída nas células:
 - 100 µL (lamínulas)
 - 200 µL (matrizes de colágeno I);
- Deixar em câmara úmida, *overnight* à 4°C;

Segunda Etapa

- Lavar 3x com PBS por 5 minutos cada;
- **Diluição do anticorpo secundário Cy3® (catálogo ab97035) diluído 1:500 (vinculina) ou 1:400 colágeno I (Abcam – catálogo ab292)**
 - Diluir anticorpo secundário em PBS + 1% BSA + 0,2% Triton x-100;
- **Incubação do anticorpo secundário por 2 horas**
 - Colocar a solução diluída nas células:
 - 100 µL (lamínulas)
 - 200 µL (matrizes de colágeno I);
- Deixar as células incubadas por 2 horas;
- Lavar 3x com PBS por 5 minutos cada;
- Adicionar da solução de estoque de DAPI (*Life Technologies*-catálogo D1306) 1 mg/mL em PBS - Concentração final de uso: 1µg/mL por 15 minutos;
- Lavar 2x com PBS por 5 minutos cada;
- Mergulhar (rapidamente) as lamínulas com o auxílio de uma pinça na água destilada;
- Escorrer o excesso de água em papel absorvente;
- Seguir o item: Montagem e Selagem da Lamínula.