

RAFAELLA DENEZINE DE OLIVEIRA

**ANÁLISE DO COMPORTAMENTO DE CÉLULAS TUMORAIS
PULMONARES A549 EM CONTATO COM *SCAFFOLD* BIOLÓGICO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Universidade Federal de Uberlândia, como requisito para
obtenção do grau de Licenciada em Ciências Biológicas.

Co-orientadora: Dra. Natássia Caroline Resende Corrêa

Orientador: Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho

UBERLÂNDIA

2019

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por sempre guiar meus caminhos.

Aos meus pais, Miriam e João, agradeço por todo amor, dedicação e por todas as vezes que mesmo sem compreender sobre o tema do trabalho, tentaram me auxiliar de alguma forma.

Aos meus familiares e amigos, obrigada por todo, amor, compreensão, por todos os momentos de alegria e imenso companheirismo.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho, obrigada pela oportunidade concedida e pelo aprendizado proporcionado.

A minha co-orientadora, Dra. Natássia Caroline Resende Corrêa, agradeço por todo carinho, paciência, convívio, por toda ajuda com os experimentos e por todos os conhecimentos compartilhados.

Ao Laboratório de Nanobiotecnologia e toda sua equipe, obrigada por terem me acolhido e possibilitado a realização deste trabalho.

RESUMO

A fim de investigar a associação de células com um *scaffold* de colágeno produzido por nosso grupo, ensaios de viabilidade foram realizados para avaliar o potencial citotóxico desse *scaffold* sobre células A549. Além disso, avaliou-se a morfologia dessas células em contato com o mesmo. Para atingir tal objetivo foi realizado o ensaio de viabilidade Alamar Blue e a análise morfológica foi realizada por meio de análise de micrografias. Nossos resultados mostraram que o *scaffold* não teve influência significativa sobre a viabilidade das células A549 com 24 e 72 horas de contato, e causou uma moderada diminuição de viabilidade com 48 horas de contato, quando comparado com seus controles. Alterações morfológicas relevantes foram observadas ao se comparar células cultivadas em monocamada e células cultivadas sobre o *scaffold*. Nossos resultados mostram que o *scaffold* de colágeno avaliado nesse estudo é biocompatível com células da linhagem A549 e que as alterações morfológicas observadas são condizentes com outros resultados da literatura.

Palavras-chave: *Scaffold* biológico, colágeno, viabilidade celular, análise morfológica, linhagem celular tumoral A549.

ABSTRACT

In order to investigate the association of cells with a collagen *scaffold* manufactured by our group, viability assays were done to evaluate the cytotoxic potential of the *scaffold* over A49 cells. In addition, we investigated the morphology of cells in contact with the *scaffold*. To reach our goals, the Alamar Blue viability assay was performed and cell morphology was assessed using micrographs. Our results show that cells did not have a significant difference of viability after 24 and 72 hours of contact with the *scaffold*. However, after 48 hours of contact, a moderate interference in the cell viability was noticed, compared to its control. Relevant morphological changes were observed on cells grown on *scaffolds*, compared to the ones cultivated on monolayer culture. Our results show that the collagen gel evaluated on this study is biocompatible with cell line A549 and that the morphologic differences found are consistent with those described on the literature.

Key words: Biological *scaffold*, collagen, cell viability, morphological analysis, tumoral cell line A549.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	6
1.1 <i>Scaffolds</i> e biomaterial	6
1.2 Cultivos biológicos	6
1.3 <i>Scaffolds</i> utilizados em estudos com células tumorais	7
1.4 Ensaio de viabilidade celular com Alamar Blue (Resazurina)	7
2. JUSTIFICATIVA	8
3. OBJETIVOS	8
3.1 Objetivo geral	8
3.2 Objetivos específicos	9
4. METODOLOGIA	9
4.1 Cultivo celular	10
4.2 Preparação da microplaca para o ensaio de viabilidade	10
4.3 Determinação de densidade celular	11
4.4 Ensaio de viabilidade celular utilizando Alamar Blue (Resazurina)	11
4.5 Análise estatística	12
5. RESULTADOS	13
6. DISCUSSÃO	15
7. CONCLUSÃO	17
8. PERSPECTIVAS	17
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	18

1. INTRODUÇÃO

1.1 *Scaffolds* e biomaterial

O *scaffold* é um suporte biocompatível que fornece as condições químicas, estruturais e morfológicas apropriadas para orientar o crescimento celular em direção ao objetivo desejado (GILPIN; YANG, 2017). Os *scaffolds* devem apresentar superfície e microestruturas que mimetizem a matriz extracelular de modo que seja compatível ao desenvolvimento das células que serão adicionadas, propiciando suporte mecânico e estrutural para o crescimento celular durante a formação do novo tecido.

