



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ

FACULDADE DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

FELIPE RHAYNAN DA SILVA ANDRADE

**CARACTERIZAÇÃO DE UM NOVO MODELO DE MICROTECIDO OBTIDO A
PARTIR DO CULTIVO TRIDIMENSIONAL DE FIBROBLASTOS E SUA
UTILIZAÇÃO NA AVALIAÇÃO DOS EFEITOS CITOTÓXICOS DO VENENO TOTAL
DE *Bothrops erythromelas*.**

FORTALEZA

2023

FELIPE RHAYNAN DA SILVA ANDRADE

CARACTERIZAÇÃO DE UM NOVO MODELO DE MICROTECIDO OBTIDO A PARTIR DO CULTIVO TRIDIMENSIONAL DE FIBROBLASTOS E SUA UTILIZAÇÃO NA AVALIAÇÃO DOS EFEITOS CITOTÓXICOS DO VENENO TOTAL DE *Bothrops erythromelas*.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

Orientadora: Profa. Dra. Helena Serra-Azul Monteiro

Co-orientadora: Profa. Dra. Roberta Jeane Bezerra Jorge

FORTALEZA

2023

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

A567c Andrade, Felipe Rhaynan da Silva.

Caracterização de um modelo de microtecido obtido a partir do cultivo tridimensional de fibroblastos e sua utilização na avaliação dos efeitos citotóxicos do veneno total de *Bothrops erythromelas*. / Felipe Rhaynan da Silva Andrade. – 2023.
93 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Fortaleza, 2023.

Orientação: Profa. Dra. Helena Serra Azul Monteiro.

Coorientação: Profa. Dra. Roberta Jeane Bezerra Jorge.

1. Engenharia Tecidual. 2. Cultura Tridimensional de Células. 3. *Bothrops*. 4. Antiveneno.
I. Título.

CDD 615.1

FELIPE RHAYNAN DA SILVA ANDRADE

CARACTERIZAÇÃO DE UM MODELO DE MICROTECIDO OBTIDO A PARTIR DO
CULTIVO TRIDIMENSIONAL DE FIBROBLASTOS E SUA UTILIZAÇÃO NA
AVALIAÇÃO DOS EFEITOS CITOTÓXICOS DO VENENO TOTAL DE *Bothrops*
erythromelas.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

Orientadora: Profa. Dra. Helena Serra-Azul Monteiro

Co-orientadora: Profa. Dra. Roberta Jeane Bezerra Jorge

Aprovada em: ____/____/____.

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a Dra. Helena Serra Azul Monteiro (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará

Prof. Dr. Tiago Lima Sampaio
Universidade Federal do Ceará

Prof.^a Dra. Ana Celeste Ximenes Oliveira
Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG)

Dedico este trabalho a todos aqueles que não estão mais entre nós, por negligência e pelo negacionismo promovido em um período tão obscuro para todo o planeta. Dedico também a todos que, neste mesmo período, foram fortes e inabaláveis na pesquisa e na atuação contra o COVID-19.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, João e Luzia, por me apoiarem em minhas decisões e por me ensinarem, desde de pequeno, sobre a importância do conhecimento. Por sempre terem colocado minha educação como prioridade. Por acreditarem que eu posso conquistar tudo que eu almejo e por serem meus maiores exemplos de perseverança e força.

Às minhas orientadoras, professora Helena Serra Azul e professora Roberta Jeane por me aceitarem no laboratório, por todo o conhecimento compartilhado, pelas conversas, pelos experimentos realizados e por embarcarem nesse projeto comigo, por acreditar no meu potencial e nos frutos que essa pesquisa poderia render e no que rendeu e no que, com certeza, continuará rendendo.

Aos meus amigos da vida: Alberto Sousa, Amanda Moura, Bruna de Araújo, Cristiane Maria, Hadryel Vieira, Hérica Felipe, Larissa Belizário, Lennon Camilo, Lucas Lopes, Mateus Monteiro e Milena Maciel, em ordem alfabética pra não ter briga, por absolutamente tudo que vivemos nos últimos anos,. Não acho que seja exagero dizer que eu confiaria minha própria vida a cada um de vocês.

Aos meus colegas e amigos do laboratório: Júnior, Priscilla, Ingrid, Ivynna, Joeliton, Danilo, Amanda e aos ICs, pelas conversas e pelo apoio num trabalho mais distante dos trabalhos dos feitos por vocês, pela ajuda, pelas conversas, pela vivência e por todo o aprendizado.

Ao Laboratório de Farmacogenética, o Farmagen, coordenado pela professora Raquel Montenegro, e aos seus membros por, tão gentilmente, me receberem. Essa parceria foi fundamental para a realização deste trabalho.

Ao meu amigo Emerson Lucena, que foi designado pra me ajudar com meus experimentos. Coitado, não sabia o que o esperava. Brincadeiras à parte, esse trabalho é quase tanto seu quanto é meu. Você começou como um parceiro de laboratório e se tornou um grande amigo pra vida. Admiro muito sua inteligência, sua simpatia e sua dedicação. Tenho certeza que você tem um futuro brilhante como pesquisador. Sou muito grato por essa amizade.

A Dra. Aline Marinho por toda a ajuda em tantos momentos, pela ajuda não somente com este trabalho, mas também com disciplinas, dúvidas aleatórias e por, além de ser tão solícita, também ser uma ótima pessoa para sentar e conversar. Seu carisma contagia e sua risada a gente escuta de longe, e quando isso acontece, sabe que quando você chegar vai rir junto com você.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, o CNPq, pelo apoio financeiro, ao Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos e à Unidade Multiusuário pelo aporte concedido para a realização do trabalho.

A todos que contribuíram com esse trabalho, tenha sido no planejamento, na execução ou na motivação, meu muito obrigado!

“I hear the music, I feel the beat and for a moment when I’m dancing I am free.”

Florence Welch

RESUMO

O cultivo tridimensional de células compreende um conjunto de técnicas que vem ganhando notoriedade nos últimos anos devido à sua robustez. O objetivo deste trabalho foi padronizar o cultivo tridimensional de fibroblastos utilizando microchips de agarose como material de ancoragem e utilizar o modelo desenvolvido para realizar tratamentos com o veneno total de *Bothrops erythromelas* e seu respectivo antiveneno. As linhagens de fibroblastos MRC-5 e L929 foram cultivadas em densidades crescentes de células (5×10^4 , 10^5 e $1,5 \times 10^5$ células/chip para a MRC-5 e $1,25 \times 10^4$, $2,5 \times 10^4$ e 5×10^4 células/chip para a L929). Os parâmetros morfométricos foram avaliados através de imagens obtidas do microscópio invertido, são eles: solidez, circularidade e diâmetro de Feret. A linhagem L929 mostrou melhores resultados morfométricos, com parâmetros de crescimento mais regulares, e foi escolhida para os demais experimentos. A viabilidade dos microtecidos foi avaliada através do método de coloração por laranja de acridina e brometo de etídio e mostraram que os microtecidos tinham células viáveis nos dias 5, 7 e 10 de cultivo. Foram realizadas análises histoquímicas e histológicas; hematoxilina/eosina, que mostrou uma boa estrutura dos esferóides. Azul de alcian mostrou uma pequena quantidade de proteoglicanos ácidos. E *Picrosirius red*, que mostrou escassez de colágeno e, por fim, a análise imunohistoquímica com ki-67 mostrou diferentes padrões de multiplicação celular a depender do dia de cultivo. Os microtecidos também foram submetidos a testes farmacológicos utilizando o veneno total de *B. erythromelas* nas concentrações de 12,5 µg/mL e 25 µg/mL por 24h e seu antiveneno (AV) em proporção de 5:1. Os resultados mostraram que o veneno não foi citotóxico em nenhum dos modelos, tradicional e tridimensional, mas causou mudanças morfológicas em ambas as formas de cultivo. As células em monocamada perderam formato e tamanho e os microtecidos mostraram uma soltura de células, perdendo sua estrutura. O antiveneno foi capaz de prevenir as ações do veneno. Dessa forma, este estudo mostrou que a linhagem de células L929 é capaz de apresentar um crescimento tridimensional estável. Mostrou também que os microtecidos gerados têm potencial para uso em experimentos farmacológicos.

Palavras-chave: Engenharia Tecidual; Cultura Tridimensional de Células; *Bothrops*; Antiveneno

ABSTRACT: CHARACTERIZATION OF A NEW MODEL OF MICROTISSUE OBTAINED FROM THE THREE-DIMENSIONAL CULTURE OF FIBROBLASTS AND ITS USE IN THE EVALUATION OF THE CYTOTOXIC EFFECTS OF THE TOTAL VENOM OF *Bothrops erythromelas*.

The three-dimensional culture of cells comprises a set of techniques that have gained notoriety in recent years due to their robustness. The objective of this study was to standardize the three-dimensional culture of fibroblasts using agarose microchips as anchoring material and to use the developed model to perform treatments with the total venom of *Bothrops erythromelas* and its respective antivenom. The MRC-5 and L929 fibroblast cell lines were cultured at increasing cell densities (5×10^4 , 10^5 , and 1.5×10^5 cells/chip for MRC-5 and 1.25×10^4 , 2.5×10^4 , and 5×10^4 cells/chip for L929). Morphometric parameters were evaluated through images obtained from an inverted microscope: solidity, circularity, and Feret diameter. The L929 cell line showed better morphometric results, with more regular growth parameters, and was chosen for further experiments. The viability of the microtissues was assessed using the acridine orange and ethidium bromide staining method, which showed viable cells in the microtissues on days 5, 7, and 10 of cultivation. Histochemical and histological analyses were performed, including hematoxylin/eosin staining, which showed a good structure of the spheroids. Alcian blue staining revealed a small amount of acid proteoglycans. Picrosirius red staining showed a scarcity of collagen, and finally, immunohistochemical analysis with ki-67 showed different patterns of cell proliferation depending on the cultivation day. The microtissues were also subjected to pharmacological tests using the total venom of *B. erythromelas* at concentrations of 12.5 $\mu\text{g/mL}$ and 25 $\mu\text{g/mL}$ for 24 hours, along with its antivenom (AV) at a ratio of 5:1. The results showed that the venom was not cytotoxic in either the traditional or three-dimensional models, but it caused morphological changes in both forms of cultivation. The cells in a monolayer lost their shape and size, and the microtissues showed cell detachment, losing their structure. The antivenom was able to prevent the actions of the venom. Thus, this study showed that the L929 cell line is capable of presenting stable three-dimensional growth. It also demonstrated that the generated microtissues have potential for use in pharmacological experiments.

Keywords: Tissue Engineering; Three dimensional; Bothrops; Antivenom.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Considerada a primeira linhagem de células imortalizadas, a linhagem de fibroblastos murino C3H em baixa densidade (à esquerda) e alta densidade (à direita).

Figura 2 - Planejamento experimental do presente trabalho

Figura 3 - Representação do passo a passo para a produção dos chips de agarose, sendo (A) Molde utilizado para fabricação dos chips de agarose (B) Representação do molde com a solução de agarose 2%, representado na cor rosa; (C) Remoção do chip após solidificação e (D) Chip de agarose pronto para uso

Figura 4 - Linhagem de células MRC-5 quando cultivadas em esferóides nas densidades (A) 5×10^4 células por chip (B) 10^5 células por chip e (C) $1,5 \times 10^5$ células por chip, nos dias 5, 10, 15 e 20 de cultivo respectivamente. As imagens foram obtidas através do uso de um microscópio de contraste de fase invertido.

Figura 5 - Gráficos referentes ao diâmetro, solidez e circularidade da linhagem MRC-5 quando cultivada em esferóides. O eixo X é referente aos dias de cultivo dos esferóides e o eixo Y ao parâmetro avaliado. O diâmetro de feret foi obtido através da comparação dos tamanhos dos esferóides pelas imagens obtidas em microscópio invertido. A solidez representa o quão regular é a estrutura do perímetro dos esferóides, sendo valores mais próximos de 1 considerados regulares e mais distantes de 1 mais irregulares. A Circularidade é a representação do quanto o esferóide medido se aproxima de uma estrutura circular, em valores próximos de 1, ou de uma estrutura em elipse, valores mais distantes de um.

Figura 6 - Linhagem de células L929 quando cultivadas em esferóides nas densidades (A) $1,25 \times 10^4$ células por chip (B) $2,5 \times 10^4$ células por chip e (C) 5×10^4 células por chip, nos dias 5, 10 e 15 de cultivo respectivamente. No décimo quinto dia de cultivo os esferóides já ocupavam todo o espaço dos poços, tornando a continuidade da cultura inviável. As imagens foram obtidas através do uso de um microscópio de contraste de fase invertido.

Figura 7 - Gráficos referentes ao diâmetro, solidez e circularidade da linhagem L929 quando cultivada em esferóides. O eixo X é referente aos dias de cultivo dos esferóides e o eixo Y ao parâmetro avaliado. O diâmetro de feret foi obtido através da comparação dos tamanhos dos esferóides pelas imagens obtidas em

microscópio invertido. A solidez representa o quão regular é a estrutura do perímetro dos esferóides, sendo valores mais próximos de 1 considerados regulares e mais distantes de 1 mais irregulares. A Circularidade é a representação do quanto o esferóide medido se aproxima de uma estrutura circular, em valores próximos de 1, ou de uma estrutura em elipse, valores mais distantes de um.

Figura 8 - Viabilidade dos esferóides da linhagem L929 através do método de coloração diferencial por Laranja de Acridina e Brometo de Etídio nos dias 5, 7 e 10 de cultivo, respectivamente. As células viáveis são coradas pela laranja de acridina e apresentam fluorescência de cor verde, enquanto células apoptóticas são coradas pelo brometo de etídio e apresentam fluorescência de cor vermelho/laranja.

Figura 9 - Histologia dos esferóides de fibroblastos da linhagem L929 nos dias 5, 7 e 10 de cultivo, respectivamente, quando corados com hematoxilina e eosina. As imagens mostram uma estrutura regular e íntegra, além de uma boa distribuição das células por todo o microtecido.

Figura 10 - Histoquímica dos esferóides de fibroblastos da linhagem L929 nos dias 5, 7 e 10 de cultivo, respectivamente, quando corados com o corante Azul de Alcian. O corante Azul de Alcian cora componentes ácidos com a cor azul. As imagens mostram fraca coloração entre as células, indicando uma baixa presença de proteoglicanos ácidos, componentes da matriz extracelular do tecido conjuntivo

Figura 11 - Imunohistoquímica dos esferóides de fibroblastos da linhagem L929 nos dias 5, 7 e 10 de cultivo, respectivamente, quando marcados com Ki-67 e contrastados com Hematoxilina. As células com o núcleo marrom possuem marcação positiva para Ki-67, indicando que estas células estão em processo de multiplicação celular. Os microtecidos nos dias iniciais têm células em divisão divididas por todo o esferóide, enquanto que nos dias 7 e 10 as células em divisão se concentram nas bordas dos esferóides, como mostrado abaixo.

Figura 12 - Histoquímica dos esferóides de fibroblastos da linhagem L929 nos dias 5, 7 e 10 de cultivo, respectivamente, quando marcados com o corante Picrosirius. O corante Picrosirius marca fibras de colágeno com uma cor amarela/alaranjada. Desta forma, os microtecidos de fibroblastos L929 não produziram colágeno, pois não tiveram marcação positiva em nenhum dos dias de cultivo, como mostrado abaixo.

Figura 13 - Gráfico de viabilidade celular pelo ensaio colorimétrico Alamar Blue® da linhagem de fibroblastos L929 quando tratada com concentrações crescentes do

veneno total de *Bothrops erythromelas*. O ensaio mostrou que o veneno não foi citotóxico em nenhuma concentração testada.

Figura 14 - Gráfico de viabilidade celular da linhagem L929 quando tratada com duas concentrações do veneno total de *Bothrops erythromelas* e em três tempos. O veneno total de *B. erythromelas* não foi citotóxico nas concentrações e tempos testados. As células mantiveram viabilidade

Figura 15 - Coloração Panótico da linhagem L929 na ausência de tratamento (controle negativo). As imagens mostram a morfologia normal das células, que têm como características um formato “estrelado” ou “pontudo”, como pode-se observar.

Figura 16 - Coloração Panótico da linhagem L929 tratadas por 24h com doxorubicina nas concentrações de 12,5 µg/mL e 25 µg/mL, respectivamente (controle positivo).

Figura 17 - Coloração Panótico da linhagem L929 tratadas por 24h com o veneno total de *Bothrops erythromelas* na concentração de 12,5 µg/mL. As análises evidenciam que, na concentração e tempo testados, as células perderam muito de sua capacidade de adesão, mas ainda contém uma boa quantidade de células quando comparado com o tratamento de 25µg/mL (abaixo). Além disso, também pode-se notar a diferença na morfologia quando comparada com as células não tratadas.

Figura 18 - Coloração Panótico da linhagem L929 tratadas por 24h com o veneno total de *Bothrops erythromelas* na concentração de 25 µg/mL. As análises evidenciam que, na concentração e tempo testados, as células perderam muito de sua capacidade de adesão, tendo sua maioria perdidas nos processos de realização do teste. Além disso, também pode-se notar a diferença na morfologia quando comparada com as células não tratadas.

Figura 19 - Microtecidos da linhagem L929 tratados com o veneno total de *Bothrops erythromelas* na concentração de 12,5 µg/mL por 24h. Visualmente, os esferóides não apresentaram diferenças notáveis no formato quando comparados aos esferóides não tratados (mostrados anteriormente).

Figura 20 - Microtecidos da linhagem L929 tratados com o veneno total de *Bothrops erythromelas* na concentração de 12,5 µg/mL por 24h, dessa vez na presença também do soro antibotrópico na proporção de 5:1 de antiveneno para veneno. Assim como nos tratamentos somente com o veneno total de *B. erythromelas*, os

microtecidos não apresentam diferenças visualmente notáveis no formato, quando comparados aos microtecidos não tratados.

Figura 22 - Microtecidos da linhagem L929 tratados com o veneno total de *Bothrops erythromelas* na concentração de 25 µg/mL por 24h, dessa vez na presença também do soro antibotrópico na proporção de 5:1 de antiveneno para veneno. Diferente dos microtecidos que não foram tratados com o soro, os esferóides dessa vez apresentaram uma estrutura semelhante aos não tratados, evidenciando a ação do antiveneno.

Figura 23 - Microtecidos da linhagem L929 tratados com o veneno total de *Bothrops erythromelas* nas concentrações de 12,5 µg/mL (esquerda) e 25 (direita) µg/mL por 24h na ausência do soro antibotrópico. Após passarem pelo processo de recuperação, ou seja, da retirada dos chips de agarose, os microtecidos apresentaram soltura expressiva das células, principalmente na concentração de 25 µg/mL.

Figura 24 - Microtecidos da linhagem L929 tratados com o veneno total de *Bothrops erythromelas* nas concentrações de 12,5 µg/mL (esquerda) e 25 (direita) µg/mL por 24h na presença também do soro antibotrópico, na proporção de 5:1 de antiveneno para veneno. Após passarem pelo processo de recuperação, ou seja, da retirada dos chips de agarose, os microtecidos não apresentaram soltura das células.

Figura 25 - Gráficos referentes ao diâmetro, solidez e circularidade da linhagem L929 quando cultivada em esferóides. O diâmetro de feret foi obtido através da comparação dos tamanhos dos esferóides pelas imagens obtidas em microscópio invertido. A solidez representa o quão regular é a estrutura do perímetro dos esferóides, sendo valores mais próximos de 1 considerados regulares e mais distantes de 1 mais irregulares. A Circularidade é a representação do quanto o esferóide medido se aproxima de uma estrutura circular, em valores próximos de 1, ou de uma estrutura em elipse, valores mais distantes de um.

Figura 26 - Viabilidade dos esferóides da linhagem L929 na densidade de $2,5 \times 10^4$ células/chip através do método de coloração diferencial por Laranja de Acridina e Brometo de Etídio quando tratados por 24h com 12,5 µg/mL (esquerda) e 25 µg/mL (direita) do veneno total de *B. erythromelas* na ausência de antiveneno. Os tratamentos foram realizados no sétimo dia de cultivo dos microtecidos. As células viáveis são coradas pela laranja de acridina e apresentam fluorescência de cor

verde, enquanto células apoptóticas são coradas pelo brometo de etídio e apresentam fluorescência de cor vermelho/laranja

Figura 27 - Viabilidade dos esferóides da linhagem L929 na densidade de $2,5 \times 10^4$ células/chip através do método de coloração diferencial por Laranja de Acridina e Brometo de Etídio quando tratados por 24h com 12,5 µg/mL (esquerda) e 25 µg/mL (direita) do veneno total de *B. erythromelas* na presença do soro antivenenoso na proporção de 5:1 de antiveneno para veneno. Os tratamentos foram realizados no sétimo dia de cultivo dos microtecidos. As células viáveis são coradas pela laranja de acridina e apresentam fluorescência de cor verde, enquanto células apoptóticas são coradas pelo brometo de etídio e apresentam fluorescência de cor vermelho/laranja

Figura 28 - Histologia dos microtecidos de fibroblastos da linhagem L929 tratados com o veneno total *Bothrops erythromelas* nas concentrações 12,5 µg/mL (esquerda) e 25 µg/mL (direita), quando corados com hematoxilina e eosina. As imagens mostram uma estrutura comprometida, além de uma desagregação dos microtecidos e, conseqüentemente, soltura das células.

Figura 29 - Histologia dos microtecidos de fibroblastos da linhagem L929 tratados com o veneno total *Bothrops erythromelas* nas concentrações 12,5 µg/mL (esquerda) e 25 µg/mL (direita) e com antiveneno na proporção de 5:1 de antiveneno para veneno, quando corados com hematoxilina e eosina. Os resultados mostraram que o antiveneno inibiu a ação do veneno, impedindo a desagregação dos microtecidos causada pelo veneno.

Figura 30 - Histoquímica dos microtecidos de fibroblastos da linhagem L929 quando tratadas com o veneno total de *B. erythromelas* nas concentrações de 12,5 µg/mL (esquerda) e 25 µg/mL (direita) quando corados com o corante Azul de Alcian. O corante Azul de Alcian marca componentes ácidos com a cor azul. As imagens mostram uma coloração azul entre as células do microtecido tratado com o veneno na concentração de 12,5 µg/mL, indicando uma marcação positiva para a presença de proteoglicanos ácidos, componentes da matriz extracelular do tecido conjuntivo. O microtecido tratado com o veneno na concentração de 25 µg/mL teve uma marcação ausente e as células desagregadas.

Figura 31 - Histoquímica dos microtecidos de fibroblastos da linhagem L929 quando tratados com o veneno total de *B. erythromelas* nas concentrações de 12,5 µg/mL (esquerda) e 25 µg/mL (direita) e com antiveneno na proporção de 5:1 de

antiveneno para veneno quando corados com o corante Azul de Alcian. O corante Azul de Alcian marca componentes ácidos com a cor azul. As imagens mostram uma coloração azulada entre as células dos microtecidos de ambos os tratamentos, indicando marcação positiva para proteoglicanos ácidos e sugerindo que estes têm papel importante na agregação das células.

Figura 32 - Histoquímica dos microtecidos de fibroblastos da linhagem L929 tratados com o veneno total de *B. erythromelas* nas concentrações de 12,5 µg/mL (esquerda) e 25 µg/mL (direita) quando marcados com o corante Picrosirius. O corante Picrosirius marca fibras de colágeno com uma cor vermelha. Desta forma, os microtecidos de fibroblastos L929 não produziram colágeno, pois não tiveram marcação positiva em nenhum dos tratamentos.

Figura 33 - Histoquímica dos microtecidos de fibroblastos da linhagem L929 tratados com o veneno total de *B. erythromelas* nas concentrações de 12,5 µg/mL (esquerda) e 25 µg/mL (direita) e com antiveneno na proporção de 5:1 de antiveneno para veneno quando marcados com o corante Picrosirius. O corante Picrosirius marca fibras de colágeno com uma cor vermelha. Desta forma, os microtecidos de fibroblastos L929 não produziram colágeno, pois não tiveram marcação positiva em nenhum dos tratamentos.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

3D	Tridimensional
Asp49	Fosfolipase A ₂
AV	Antiveneno
BPP	Peptídeo Potenciador da Bradicinina
CONCEA	Conselho Nacional de Experimentação Animal
COX-1	Ciclooxigenase 1
COX-2	Ciclooxigenase 2
CTL	Lectina do tipo C
DC	desintegrina-like/ cisteína-domínio rico
Disi	Desintegrina
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
ECA	Enzima Conversora de Angiotensina
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ET	Engenharia Tecidual
IL-1	Interleucina 1
IL-10	Interleucina 10
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
INF- γ	Interferon γ
MCTIC	Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações
MEC	Matriz Extracelular
MEM	<i>Modified Eagle Medium</i>
NO	Óxido Nítrico
PBS	Tampão fosfato-salino
PDE	5'NT: 5'-nucleotidase
PI-SVMP	<i>Snake Venom Metalloproteinase</i> da família PI
PIII-SVMP	<i>Snake Venom Metalloproteinase</i> da família PIII
PLB	Fosfolipase B
RENAMA	Rede Nacional de Métodos Alternativos
Ser-Prot	Serinoproteinases

SFB	Soro Fetal Bovino
svVEGF serpente	Fator de crescimento endotelial vascular de veneno de serpente
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral α
UNESCO Cultura	Organização das Nações Unidas para a Educação, a Ciência e a Cultura

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	21
1.1 Métodos Alternativos ao Uso de Animais nas pesquisas de laboratório.....	21
1.2 Cultivo de Células.....	22
1.2.1 Cultivo tridimensional de células.....	24
1.3 Serpentes do Gênero Bothrops: acidentes ofídicos, composição e efeitos fisiopatológicos dos venenos botrópicos.....	26
1.3.1 Venenos botrópicos e o veneno de <i>Bothrops erythromelas</i>.....	27
1.3.2 Efeitos fisiopatológicos dos venenos botrópicos.....	29
1.4 Soro Antibotrópico.....	30
2 RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA.....	31
3 OBJETIVOS.....	33
3.1 Objetivo geral.....	33
3.2 Objetivos específicos.....	33
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	34
PARTE I: GERAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS MICROTECIDOS.....	34
4.1 Planejamento experimental.....	34
4.2 Linhagens celulares e cultivo das células.....	35
4.3 Cultivo tridimensional das linhagens de fibroblastos em chips de agarose... 36	
4.3.1 Preparo da solução de agarose.....	36
4.3.2 Preparo dos chips.....	36
4.3.3 Plaqueamento de células nos chips de agarose.....	37
4.3.4 Protocolo de recuperação dos esferóides.....	38
4.4 Acompanhamento das culturas e análises morfológicas e morfométrica... 38	
4.5 Análise da viabilidade dos esferóides da linhagem L929 nos dias 5, 7 e 10 de crescimento.....	39
4.6 Análises Histoquímicas e histológicas.....	39
4.6.1 Fixação.....	40

4.6.2 Desidratação.....	40
4.6.3 Diafanização (clarificação).....	40
4.6.5 Inclusão em parafina.....	40
4.6.6 Coloração.....	41
4.7 Análise imunohistoquímica.....	41
PARTE II: LINHAGEM L929, EM MONOCAMADA E MICROTECIDOS, TRATADA COM O VENENO DE B. erythromelas E ANTIVENENO.....	42
4.8 Análise da viabilidade celular da linhagem L929 cultivada em monocamada quando tratada com veneno de Bothrops erythromelas pelo ensaio colorimétrico Alamar Blue®.....	42
4.9 Análise da viabilidade celular da linhagem L929 cultivada em monocamada quando tratadas com veneno de Bothrops erythromelas pelo método Azul de Tripan.....	43
4.10 Análise morfológica através do método de coloração Panóptico das células da linhagem L929 cultivadas em monocamada quando tratadas com o veneno total de Bothrops erythromelas.....	44
4.11 Análise da viabilidade celular dos microtecidos de L929 quando tratados com veneno de Bothrops erythromelas e antiveneno pelo ensaio colorimétrico Alamar Blue®.....	45
4.12 Análise da viabilidade dos microtecidos da linhagem L929 quando tratados com veneno de Bothrops erythromelas e antiveneno pelo método Laranja de Acridina/Brometo de Etídeo.....	46
5 RESULTADOS.....	49
PARTE I: GERAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS MICROTECIDOS.....	49
5.1 Acompanhamento das culturas e análises morfológicas.....	49
5.1.1 Linhagem de fibroblastos humanos - MRC-5.....	49
5.1.2 Linhagem de fibroblastos murinos - L929.....	52
5.2 Análise da viabilidade dos esferóides da linhagem L929 através do método de Laranja de Acridina/Brometo de etídio.....	55
5.3 Análises histológicas.....	57
PARTE II: LINHAGEM L929, EM MONOCAMADA E MICROTECIDOS, TRATADA	

COM O VENENO DE B. erythromelas E ANTIVENENO.....	61
5.4 Análise da viabilidade celular da linhagem L929 cultivada em monocamada quando tratada com veneno de Bothrops erythromelas pelo ensaio colorimétrico Alamar Blue®.....	61
5.5 Análise da viabilidade celular da linhagem L929 cultivadas em monocamada quando tratadas com veneno de Bothrops erythromelas pelo método Azul de Tripán.....	62
5.6 Análise morfológica através do método de coloração Panóptico das células da linhagem L929 cultivadas em monocamada quando tratadas com o veneno total de Bothrops erythromelas.....	63
5.7 Acompanhamento das culturas e análises morfológicas dos microtecidos tratados com o veneno de B.erytromelas e antiveneno.....	66
5.8 Análise da viabilidade dos microtecidos da linhagem L929 tratadas com o veneno de B. erythromelas e antiveneno através do método de Laranja de Acridina/Brometo de etídio.....	72
6 DISCUSSÃO.....	79
7 CONCLUSÕES.....	86
REFERÊNCIAS.....	87

1 INTRODUÇÃO

1.1 Métodos Alternativos ao Uso de Animais nas pesquisas de laboratório

É de conhecimento comum que os animais fazem parte da história humana, foram e ainda são utilizados para diversos fins e com diversos propósitos, seja como companhia, transporte, alimentação dentre outros. A utilização de animais em laboratório para fins de pesquisas biomédicas e comportamentais vem sendo feita a milênios, tendo um dos seus primeiros registros históricos datado do século IV a.C, onde estudos realizados por Aristóteles mostraram diferenças anatômicas entre animais através de sua dissecação (ROWAN, 1984). Atualmente, são diversas as aplicações nas pesquisas científicas, como por exemplo a performance de novos potenciais fármacos ou efeitos fisiopatológicos de substâncias, experimentos esses que são importantes para o desenvolvimento de novos tratamentos de doenças.

Ao longo dos anos foram surgindo movimentos que tinham por objetivo reduzir os danos a esses animais, bem como definir um modelo ético a ser seguido quando seu uso fosse feito em laboratório. O princípio dos 3 Rs foi então apresentado pela primeira vez em 1959 na obra *“The principles of humane experimental technique”* de William Russel e Rex Burch. São eles: *Replace*, que quer dizer substituir, e que consiste na substituição dos animais vertebrados e sencientes por invertebrados, embriões de vertebrados ou modelos *in vitro*, desde que fosse possível haver essa substituição sem comprometer os resultados dos experimentos. *Reduce*, que quer dizer reduzir e consiste na redução do número de animais utilizados, também sem que haja prejuízos aos resultados dos experimentos. E, por fim, *Refinement*, que quer dizer refinamento, que visa o refinamento das técnicas utilizadas para que haja diminuição do sofrimento dos animais enquanto os experimentos estiverem sendo realizados (RUSSEL; BURCH, 1959).

Em 1978, a Organização das Nações Unidas para Educação, Ciência e Cultura, a UNESCO, publicou a Declaração Universal dos Direitos dos Animais, do qual o Brasil foi signatário. A declaração tinha como objetivo servir como base para

a elaboração de diretrizes legais no que diz respeito à experimentação animal. No Brasil, a articulação da comunidade científica junto de políticos do Congresso Nacional acabou culminando na criação da Lei Federal 11794/08, que ficou conhecida como Lei Auroca, homenagem ao médico sanitarista Antônio Sérgio da Silva Auroca, tendo sido promulgada em outubro de 2008 (UNESCO, 1978; BRASIL, 1988, 2008). A partir da vigência da Lei Auroca, foi criado o Conselho Nacional de Experimentação Animal (CONCEA), vinculado ao Ministério de Ciência, Tecnologia e Inovação (MCTIC). O CONCEA então estabeleceu a criação de uma câmara de atuação permanente voltada para a implementação de diretrizes, junto a uma Rede Nacional de Métodos Alternativos, o RENAMA, referentes tanto quanto à utilização de métodos alternativos ao uso de animais de laboratório quanto à sua regulamentação (MORETTO, 2019).

Os métodos alternativos ao uso de animais podem ser definidos como sendo um conjunto não apenas de diferentes técnicas e esforços não apenas para a substituição do uso de animais, mas também métodos que contribuem para sua redução e/ou refinamento de técnicas e protocolos. São considerados métodos alternativos o uso de alguns vertebrados como peixes, répteis e anfíbios, sendo alternativos ao uso de mamíferos.

Além dos modelos citados, são também utilizados microrganismos, modelos computacionais e o cultivo de células e tecidos, sempre com uma abordagem de redução, refinamento ou, mais raramente, de substituição dos modelos animais convencionais.

1.2 Cultivo de Células

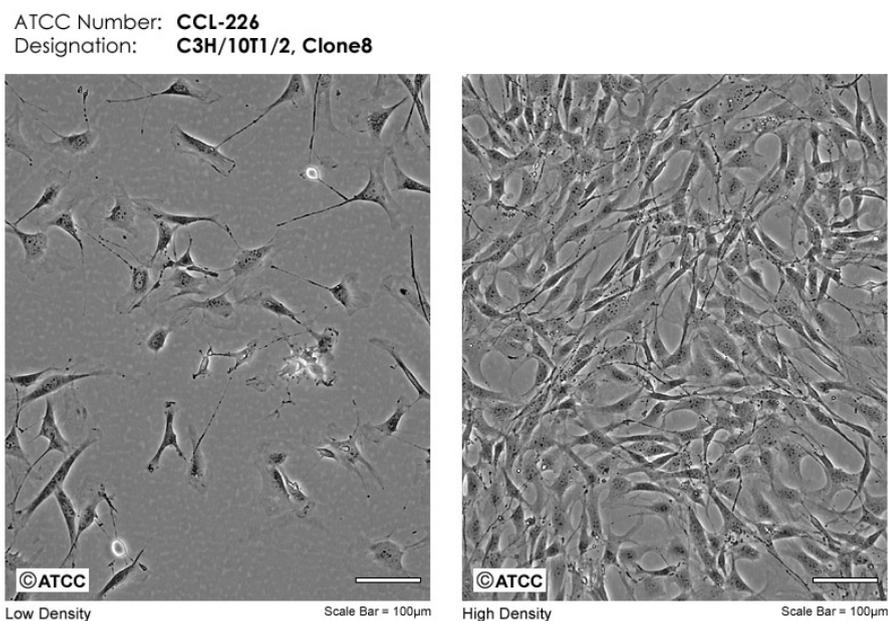
O cultivo de células é uma técnica que permite manter células vivas fora do seu organismo de origem e estudá-las. Isso acontece através do isolamento de células eucarióticas de um determinado tecido, podendo este ser animal ou vegetal, da manutenção da viabilidade e proliferação dessas células em um sistema *in vitro* que tem fatores como pH, temperatura, atmosfera de CO₂ controlados, bem como os próprios nutrientes que as células têm ou não acesso (BARBOSA et al., 2015).

Historicamente, existem registros de técnicas que tinham como objetivo manter células vivas em algum sistema fora do organismo de origem, mas foi apenas em 1943 que Earle e colaboradores publicaram o primeiro estudo fazendo uso de um meio produzido em laboratório com o que viria a ser a primeira linhagem

de células, C3H, uma linhagem derivada de fibroblastos de camundongo, células mostradas na figura 1. A partir daí iniciou-se o processo de estudos com células e produção de meios de cultivo nas décadas seguintes, como o meio criado pelo grupo de Eagle (*Minimum Essential Medium Eagle* ou MEM), e o “Meio de Eagle modificado por Dulbecco” (*Dulbecco’s Modified Eagle Medium* ou DMEM), que adicionou aminoácidos essenciais e não-essenciais (RODRÍGUEZ-HERNÁNDEZ et al., 2014).

Até os dias atuais, o cultivo de células e os estudos *in vitro* são amplamente conhecidos e utilizados, além de apresentar-se como uma ferramenta essencial no desenvolvimento da ciência. São estudos em diversas áreas, desde a pesquisa básica, como estudos envolvendo DNA e metabolismo, até pesquisa aplicada, que envolve estudos com biologia molecular, manipulação e modulação genética, proteômica e virologia.

Figura 1 - Considerada a primeira linhagem de células imortalizadas, a linhagem de fibroblastos murino C3H em baixa densidade (à esquerda) e alta densidade (à direita).



Fonte: <https://www.atcc.org>

São muitos os estudos que podem ser encontrados na literatura que fazem uso de cultivos celulares em monocamada ou tridimensionais. Desde pesquisas farmacológicas que avaliam diferentes efeitos de diferentes substâncias, interações fármaco-receptor, mutagênese, carcinogênese, ensaios de ancoragem, agregação de células, até estudos relacionados à engenharia de tecidos, onde a produção de microtecidos tem ganhado destaque e muitos estudos tem o objetivo de possibilitar transplantes, regeneração de tecidos e desenvolvimento de matriz extracelular (YAO; ASAYAMA, 2017; RODRÍGUES-HERNÁNDEZ et al., 2014).

1.2.1 Cultivo tridimensional de células

O cultivo tridimensional de células compreende um conjunto de diferentes técnicas que tem por objetivo trazer mais robustez aos modelos de estudo *in vitro* através da possibilidade da formação de agregados celulares que sejam capazes de mimetizar um tecido. Isso faz com que seja possível a realização de experimentos que podem ser considerados até mesmo como estudos *ex vivo*, ou seja, em um tecido fora de um organismo (EDMONDSON et al. 2014).

Inicialmente, três elementos básicos eram necessários para que células isoladas fossem capazes de formar agregados e, eventualmente, um microtecido, sendo estes: as células, o biomaterial e os fatores de crescimento (LANGER; VACANTI, 1993). Atualmente, porém, é possível gerar um microtecido sem utilização de biomateriais, através da utilização de micro-moldes ou micro-chips não aderentes. Esses moldes podem ser fabricados com diversos formatos (esféricos, cilíndricos, tubulares, dentre outras) e já tem se mostrado uma alternativa viável a utilização de biomateriais. Esses estudos fazem parte da chamada Engenharia de Tecidos ou Engenharia Tecidual (ET) (DEAN; NAPOLITANO; YOUSSEF, 2007; FENNEMA; RIVRON; ROUWKEMA, 2013; NAPOLITANO et al., 2007)

Atualmente, a ET oferece a possibilidade de gerar diversos tecidos, tanto para estudos fisiopatológicos, como para a utilização na reconstrução de tecidos e órgãos, cobrindo uma ampla gama de tecidos, incluindo: epitelial, nervoso, muscular, tecido ósseo e cartilaginoso, estruturas nervosas, além de tecidos especializados como ligamentos periodontais e glândulas salivares, dentre outros (RAI et al., 2015).

Todos esses estudos demonstram que o cultivo tridimensional de células, seja por técnicas que utilizem biomateriais ou formação de agregados celulares em

moldes, favorecem a diferenciação celular, permitindo a geração de substitutos biomiméticos, que, em alguns casos, se mostraram capaz até mesmo de promover a regeneração de tecidos em alguns modelos animais (ACHILLI; MEYER; MORGAN, 2012).

Além disso, os microtecidos também são uma ferramenta útil para avaliar o comportamento de determinadas células em certas condições de cultivo, permitindo estudar a dinâmica de adesão celular para a formação dos agregados, a interação célula-célula e interação célula-matriz extracelular, o que permite a criação de novos modelos *in vitro* para a investigação de diferentes substâncias ou fármacos, por exemplo (EDMONDSON; ADCOCK; YANG, 2014).

Dentre as principais técnicas de cultivo tridimensional, pode-se citar os órgãos em chips, onde as células são cultivadas em dispositivos microfluídicos com ambiente experimental controlado e são capazes de reproduzir propriedades fisiológicas semelhantes dos tecidos e órgãos, preservando a morfologia e importantes interações celulares (MI, S., *et al.*, 2018). O método da gota suspensa, que faz com que a formação de agregados celulares/esferóides aconteçam através da ação da força da gravidade. Nesse modelo, as células são cultivadas em gotas na tampa das placas de cultivo, que, posteriormente, são invertidas (Jorgensen *et al.*, 2014; Prange *et al.*, 2016). Além de outros métodos como camada por camada, placa magnética, modelos que fazem uso de um *scaffold* que auxiliem na formação dos esferóides etc.

Ou seja, diversos são os modelos e propósitos dos estudos que fazem uso do cultivo 3D de células. Todos eles, porém, buscam, de certa forma, algo parecido: um modelo *in vitro* que tenha uma robustez que faça com que eles se equiparem até mesmo a modelos *in vivo*.

Em estudo publicado por Lafnoute e colaboradores (2022), o cultivo 3D foi utilizado para avaliar a citotoxicidade da cobra *Naja haje* utilizando o que eles chamaram de “tumor esferóide multicelular”, que nada mais era que um co-cultivo de quatro tipos celulares (a linhagem de carcinoma hepatocelular Huh7, a linhagem de fibroblastos WI38, a linhagem de células estreladas hepáticas LX2 e células derivadas do endotélio de veias do cordão umbilical humano, as células HUVEC. Seus principais resultados mostraram que o veneno de *N. haje* possui um potencial efeito anti tumoral em câncer hepático, uma vez que apresentou citotoxicidade para as células de carcinoma mas apresentou baixa toxicidade em células normais.

1.3 Serpentes do Gênero *Bothrops*: acidentes ofídicos, composição e efeitos fisiopatológicos dos venenos botrópicos

No Brasil, as serpentes peçonhentas são representadas principalmente por duas famílias, Viperidae e Elapidae. A família Elapidae é representada por dois principais gêneros, *Micrurus* e *Leptomicrurus*, enquanto a família Viperidae é representada por 5 principais gêneros, *Bothrops*, *Bothriopsis*, *Bothrocophias*, *Lachesis* e *Crotalus* (COSTA, 2021).

O gênero *Bothrops* é pertencente à subfamília Crotalidae, constituindo um grupo numeroso de espécies, tendo sido 32 catalogadas até o momento, e com uma variedade morfológica, tendo diversas cores, tamanhos e hábitos. São encontradas nas Américas Central e do Sul e ocupam todo o território brasileiro. As espécies ocupam os mais variados ambientes, desde florestas úmidas, podendo ser encontradas na copa de árvores ou à beira de rios, até regiões semiáridas, como a caatinga (MELGAREJO, 2009).

Dentre as espécies de maior relevância para a saúde pública destacam-se *Bothrops alternatus* (urutu-cruzeiro, cruzeira), *B. erythromelas* (jararaca-da-seca), *B. jararaca* (jararaca, jararaca preguiçosa), *B. jararacussu* (jararacuçu), *B. leucurus* (jararaca), *B. moojeni* (caiçaca), *B. neuwiedi* (jararaca-pintada, jararaca-de-rabo-branco) e *B. atrox* (jararaca, jararaca-do-norte) (MELGAREJO, 2009). Devido ao grande número de espécies e as semelhanças que estas apresentam entre si, a dificuldade de identificação por nomes populares ainda é grande (PUORTO, 1992).

Estima-se que, anualmente, cerca de 400 mil pessoas sofram com acidentes ofídicos todos os anos, dos quais 80% são pertencentes a serpentes do gênero *Bothrops*, conhecidas popularmente como jararacas.

No Nordeste brasileiro, a espécie *Bothrops erythromelas* é uma das principais causadoras de acidentes ofídicos. É conhecida popularmente como jararaca-da-seca por habitar regiões xerófilas, como a caatinga, podendo ser encontrada nos estados do Piauí, Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba, Bahia, Pernambuco, Alagoas, Sergipe, Maranhão e Minas Gerais. Apresenta um comprimento médio de 55 cm e se alimenta de pequenos animais, como rãs, lagartos e pequenos mamíferos (LIRA-DA-SILVA *et al.*, 2009; BARROS *et al.*, 2014).

1.3.1 Venenos botrópicos e o veneno de *Bothrops erythromelas*

Os venenos de serpentes são constituídos de uma mistura complexa de glicoproteínas, enzimas, polipeptídeos e outros componentes não proteicos. Essa mistura é produzida e armazenada em glândulas especializadas que possuem dutos de ligação com as presas do animal. Esses componentes fazem com que o veneno das serpentes possua uma atividade biológica que permite que estas possam enfraquecer suas presas, através de imobilização, para então se alimentar, bem como funcionar como um mecanismo de proteção contra eventuais predadores ou outras ameaças, uma vez que o veneno age atacando vários sistemas fisiológicos do organismo da presa/vítima, debilitando-a ou podendo até mesmo levar a sua morte (MACKESSY; BAXTER, 2006; CALVETE *et al.*, 2009; ESPINO-SOLIS *et al.*, 2009).

Cerca de 95% do peso seco dos venenos ofídicos é composto por substâncias proteicas. O restante da mistura, ou seja, a fração não-protéica, é composta de substâncias inorgânicas que podem estar relacionadas a mecanismos catalíticos de algumas das enzimas presentes no veneno. Algumas dessas substâncias são: cálcio, magnésio, zinco, ferro, cobre, potássio, sódio, cobalto, dentre outros. Além disso também podem ser encontrados aminoácidos livres, pequenos peptídeos, carboidratos, fosfolipídios e aminas biogênicas (BJARNASON; FOX, 1994; KOH, 2006).

Após inoculado, o veneno mostra uma variedade de ações biológicas e, geralmente, cada componente da mistura possui uma atividade própria. Porém, em alguns casos, podem ocorrer a formação de complexos proteicos, covalentes ou não-covalentes, sinérgicos, capazes de aumentar a atividade biológica (DOLEY; KINI, 2009). O veneno de *B. erythromelas* possui quatro componentes isolados e caracterizados. São eles: Peptídeo potenciador de bradicinina (BPP), Fator de crescimento endotelial vascular de veneno de serpente (svVEGF), Fosfolipase A₂ (Asp49) ácida e uma metaloproteinase do tipo III.

O Peptídeo potenciador de bradicinina (BPP) é um inibidor natural da enzima conversora de angiotensina (ECA). A hipotensão é frequentemente verificada após o envenenamento botrópico é em grande parte decorrente da ação inibitória destes peptídeos vasoativos (BPPs) sobre a ECA, característica que impede a geração do peptídeo vasoconstritor angiotensina II e inativação do

peptídeo hipotensor, a bradicinina (ONDETTI; CUSHMAN, 1981; MCCLEARY; KINI, 2013);

O svVEGF atua mediando o efeito hipotensor, pois, acredita-se que os svVEGFs atuam potencializando a atividade de outros componentes tóxicos dos venenos, bem como sendo coadjuvantes da atividade hipotensora verificada em alguns venenos, podendo estar envolvido na resposta local e sistêmica no envenenamento, assim como no efeito primário de imobilização da presa (JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO et al., 2001).

A Fosfolipase A₂ (Asp49) ácida também está relacionada com o efeito anti-plaquetário e inflamatório. As enzimas Fosfolipase A₂ catalizam a hidrólise de glicerofosfolípídios na posição sn-2 da cadeia principal do glicerol liberando lisofosfolípídios e ácido araquidônico. O metabolismo deste último, pelas ciclooxigenases COX-1 e COX-2, origina prostaglandinas, importantes segundos mensageiros fisiológicos e mediadores de processos inflamatórios. E a metaloproteinase do tipo III, chamada de Berythreactivase, apresenta atividade coagulante, o que difere das demais metaloproteinases da mesma classe encontradas em venenos de serpentes de outras espécies, que, de maneira geral, possuem atividade hemorrágica e não coagulante, o que pode ser um indicativo de uma fisiopatologia diferente no veneno de *B. erythromelas* em relação às demais espécies botrópicas. (BURKE; DENNIS, 2009; Schattner et al., 2005).

Estudo proteômico realizado por Jorge e colaboradores mostrou que o veneno de *B. erythromelas* apresenta um perfil proteico diferente de acordo com a região das serpentes. Mas, de maneira geral, são compostos majoritariamente de metaloproteinases das classes PI e PIII - PI-SVMP e PIII-SVMP (*Snake Venom Metalloproteinase*), que, juntos, representam cerca de 45% da composição do veneno. O segundo componente mais presente varia de acordo com a região, podendo ser os peptídeos potencializadores de bradicinina, que representam de 11% à 15% da composição ou as lectinas do tipo C (CTL) que variam de 9% à 22%, além das fosfolipases do tipo A₂, que também compõem de 11% à 15% da composição. Os demais componentes são serinoproteinases (Ser-Prot), fator de crescimento endotelial vascular de veneno de serpente (svVEGF), desintegrina-like/ cisteína-domínio rico (DC), desintegrina (Disi), fosfolipase B (PLB) e fosfodiesterase; 5'NT: 5'-nucleotidase (PDE) (JORGE et al., 2015).

1.3.2 Efeitos fisiopatológicos dos venenos botrópicos

No envenenamento botrópico, ocorre o rápido desenvolvimento de edema e inflamação no local da picada. O surgimento de edema causado pelo veneno está diretamente ligado à ação de toxinas, tais como hemorraginas, que são responsáveis por agir diretamente sobre o endotélio dos capilares e pequenas veias, dessa maneira aumentando a sua permeabilidade; citotoxinas, que induzem a liberação de histamina, fosfolipase A, ácido araquidônico, que é liberado após a desestabilização da bicamada de fosfolípidos de membrana, a partir da síntese de prostaglandinas (que aumenta a permeabilidade capilar); proteases, que catalisam o cininogênio em cininas e leva à produção de óxido nítrico e prostaglandinas; peptídeos vasoativos, que inibem a ação da enzima conversora da angiotensina (ECA), fazendo assim com que a ação da bradicinina seja aumentada; e componentes da cascata do sistema complemento (GUTIÉRREZ; LOMONTE, 1989; GILMAN, 1996).

Os efeitos locais do veneno de botrópico estão relacionados principalmente a dor, hemorragia e eventualmente necrose tecidual, que podem levar a perda de função dos tecidos afetados. Isso acontece devido a um conjunto de eventos que envolvem ação coordenada dos componentes citados anteriormente. A fosfolipase A₂ aparece como uma das principais responsáveis por desencadear os efeitos inflamatórios locais no envenenamento. Além disso, a presença de outras substâncias fazem com que uma resposta hemorrágica seja observada. Algumas metaloproteinases degradam não apenas fibrina e fibrinogênio mas também proteínas da matriz extracelular produzida pelos fibroblastos da pele (laminina, fibrinectina, colágeno tipo IV), além interromper a ação enzimática da membrana basal e da matriz extracelular ao redor dos capilares. A presença dessas enzimas que degradam os componentes matriz extracelular do tecido conjuntivo da célula faz com que a lesão tecidual seja acentuada, diminuindo os níveis de fibrinogênio e acentuando a hemorragia ao reduzir agregação plaquetária e, conseqüentemente, a coagulação (ARAGÃO *et al*, 2009; MOREIRA *et al*, 2021).

De maneira geral, os venenos botrópicos apresentam uma atividade pró-inflamatória e diversos estudos já demonstraram que diversos mediadores inflamatórios participam dos mecanismos fisiopatológicos induzidos pela presença

de veneno de diversas espécies do gênero *Bothrops* nos organismos das presas/vítimas (TREBIEN; CALIXTO, 1989; GONÇALVES; MARIANO, 2000; ARAÚJO et al., 2000; BARBOSA et al., 2003). A produção de citocinas de perfil principalmente pró-inflamatório, óxido nítrico e ativação do sistema complemento são exemplos dos mecanismos descritos nesses estudos. Algumas das citocinas envolvidas no envenenamento são: IL-1, IL-6, IL-8, INF- γ e TNF- α . A produção de NO está diretamente ligada a indução de lesão tecidual, devido a tendência a formar nitritos e peroxinitritos, além de causar vasodilatação, gerando assim uma hipotensão.

Dentre os estudos com ensaios biológicos utilizando o veneno de *B.erythromelas*, um estudo realizado por Luna e colaboradores (2011) demonstrou que, *in vitro*, o veneno de *Bothrops erythromelas* foi capaz de produzir citocinas pró inflamatórias em cultivo primário de esplenócitos de camundongos, seus resultados mostraram que IL-6, NO e INF- γ foram produzidos por células tratadas com veneno, e que, frente ao veneno de *Crotalus durissus cascavella*, a serpente cascavel, o veneno botrópico mostrou ainda uma maior citotoxicidade.

1.4 Soro Antibotrópico

Os estudos dos antivenenos têm muito a ver com o marco do entendimento da imunologia pela humanidade. No fim do século XIX, o cientista Henry Sewall decidiu estudar a possibilidade de imunização contra o veneno de serpentes, inoculando doses não letais em pássaros, observando um aumento na resistência contra os efeitos do veneno (SEWALL, 1887). Alguns anos depois, Albert Calmette realizou experimentos que demonstraram que a aplicação de doses crescentes do veneno de serpentes em coelhos aumentava a resistência desses animais contra as ações do veneno, e não somente isso, que o soro dos animais imunizados era capaz de neutralizar a ação do veneno em experimentos *in vitro* bem como tinham uma capacidade preventiva e terapêutica em casos de envenenamento *in vivo* (HAWGOOD, 1999).

No Brasil, o médico Vital Brazil Mineiro da Campanha, famoso pesquisador imunologista, foi um dos responsáveis pela produção dos primeiros soros antiofídicos no Brasil, em 1901. Na época, somente no estado de São Paulo, cerca de 5000 pessoas sofriam acidentes ofídicos anualmente, causados principalmente

por serpentes dos gêneros *Bothrops sp.* e *Crotalus sp.*, as jararacas e cascavéis, respectivamente. Vital Brazil então observou que o tratamento desenvolvido por Calmette não era eficaz nos acidentes ofídicos observados no Brasil, realizando experimentos baseados nos de Calmette e concluindo que os antivenenos eram específicos para venenos de diferentes gêneros, e que um soro só seria eficaz contra o veneno de serpentes do gênero do qual fora utilizado em sua produção. Vital Brazil produziu então os primeiros soros antibotrópico e anticrotálico em 1901 (SQUAIELLA-BAPTISTÃO et al., 2018).