Atualmente existe uma enorme diversidade de biomateriais que são divididos em quatro classes: materiais naturais (de origem animal ou vegetal), polímeros, cerâmicas (inclui vidros e carbono) e metais (RATNER, 2004).

De acordo com Brown e colaboradores (2005), as características mais importantes que influenciam na escolha de um biomaterial são a biocompatibilidade, as exigências físicas (resistência, dureza, densidade, flexibilidade, etc.) e as exigências químicas (toxicidade, reatividade e outros). A biocompatibilidade é relacionada ao fato de o biomaterial não apresentar citotoxicidade e ter baixa imunogenicidade ou ser desprovido desta, ou seja, o material não estimula respostas imunes desfavoráveis. Além disso, o biomaterial, em alguns casos, tem de ser biodegradável e reabsorvível pelo organismo, possibilitando a substituição do *scaffold* pelo tecido normal sem causar processos inflamatórios, que poderiam estimular uma resposta imune indesejada no organismo (KOH; ATALA, 2004).

Os *scaffolds* biológicos apresentam matrizes extracelulares naturais, que podem manter fatores de crescimento e elementos estruturais, como elastina, fibronectina e colágeno, fornecendo ambiente propício para adesão, proliferação e diferenciação celular (PARENTEAU-BAREIL et al., 2010).

1.2 Cultivos biológicos

Existem duas formas de cultivo celular, o cultivo bidimensional (2D) em monocamada e o cultivo tridimensional (3D). O cultivo de células em monocamada é amplamente utilizado para estudo de metabolismo de drogas e ensaios de toxicidade, no entanto, em certos tipos

celulares, essa forma de cultivo pode induzir mudanças morfológicas e funcionais (GODOY et al., 2013).

Já o cultivo 3D, em que as células se organizam dentro de um *scaffold*, em diferentes tipos de matrizes ou na forma de esferoides ou agregados, possibilita o melhoramento das funções dos tipos celulares envolvidos, podendo propiciar um ambiente mais semelhante ao natural e uma manutenção mais fidedigna da morfologia e das funções celulares (BRESLIN; O'DRISCOLL, 2013; SOUZA et al., 2018; WANG, D. et al., 2016).

1.3 *Scaffolds* utilizados em estudos com células tumorais

Modelos de cultivo 3D estão sendo utilizados para analisar o comportamento de células tumorais e trazem representações cada vez mais precisas e semelhantes com o microambiente tumoral encontrado *in vivo* (FISCHBACH et al., 2007; DHIMAN et al., 2005; HUTMACHER, 2010). Estas semelhanças são cruciais para estudos que objetivam desenvolver estratégias de tratamento e formas de diagnóstico precoce para o câncer (CEYLAN & BOLGEN, 2016; DUTTA & DUTTA, 2009; ELLIOTT & YUAN, 2010; GURSKI et al., 2010).

Dentre esses modelos de estudo com *scaffolds*, o mais predominante na literatura é uma membrana basal derivada de tumor de camundongo que é líquida em baixas temperaturas e se solidifica a 37°C, denominada de Matrigel (DEBNATH, J. et al., 2003; LEE, G.Y. et al., 2007). Contudo, estes experimentos também podem ser realizados em *scaffolds* sintéticos como o Alvetex da marca Reprocell (REPROCELL GLOBAL CORPORATE OFFICES, 2019), em *scaffolds* a base de quitosana e alginato (WANG, J. et al., 2016; MAHMOUDZADEH & MOHAMMADPOUR, 2016) e em *scaffolds* ricos em colágeno (JIA et al., 2018; CHEN et al., 2012).

1.4 Ensaio de viabilidade celular com Alamar Blue (Resazurina)

Alamar Blue, também conhecido como resazurina, é um indicador de oxirredução que é capaz de atravessar a membrana de células vivas e é utilizado em testes de viabilidade celular. A resazurina dissolvida em tampões fisiológicos forma uma solução de cor azul escuro. Células viáveis e com metabolismo ativo reduzem a resazurina a uma outra substância, a resorufina, que apresenta cor rosa e emite fluorescência. A grande vantagem

deste teste de viabilidade celular é que a resazurina não causa morte celular, possibilitando o uso das mesmas células em experimentos posteriores (RISS et al., 2016).

A quantidade de resorufina produzida é proporcional ao número de células viáveis, o que pode ser quantificado por meio de fluorescência ou por meio de absorbância. A quantificação de células por meio da fluorescência é mais utilizada pois apresenta maior sensibilidade do que a quantificação por meio da detecção de absorbância (RISS et al., 2016).