Atualmente, o soro antibotrópico é um soro pentavalente produzido através do plasma de equinos hiperimunizados com uma mistura dos venenos de cinco serpentes do gênero *Bothrops* (*B. jararaca*, *B. alternatus*, *B. jararacussu*, *B. moojeni* e *B. neuwiedi*). Essa composição foi definida pelos estudos pré clínicos realizados por Dias da Silva e colaboradores que avaliaram a reatividade cruzada dos venenos de 10 espécies do gênero *Bothrops* (*B. alternatus*, *B. atrox*, *B. cotiara*, *B. erythromelas*, *B. insularis*, *B. jararaca*, *B. jararacussu*, *B. moojeni*, *B. neumiedi* e *B. pradoi*) e verificaram que os venenos de *B. jararaca*, *B. alternatus*, *B. moojen*, e *B. neuwied* eram bons imunizadores, capazes de induzir a formação de anticorpos que neutralizavam os venenos das demais espécies, com exceção à *B. jararacussu*, que foi, portanto, adicionada ao pool, criando-se assim o soro pentavalente utilizado até hoje (Dias da Silva et al., 1989; Instituto Butantan, 2023).

2 RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA

Os estudos que envolvem experimentos *in vitro* vem sendo usado há décadas, bem como também vem ganhando novas metodologias e novos meios de tornar esses estudos cada vez mais robustos e com uma maior confiabilidade no que diz respeito à reprodutibilidade dos resultados quando são levados adiante com estudos *in vivo*.

Uma dessas metodologias que busca melhorar a qualidade dos estudos com células são os diferentes tipos de cultivo que compreendem o chamado "cultivo tridimensional", ou cultivo 3D, de células, que tem por objetivo trazer um conjunto de características que possam aproximar mais os sistemas *in vitro* da complexidade de sistemas e organismos vivos. Assim, existe uma ampla gama de aplicações para os

microtecidos gerados, que vão desde aplicações farmacológicas, avaliação de toxicidade até técnicas mais avançadas de engenharia tecidual no reparo de tecidos

Além disso, a serpente *B. erythromelas* é a principal causadora de acidentes ofídicos na região nordeste, e, apesar disso, seu veneno não faz parte do pool utilizado na fabricação do soro antiofídico, que utiliza venenos apenas de *B. jararaca*, *B. jararacussu*, *B. alternatus*, *B. neuwiedi* e *B. moojeni*. Em geral, os efeitos do envenenamento por *Bothrops* são semelhantes e os venenos da maioria das espécies possuem atividade de ativação direta sobre protrombina, combinada, ou não, com atividade trombina-símile. No entanto, esta espécie destaca-se entre as desses gêneros por possuir alta atividade coagulante (FERREIRA et al., 1992b; ZAPPELLINI, 1991), além da particularidade de não exibir ação similar a trombina (serino proteases que atuam diretamente sobre a molécula de fibrinogênio convertendo-a em fibrina - encontradas em outras peçonhas botrópicas), o que leva a distúrbios hemostáticos graves (MARUYAMA et al., 1992).

Neste estudo, além de padronizar um cultivo tridimensional iremos aplicá-los no estudo da citotoxicidade do veneno da serpente de *Bothrops erythromelas*, uma serpente de importância médica e endêmica na região do Nordeste brasileiro e que não faz parte do pool utilizado no soro antiofídico, além de possuir poucos estudos publicados.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

- Padronizar o cultivo tridimensional de uma linhagem de fibroblastos utilizando microchips de agarose como material de ancoragem e realizar testes de citotoxicidade quando tratados com o veneno total de *Bothrops erythromelas*, comparando seus resultados com os obtidos no cultivo tradicional em monocamada.

3.2 Objetivos específicos

- Padronizar o cultivo tridimensional de uma linhagem de fibroblastos
- Avaliar o perfil de toxicidade do veneno total de *B. erythromelas* nas células cultivadas em monocamada e em microtecidos;
- Comparar a toxicidade do veneno total de *B. erythromelas* entre os cultivos tridimensional e em monocamada .
- Analisar os efeitos do soro antibotrópico nos grupos tratados com o veneno total de *B. erythromelas*

4 MATERIAIS E MÉTODOS

PARTE I: GERAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS MICROTECIDOS

4.1 Planejamento experimental

Para o início do cultivo 3D, foram escolhidas duas linhagens de fibroblastos, sendo elas as linhagens MRC-5 e L929, fibroblastos de tecido pulmonar humano e fibroblastos derivados do tecido areolar subcutâneo e adiposo de camundongo, respectivamente, seguindo protocolo descrito por Durand-Herrera e colaboradores (2018). Os experimentos foram realizados em parceria com o Laboratório de Farmacogenética, coordenado pela professora Dra. Raquel Montenegro.

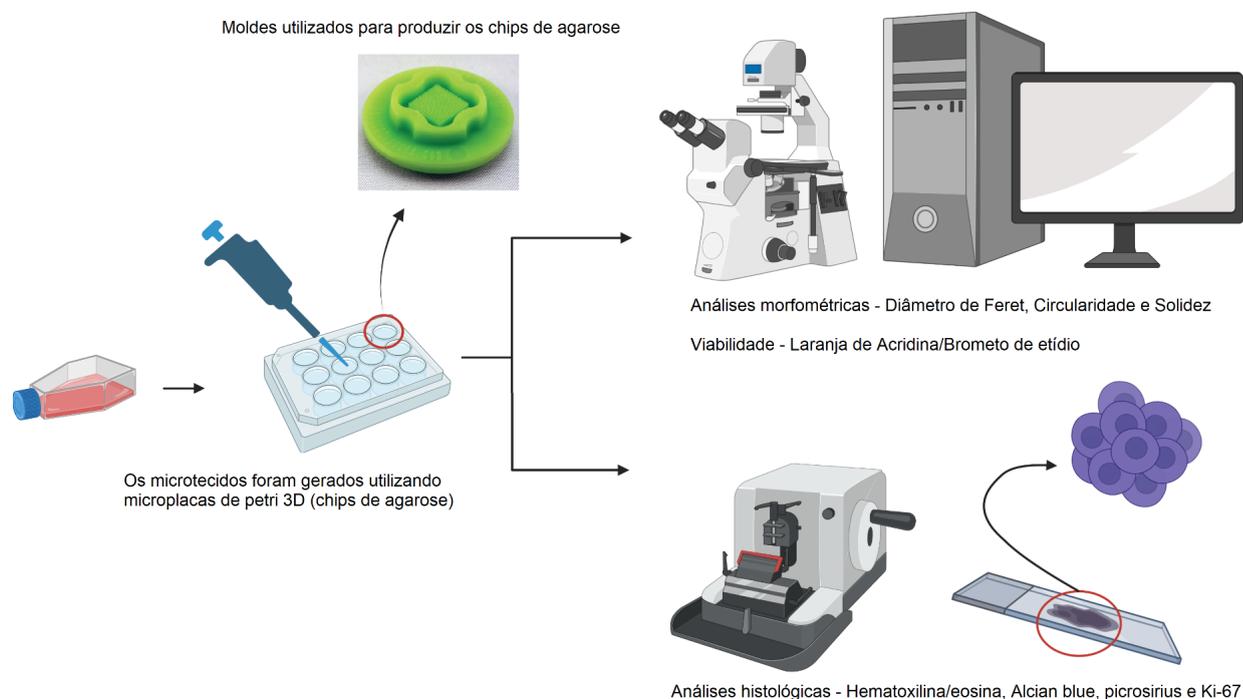
O preparo dos chips de agarose para o cultivo 3D dos fibroblastos foi o passo seguinte. Começando com o preparo da solução de agarose diluída em tampão PBS 1x, feita a uma concentração de 2%. A solução preparada seguiu para esterilização em autoclave. Após estéril, a solução de agarose, ainda em estado líquido, foi adicionada aos micromoldes e, quando solidificadas em temperatura ambiente, foram retiradas e mantidas em solução de PBS estéril a 4°C até o momento de sua utilização. Os chips de agarose foram embebidos em meio DMEM e mantidos em incubadora a 37°C e atmosfera de 5% de CO₂ com, pelo menos, 24h de antecedência à sua utilização para o cultivo celular.

Após as 24h com os chips imersos em meio de cultivo, houve a retirada deste meio e as células foram adicionadas aos chips em três densidades iniciais para testagem: 5×10^4 , 10^5 e 5×10^5 células por chip, as concentrações foram alteradas de acordo com os resultados observados, mais detalhes posteriormente. Foram feitas fotografias todos os dias nos primeiros 5 dias e, após isso, a cada 5 dias para acompanhar o crescimento dos esferóides. O meio de cultivo foi trocado a cada 2 dias.

Definidas as melhores condições de cultivo e densidades adequadas, os esferóides seguiram então para análises de fluorescência, para que se pudesse verificar a viabilidade das células utilizando os corantes laranja de acridina e

brometo de etídio bem como foram preparados para as análises histológicas. A figura 2 mostra o planejamento experimental seguido.

Figura 2 - Planejamento experimental do presente trabalho



Fonte - Elaborada pelo autor

4.2 Linhagens celulares e cultivo das células

Para a padronização das condições para o cultivo tridimensional de fibroblastos, foram utilizadas as linhagens MRC-5 e L929, enquanto para a realização dos experimentos seguintes, foi utilizada somente a linhagem de fibroblastos murinos L929.

O cultivo foi realizado em frascos plásticos para cultura (25 cm², volume de 50 mL), utilizando o meio DMEM (Difco) suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado e 1% de antibióticos (penicilina/estreptomicina 5000U/5000µg/mL). Todo o manuseio das células foi realizado em condições estéreis, em uma câmara de fluxo laminar vertical e a cultura foi mantida em incubadora de gás carbônico a 37°C com atmosfera de 5% de CO₂.

O crescimento das culturas foi observado periodicamente com o auxílio de um microscópio invertido (Leica DMIL LED) até a confluência de, no máximo,

85%. Além disso, também foi verificado o consumo de nutrientes contidos no meio de cultura através da modificação do pH, que resultava em uma modificação da coloração deste meio, de rosado para amarelado. No momento em que as células apresentavam confluência, era realizada uma manutenção da cultura, que seguia os seguintes passos: Inicialmente, o meio contido nas garrafas era descartado e as células lavadas com tampão fosfato-salino (PBS) 1x (NaCl 137 mM, Fosfato 10 mM e KCl 2,7 mM e pH 7.4), em seguida vinha a adição de tripsina-EDTA (0,25% v/v em PBS 1x) durante 5 minutos em estufa de CO₂ a 37°C para que as células perdessem sua aderência. Após isso, a tripsina era inativada com meio de cultura acrescido de 10% de soro fetal bovino (SFB). A solução era então homogeneizada e uma parte descartada, por fim, era adicionado meio de cultura novo à garrafa para que se pudesse manter a cultura até que fosse necessário repetir esse ciclo.

4.3 Cultivo tridimensional das linhagens de fibroblastos em chips de agarose

4.3.1 Preparo da solução de agarose

A solução utilizada para a obtenção dos chips de agarose foi preparada na concentração de 4%. Para isso, primeiro foram calculados os volumes necessários para preencher os moldes de modo a se obter todos os chips desejados para cada etapa dos experimentos.

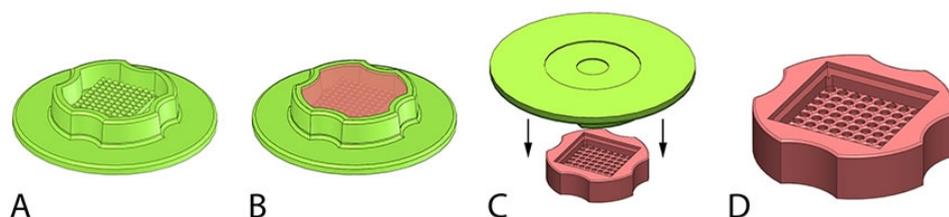
Após isso, a agarose foi adicionada a cerca de 90% do volume final de tampão PBS em um erlenmeyer e a solução foi aquecida em microondas até que a agarose se dissolvesse completamente. Após isso, a solução foi transferida para uma proveta e foi adicionado o volume de tampão PBS necessário para atingir o volume final desejado e, por fim, a solução foi esterilizada em autoclave. Depois de autoclavada, a solução foi manipulada apenas em condições estéreis, na câmara de fluxo laminar. Pode-se também preparar uma solução estoque de agarose, que deve ser aquecida em microondas para voltar ao estado líquido antes da sua utilização para fazer os moldes.

4.3.2 Preparo dos chips

Ainda em estado líquido, 600 µL da solução foi adicionada nos micromoldes e deixada em temperatura ambiente até que fosse totalmente

solidificada. Quando isso aconteceu, os microchips foram separados dos moldes. Cada chip continha 256 micropoços com 800µm de profundidade e 400µm de diâmetro. Os chips obtidos podem ser mantidos em PBS estéril a 4°C até o momento de sua utilização. Os chips foram alocados para as placas de 12 poços e embebidos em 500µL do meio de cultivo das células a serem plaqueadas com, pelo menos, 24h de antecedência ao plaqueamento. A figura 3 mostra uma representação do passo a passo para a produção dos chips de agarose.

Figura 3 - Representação do passo a passo para a produção dos chips de agarose, sendo (A) Molde utilizado para fabricação dos chips de agarose (B) Representação do molde com a solução de agarose 2%, representado na cor rosa; (C) Remoção do chip após solidificação e (D) Chip de agarose pronto para uso



Fonte: <<https://www.microtissues.com>>

4.3.3 Plaqueamento de células nos chips de agarose

Após verificação em microscópio invertido, para identificação de eventuais contaminações e observação da morfologia das células, o meio das garrafas foi removido e adicionado tripsina para que as células perdessem a aderência e fosse realizada a sua contagem. Foi feita uma alíquota de 90 µL da solução de células e foi realizada a contagem das células em uma câmara de Neubauer. Após isso, foram calculados os volumes que fossem suficientes para o número de placas/poços desejados em cada etapa dos experimentos. Por fim, foram adicionados meio DMEM completo para que o volume fosse de 190 µL para cada chip a ser utilizado.

As densidades utilizadas inicialmente para avaliar o crescimento dos esferóides tanto da linhagem L929 quanto da MRC-5 foram: 5×10^4 , 10^5 e $1,5 \times 10^5$ células/chip. A linhagem L929, porém, apresentou um crescimento exacerbado nessas densidades, e com menos de 10 dias de cultivo os esferóides formados já chegavam a extravasar os micropoços dos chips. Por conta disso, posteriormente, o

cultivo da linhagem L929 foi feito com densidades menores, sendo elas: $1,25 \times 10^4$, $2,5 \times 10^4$ e 5×10^4 células/chip.

Para o plaqueamento, foram adicionados 190 μ L da suspensão de células nos chips presentes nos poços. Após um descanso de aproximadamente 1h, para que as células pudessem se assentar nos micropoços do chip, 1 mL do meio de cultivo foi então adicionado em cada poço. As placas contendo os chips com as células foram mantidas em estufa incubadora a 37°C e atmosfera de 5% de CO₂ durante o período de experimento. A linhagem L929 foi escolhida para os demais experimentos, pois seus microtecidos apresentaram um crescimento mais regular. A densidade escolhida foi de $2,5 \times 10^4$ células/chip.

4.3.4 Protocolo de recuperação dos esferóides

Para a realização de experimentos como análises histológicas e de viabilidade, a retirada dos esferóides dos chips onde foram cultivadas se fazia necessária, e, para isso, seguiu-se o seguinte protocolo: Primeiro, o meio foi retirado dos chips e adicionados 190 μ L de PBS no chip e mais 210 μ L no poço. Após isso, os chips foram virados de cabeça para baixo e as placas levadas para centrifuga de placa e centrifugados a 500 rpm por 5 minutos. Passado o tempo, os chips foram retirados da placa e descartados e a solução contendo PBS e os esferóides podia então ser transferida para outra placa ou eppendorfs, a depender de qual protocolo se seguiria dali.

4.4 Acompanhamento das culturas e análises morfológicas e morfométrica

As células foram acompanhadas diariamente durante os cinco primeiros dias de cultivo e, uma vez verificado o estabelecimento e crescimento das culturas, passaram a ser observadas a cada 5 dias de crescimento. Sendo assim, os dias 1,2,3,4,5,10,15, 20 e 25 são os dias utilizados nas análises morfológicas dos esferóides formados. Além disso, o meio de cultivo dos poços e dos microchips foi trocado a cada 2 dias.

Os parâmetros avaliados visualmente foram: Diâmetro de Feret, que é o comprimento do eixo que liga os pontos mais afastados do perímetro da partícula; Solidez, que é um parâmetro que verifica o quão regular é o perímetro avaliado; Circularidade, parâmetro calculado através da fórmula $\frac{4\pi \times A}{P}$ onde A é a área do

esferóide e P é o seu perímetro (IVANOV et al 2014). Todos esses parâmetros foram avaliados pelo *software* Image J.

4.5 Análise da viabilidade dos esferóides da linhagem L929 nos dias 5, 7 e 10 de crescimento.

O método de coloração por brometo de etídio e laranja de acridina permite diferenciar as células viáveis daquelas em processo de morte celular por apoptose ou necrose, pela coloração diferencial por fluorescência com base em alterações morfológicas nucleares e citoplasmáticas (MCGAHON et al., 1995). A laranja de acridina consegue atravessar membranas celulares intactas e se liga ao DNA, conferindo uma aparência verde ao núcleo das células. O brometo de etídeo é incorporado principalmente por células com a membrana já danificada (não viáveis), ligando-se ao DNA e corando-o de laranja. As células viáveis com membrana intacta apresentam núcleo uniformemente corado de verde pela laranja de acridina.

As células da linhagem L929 foram inoculadas nos microchips de agarose na densidade $2,5 \times 10^4$ células/chip e mantidas como descrito inicialmente.

Após 5, 7 e 10 dias de cultivo, todo o meio dos chips e poços foi removido, foram adicionados 190 μ L de solução contendo brometo de etídio e laranja de acridina ambos na concentração de 10 μ g/mL dentro de cada um dos chips. Os chips foram colocados em estufa incubadora à 37°C e atmosfera de 5% de CO₂ por cerca de 30 minutos. Após isso, foram adicionados 210 μ L de tampão PBS nos poços, os chips foram virados e o protocolo de recuperação dos microtecidos foi realizado. Após a centrifugação, os esferóides foram ressuspensos em 300 μ L de tampão PBS e 50 μ L foram adicionados em uma placa de 96 poços, adicionando-se mais 50 μ L de tampão PBS em cada poço, posteriormente. As placas foram então levadas para as análises de fluorescência no equipamento Cytation 3, da fabricante BD Biosciences.

4.6 Análises Histoquímicas e histológicas

Para análises histológicas e histoquímicas, seguiram-se as seguintes etapas: Fixação, desidratação, diafanização e inclusão dos esferóides em parafina. Estas etapas foram realizadas na Universidade de Granada em colaboração com o prof Dr. Victor Sebastian Carriel Araya, Departamento de Histologia, grupo de pesquisa de Engenharia Tecidual.

4.6.1 Fixação

Após a realização do protocolo de recuperação dos esferóides, estes foram fixados com formalina 10% tamponada, preparada utilizando: Formol 40%, Água destilada, 4,0 g de fosfato de sódio monobásico ($1H_2O$) ou anidro e 6,5 g de Fosfato de sódio dibásico anidro, ambos para cada litro de solução. Por fim, após a fixação, os esferóides seguiram para a desidratação.

4.6.2 Desidratação

A desidratação foi realizada utilizando concentrações ascendentes de álcool (50% até 95%) na ressuspensão do *pellet*. O álcool foi adicionado nos tubos eppendorf e em seguida foram realizados *Spins* entre as etapas, apenas para concentrar os esferóides no fundo do microtubo. Após isso, os sobrenadantes foram então descartados e a solução trocada para a concentração seguinte. Ao final, foi dado um pulso de 10000 rpm na centrífuga, o sobrenadante foi então descartado e seguiu-se com a etapa de diafanização.

4.6.3 Diafanização (clarificação)

O processo de diafanização é realizado utilizando xilol, e tem como consequência o clareamento do tecido, que passa a ser transparente. Para esse processo, foi utilizada uma solução de xilol, em duas etapas. Após o pulso realizado na desidratação, houve a ressuspensão da solução em xilol e foi realizado um *spin*, seguido do descarte do sobrenadante. Esta etapa foi repetida 1x. Após isso, foi realizado um pulso de 10000 rpm em centrífuga seguido de descarte do sobrenadante. Os tubos então foram postos em um thermoblock (banho seco) para que o restante do xilol evaporasse. E, após isso, seguiu-se para a etapa de inclusão na parafina.

4.6.5 Inclusão em parafina

Foram adicionadas 500 μ L de parafina nos tubos ainda no banho seco e então foi realizado um spin mais forte para que os esferóides se concentrem no fundo do eppendorf quando a parafina solidificar. Após o processamento, foi realizada a inclusão do material em parafina, utilizando o equipamento para Banho Histológico Modelo BH05. Os blocos de parafina seguiram para o corte em

micrótomo (5 micrômetros) utilizando-se micrótomo de impacto Poycut S® (Leica, GER) equipado com navalha de tungstênio de 16 cm, tipo D (Leica, GER).

4.6.6 Coloração

Para as análises foram utilizados os corantes hematoxilina e eosina, para avaliar a morfologia e integridade dos esferóides, alcian blue, marcador de proteoglicanos ácidos, picrosirius, marcador de fibras colágenas.

4.7 Análise imunohistoquímica

Para o estudo imuno-histoquímico foi empregado o método da avidina-biotina-peroxidase (HSU et al., 1981). Foi utilizado um anticorpo monoclonal para avaliar a expressão de Ki-67, marcador de multiplicação celular. Esta etapa também foi realizada na Universidade de Granada.

PARTE II: LINHAGEM L929, EM MONOCAMADA E MICROTECIDOS, TRATADA COM O VENENO DE *B. erythromelas* E ANTIVENENO

4.8 Análise da viabilidade celular da linhagem L929 cultivada em monocamada quando tratada com veneno de *Bothrops erythromelas* pelo ensaio colorimétrico Alamar Blue®

Princípio do teste

O ensaio colorimétrico da resazurina, conhecida comercialmente como Alamar Blue®, consiste na utilização deste corante em ensaios de viabilidade e proliferação celular, além de ensaios de citotoxicidade e avaliação da função mitocondrial. O Alamar Blue® tem uma cor azulada e não fluorescente, porém, ao ser metabolizado por células viáveis sofre um processo de óxido-redução, sendo reduzida à resofurin, que por sua vez possui uma coloração rosa e é fluorescente. Além disso, sua conversão não forma precipitados, fazendo com que seja possível analisar atividade metabólica celular através de leitura fluorescente. Trata-se de um método rápido, sensível e não citotóxico (ROLÓN *et al*, 2006).

Procedimento experimental

As células L929 foram mantidas em meio de cultura DMEM (Difco) suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado e 1% de antibióticos (penicilina/estreptomicina 5000U/5000µg/mL). Em seguida, foram deslocadas das garrafas de cultura por meio da exposição à tripsina-EDTA (0,25/0,02% v/v) por aproximadamente 5 min em estufa de CO₂ a 37°C. Após quantificação em câmara de Neubauer, as células L929 foram plaqueadas a 3x10⁴ céls/mL em placas de 96 poços. Decorridas 24 horas do plaqueamento, foram adicionadas aos poços diferentes concentrações do veneno total de *B. erythromelas* (200; 100; 50; 25; 12,5; 6,25 e 3,12 µg/mL). Após 24 horas do tratamento com o veneno total de *B. erythromelas*, foi removido 100 µL do sobrenadante do meio de cultura e adicionou-se 20 µL de Alamar Blue® dissolvido em PBS na concentração de 2,2mg/mL. Após incubação de 5 horas em estufa com 5% de CO₂ à 37°C foi realizada a leitura em espectrofotômetro com comprimento de onda de 570nm. Os ensaios foram realizados em triplicata. O controle negativo correspondeu a 100% de

sobrevivência das células L929 tratadas em presença do veículo de diluição do veneno e a viabilidade celular foi determinada por comparação entre os percentuais médios de células vivas neste grupo e nos demais grupos tratados com a substância-teste (MOSMANN, 1983).

Uma vez que este teste mostrou uma morfologia alterada das células tratadas a partir da concentração de 12,5 µg/mL, as concentrações utilizadas posteriormente foram escolhidas baseadas nisso.

4.9 Análise da viabilidade celular da linhagem L929 cultivada em monocamada quando tratadas com veneno de *Bothrops erythromelas* pelo método Azul de Tripán

Princípio do teste

A coloração com o corante Azul de Tripán é uma técnica amplamente utilizada para determinar a viabilidade de células em suspensão. A técnica se baseia no princípio de que as células viáveis apresentam a membrana celular intacta o que impede a entrada de certos corantes, como é o caso do azul de tripan, eosina, iodeto de propídio (IP), enquanto as células mortas, que apresentam rupturas na membrana, permitem a entrada dos corantes e então são facilmente mensuráveis por meio de técnicas de análise (microscopia de fluorescência, microscopia convencional, citometria, entre outras). O corante azul de tripan cora o citoplasma de células mortas em azul, enquanto que as células viáveis mantêm o citoplasma límpido (STROBER, 2015).

Procedimento experimental

A linhagem celular L929 foi inoculada em placas de 12 poços na densidade de 7×10^4 células/poço. Após a aderência celular, o veneno foi adicionado nas concentrações de 5µg/mL e 25 µg/mL e, após os respectivos tempos de tratamento de 1h, 12h e 24h, as células foram lavadas com PBS 1x e tripsinizadas com tripsina-EDTA (0,25%) por 5 minutos. Em seguida, na suspensão celular foi adicionado meio suplementado para inativação da tripsina e a solução foi transferida para eppendorfs estéreis e centrifugados (Universal 320 R) a 1.500 rpm por 5 minutos. O pellet celular foi então ressuspendido em 100 µL de PBS 1x e uma alíquota de 20 µL foi transferida para um novo tubo e o corante azul de tripan (0,4%)

foi adicionado a suspensão, em seguida as células viáveis foram contadas com o auxílio de uma câmara de Neubauer em microscópio óptico invertido (Leica DMIL LED) e a viabilidade celular foi estimada.

Análise de dados

As células foram diferenciadas em viáveis e não viáveis, as viáveis com citoplasma límpido e as não viáveis/mortas com citoplasma corado em azul. A viabilidade celular foi mensurada pela fórmula:

$$Viabilidade (\%) = \frac{Células\ viáveis}{Células\ totais} \times 100$$

Os dados foram analisados a partir da média \pm desvio padrão da média de 3 experimentos independentes. Para verificar a ocorrência de diferenças entre os grupos, os dados foram comparados por 2 way ANOVA seguida pelo pós-teste de Bonferroni, com nível de significância de 95% ($p < 0,05$) utilizando o programa estatístico GraphPad Prism® 5.1.

4.10 Análise morfológica através do método de coloração Panóptico das células da linhagem L929 cultivadas em monocamada quando tratadas com o veneno total de *Bothrops erythromelas*

Princípio do teste

A análise morfológica celular permite visualizar, identificar e classificar anormalidades características de doenças e processos celulares específicos (CHEN et al., 2012). As técnicas de coloração que se baseiam no método tradicional de Romanowsky tem como princípio a capacidade de corantes ácidos e básicos possuírem especificidade de ligação à componentes celulares de cargas opostas, ou seja, os corantes ácidos, que coram em rósea/vermelho, se ligam aos componentes básicos celulares, enquanto os corantes básicos, que coram em azul/roxo, se ligam aos componentes ácidos, como por exemplo o núcleo celular. Essas interações fazem com que seja possível visualizar não apenas como é a morfologia normal das células, mas também possíveis alterações estruturais causadas por algum tratamento ou condição específica (HOROBIN, 2011; WEISS, 1953).

Procedimento experimental

A linhagem celular L929 foi inoculada em placas de 12 poços na densidade de 7×10^4 células/poço. Cada poço tinha em seu fundo uma lamínula circular previamente esterilizada para que as células pudessem ser visualizadas posteriormente em microscópio com câmera acoplada. Após a aderência celular, o veneno foi adicionado nas concentrações de 12,5 µg/mL e 25 µg/mL e, após as 24h de tratamento, as células foram lavadas com PBS 1x e seguiu para o protocolo de coloração do kit panótico.

4.11 Análise da viabilidade celular dos microtecidos de L929 quando tratados com veneno de *Bothrops erythromelas* e antiveneno pelo ensaio colorimétrico Alamar Blue®

As células da linhagem L929 foram inoculadas nos microchips de agarose na densidade $2,5 \times 10^4$ células/chip e mantidas como descrito inicialmente. As análises de viabilidade mostraram bons resultados de formação e estabilidade dos microtecidos entre o sétimo e o décimo dia de cultivo. Para a análise de viabilidade e morfologia, os microtecidos foram tratados com o veneno total de *Bothrops erythromelas*, na presença ou não de antiveneno, no sétimo dia de cultivo.

O antiveneno utilizado foi o soro botrópico pentavalente (Imunoglobulina heteróloga contra veneno de *Bothrops sp*) na concentração de 5 mg/mL

Decorridos 7 dias do plaqueamento, foram adicionadas aos poços duas concentrações do veneno total de *B. erythromelas*, sendo elas 25 µg/mL e 12,5 µg/mL, por 24h.

Outro grupo foi tratado com o veneno nas mesmas concentrações e posterior adição do soro antibotrópico utilizado no tratamento de pacientes que sofrem com o envenenamento por serpentes do gênero *Bothrops*. A proporção utilizada de antiveneno para veneno foi de 5:1, ou seja, 5 vezes a quantidade de antiveneno para a quantidade de veneno. O antiveneno foi adicionado após um curto período do envenenamento, cerca de 15 minutos.

Após o tempo de tratamento, todo o conteúdo líquido da placa e dos chips de agarose foi removido, e então foi adicionado, dentro de cada um dos chips, 190 µL de Alamar Blue® dissolvido em PBS na concentração de 2,2mg/mL. Após incubação por no mínimo 3 horas em estufa com 5% de CO₂ à 37°C foi realizada a

leitura em espectrofotômetro com comprimento de onda de 570nm. Os ensaios foram realizados em triplicata. O controle negativo correspondeu a 100% de sobrevivência das células L929 tratadas em presença do veículo de diluição do veneno e a viabilidade celular foi determinada por comparação entre os percentuais médios de células vivas neste grupo e nos demais grupos tratados com a substância-teste (MOSMANN, 1983).

O experimento foi aproveitado para a realização das análises morfológicas e morfométricas dos microtecidos tratados com o veneno total de *B. erythromelas* na presença ou não do soro antibotrópico. Para isso, os parâmetros avaliados visualmente foram os mesmos descritos anteriormente, sendo eles: Diâmetro de Feret, solidez e circularidade. Todos esses parâmetros foram avaliados pelo *software* Image J.

4.12 Análise da viabilidade dos microtecidos da linhagem L929 quando tratados com veneno de *Bothrops erythromelas* e antiveneno pelo método Laranja de Acridina/Brometo de Etídeo.

As células da linhagem L929 foram inoculadas nos microchips de agarose na densidade $2,5 \times 10^4$ células/chip e mantidas como descrito inicialmente. As análises de viabilidade mostraram melhores resultados de formação e estabilidade dos microtecidos entre o sétimo e o décimo dia de cultivo. Para a análise de viabilidade e morfologia, os microtecidos foram tratados com o veneno total de *Bothrops erythromelas* no sétimo dia de cultivo.

Decorridos 7 dias do plaqueamento, foram adicionadas aos poços duas concentrações do veneno total de *B. erythromelas* (25 e 12,5 $\mu\text{g/mL}$), por 24h de tratamento. Outro grupo foi tratado com o veneno nas mesmas concentrações e posterior adição do soro antibotrópico utilizado no tratamento de pacientes que sofrem com o envenenamento por serpentes do gênero *Bothrops*. A proporção utilizada de antiveneno para veneno foi de 5:1, ou seja, 5 vezes a quantidade de antiveneno para a quantidade de veneno. O antiveneno foi adicionado após um curto período do envenenamento, cerca de 15 minutos.

Após 24h de tratamento, todo o meio dos chips e poços foi removido, e foram adicionados 190 μL de solução contendo brometo de etídeo e laranja de acridina, ambos na concentração de 10 $\mu\text{g/mL}$ dentro de cada um dos chips. Os chips foram colocados em estufa incubadora a 37°C e atmosfera de 5% de CO_2 por

cerca de 30 minutos. Após isso, foram adicionados 210 µL de tampão PBS nos poços, os chips foram virados e o protocolo de recuperação dos microtecidos foi realizado. Após a centrifugação, os esferóides foram ressuspensos em 300 µL de tampão PBS e 50 µL foram adicionados em uma placa de 96 poços, adicionando-se mais 50 µL de tampão PBS em cada poço, posteriormente. As placas foram então levadas para as análises de fluorescência no equipamento Cytation 3, da fabricante BD Biosciences.

4.13 Análises histológicas dos esferóides da linhagem L929 tratadas com o veneno de *B. erythromelas* e seu antiveneno

As células da linhagem L929 foram inoculadas nos microchips de agarose na densidade $2,5 \times 10^4$ células/chip e mantidas como descrito inicialmente. As análises de viabilidade mostraram melhores resultados de formação e estabilidade dos microtecidos entre o sétimo e o décimo dia de cultivo. Para a análise de viabilidade e morfologia, os microtecidos foram tratados com o veneno total de *Bothrops erythromelas* no sétimo dia de cultivo.

Decorridos 7 dias do plaqueamento, foram adicionadas aos poços duas concentrações do veneno total de *B. erythromelas* (25 e 12,5 µg/mL), por 24h de tratamento. Outro grupo foi tratado com o veneno nas mesmas concentrações e posterior adição do soro antibotrópico utilizado no tratamento de pacientes que sofrem com o envenenamento por serpentes do gênero *Bothrops*. A proporção utilizada de antiveneno para veneno foi de 5:1, ou seja, 5 vezes a quantidade de antiveneno para a quantidade de veneno. O antiveneno foi adicionado após um curto período do envenenamento, cerca de 15 minutos.

Para análises histológicas e histoquímicas, seguiram-se as seguintes etapas: Fixação, desidratação, diafanização e inclusão dos esferóides em parafina. Estas etapas foram realizadas na Universidade de Granada em colaboração com o Prof. Dr. Victor Sebastian Carriel Araya, do Departamento de Histologia, grupo de pesquisa de Engenharia Tecidual. As etapas de processamento realizadas foram as mesmas descritas no tópico 4.6. Para as análises foram utilizados os corantes hematoxilina/eosina, para verificar a integridade dos microtecidos, azul de alcian, para verificar a presença de proteoglicanos ácidos e *Picrosirius Red*, marcador de fibras de colágeno.

5 RESULTADOS

PARTE I: GERAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS MICROTECIDOS

5.1 Acompanhamento das culturas e análises morfológicas

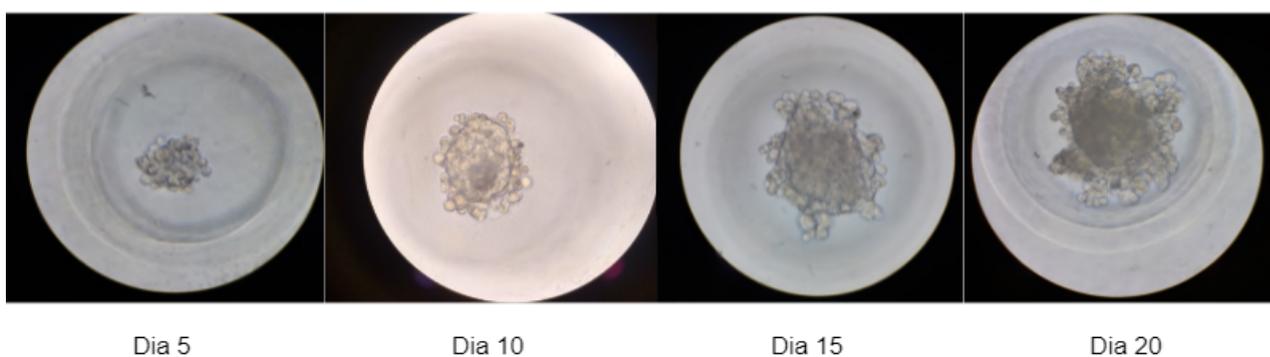
As análises das imagens mostraram que, inicialmente, as células estavam espalhadas por todo o fundo dos micropoços. A tendência, porém, foi que essas células fossem se agregando mais ou centro, diminuindo assim a área de ocupação inicial. Em ambos os tipos celulares, no dia 5 já havia a formação de agregados celulares muito bem assentados nos micropoços. A partir de formado os agregados, a redução de área inicial passou a voltar a ser um aumento, os esferóides já bem definidos passaram a aumentar de tamanho, como mostram as figuras abaixo, separadas por tipos celulares.

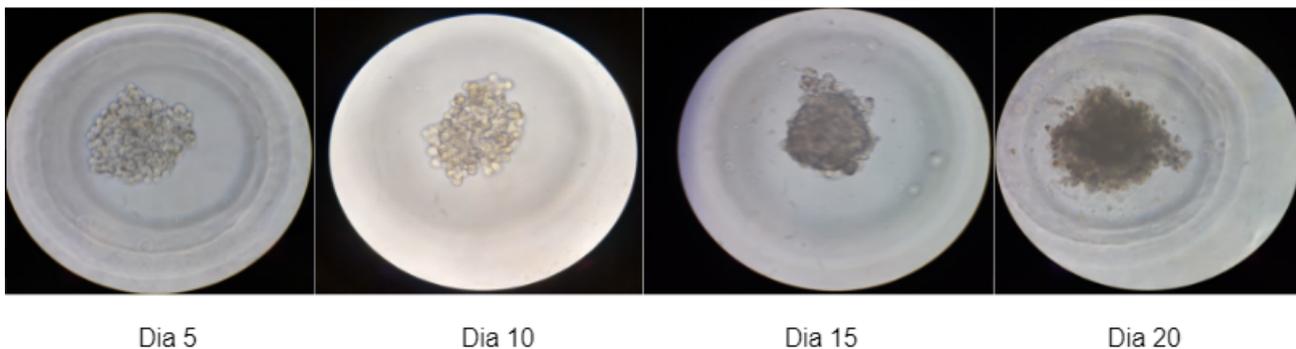
5.1.1 Linhagem de fibroblastos humanos - MRC-5

Os fibroblastos da linhagem MRC-5 formaram agregados que se mantiveram irregulares durante todo o período de cultivo. A figura 4 mostra o acompanhamento do cultivo nas densidades de 5×10^4 , 10^5 e $1,5 \times 10^5$ células/chip nos dias 5, 10, 15 e 20 de crescimento celular.

Figura 4 - Linhagem de células MRC-5 quando cultivadas em esferóides nas densidades (A) 5×10^4 células por chip (B) 10^5 células por chip e (C) $1,5 \times 10^5$ células por chip, nos dias 5, 10, 15 e 20 de cultivo respectivamente. As imagens foram obtidas através do uso de um microscópio de contraste de fase invertido.

A) MRC5 - 5×10^4 células/chip



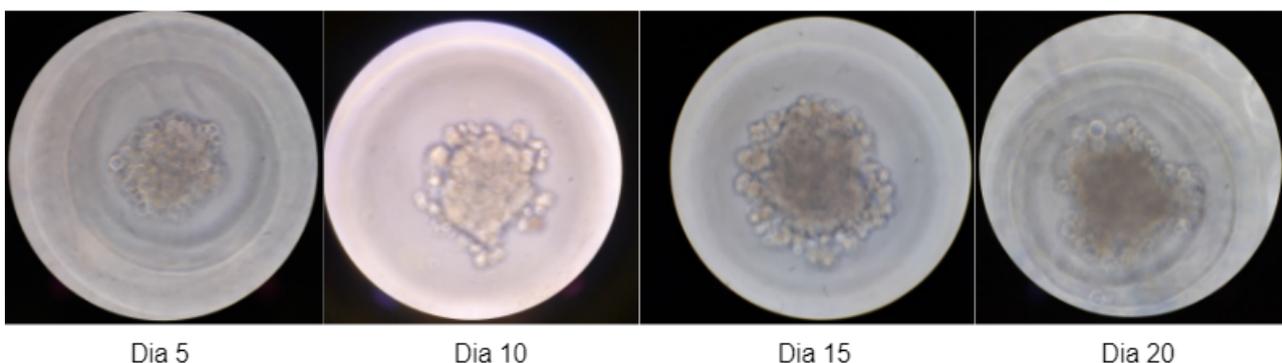
B) MRC-5 - 10^5 células/chip

Dia 5

Dia 10

Dia 15

Dia 20

C) MRC-5 - $1,5 \times 10^5$ células/chip

Dia 5

Dia 10

Dia 15

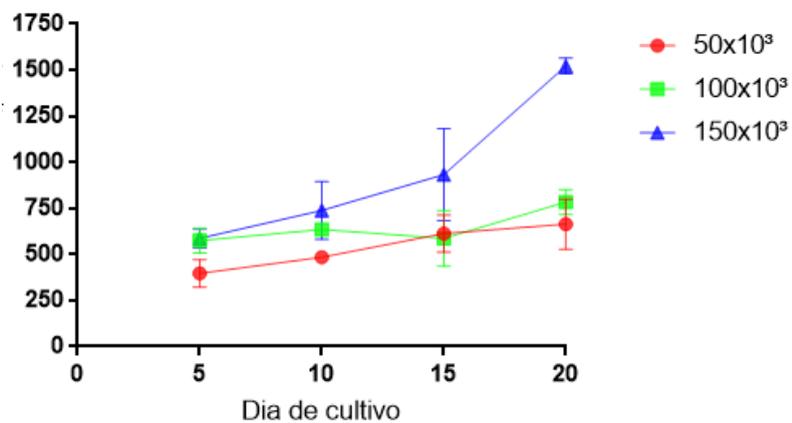
Dia 20

Fonte - Imagem elaborada pelo autor

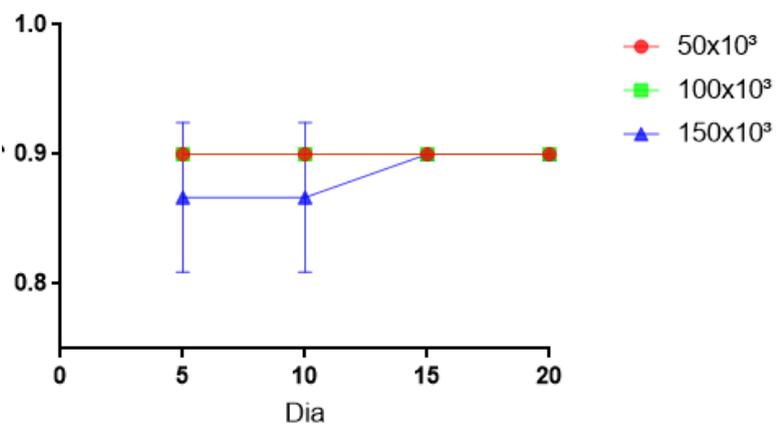
Além disso, a caracterização morfológica do cultivo dessa linhagem mostrou o que pode ser percebido visualmente, isto é, que, de forma geral, seu crescimento não foi regular tampouco estava tão próximo de ser uma esfera. A análise em relação ao diâmetro de Feret mostrou, porém, que seu crescimento foi consistente, como mostram os gráficos da figura 5, abaixo.

Figura 5 - Gráficos referentes ao diâmetro, solidez e circularidade da linhagem MRC-5 quando cultivada em esferóides. O eixo X é referente aos dias de cultivo dos esferóides e o eixo Y ao parâmetro avaliado. O diâmetro de feret foi obtido através da comparação dos tamanhos dos esferóides pelas imagens obtidas em microscópio invertido. A solidez representa o quão regular é a estrutura do perímetro dos esferóides, sendo valores mais próximos de 1 considerados regulares e mais distantes de 1 mais irregulares. A Circularidade é a representação do quanto o esferóide medido se aproxima de uma estrutura circular, em valores próximos de 1, ou de uma estrutura em elipse, valores mais distantes de um.

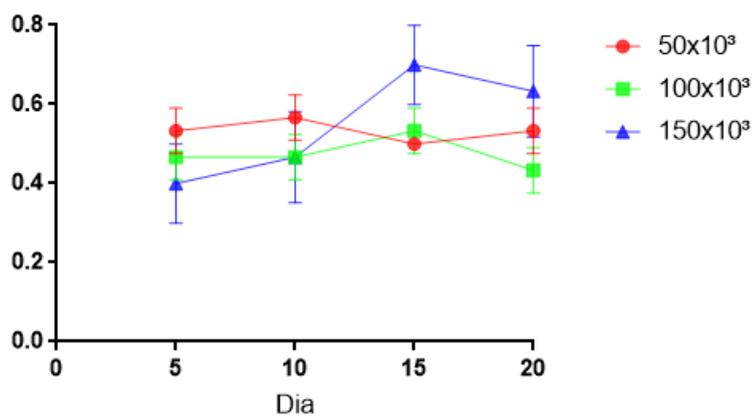
MRC5 - Diâmetro



MRC5 - Solidez



MRC5 - Circularidade



Fonte: elaborado pelo autor

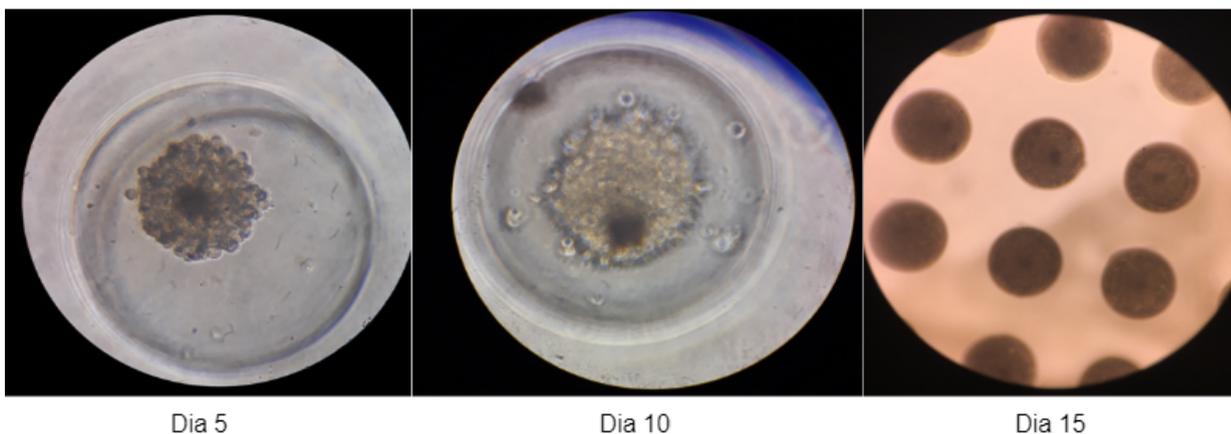
5.1.2 Linhagem de fibroblastos murinos - L929

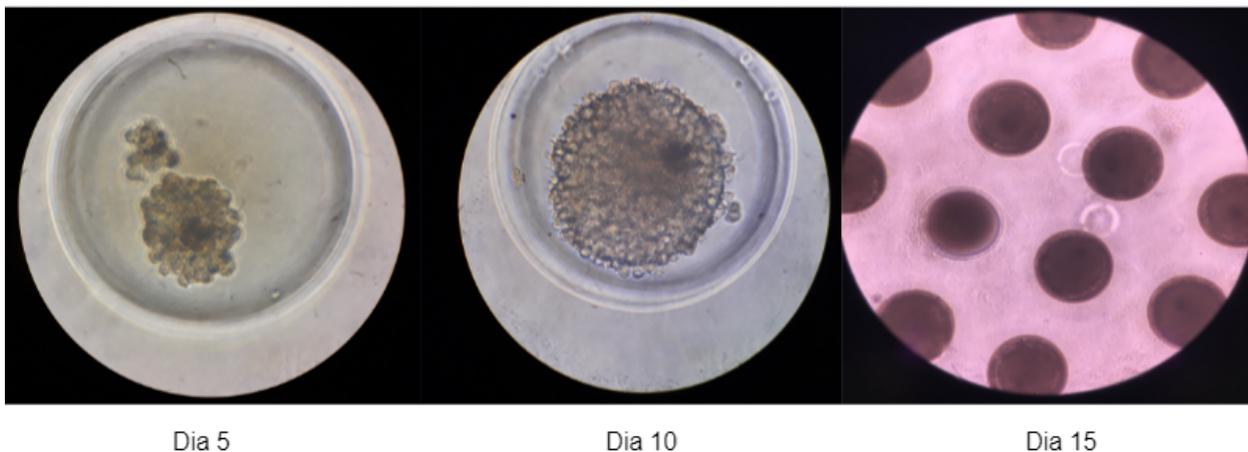
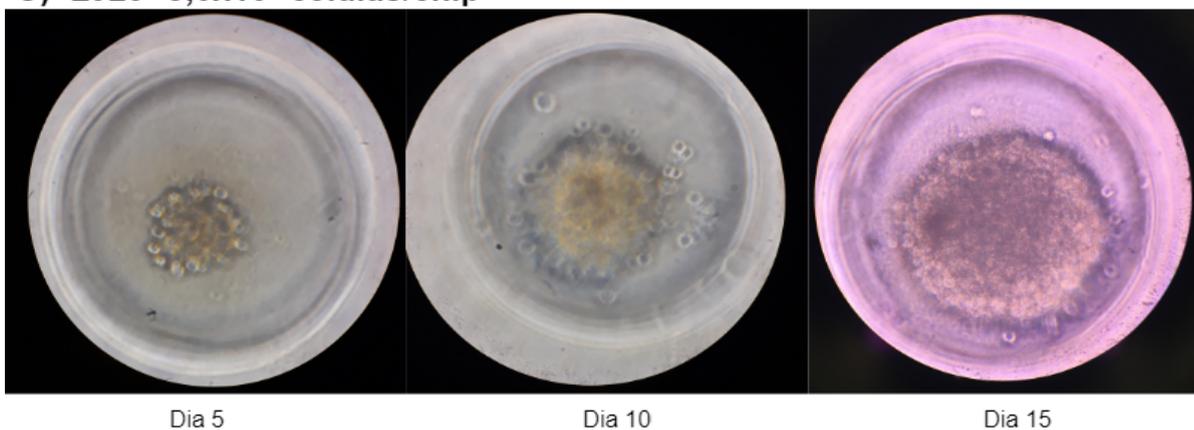
Os fibroblastos da linhagem L929, por outro lado, apresentaram um crescimento bem mais regular, com esferóides mais definidos. Seu crescimento, porém, foi muito rápido entre os dias 15 e 20 de cultivo, fazendo com que, os testes iniciais no primeiro cultivo, com as mesmas concentrações utilizadas para a linhagem MRC-5, se tornassem inviáveis. Desse modo, a solução encontrada para contornar esse problema foi diminuir as densidades celulares para $1,25 \times 10^4$, $2,5 \times 10^4$ e 5×10^4 células/chip.

As imagens da figura 6, abaixo, mostram a progressão do cultivo nessas concentrações nos dias 5, 10 e 15 de cultivo, tendo em vista que, a partir do dia 15, as células já não se encontravam mais de forma organizada, uma vez que cresceram ao ponto de ocupar todo o espaço do micropoço.

Figura 6 - Linhagem de células L929 quando cultivadas em esferóides nas densidades (A) $1,25 \times 10^4$ células por chip (B) $2,5 \times 10^4$ células por chip e (C) 5×10^4 células por chip, nos dias 5, 10 e 15 de cultivo respectivamente. No décimo quinto dia de cultivo os esferóides já ocupavam todo o espaço dos poços, tornando a continuidade da cultura inviável. As imagens foram obtidas através do uso de um microscópio de contraste de fase invertido.

A) L929- $1,25 \times 10^4$ células/chip



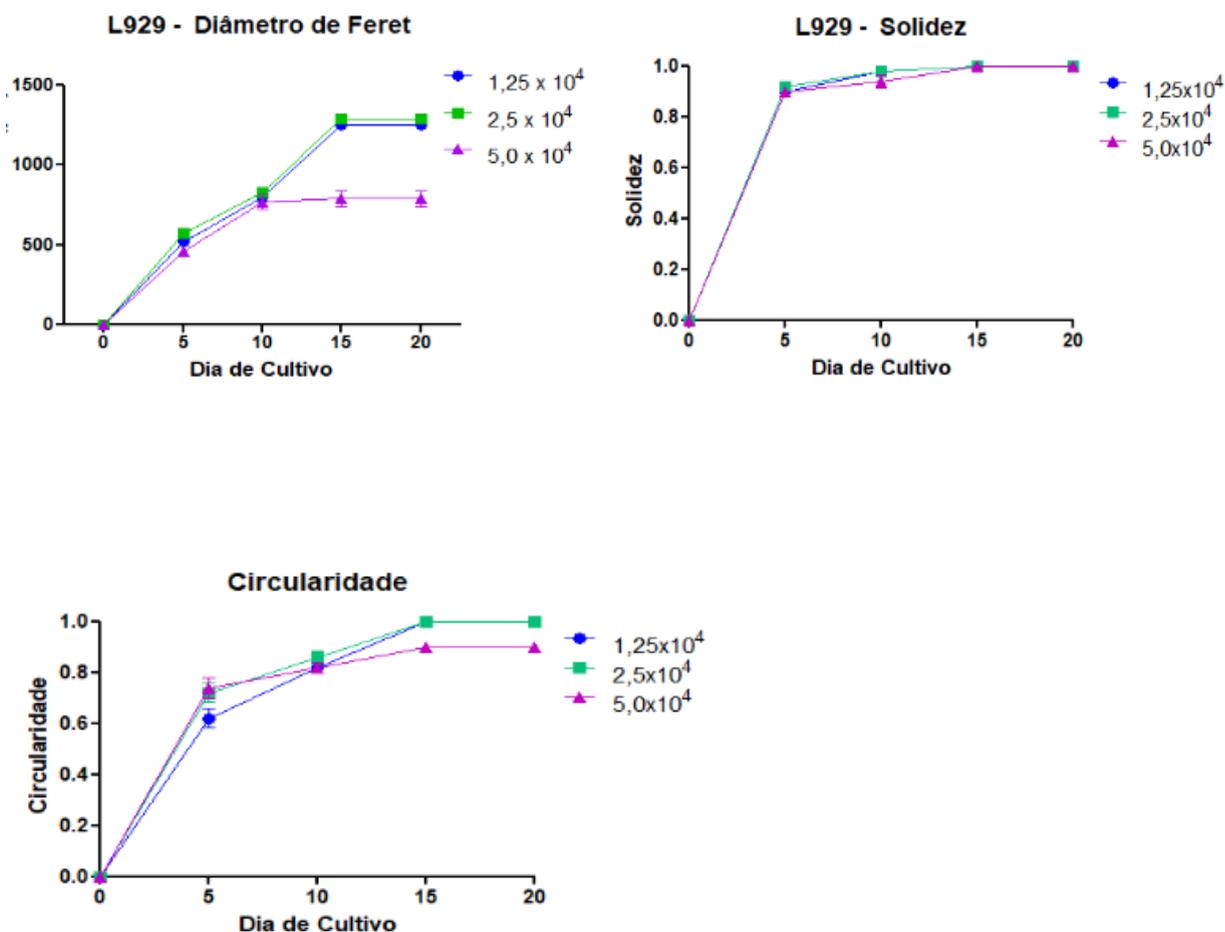
B) L929- $2,5 \times 10^4$ células/chip**C) L929- $5,0 \times 10^4$ células/chip**

Fonte: Elaborada pelo autor

As análises morfológicas mostraram que, de forma geral, o cultivo da linhagem L929 foi regular e apresentou boas características de esfericidade e circularidade, além disso, o seu crescimento também ocorreu de forma linear durante os dias de cultivo.

Os gráficos da figura 7, a seguir, mostram, numericamente, esses resultados.

Figura 7 - Gráficos referentes ao diâmetro, solidez e circularidade da linhagem L929 quando cultivada em esferóides. O eixo X é referente aos dias de cultivo dos esferóides e o eixo Y ao parâmetro avaliado. O diâmetro de feret foi obtido através da comparação dos tamanhos dos esferóides pelas imagens obtidas em microscópio invertido. A solidez representa o quão regular é a estrutura do perímetro dos esferóides, sendo valores mais próximos de 1 considerados regulares e mais distantes de 1 mais irregulares. A Circularidade é a representação do quanto o esferóide medido se aproxima de uma estrutura circular, em valores próximos de 1, ou de uma estrutura em elipse, valores mais distantes de um.



Fonte: elaborado pelo autor

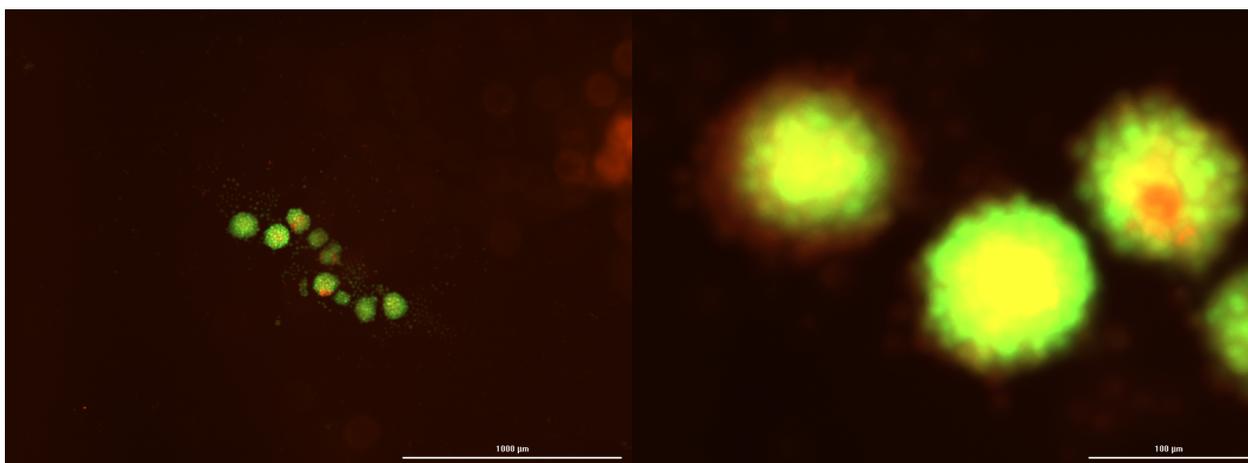
Dadas as melhores características de cultivo, a linhagem L929 foi a escolhida para seguir com o restante dos experimentos, isto é, análises de viabilidade e histológicas dos cultivos, bem como os experimentos com o veneno total de *B. erythromelas*. A densidade escolhida para os experimentos foi a de $2,5 \times 10^4$ células/chip, tendo em vista que no décimo dia de cultivo os esferóides apresentam uma estrutura bem regular e esférica. Para os demais experimentos, o dia 10 foi considerado como limite para o cultivo, tendo em vista que a partir daí

seria inviável, uma vez que no décimo quinto dia os microtecidos já tinham crescido de forma exacerbada, chegando, às vezes, a extravasar os limites dos micropoços.

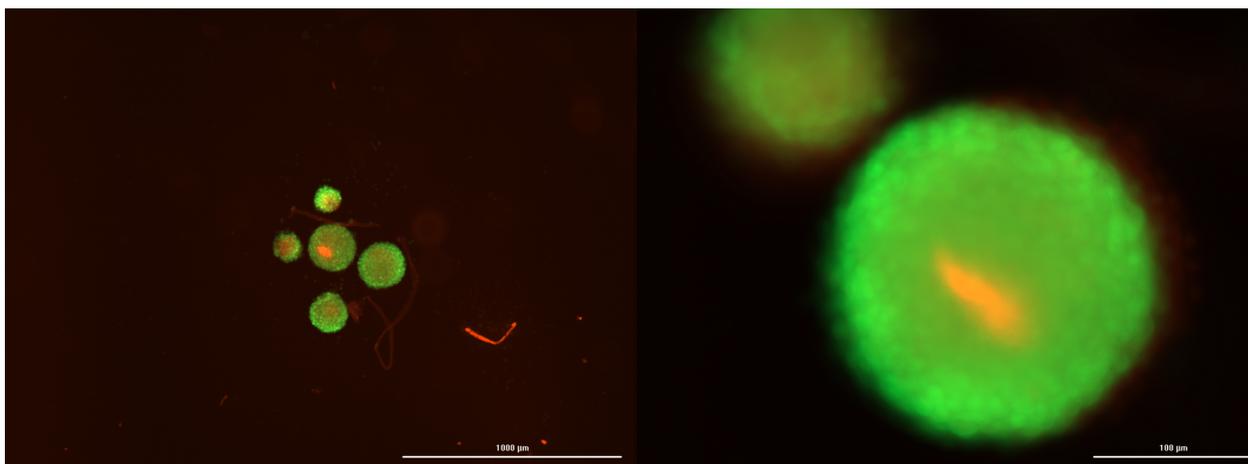
5.2 Análise da viabilidade dos esferóides da linhagem L929 através do método de Laranja de Acridina/Brometo de etídio

As análises da viabilidade feitas através do tratamento com os corantes fluorescentes Laranja de Acridina e Brometo de Etídio nos dias 5, 7 e 10 mostraram que os esferóides mantiveram suas células viáveis durante os primeiros 10 dias de cultivo. A figura abaixo mostra os resultados.

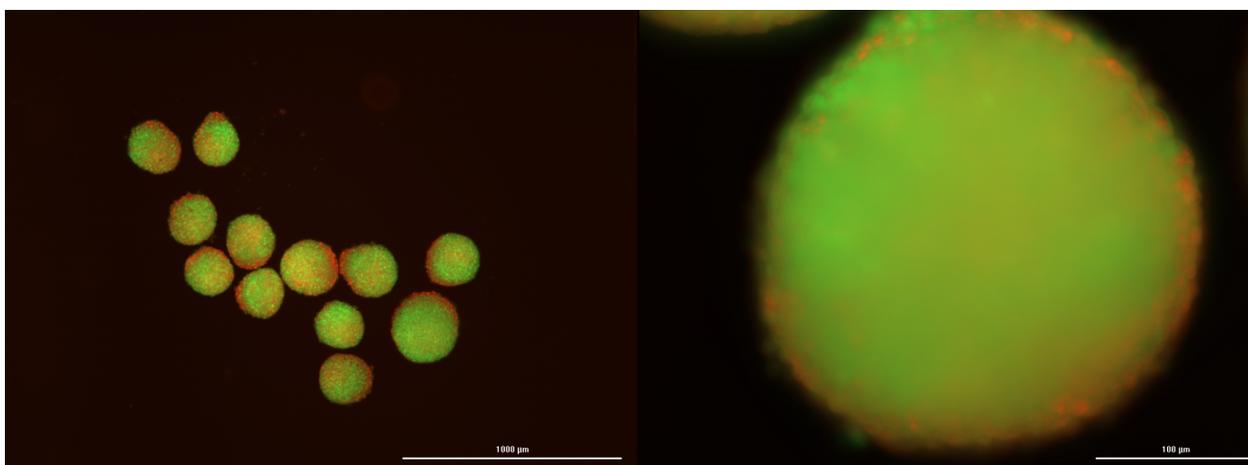
Figura 8 - Viabilidade dos esferóides da linhagem L929 através do método de coloração diferencial por Laranja de Acridina e Brometo de Etídio nos dias 5, 7 e 10 de cultivo, respectivamente. As células viáveis são coradas pela laranja de acridina e apresentam fluorescência de cor verde, enquanto células apoptóticas são coradas pelo brometo de etídio e apresentam fluorescência de cor vermelho/laranja.



Dia 5



Dia 7



Dia 10

No quinto dia de crescimento, os esferóides estavam com seu crescimento e formação em andamento, apresentando uma estrutura irregular, e um menor tamanho comparado aos outros dias de análises. Apresentaram uma boa viabilidade e, durante as etapas necessárias para a realização da coloração, apresentaram um pouco de desprendimento das células dos esferóides, como é possível observar na figura acima.

No sétimo dia os esferóides já estavam bem formados e com um tamanho maior quando comparados ao quinto dia, sua estrutura já era bastante regular e esférica, além disso praticamente não houve desprendimento das células quando os microtecidos foram resgatados dos microchips de agarose, o que demonstra a estabilidade dos esferóides formados.

O décimo dia apresentou as mesmas características do sétimo dia, esferóides estáveis e regulares além de maiores. Como visto anteriormente, os

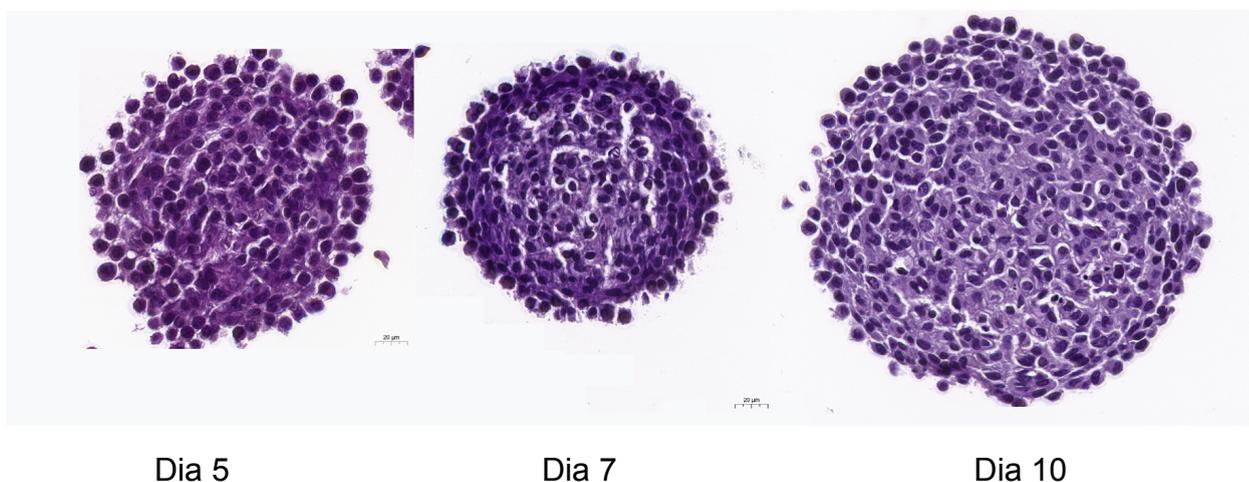
esferóides tendem a ter um tamanho exacerbado a partir do décimo dia de cultivo, chegando até mesmo a extravasar os limites dos micropoços nos chips de agarose.

Por isso, com base nos resultados apresentados até aqui, foi definido que os melhores tempos para utilização dos esferóides nos demais experimentos seria entre os dias 7 e 10 de cultivo.

5.3 Análises histológicas

Os resultados das análises histológicas feitas com hematoxilina e eosina mostraram que a formação de esferóides bem definidos e que apresentaram uma estrutura circular nos dias de cultivo avaliados. Além disso, as células estão bem distribuídas por todo o perímetro dos esferóides e sem sítios aparentes de morte celular nos três dias de cultivo, como mostrado nas imagens da figura 9.

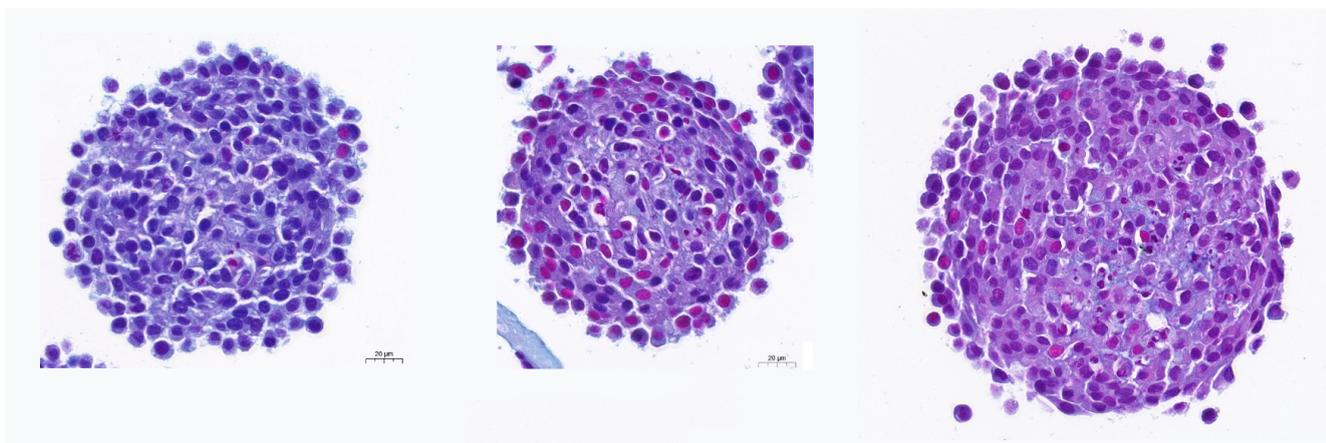
Figura 9 - Histologia dos esferóides de fibroblastos da linhagem L929 nos dias 5, 7 e 10 de cultivo, respectivamente, quando corados com hematoxilina e eosina. As imagens mostram uma estrutura regular e íntegra, além de uma boa distribuição das células por todo o microtecido.



As imagens dos ensaios histoquímicos obtidas pela coloração com azul de alcian mostraram uma marcação positiva para proteoglicanos ácidos nos esferóides gerados a partir de fibroblastos, em todos os dias de cultivo, isto é, 5, 7 ou 10 dias de cultivo, como mostra a figura abaixo. O Azul de Alcian tem grande especificidade em corar mucinas ácidas. Este corante cora, de forma específica e intensa, componentes ácidos, de cor azul. A figura 10 abaixo mostra essa marcação

positiva por entre as células, indicando presença de proteoglicanos ácidos no meio extracelular.

Figura 10 - Histoquímica dos esferóides de fibroblastos da linhagem L929 nos dias 5, 7 e 10 de cultivo, respectivamente, quando corados com o corante Azul de Alcian. O corante Azul de Alcian cora componentes ácidos com a cor azul. As imagens mostram a marcação positiva entre as células, indicando a presença de proteoglicanos ácidos, componentes da matriz extracelular do tecido conjuntivo.



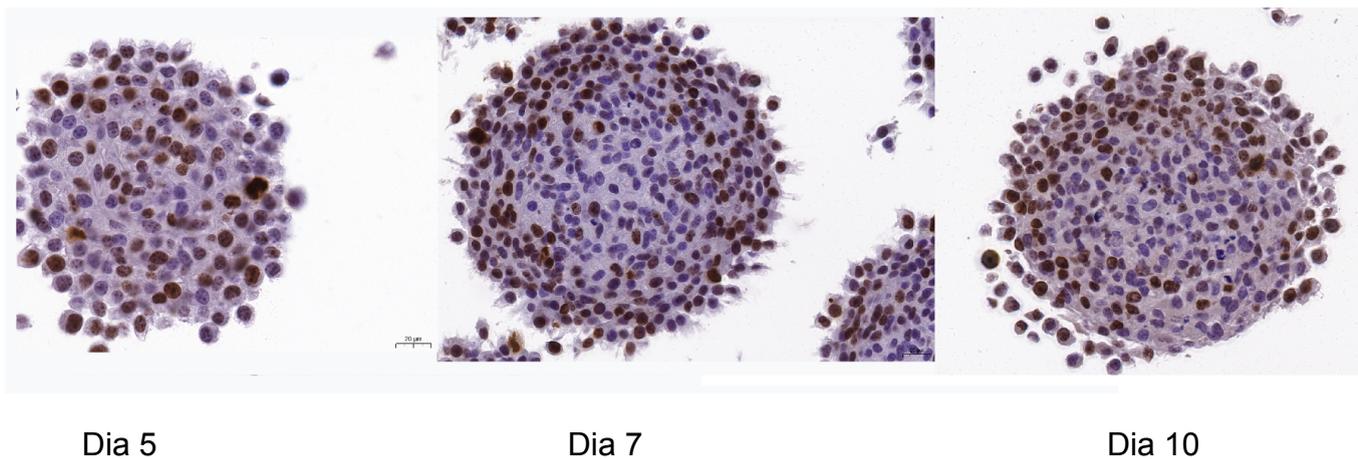
Dia 5

Dia 7

Dia 10

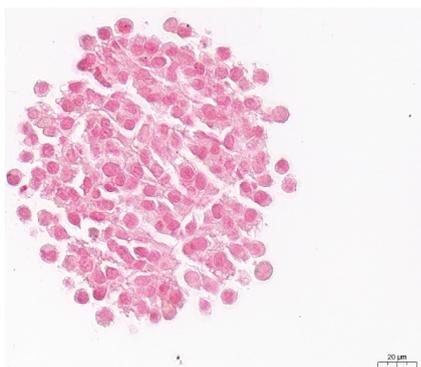
O marcador de Ki-67 identifica células em processo de multiplicação celular através da coloração de cor marrom dos núcleos das células passando por esse processo. Os resultados da imunohistoquímica dos esferóides quando marcados com Ki-67 mostraram que no quinto dia as células que estavam em divisão estavam presentes em todo o esferóide. Nos dias 7 e 10, por outro lado, pode-se observar que as células que estão se multiplicando passam a ser mais encontradas nas bordas dos esferóides, que passam a ter um centro com menos células em divisão, como mostrado na figura 11 a seguir.

Figura 11 - Imunohistoquímica dos esferóides de fibroblastos da linhagem L929 nos dias 5, 7 e 10 de cultivo, respectivamente, quando marcados com Ki-67 e contrastados com Hematoxilina. As células com o núcleo marrom possuem marcação positiva para Ki-67, indicando que estas células estão em processo de multiplicação celular. Os microtecidos nos dias iniciais tem células em divisão divididas por todo o esferóide, enquanto que nos dias 7 e 10 as células em divisão se concentram nas bordas dos esferóides, como mostrado abaixo.



As análises histoquímicas realizadas com o corante picosirius red mostraram ausência de colágeno na estrutura dos esferóides em todos os dias avaliados, não havendo marcação positiva em nenhum desses dias como mostra a figura abaixo. Picosirius é uma coloração seletiva de tecido conjuntivo que permite uma análise qualitativa das fibras colágenas do tecido conjuntivo. A marcação positiva permite verificar a presença ou não de fibras de colágeno, que são marcadas em uma cor avermelhada. A figura a seguir mostra a ausência de fibras de colágeno nos microtecidos de fibroblastos em todos os tempos de cultivo.

Figura 12 - Histoquímica dos esferóides de fibroblastos da linhagem L929 nos dias 5, 7 e 10 de cultivo, respectivamente, quando marcados com o corante Picrosirius. O corante Picrosirius marca fibras de colágeno com uma cor amarela/alaranjada. Desta forma, os microtecidos de fibroblastos L929 não produziram colágeno, pois não tiveram marcação positiva em nenhum dos dias de cultivo, como mostrado abaixo.



Dia 5



Dia 7



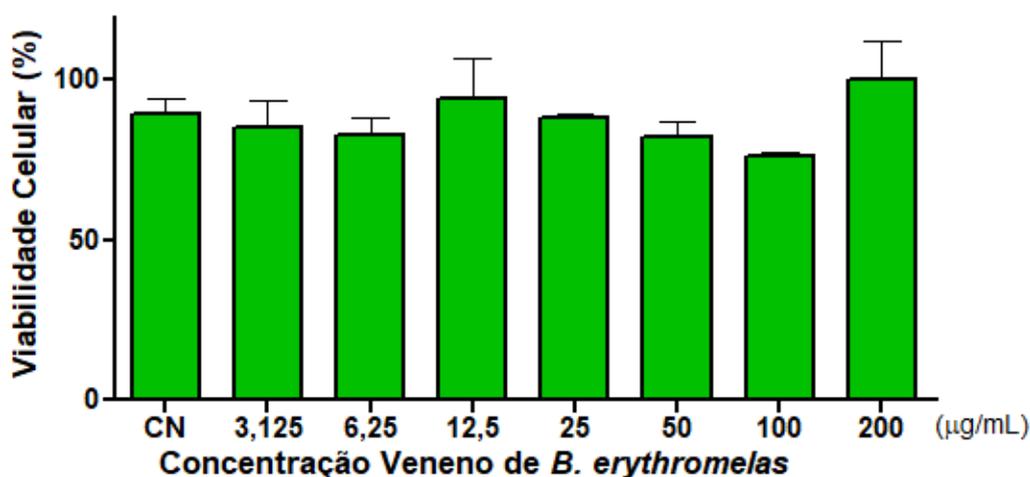
Dia 10

PARTE II: LINHAGEM L929, EM MONOCAMADA E MICROTECIDOS, TRATADA COM O VENENO DE *B. erythromelas* E ANTIVENENO

5.4 Análise da viabilidade celular da linhagem L929 cultivada em monocamada quando tratada com veneno de *Bothrops erythromelas* pelo ensaio colorimétrico Alamar Blue®

As análises realizadas pelo ensaio colorimétrico Alamar Blue® mostraram que, após tratadas por 24h com o veneno total de *B. erythromelas*, em diluição seriada de fator 2 (200µg/mL - 3,12µg/mL) a linhagem de células L929 mantiveram viabilidade acima de 75%, mostrando, dessa forma, a ausência de citotoxicidade do veneno nas concentrações e tempo testados. Apesar de viáveis, as células apresentaram uma mudança de morfologia e perda de capacidade de adesão nos tratamentos com concentrações superiores à 12,5µg/mL, o que sugere que, apesar de viáveis, as células podem estar passando por um processo inicial de morte celular ou estarem sob alguma condição de estresse, sendo necessárias a realização de experimentos que confirmem ou não essa hipótese. De todo modo, as concentrações para os demais experimentos foram escolhidas, a partir desses resultados.

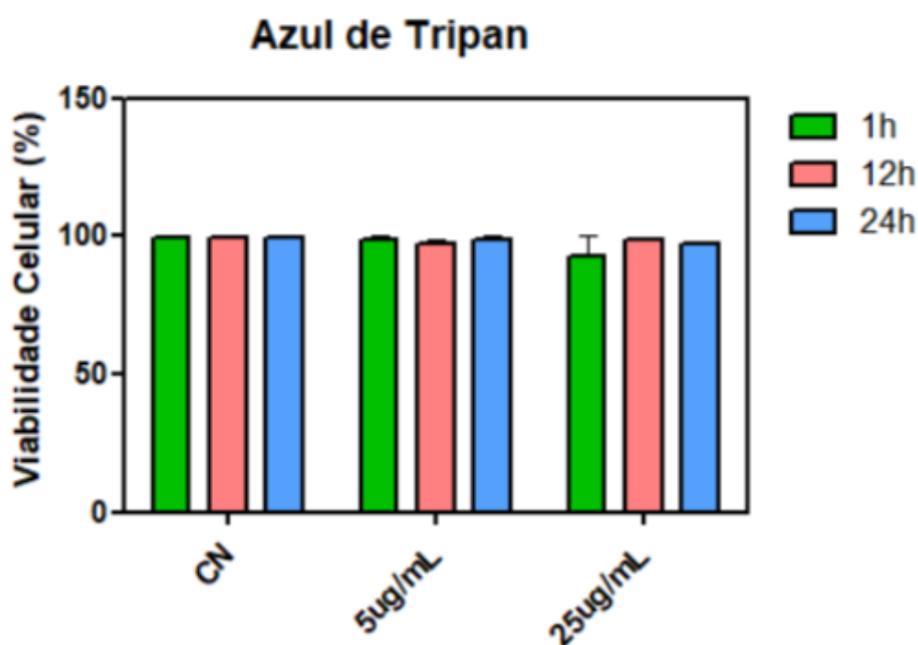
Figura 13 - Gráfico de viabilidade celular pelo ensaio colorimétrico Alamar Blue® da linhagem de fibroblastos L929 quando tratada com concentrações crescentes do veneno total de *Bothrops erythromelas* por 24h. O ensaio mostrou que o veneno não foi citotóxico em nenhuma concentração testada.



5.5 Análise da viabilidade celular da linhagem L929 cultivadas em monocamada quando tratadas com veneno de *Bothrops erythromelas* pelo método Azul de Tripán

As análises realizadas pelo método do azul de tripan mostraram que após tratadas com o veneno total de *B. erythromelas* nas concentrações de 5 µg/mL e 25 µg/mL por 1h, 12h e 24h as células da linhagem L929, apesar de apresentarem uma mudança morfológica brusca e perda de aderência, mantiveram-se viáveis com cerca de 100% de viabilidade após o tratamento, como mostra o gráfico representado na figura abaixo.

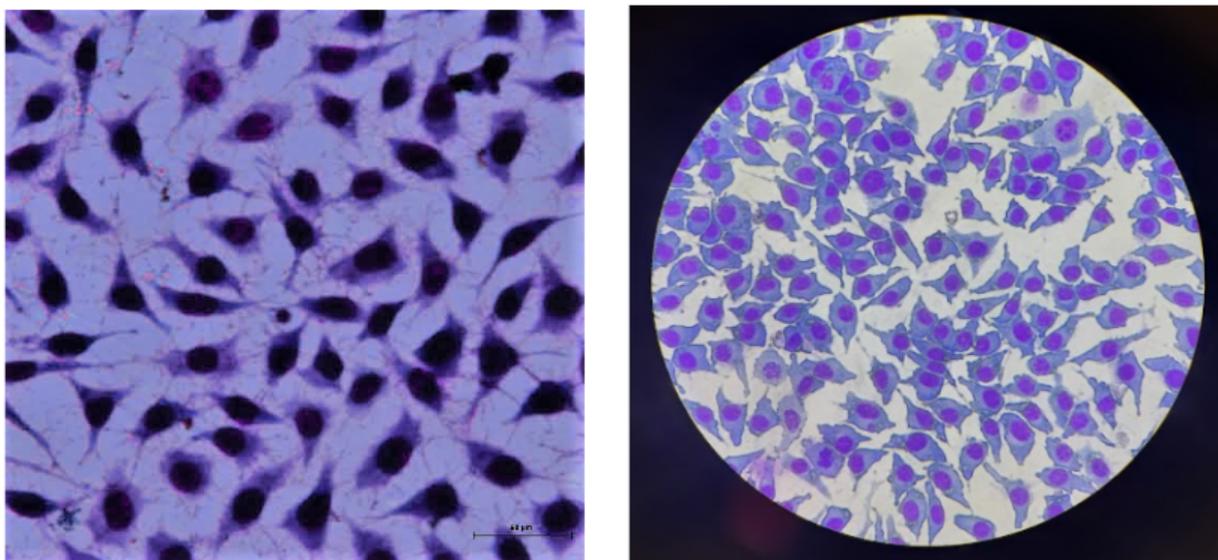
Figura 14 - Gráfico de viabilidade celular da linhagem L929 quando tratada com duas concentrações do veneno total de *Bothrops erythromelas* e em três tempos. O veneno total de *B. erythromelas* não foi citotóxico nas concentrações e tempos testados. As células mantiveram viabilidade



5.6 Análise morfológica através do método de coloração Panóptico das células da linhagem L929 cultivadas em monocamada quando tratadas com o veneno total de *Bothrops erythromelas*

As células L929 quando cultivadas em monocamada apresentam uma morfologia “estrelar” pontiaguda, como observado na figura 15 abaixo, quando não houve tratamento.

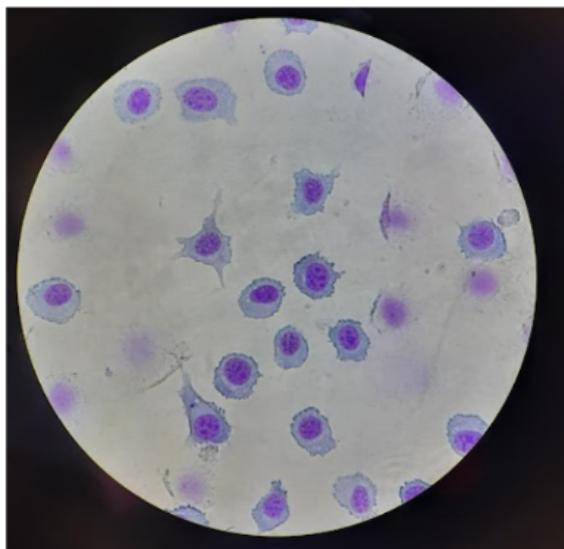
Figura 15 - Coloração Panóptico da linhagem L929 na ausência de tratamento (controle negativo). As imagens mostram a morfologia normal das células, que têm como características um formato “estrelado”, como pode-se observar.



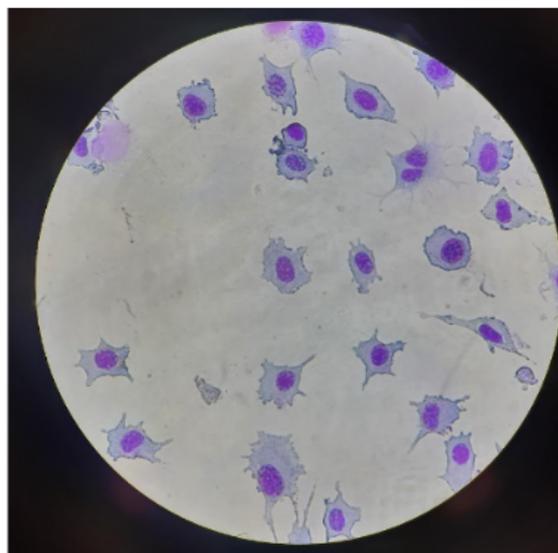
Controle Negativo

A presença de doxorrubicina faz com que as células percam esse formato característico, apresentando uma estrutura mais arredondada e irregular, como observado na figura 16 a seguir. A doxorrubicina foi utilizada como controle positivo neste experimento.

Figura 16 - Coloração Panótico da linhagem L929 tratadas por 24h com doxorubicina nas concentrações de 12,5 µg/mL e 25 µg/mL, respectivamente (controle positivo).



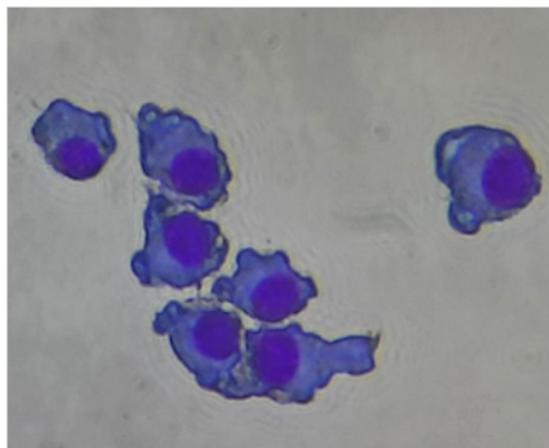
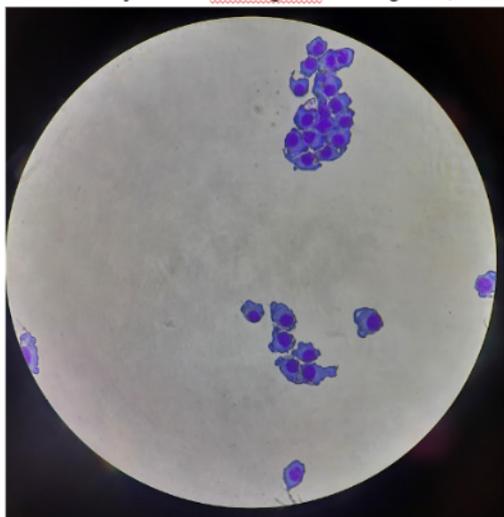
DOX 12,5ug/mL 24h



DOX 25 ug/mL 24h

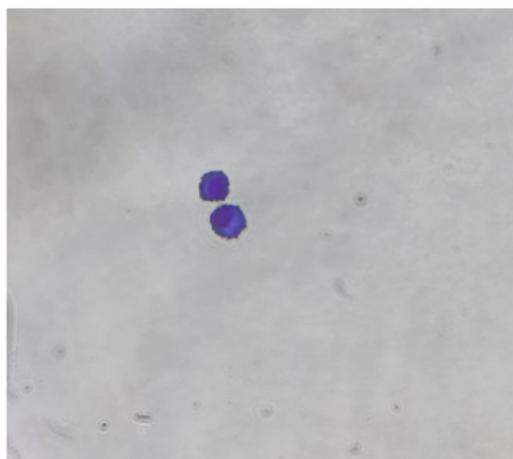
Quando tratadas com o veneno total de *Bothrops erythromelas*, as células além de perderem o formato estrelado característico, apresentaram também uma redução de tamanho além da perda de capacidade de adesão. A figura 17 mostra as células quando tratadas com o veneno total de *B. erythromelas* na concentração de 12,5 µg/mL por 24h, já apresentando essa redução de tamanho e modificação na estrutura das células. A figura 18 também mostra as células quando tratadas com o veneno total de *B. erythromelas* porém numa concentração de 25 µg/mL onde as células já perderam praticamente toda a capacidade de adesão e, por isso, nas análises tiveram sua maioria perdida nos processos de lavagem, restando poucas células a serem observadas. Estas poucas células apresentaram essa perda de morfologia característica, redução de tamanho, além das bordas irregulares, porém visualmente mais acentuadas.

Figura 17 - Coloração Panótico da linhagem L929 tratadas por 24h com o veneno total de *Bothrops erythromelas* na concentração de 12,5 µg/mL. As análises evidenciam que, na concentração e tempo testados, as células perderam sua capacidade de adesão. Além disso, também pode-se notar a diferença no formato quando comparado com as células não tratadas.



Veneno de *B. erythromelas* 12,5ug/mL - 24h

Figura 18 - Coloração Panótico da linhagem L929 tratadas por 24h com o veneno total de *Bothrops erythromelas* na concentração de 25 µg/mL. As análises evidenciam que, na concentração e tempo testados, as células perderam sua capacidade de adesão, tendo sua maioria se perdido nos processos de realização do teste. Além disso, também pode-se notar a diferença na morfologia quando comparada com as células não tratadas.



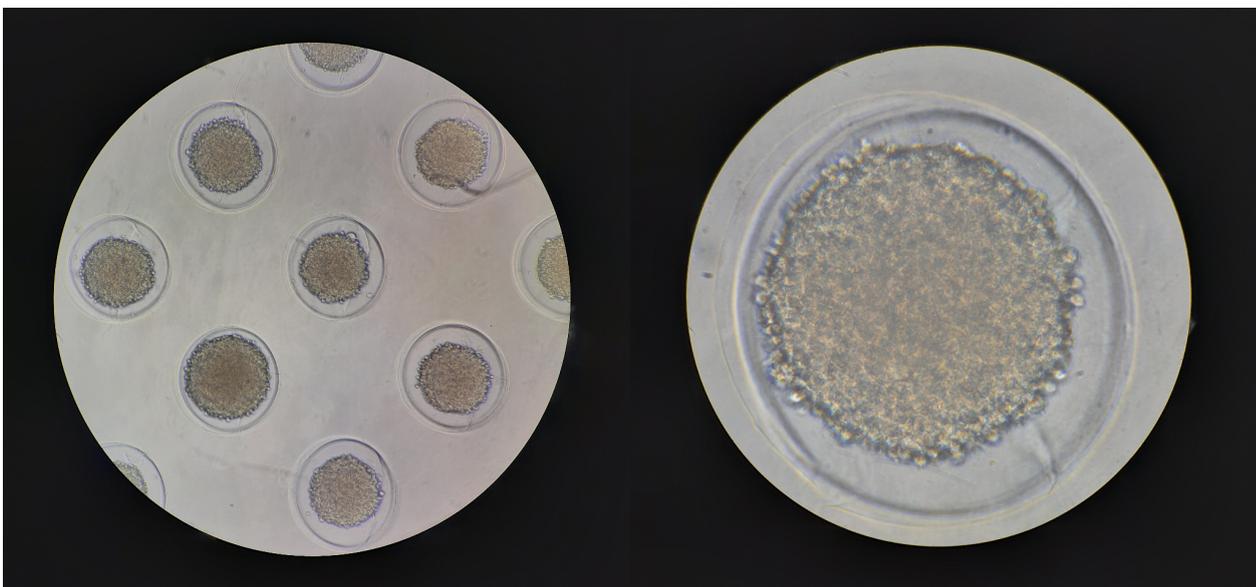
Veneno de *B. erythromelas* - 25ug/mL - 24h

5.7 Acompanhamento das culturas e análises morfológicas dos microtecidos tratados com o veneno de *B.erythromelas* e antiveneno

Os microtecidos formados pelas células da linhagem L929, como mostrados anteriormente, apresentam uma estrutura bem regular e praticamente nenhuma soltura de células durante o processo de recuperação. O tratamento com o veneno total de *B. erythromelas* mostrou que concentrações mais altas do veneno interferem nessa capacidade de adesão e, conseqüentemente, na formação dos microtecidos estáveis. Além disso, os resultados também mostram que o soro antibotrópico, ou antiveneno, foi capaz de inibir essa atividade “antiaderente” do veneno. Como citado, foram utilizadas duas concentrações do veneno, sendo elas 12,5 µg/mL e 25 µg/mL e, nos tratamentos com veneno e antiveneno, a proporção de 5:1 de antiveneno para veneno.

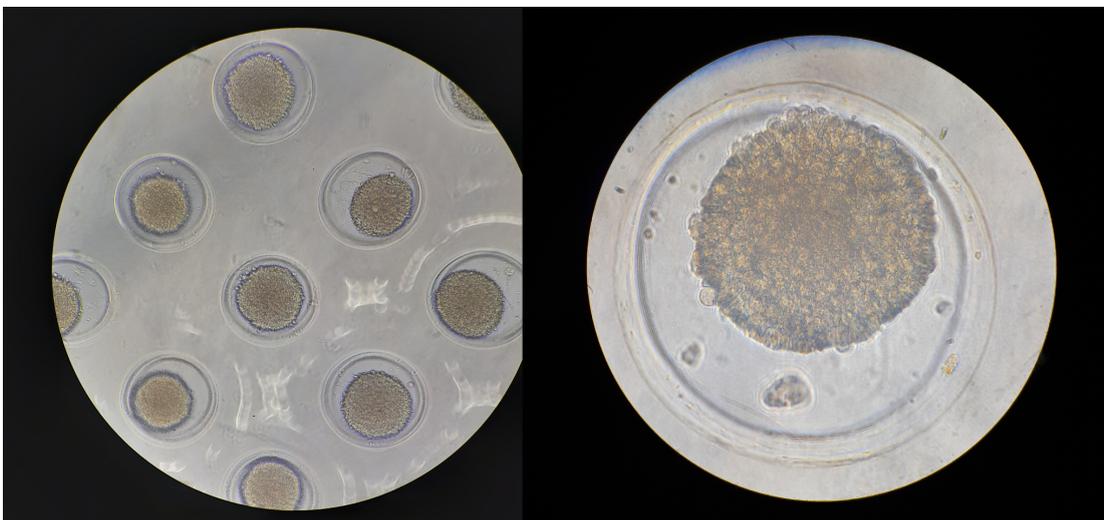
A figura 19 mostra os microtecidos tratados com veneno na concentração de 12,5 µg/mL com 24h de tratamento.

Figura 19 - Microtecidos da linhagem L929 tratados com o veneno total de *Bothrops erythromelas* na concentração de 12,5 µg/mL por 24h. Visualmente, os esferóides não apresentaram diferenças notáveis no formato quando comparados aos esferóides não tratados (mostrados anteriormente).



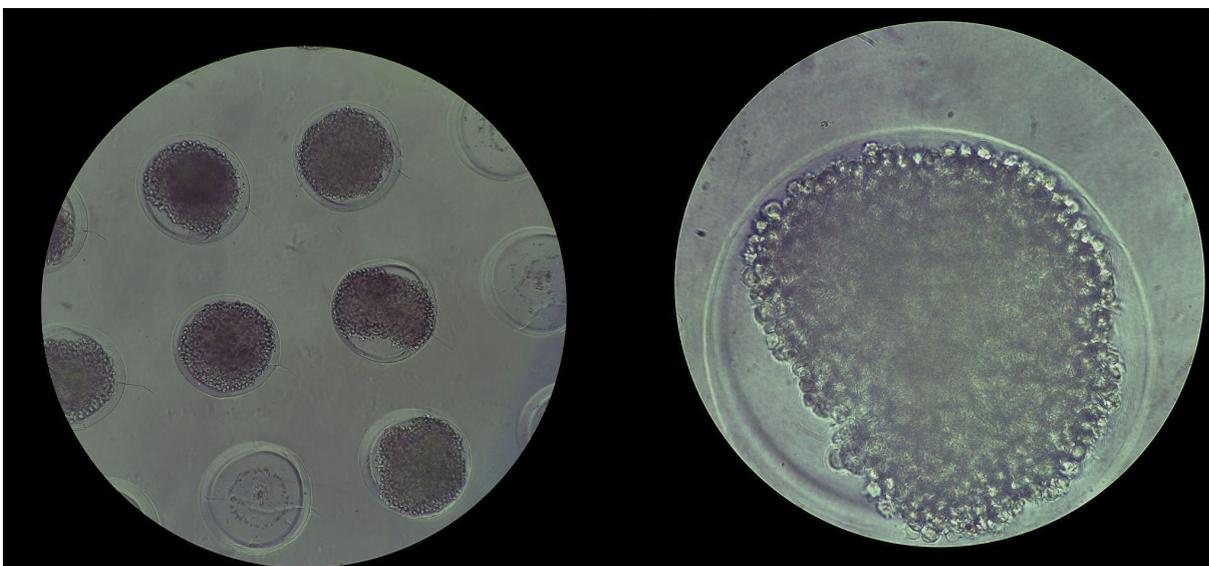
A figura 20 mostra os microtecidos tratados com veneno na concentração de 12,5 µg/mL e com o antiveneno, também com 24h de tratamento.

Figura 20- Microtecidos da linhagem L929 tratados com o veneno total de *Bothrops erythromelas* na concentração de 12,5 µg/mL por 24h, dessa vez na presença também do soro antitetrápico na proporção de 5:1 de antiveneno para veneno. Assim como nos tratamentos somente com o veneno total de *B. erythromelas*, os microtecidos não apresentam diferenças visualmente notáveis no formato, quando comparados aos microtecidos não tratados.



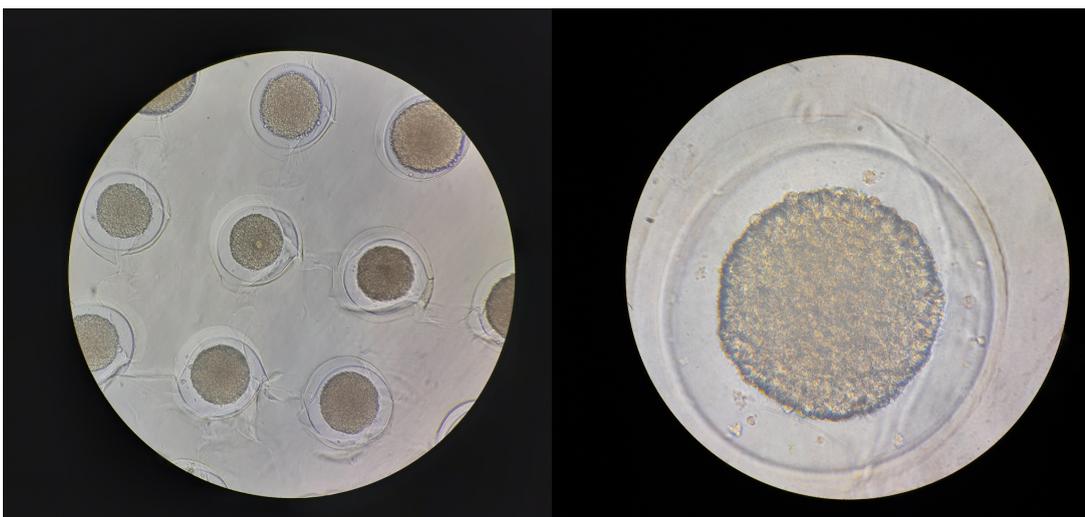
A figura 21 mostra os microtecidos tratados com veneno na concentração de 25 µg/mL com 24h de tratamento.

Figura 21- Microtecidos da linhagem L929 tratados com o veneno total de *Bothrops erythromelas* na concentração de 25 µg/mL por 24h. Diferente da concentração anterior, os microtecidos tratados nesta concentração apresentaram uma mudança perceptível no seu formato, mostrando-se mais irregulares, sinalizando essa atividade de inibição da aderência celular causada pelo veneno.



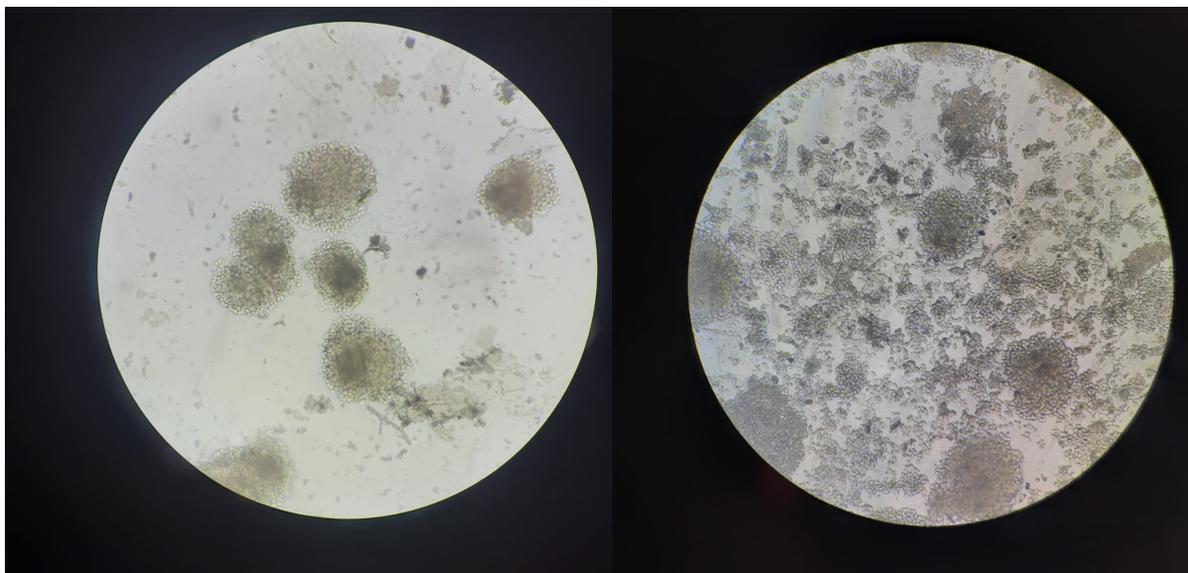
A figura 22 mostra os microtecidos tratados com veneno na concentração de 25 µg/mL e com o antiveneno, também com 24h de tratamento.

Figura 22 - Microtecidos da linhagem L929 tratados com o veneno total de *Bothrops erythromelas* na concentração de 25 µg/mL por 24h, dessa vez na presença também do soro antibotrópico na proporção de 5:1 de antiveneno para veneno. Diferente dos microtecidos que não foram tratados com o soro, os esferóides dessa vez apresentaram uma estrutura semelhante aos não tratados, evidenciando a ação do antiveneno.



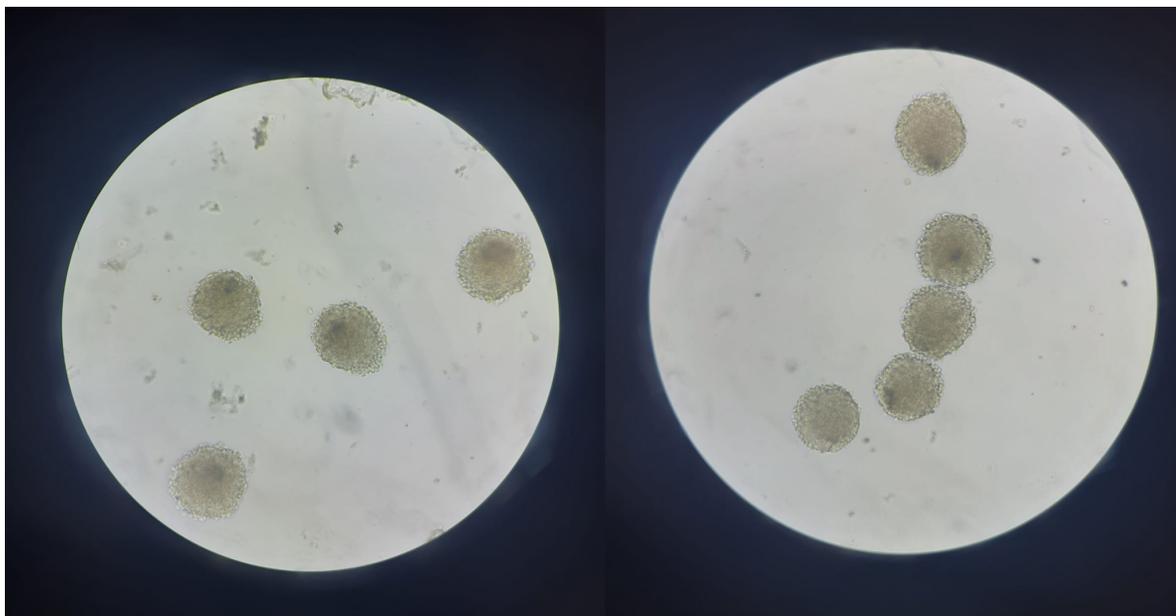
Os protocolos de recuperação realizados para obtenção dos microtecidos mostraram que, quando tratados apenas com o veneno total de *B. erythromelas*, os esferóides perderam seu formato, apresentando, também, uma soltura das células dos microtecidos, como mostrado na figura 23, a seguir.

Figura 23 - Microtecidos da linhagem L929 tratados com o veneno total de *Bothrops erythromelas* nas concentrações de 12,5 µg/mL (esquerda) e 25 (direita) µg/mL por 24h na ausência do soro antibotrópico. Após passarem pelo processo de recuperação, ou seja, da retirada dos chips de agarose, os microtecidos apresentaram soltura expressiva das células, principalmente na concentração de 25 µg/mL.



Por outro lado, após o protocolo de recuperação das células que foram tratadas com o veneno e com o antiveneno, os microtecidos não apresentaram perda de formato nem soltura notável de células após a recuperação. Estes resultados podem ser observados na figura 24, a seguir.

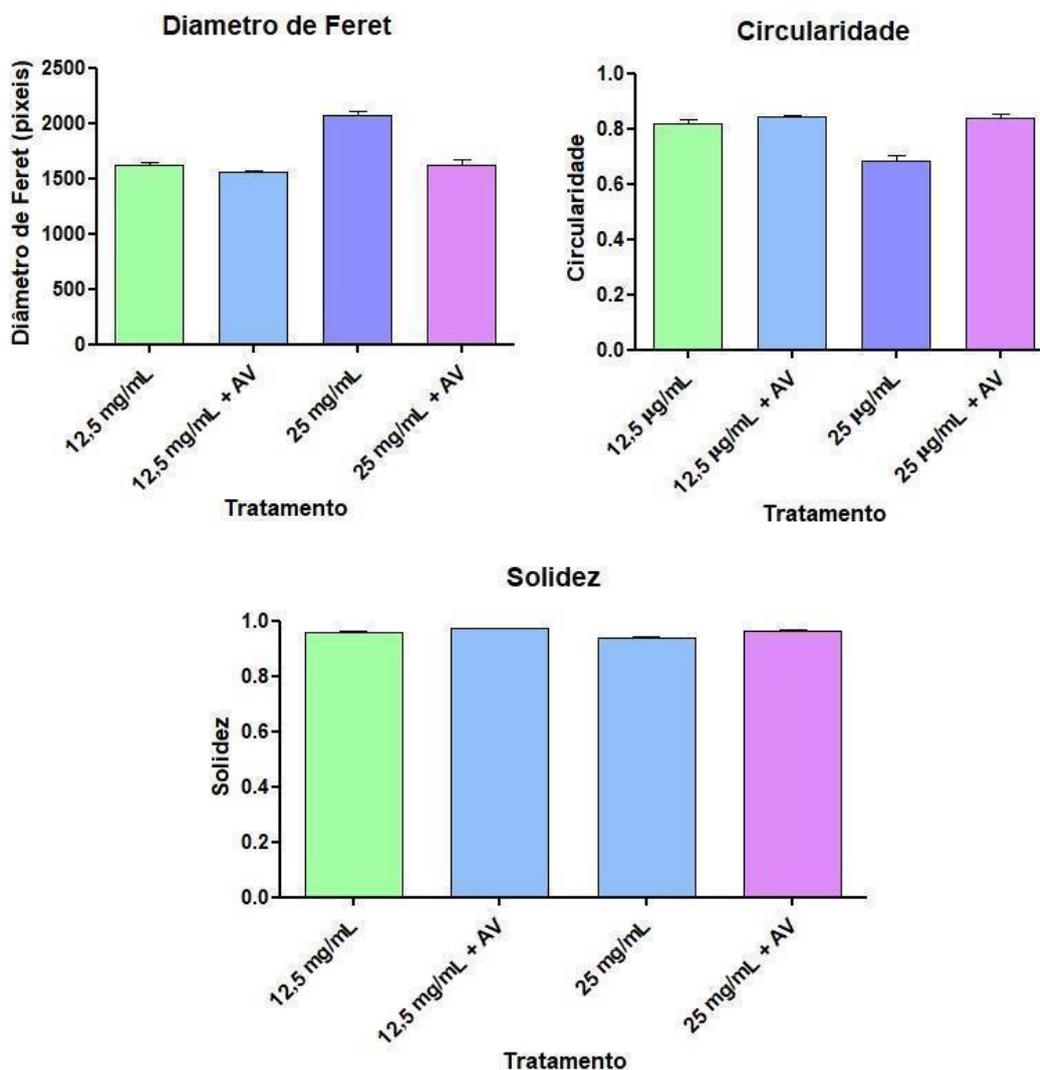
Figura 24 - Microtecidos da linhagem L929 tratados com o veneno total de *Bothrops erythromelas* nas concentrações de 12,5 µg/mL (esquerda) e 25 (direita) µg/mL por 24h na presença também do soro antibotrópico, na proporção de 5:1 de antiveneno para veneno. Após passarem pelo processo de recuperação, ou seja, da retirada dos chips de agarose, os microtecidos não apresentaram soltura das células.



Por outro lado, para as análises morfométricas, assim como anteriormente, foram analisados os parâmetros: Diâmetro de Feret, Circularidade e Solidez. Os resultados mostraram que, como esperado, o diâmetro de Feret foi maior no tratamento com a concentração de 25 µg/mL de veneno total de *B. erythromelas*, isso pois, como observado nas imagens, o veneno fez com que houvesse soltura das células, o que praticamente não aconteceu no tratamento com a concentração de 12,5 µg/mL, bem como nos tratamentos com a presença do antiveneno, na proporção de 5:1 de antiveneno para veneno.

E, por fim, a circularidade também foi alterada neste tratamento quando comparado aos demais, evidenciando a perda do formato esférico característico dos microtecidos em condições normais de crescimento. Os gráficos estão representados na figura 25, a seguir.

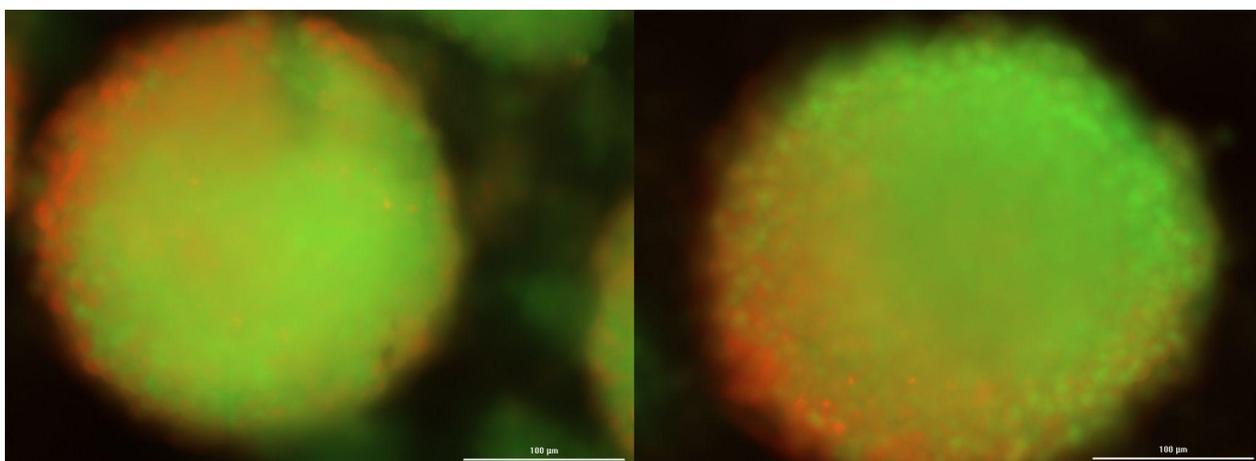
Figura 25 - Gráficos referentes ao diâmetro, solidez e circularidade da linhagem L929 quando cultivada em esferóides. O diâmetro de feret foi obtido através da comparação dos tamanhos dos esferóides pelas imagens obtidas em microscópio invertido. A solidez representa o quão regular é a estrutura do perímetro dos esferóides, sendo valores mais próximos de 1 considerados regulares e mais distantes de 1 mais irregulares. A Circularidade é a representação do quanto o esferóide medido se aproxima de uma estrutura circular, em valores próximos de 1, ou de uma estrutura em elipse, valores mais distantes de um.



5.8 Análise da viabilidade dos microtecidos da linhagem L929 tratadas com o veneno de *B. erythromelas* e antiveneno através do método de Laranja de Acridina/Brometo de etídio

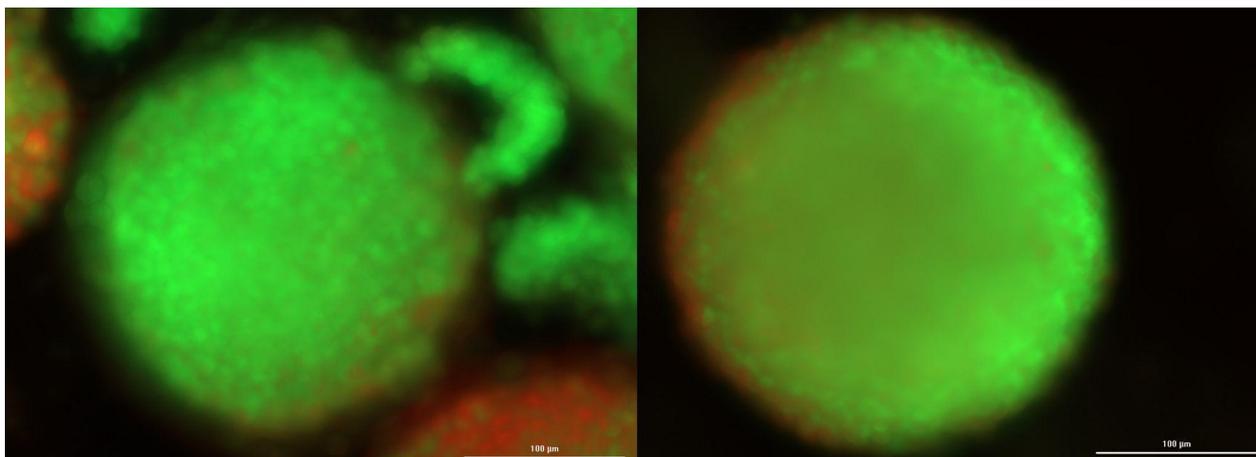
As análises da viabilidade feitas através do tratamento com os corantes fluorescentes Laranja de Acridina e Brometo de Etídio mostraram que os microtecidos que foram tratados apenas com o veneno total de *B. erythromelas* apresentaram pontos de morte celular bem aparentes, mas ainda com maioria de viabilidade, como mostrado na figura 26 abaixo. A densidade de células utilizada para obtenção dos microtecidos foi de $2,5 \times 10^4$ células/chip e os tratamentos foram realizados no sétimo dia de cultivo.

Figura 26 - Viabilidade dos microtecidos da linhagem L929 na densidade de $2,5 \times 10^4$ células/chip através do método de coloração diferencial por Laranja de Acridina e Brometo de Etídio quando tratados por 24h com 12,5 µg/mL (esquerda) e 25 µg/mL (direita) do veneno total de *B. erythromelas* na ausência de antiveneno. Os tratamentos foram realizados no sétimo dia de cultivo dos microtecidos. As células viáveis são coradas pela laranja de acridina e apresentam fluorescência de cor verde, enquanto células apoptóticas são coradas pelo brometo de etídio e apresentam fluorescência de cor vermelho/laranja



Por outro lado, os microtecidos tratados com veneno e com antiveneno apresentaram suas células viáveis, sem pontos de morte celular aparente, diferentemente do tratamento sem o AV, como é mostrado na figura 27 a seguir.

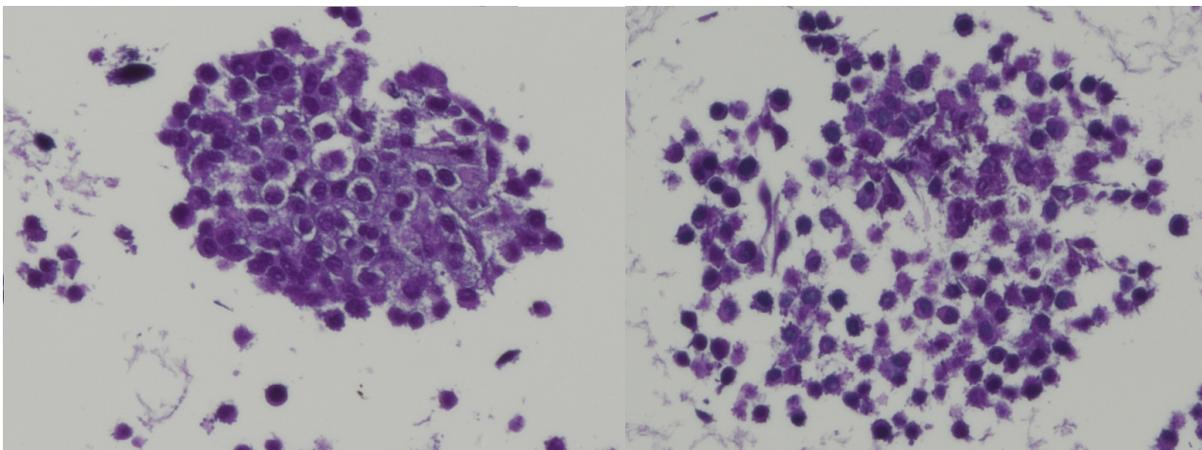
Figura 27 - Viabilidade dos microtecidos da linhagem L929 na densidade de $2,5 \times 10^4$ células/chip através do método de coloração diferencial por Laranja de Acridina e Brometo de Etídio quando tratados por 24h com 12,5 $\mu\text{g/mL}$ (esquerda) e 25 $\mu\text{g/mL}$ (direita) do veneno total de *B. erythromelas* na presença do soro antibotrópico na proporção de 5:1 de antiveneno para veneno. Os tratamentos foram realizados no sétimo dia de cultivo dos microtecidos. As células viáveis são coradas pela laranja de acridina e apresentam fluorescência de cor verde, enquanto células apoptóticas são coradas pelo brometo de etídio e apresentam fluorescência de cor vermelho/laranja



5.9 Análises histológicas e histoquímicas dos microtecidos da linhagem L929 tratadas com o veneno de *B. erythromelas* e seu antiveneno.

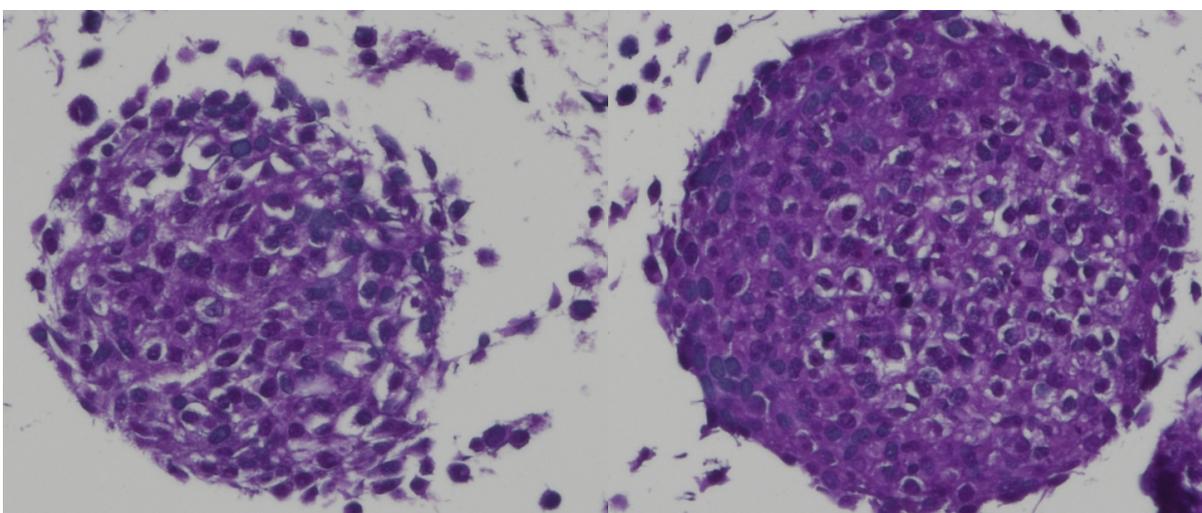
As análises histológicas com hematoxilina/eosina, que tinham por objetivo mostrar integridade dos microtecidos quando tratados com o veneno total de *B. erythromelas* na presença ou não do antiveneno, mostraram que, como relatado nas análises morfométricas, os microtecidos tratados com o veneno tiveram sua estrutura comprometida. Os microtecidos tratados com o veneno na concentração de 25 $\mu\text{g/mL}$ mostram um perfil de desagregação dos esferóides, comprometendo sua estrutura e apresentando uma soltura das células, como mostrado na figura 28, a seguir.

Figura 28 - Histologia dos microtecidos de fibroblastos da linhagem L929 tratados com o veneno total *Bothros erythromelas* nas concentrações 12,5 µg/mL (esquerda) e 25 µg/mL (direita), quando corados com hematoxilina e eosina. As imagens mostram uma estrutura comprometida, além de uma desagregação dos microtecidos e, conseqüentemente, soltura das células.



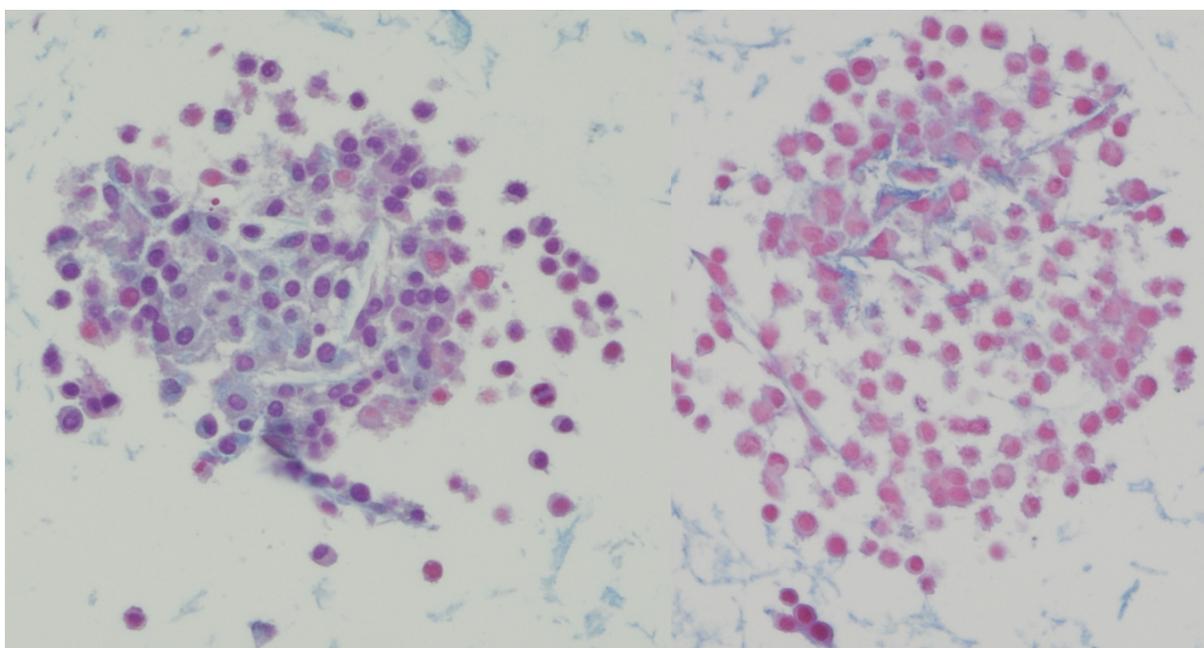
Por outro lado, as células tratadas com o veneno e com o antiveneno não tiveram sua integridade comprometida, não apresentando desagregação dos esferóides e soltura das células em nenhuma das concentrações do veneno, como mostrado na figura 29, a seguir.

Figura 29 - Histologia dos microtecidos de fibroblastos da linhagem L929 tratados com o veneno total *Bothrops erythromelas* nas concentrações 12,5 µg/mL (esquerda) e 25 µg/mL (direita) e com antiveneno na proporção de 5:1 de antiveneno pra veneno, quando corados com hematoxilina e eosina. Os resultados mostraram que o antiveneno inibiu a ação do veneno, impedindo a desagregação dos microtecidos causada pelo veneno.



As imagens dos ensaios histoquímicos obtidas pela coloração com azul de alcian mostraram uma quantidade pequena de proteoglicanos ácidos nos esferóides gerados a partir de fibroblastos, como mencionado anteriormente. No caso dos microtecidos tratados com o veneno total de *Bothrops erythromelas*, a quantidade de proteoglicanos não foi alterada quando comparada aos controles no tratamento com o veneno na concentração de 12,5 µg/mL. No tratamento com 25 µg/mL, por outro lado, a desagregação dos microtecidos foi bastante evidente, e a ausência de marcação positiva para o corante também, indicativo de que a matriz extracelular, que já não estava mais presente, tivesse papel central na agregação das células, como mostra a figura 30, a seguir.

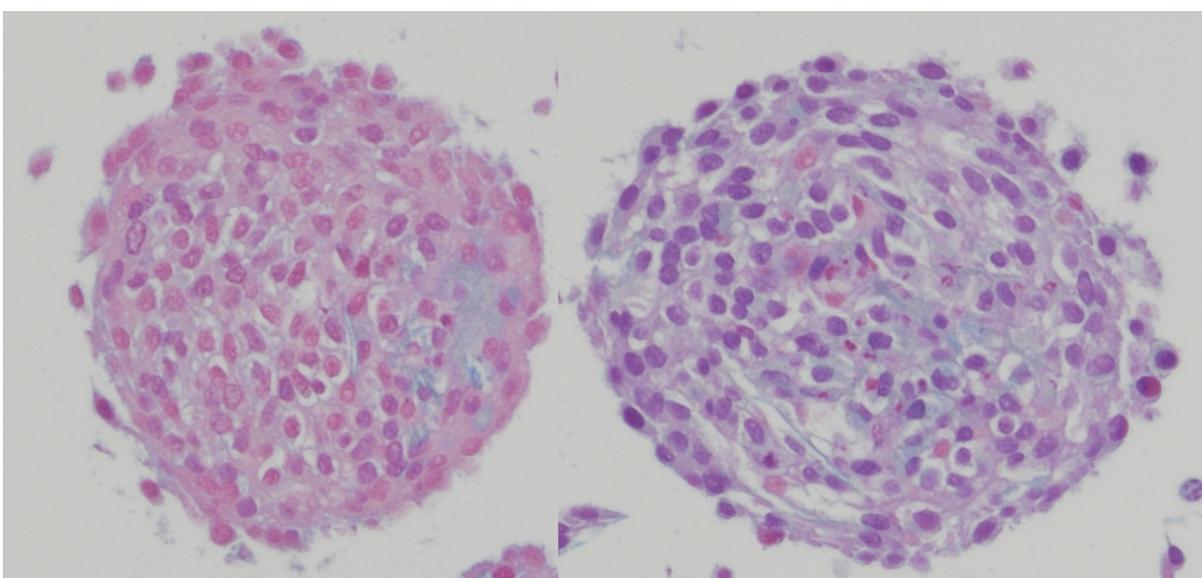
Figura 30 - Histoquímica dos microtecidos de fibroblastos da linhagem L929 quando tratadas com o veneno total de *B. erythromelas* nas concentrações de 12,5 µg/mL (esquerda) e 25 µg/mL (direita) quando corados com o corante Azul de Alcian. O corante Azul de Alcian marca componentes ácidos com a cor azul. As imagens mostram uma coloração azul entre as células do microtecido tratado com o veneno na concentração de 12,5 µg/mL, indicando uma marcação positiva para a presença de proteoglicanos ácidos, componentes da matriz extracelular do tecido conjuntivo. O microtecido tratado com o veneno na concentração de 25 µg/mL teve uma marcação ausente e as células desagregadas.



Os grupos tratados com o antiveneno, por outro lado, manteve sua integridade, reforçando a hipótese de que esses componentes da matriz extracelular

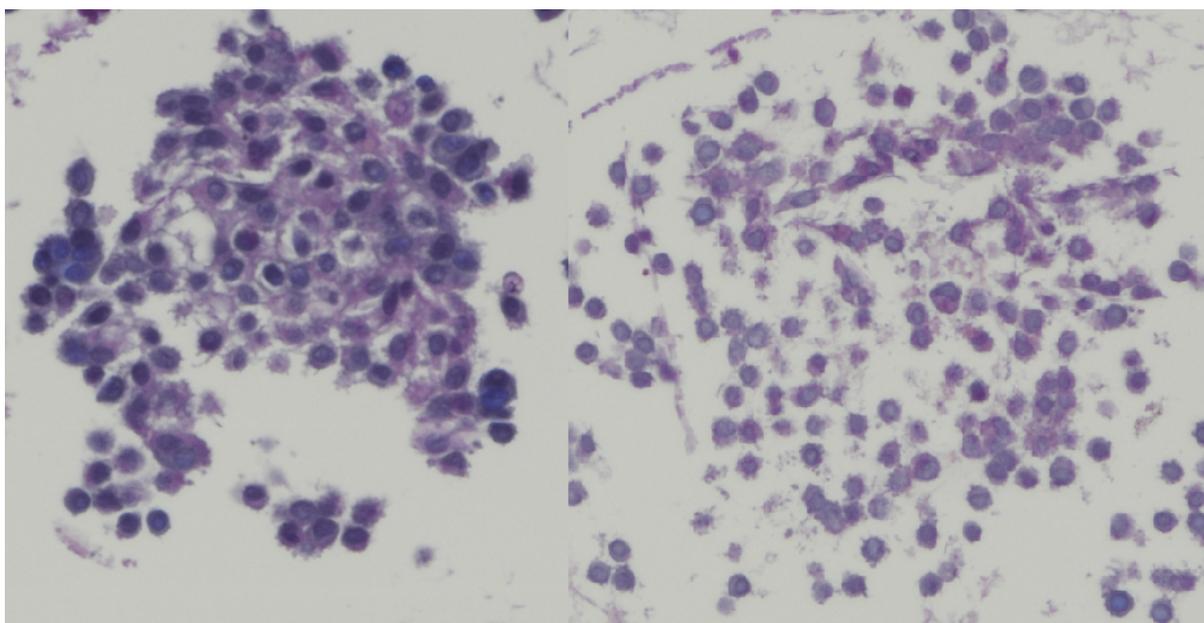
têm papel fundamental na agregação dos microtecidos. A figura 31, a seguir, mostra esses resultados.

Figura 31 - Histoquímica dos microtecidos de fibroblastos da linhagem L929 quando tratados com o veneno total de *B. erythromelas* nas concentrações de 12,5 µg/mL (esquerda) e 25 µg/mL (direita) e com antiveneno na proporção de 5:1 de antiveneno para veneno quando corados com o corante Azul de Alcian. O corante Azul de Alcian marca componentes ácidos com a cor azul. As imagens mostram uma coloração azulada entre as células dos microtecidos de ambos os tratamentos, indicando marcação positiva para proteoglicanos ácidos e sugerindo que estes têm papel importante na agregação das células.



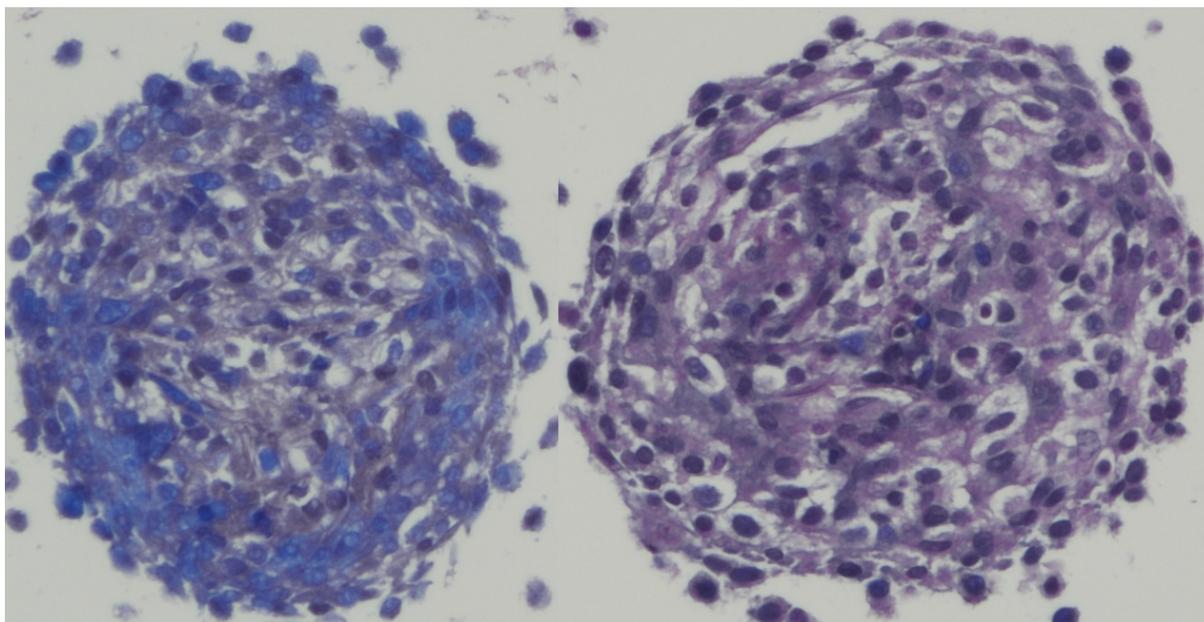
Assim como anteriormente relatado, as análises histoquímicas realizadas com o corante picosirius red mostraram ausência de colágeno na estrutura dos esferóides em todos os dias avaliados, não havendo marcação positiva em nenhum dos tratamentos, apresentando apenas os perfis de desagregação das células mostrados anteriormente. A marcação positiva permite verificar a presença ou não de fibras de colágeno, que são marcadas em uma cor vermelha. A figura 32 a seguir mostra a ausência de fibras de colágeno nos microtecidos de fibroblastos tratados com o veneno total de *Bothrops erythromelas* nas concentrações de 12,5 µg/mL e 25 µg/mL.

Figura 32 - Histoquímica dos microtecidos de fibroblastos da linhagem L929 tratados com o veneno total de *B. erythromelas* nas concentrações de 12,5 µg/mL (esquerda) e 25 µg/mL (direita) quando marcados com o corante Picrosirius. O corante Picrosirius marca fibras de colágeno com uma cor vermelha. Desta forma, os microtecidos de fibroblastos L929 não produziram colágeno, pois não tiveram marcação positiva em nenhum dos tratamentos.



Por fim, os microtecidos tratados com o veneno e com o antiveneno também não apresentaram marcação positiva para colágeno, como mostra a figura 33 a seguir.

Figura 33 - Histoquímica dos microtecidos de fibroblastos da linhagem L929 tratados com o veneno total de *B. erythromelas* nas concentrações de 12,5 µg/mL (esquerda) e 25 µg/mL (direita) e com antiveneno na proporção de 5:1 de antiveneno para veneno quando marcados com o corante Picrosirius. O corante Picrosirius marca fibras de colágeno com uma cor vermelha. Desta forma, os microtecidos de fibroblastos L929 não produziram colágeno, pois não tiveram marcação positiva em nenhum dos tratamentos.



6 DISCUSSÃO

O cultivo tridimensional de células vem ganhando cada vez mais seu espaço como uma alternativa mais robusta em relação às metodologias de cultivo tradicionais nas experimentações *in vitro*. Seu amplo leque de aplicações, desde utilização em testes farmacológicos e toxicológicos até mesmo na sua pretensão ao reparo tecidual, com as técnicas mais avançadas de engenharia tecidual, faz com que diversos modelos com diversas finalidades venham surgindo ao longo dos últimos anos.

Através do presente trabalho foi mostrado que as linhagens de fibroblastos MRC-5 e L929 crescem em esferóides como microtecidos, porém, a linhagem L929 possui melhores parâmetros de crescimento. As análises morfológicas mostraram que o crescimento aconteceu de forma linear, através do diâmetro de Feret, que mostrou aumento dos microtecidos em função do tempo de cultivo. Além disso, também se mostraram como estruturas regulares, uma vez que as análises de solidez mantiveram-se sempre próximas a 1, o que significa estabilidade em sua estrutura. Por fim, também apresentaram boa circularidade, o que significa que seu perímetro se aproxima de uma esfera. Esses resultados foram melhores na linhagem L929, pois a linhagem MRC-5 mostrou diferenças no diâmetro, estruturas pouco regulares e circularidade menores.

Uma das explicações possíveis para essa diferença de resultado é que, para a linhagem MRC-5, a recomendação é de que não se deve ser cultivada até a confluência, tendo uma densidade de subcultivo recomendada pela *American Type Culture Collection*, a ATCC, de $1,0 \times 10^4$ a $6,0 \times 10^4$ células viáveis/cm² não havendo essa restrição para a linhagem L929 que pode ser subcultivada ao atingir a confluência (ATCC, 2023).

Os microtecidos da linhagem L929 estavam viáveis nos dias 5, 7 e 10 de cultivo. As análises mostraram, porém, que no quinto dia de crescimento, os microtecidos ainda não estavam muito bem formados, fazendo com que os melhores dias para uso em análises fossem entre os dias 7 e 10 de cultivo, idealmente acabando no décimo dia. Isso pois, a partir do décimo dia, os microtecidos apresentaram um crescimento exacerbado, chegando muitas vezes a extravasar os limites dos micropoços nos quais estavam sendo cultivados.

Existem diversos estudos que tem por objetivo produzir microtecidos que sirvam como base para uma engenharia tecidual de sucesso. Porém, devido a alguns problemas recorrentes como a dificuldade de isolar as células do tecido alvo, problemas no cultivo dessas células, crescimento insuficiente ou inadequado quando cultivadas *in vitro* e problemas de desdiferenciação celular acabam fazendo com que o uso de células mesenquimais surjam como alternativa na produção de microtecidos (Al Madhoun et al. 2016; Potier et al. 2016).

Em um trabalho realizado por Madhoun e colaboradores (2016), por exemplo, teve por objetivo o desenvolvimento de um protocolo de diferenciação de células mesenquimais em uma linhagem de endoderme. Utilizando placas de cultivo específicas para a formação de esferóides, as células mesenquimais de cordão umbilical humano foram cultivadas e as condições de cultivo foram definidas de modo que essas células viessem a se diferenciar em células de endoderme, que tem papel importante no desenvolvimento de órgãos como pâncreas e fígado, podendo ser, portanto, uma fonte de referência para futuros estudos de engenharia tecidual.

A utilização de cultivos primários, isto é, de células recém isoladas de algum organismo, para a produção desses microtecidos também é majoritária nos estudos. Em um trabalho realizado por Garzón e colaboradores (2012), foi indicado que, em condrócitos isolados do tecido retrodiscal humano para um cultivo primário, as células cultivadas após 6 ou mais passagens não apresentaram características consideradas ideais para estudos de engenharia tecidual, seja referente a sua viabilidade ou capacidade de síntese de componentes majoritários da matriz extracelular, corroborando com a afirmação que alguns tipos celulares podem trazer problemas quando utilizadas na engenharia tecidual.

Os fibroblastos são células do tecido conjuntivo, onde tem um papel fundamental na manutenção da integridade e função desse tecido através da produção de matriz extracelular, que é rica em colágeno, além de elastina, fibronectina, glicosaminoglicanas e proteases, responsáveis pelo desbridamento e remodelamento fisiológicos da célula. Esse conjunto de características faz com que os fibroblastos sejam as principais células envolvidas em processos de cicatrização (PAGNANO *et al*, 2008).

Como citado anteriormente, para o presente estudo, duas linhagens celulares foram selecionadas para que a padronização do cultivo tridimensional fosse realizada. Ambas linhagens de fibroblastos, a linhagem MRC-5, derivada de células humanas, e a linhagem L929, derivada de células murinas, foram as selecionadas. O método escolhido foi o de cultivo em chips de agarose, ou microplacas de cultivo de agarose, que funcionam como âncora para que as células possam crescer sem aderência ao fundo ou as paredes dos poços, fazendo com que interajam entre si.

Os microtecidos obtidos da linhagem L929 mostraram bons resultados nas análises histológicas, histoquímicas e imuno-histoquímicas. A coloração por eosina e hematoxilina mostrou uma boa estrutura e distribuição das células. A coloração por alcian blue mostrou uma quantidade pequena de proteoglicanos ácidos, componentes da matriz extracelular de tecido conjuntivo. A imunohistoquímica com Ki-67 mostrou que as células dos microtecidos apresentaram diferentes padrões de multiplicação a depender do tempo de cultivo, e, por fim, a coloração com picrossirius red apontou escassez de colágeno nos microtecidos.

Dentre as principais diferenças entre os cultivos tradicionais em monocamada e os cultivos tridimensionais, podemos citar o formato das células, a proliferação celular, as diferenças de exposição ao meio no qual estas células estão sendo cultivadas, o custo de cultivo, dentre outras (Jensen e Teng, 2020).

Quando cultivadas em monocamada, as células são alongadas e achatadas, além de crescerem na superfície plana, aderidas aos poços das placas de cultura. Quando cultivadas tridimensionalmente, as células são capazes de preservar seu formato natural e podem crescer em múltiplas camadas. O presente estudo mostrou essas diferenças no crescimento, as células cultivadas em monocamada apresentam um formato característico “pontudo”, enquanto que as células cultivadas em microtecido são, em boa parte, arredondadas.

Outra diferença de características que pode ser observada diz respeito à proliferação celular. É sabido que as células em cultivo tradicional se proliferam de maneira uniforme, o experimento de imunohistoquímica com o marcador Ki-67 mostrou que, no cultivo tridimensional, com o passar dos dias, as células do centro dos microtecidos diminuíram sua proliferação, que se manteve através das células

localizadas nas bordas. Essa diferença pode ser explicada com a outra diferença entre as formas de cultivo: a distribuição dos nutrientes no cultivo.

As células em monocamada se dispõem de tal maneira que todas elas têm contato direto com o meio de cultivo no qual estão inseridas, tendo, portanto, acesso aos nutrientes que compõem esse meio. Diferente do cultivo em monocamada, no cultivo tridimensional as células das camadas mais externas têm um contato direto com o meio enquanto que as células das camadas mais internas tem um acesso mais limitado ao meio de cultura, o que pode acabar resultando em processos metabólicos diferentes nessas diferentes camadas. As células mais externas, portanto, têm essa capacidade proliferativa maior em comparação com as células mais internas.

Por fim, quanto ao custo de cultivo, como citado anteriormente, existem diferentes formas de cultivo tridimensional, cada uma com suas características e insumos necessários, alguns de maior custo do que outros. A técnica utilizada, a de cultivo em chips de agarose, apesar de apresentar um custo maior que o cultivo tradicional, ainda apresenta um custo relativamente baixo quando comparada a outras técnicas. No caso do cultivo em chips de agarose, os gastos adicionais foram com os moldes usados na produção dos chips, moldes estes que podem ser reutilizados, e com a agarose utilizada. Ademais, os custos com meio de cultura e placas de cultivo são praticamente os mesmos do cultivo em monocamada.

Estudo realizado por Durand-Herrera e colaboradores (2018) mostrou que o cultivo tridimensional primário de fibroblastos humanos foi capaz de se manter viável até o vigésimo oitavo dia de cultivo. A formação dos esferóides se deu já no primeiro dia de cultivo, e se manteve estável até o último dia de análises, sendo este o 28º dia. Ao longo do cultivo também foi possível observar que os esferóides formados não apresentaram um crescimento ao longo do tempo. Uma vez bem estabelecidos, permaneceram praticamente do mesmo tamanho desde o primeiro até o último dia de análises.

Quando comparados com os resultados obtidos através do cultivo tridimensional da linhagem L929, os resultados de Durand-Herrera foram diferentes. A linhagem L929 formou esferóide em torno do quinto dia, mas ainda assim não muito bem definida em formato. Sendo essa definição alcançada a partir do sétimo dia de cultivo. Além disso, os esferóides apresentaram crescimento durante todo o período de cultivo, inclusive chegando a ultrapassar os limites dos micropoços do

chip de agarose a partir do décimo quinto dia de cultivo, apresentando, portanto, um crescimento linear, em contraste ao observado no estudo citado anteriormente.

Outro ponto importante diz respeito à formação de matriz extracelular. No estudo de Durand-Herrera houve forte presença de proteoglicanos, marcados por Alcian Blue. Já os esferóides da linhagem L929 apresentaram poucas regiões marcadas. O mesmo para a marcação de colágeno, pelo corante picosirius red. Os esferóides do cultivo primário de fibroblastos mostraram a presença de colágeno, enquanto os esferóides da L929 não apresentaram essa marcação.

Como citado anteriormente, os tipos celulares e até mesmo a passagem que estas células se encontram tem forte influência no processo de desenvolvimento desses esferóides. A linhagem L929 é uma linhagem imortalizada e que tem suas origens na década de 50, sendo cultivada até hoje. Se mesmo em um cultivo primário, as passagens das células influenciam, certamente o fato de um tipo celular ser uma linhagem imortalizada irá ter influência nos parâmetros avaliados na formação dos esferóides. Sendo isso, portanto, uma provável causa e justificativa para essas diferenças no crescimento dos esferóides, que não foi linear quando em cultivo primário, mas foi linear e, inclusive cresceu de maneira exagerada, quando as células em questão vinham de uma linhagem já estabelecida. Além das diferenças também na formação da matriz extracelular, que apresentou poucos proteoglicanos e não apresentou fibras de colágeno típicas de MEC de fibroblastos.

As análises farmacológicas com o veneno total de *Bothrops erythromelas* mostraram que o veneno não apresentou citotoxicidade frente às células da linhagem L929 quando cultivadas em monocamada ou tridimensionalmente. Porém, foram capazes de alterar visivelmente a morfologia das células em ambas as formas de cultivo. As células cultivadas em monocamada perderam sua capacidade de adesão e formato típico das células, enquanto que os microtecidos apresentaram uma soltura das células de sua estrutura, tornando-as mais instáveis.

Um estudo realizado por Bernardes-Oliveira e colaboradores (2016) testou os efeitos citotóxicos dos venenos totais de *Bothrops jararaca* e *B. erythromelas* frente a três linhagens celulares, HeLa e SiHa, ambas linhagens de carcinomas, além da linhagem de células normais 3T3, uma linhagem de fibroblastos embrionários de camundongos. Seus resultados mostraram que, para as células cancerosas, ambos os venenos foram citotóxicos, por outro lado, porém,

nenhum dos venenos foi citotóxico na linhagem 3T3. O autor cita uma aparente seletividade para células de carcinoma e faz uma avaliação do potencial antitumoral dos venenos de ambas as serpentes.

Além disso, também é relatado pelos autores que as células apresentaram uma alteração em sua morfologia, indicativo de estresse e morte celular. Essas análises, porém, só foram feitas utilizando as linhagens de carcinoma, não sendo possível saber se as células da linhagem normal, apesar de não apresentarem morte celular quando tratadas com os venenos, apresentaram também essa perda de formato celular característico de um cultivo em condições normais.

Os resultados corroboram, parcialmente, com os resultados obtidos no presente trabalho, onde as células da linhagem L929 não apresentaram morte celular aparente quando tratadas com o veneno total de *B. erythromelas*, contudo tiveram sua morfologia alterada, bem como sua capacidade de adesão no fundo da placa. Ambos os estudos foram realizados utilizando fibroblastos, de diferentes linhagens. Os tempos e concentrações utilizados por Bernardes-Oliveira foram similares. 12,5 µg/mL e 25 µg/mL e 24h, adicionando também a concentração 50 µg/mL de veneno total e 48h de tratamento. Mesmo nas maiores concentrações, os venenos de *B. jararaca* e *B. erythromelas* não apresentaram citotoxicidade frente à linhagem de células normais. Em relação a morfologia, como dito anteriormente, o estudo carece de dados, apresentando somente informações relativas a perda de morfologia das linhagens de carcinoma.

Analisando os dados de forma conjunta, as células cultivadas em monocamada e as células cultivadas tridimensionalmente apresentaram características semelhantes quando tratadas com o veneno total de *Bothrops erythromelas*. Em ambos os cultivos, a viabilidade das células foi mantida apesar de uma notável mudança morfológica e perda de capacidade de adesão. Desta forma, os resultados são portanto compatíveis e similares nos dois modelos.

Como já colocado anteriormente, os modelos tridimensionais tem como proposta servirem como uma alternativa mais robusta quando comparados com os modelos *in vitro* tradicionais, ou seja, os cultivados em monocamada. Desta forma, os resultados obtidos especificamente pelo conjunto de tratamentos realizado neste trabalho devem ser aperfeiçoados para que se possa, de fato, chegar a uma conclusão sobre as diferenças entre os dois modelos.

A utilização de outros testes e experimentos que avaliem outros pontos de vista do envenenamento , que não somente a citotoxicidade, surgem como uma maneira de aperfeiçoar o modelo, isto tendo em vista que no modelo em monocamada o veneno total de *B. erythromelas* não foi citotóxico, sendo esperado e mostrado que no modelo tridimensional também não fosse verificada essa citotoxicidade. Experimentos de estresse celular, liberação de citocinas inflamatórias e análises proteômicas, por exemplo, podem ser utilizados com esses objetivos de elucidar melhor as diferenças nos testes entre os dois tipos de cultivo celular.

O presente trabalho abre um leque de possibilidades de melhorias para que sua utilização possa ser ampliada, desde a utilização de fatores como adição de colágeno, tendo em vista que as células utilizadas não foram capazes de produzi-lo por conta própria, até o co-cultivo com diferentes tipos celulares, como queratinócitos, para quem sabe mimetizar de forma eficiente um microambiente da pele.

7 CONCLUSÕES

Os resultados do presente trabalho mostraram que as linhagens celulares de fibroblastos murino - Linhagem L929 - e humano - Linhagem MRC5 - são capazes de crescer em microtecidos pela técnica de cultivo tridimensional de cultura em chips de agarose. Além disso, as células da linhagem L929, quando cultivadas tridimensionalmente, mostraram-se viáveis até o décimo dia de cultura, crescendo de forma regular porém com uma modesta expressão de matriz extracelular.

Ademais, quando tratadas com o veneno as células L929 mostraram uma mudança morfológica tanto no cultivo tradicional em monocamada quanto no cultivo tridimensional em microtecidos. As células cultivadas em monocamada perderam sua capacidade de adesão enquanto que as células cultivadas tridimensionalmente mostraram-se mais sensíveis à perda do formato de esferóide. O tratamento com anti veneno reverteu esses efeitos.

REFERÊNCIAS

ACHILLI T.M., MEYER J., MORGAN J.R. Advances in the formation, use and understanding of multi-cellular spheroids. **Expert opinion on biological therapy**. 2012;12(10):1347-60

ARAÚJO, A. L., et al. *Bothrops lanceolatus* (Fer de lance) venom induces oedema formation and increases vascular permeability in the mouse hind paw. **Toxicon**, v. 38, p. 209–221, 2000.

BARBOSA, A. M., et al. Pharmacological characterization of mouse hind paw oedema induced by *Bothrops insularis* (jararaca ilhoa) snake venom. **Toxicon**, v. 42, p. 515–523, 2003.

BARRAVIERA, B. Estudo clínico dos acidentes ofídicos. **JBM**, v. 65, n. 4, p.209-250,1993.

BARROS, V. A.; ROJAS, C. A.; ALMEIDA-SANTOS, S. M. Is rainfall seasonality important for reproductive strategies in viviparous Neotropical pit vipers? A case study with *Bothrops leucurus* from the Brazilian Atlantic Forest. **The Herpetological Journal**, v. 24, n. 2, p. 69-77, 2014.

BJARNASON, J. B.; FOX, J. W. Hemorrhagic metalloproteinase from snake venoms. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 62, n. 3, p. 325-372, 1994.

BOILARD, Eric et al. A novel anti-inflammatory role for secretory phospholipase A2 in immune complex-mediated arthritis. **EMBO molecular medicine**, v. 2, n. 5, p. 172-187, 2010.

BRASIL. Lei 11794 de 08 de Outubro de 2008. Procedimentos para uso científico dos animais. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2007-2010/2008/lei/l11794.htm> Acesso em 5 de julho de 2022.

CALVETE, J. J. *et al.* Snake venomics and antivenomics of *Bothrops colombiensis*, a medically important pitviper of the *Bothrops atrox-asper* complex endemic to Venezuela: Contributing to its taxonomy and snakebite management. **J. Proteomics.**, v.72, p.227-40, 2009.

CHEN, Shengyong; ZHAO, Mingzhu; WU, Guang; et al. Recent Advances in Morphological Cell Image Analysis. **Computational and Mathematical Methods in Medicine**, v. 2012, 2012.

DEAN D.M., NAPOLITANO A.P., YOUSSEF J., MORGAN J.R. Rods, tori, and honeycombs: the directed self-assembly of microtissues with prescribed microscale geometries. **FASEB jornal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**. 2007;21(14):4005-12.

DIAS DA SILVA, W. et al. Crossreactivity of horse monovalent antivenoms to venoms of ten species of *Bothrops* species. **Memórias do Instituto Butantan**, v. 51, p. 153-168, 1989.

DOKE, Sonali K.; DHAWALE, Shashikant C. Alternatives to animal testing: A review. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 23, n. 3, p. 223-229, 2015.

DOLEY, R, KINI, R. M. Protein complexes in snake venom. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 66, n. 17, p. 2851-2871, 2009.

DURAND-HERRERA, D. et al. Wharton's jelly-derived mesenchymal cells as a new source for the generation of microtissues for tissue engineering applications. **Histochemistry and Cell Biology**, v. 150, p. 379-393, 2018.

EDMONDSON R, BROGLIE JJ, ADCOCK AF, YANG L. Three-dimensional cell culture systems and their applications in drug discovery and cellbased biosensors. **Assay and drug development technologies**. 2014;12(4):207-18.

EPHRUSSI, B. "Chemistry of eye color hormones of *Drosophila*". **Q.Rev.Biol.** 17: 327-338. 1942.

ESPINO-SOLIS, G. P.; RIANO-UMBARILA, L.; BECERRIL, B.; POSSANI, L. D. Antidotes against venomous animals: state of the art and perspectives. **Journal of Proteomics**, v. 72, n. 2, p. 183-199, 2009.

FENNEMA E., RIVRON N., ROUWKEMA J., VAN BLITTERSWIJK C., DE BOER J. Spheroid culture as a tool for creating 3D complex tissues. **Trends in biotechnology**. 2013;31(2):108-15.

FERNÁNDEZ, María Laura et al. Intravascular hemolysis induced by phospholipases A2 from the venom of the Eastern coral snake, *Micrurus fulvius*: Functional profiles of hemolytic and non-hemolytic isoforms. **Toxicology Letters**, v. 286, p. 39-47, 2018.

GILMAN, G. As bases farmacológicas da terapêutica, Rio de Janeiro, Editor: McGraw Hill, 1996.

GONÇALVES, L. R. C.; MARIANO, M. Local haemorrhage induced by *Bothrops jararaca* venom: relationship to neurogenic inflammation. **Mediators Inflamm.** v. 9, p. 101–107, 2000.

GRISOTTO, L. S.; MENDES, G. E.; CASTRO, I.; BAPTISTA, M. A.; ALVES, V. A.; YU, L.; BURDMANN, E. A.. Mechanisms of bee venom-induced acute renal failure. **Toxicon**, v.48, n°1, p.44-54, 2006.

GUTIERRÉZ JM, LOMONTE B. Local tissue damage by *Bothrops* snake venoms: a review **Mem. Inst. Butantan**. 1989; 51:211-223.

GUTIERREZ, J.M.; LOMONTE, B. Local pathological effects induced by Bothrops snake venom. **Memórias do Instituto Butantan**, v.33, p. 1405-1474, 1995.

HODGKIN, A.L.; Huxley, A. F. "A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve". **J.- Physiol.** 117: 500-544. 1952

HOROBIN, R.W. How Romanowsky stains work and why they remain valuable — including a proposed universal Romanowsky staining mechanism and a rational troubleshooting scheme. **Biotechnic & Histochemistry**, v. 86, n. 1, p. 36–51, 2011.

Instituto Butantan .2023. Disponível em:

<<https://butantan.gov.br/assets/arquivos/soros-e-vacinas/soros/Soro%20antibotrópico.pdf>>. Acesso em 02/03/2023

IVANOV, Delyan P. et al. Multiplexing spheroid volume, resazurin and acid phosphatase viability assays for high-throughput screening of tumour spheroids and stem cell neurospheres. **PloS one**, v. 9, n. 8, p. e103817, 2014.

JORGE, M. T.; RIBEIRO, L. A. Acidentes por serpentes peçonhentas do Brasil. *Rev. Assoc. Med. Brasil.*, v. 36, n. 2, p. 66-77, 1990.

KAMIGUTI, A. S.; HAY, C. R.; ZUZEL, M. Inhibition of collagen-induced platelet aggregation as the result of cleavage of alpha 2 beta 1-integrin by the snake venom metalloproteinase jararhagin. **Biochemical Journal**, v. 320 (Pt 2), p. 635-641, 1996b

KOH, D. C. I.; ARMUGAN, A.; JEYASEELAN, K. Snake venom components and their applications in biomedicine. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 63, n. 24, p.3030-3041, 2006.

LAFNOUNE, Ayoub et al. Anti-cancer effect of Moroccan Cobra *Naja Haje* venom and its fractions against hepatocellular carcinoma in 3D cell culture. **Toxins**, v. 13, n. 6, p. 402, 2021.

LANGER R., VACANTI J.P. Tissue engineering. **Science**. 1993;260(5110):920-6.

LIRA-DA-SILVA, R. M; MISE, Y. F.; CASAIS--ESILVA L. L.; ULLOA J.; HAMDAN B.; Brazil, T. K. SERPENTES DE IMPORTANCIA MÉDICA DO NORDESTE DO BRASIL. **Gazeta Médica da Bahia**, v. 79, p.7-20, 2009.

MACKESSY, S.P.; BAXTER, L. M. Bioweapons synthesis and storage: The venom gland of front-fanged snakes. **Zoologischer Anzeiger**, v. 245, n. 3-4, p. 147-159, 2006.

MARKLAND, F. S. Snake venoms and the hemostatic system. **Toxicon**, Oxford, v. 36, p. 1749-1800, 1998.

McGAHON, A. J.; MARTIN, S. M.; BISSONNETTE, R. P.; MAHBOUBI, A.; SHI, Y.; MOGIL, R. J.; NISHIOKA, W. K.; GREEN, D. R.; The end of the (cell) line: methods for the study of apoptosis in vitro. **Methods cell biol.** v. 46, p.153 – 185, 1995)

MELGAREJO, A. R. Serpentes peçonhentas do Brasil. In: CARDOSO, J. L.; FRANÇA, F. O. S.; WEN, F. H.; MÁLAQUE, C. M. S.; JR, V. H. Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica. 2 ed. São Paulo: SARVIER, 2009.

MORETTO, Lauro Domingos. Métodos alternativos ao uso de animais em pesquisa reconhecidos no Brasil / Lauro Domingos Moretto e Marco Antonio Stephano. São Paulo: Limay, 2019. 732 p.

NAPOLITANO A.P., CHAI P., DEAN D.M., MORGAN J.R. Dynamics of the self-assembly of complex cellular aggregates on micromolded nonadhesive hydrogels. **Tissue engineering**. 2007;13(8):2087-94.

PETERSON, Randall T. et al. Use of non-mammalian alternative models for neurotoxicological study. **Neurotoxicology**, v. 29, n. 3, p. 546-555, 2008.

PINHO, F. O.; VIDAL, E. C.; BURDIMANN, E. A. Atualização em Insuficiência Renal Aguda: insuficiência renal após acidente crotálico. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, 22(3), p.162-168, 2000.

RAI R., RAVAL R., KHANDEPARKER R.V., CHIDRAWAR S.K., KHAN A.A., GANPAT M.S. Tissue Engineering: Step Ahead in Maxillofacial Reconstruction. **Journal of international oral health: JIOH**. 2015;7(9):138-42.

RODRÍGUES-HERNÁNDEZ, C. O.; TORRES-GARCA, S. E.; OLVERASANDOVAL, C.; RAMÍREZ-CASTILLO, F. Y.; MURO, A. L.; AVELARGONZALEZ, F. J.; GUERRERO-BARRERA, A. L. Cellculture: History, developmentand prospects. **Int. J. Curr. Res. Aca.** Ver., 2, p. 188-200, 2014.

RÓLON, M.; VEJA, C.; ESCARIO, J.A.; GÓMEZ-BARRIO, A. Development of resazurin microtiter assay for drug sensibility testing of Trypanosoma cruzi epimastigotes. **Parasitol Res**, v.99, n.2, p.103-7, 2006.

ROWAN, Andrew N. Of mice, models, and men: A critical evaluation of animal research. **SUNY Press**, 1984.

Schattner M, Fritzen M, Ventura Jde S, de Albuquerque Modesto JC, Pozner RG, Moura-da-Silva AM, Chudzinski-Tavassi AM. The snake venom metalloproteases berythracivase and jararhagin activate endothelial cells. **Biol Chem**. V. 386 n.4 , p. 369-74, 2005.

SILVA, Cássio Prinholato da et al. Antitumor potential of the myotoxin BthTX-I from Bothrops jararacussu snake venom: evaluation of cell cycle alterations and death mechanisms induced in tumor cell lines. **Journal of Venomous Animals and Toxins**

SITPRIJA, V. Animal toxins and the kidney. **Nature Clinical Practice Nephrology**, v.4, n.11, p.616-627, 2008.

SQUAIELLA-BAPTISTÃO, C. C., et al. The history of antivenoms development: Beyond Calmette and Vital Brazil. **Toxicon**, v. 150, p. 86-95, 2018.

TREBIEN, H. A., CALIXTO, J. B. Pharmacological evaluation of rat paw oedema induced by Bothrops jararaca venom. **Agents and Actions** v. 26, p. 292-300, 1989.

UNESCO, Declaração Universal Dos Direitos Dos Animais, publicada originalmente em 1978. Disponível em:

<<https://www.crmv-ce.org.br/images/PDF/DECLARAO-UNIVERSAL-DOS-DIREITOS-DOS-ANIMAIS.pdf>> Acesso em 5 de julho de 2022.

WARRELL, David A. Treatment of bites by adders and exotic venomous snakes. **Bmj**, v. 331, n. 7527, p. 1244-1247, 2005.

WEISS, Leon Paul. Binding of Acid and Basic Dye at Varied pH by Blood and Bone Marrow Cells of Man With Observations of Blood and Bone Marrow Stained with Serra's Method for Arginine. **Blood**, v. 8, n. 3, p. 249–261, 1953.

YAO, T.; ASAYAMA, Y. Animal-cell culture media: History, characteristics, and current issues. *Reprod. Med. Biol.*, v. 16, p. 99-117, 2017.