A solução contendo resazurina pode ser colocada diretamente sobre as células em cultivo e, para emitir um sinal de fluorescência adequado para leitura, deve ficar em incubação de 1 a 4 horas, variando de acordo com a atividade metabólica de cada tipo celular. Após o período de incubação o sobrenadante é recolhido e colocado em uma microplaca para leitura em um fluorímetro, utilizando luz com comprimento de onda de 560 nm para excitação e 590 nm na emissão (RISS et al., 2016).

2. JUSTIFICATIVA

Numerosos estudos têm demonstrado que o cultivo celular 3D em biomateriais pode promover desenvolvimento celular mais similar ao encontrado *in vivo* (EDMONDSON et al., 2014). Portanto, para investigar a adequabilidade desses materiais é necessário verificar quais tipos de interferência esses *scaffolds* biológicos poderiam ter na viabilidade e morfologia celular, por exemplo. Isso é relevante pois a ausência de citotoxicidade do material em si é importante para não influenciar nos estudos de comportamento das células tumorais. A fim de obter um material adequado para ser utilizado como *scaffold* para pesquisas de microambiente tumoral, nesse estudo células da linhagem A549 foram cultivadas em *scaffold* de gel rico em colágeno, a fim de avaliar a influência do mesmo sobre a viabilidade celular e morfologia das células supracitadas.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Analisar se o contato de células A549 com o *scaffold* biológico altera a viabilidade e a morfologia dessas células, e assim sugerir este *scaffold* como potencial modelo de estudo de microambiente tumoral.

3.2 Objetivos específicos

- Preparo dos *scaffolds* para semeadura;
- Cultivo das células A549 para semeadura e realização da semeadura dessas células no *scaffold*;
- Análise da viabilidade celular de células A549 semeadas no *scaffold* por meio do ensaio fluorimétrico Alamar blue.
- Análise morfológica de células A549 semeadas na superfície do *scaffold* biológico.

4. METODOLOGIA

Os *scaffolds* que foram utilizados neste estudo não podem ser descritos detalhadamente pois são desenvolvidos em parceria com empresa privada e, por isso, estão protegidos, uma vez que o processo de desenvolvimento desse material será objeto de depósito de patentes e/ou segredo industrial.

De forma resumida, o tecido bruto de origem animal foi obtido a partir de um material proveniente do descarte de frigorífico no estado de Minas Gerais, com autorização dessa empresa. Os materiais foram limpos e descelularizados em protocolo estabelecido no Laboratório de Nanobiotecnologia no Instituto de Biotecnologia da Universidade Federal de Uberlândia (Campus Umuarama, Uberlândia/MG - Brasil). Em seguida, o sucesso da descelularização foi confirmado através de quantificação de DNA por espectrofotometria, análise da integridade do material genético por eletroforese em gel de agarose e análise histológica por coloração com hematoxilina e eosina para avaliar a ausência de núcleos celulares. Em estudos posteriores verificou-se através de *dot blot* que esse material é rico em colágeno do tipo I e contém elastina e colágeno do tipo III (dados não mostrados).

Em seguida, o tecido descelularizado foi submetido a um processo de preparo de um gel rico em colágeno, aqui denominado pré-gel. De forma resumida, o tecido foi digerido com pepsina e, após digestão, centrifugado e o pH ajustado para condições fisiológicas. O pré-gel foi mantido resfriado para evitar a geleificação precoce. O processo de desenvolvimento desse pré-gel faz parte de uma patente em fase de depósito e, portanto, não pode ser divulgado.

4.1 Cultivo celular

Para realização deste estudo foram utilizadas células autenticadas da linhagem A549 (ATCC CCL-185). Estas células são aderentes e derivadas de células de carcinoma pulmonar humano.

As células A549 foram cultivadas até 70-80% de confluência em meio de cultivo DMEM/F-12 (Dulbecco Medium Eagle Modified: Nutrient Mixture F-12) (Gibco) com 10% de soro fetal bovino (SFB, Gibco) e solução antibiótica/antimicótica (Gibco), em estufa úmida, com 5% de CO₂, a 37 °C.

Para a manutenção da confluência celular, as células foram tripsinizadas periodicamente. Durante a tripsinização das células, todo o meio de cultura foi removido e as células foram lavadas com PBS (*Phosphat-Buffered Saline*, tampão fosfato salino, em português) 1X. Foi adicionada quantidade adequada de tripsina-EDTA 0,25% (Gibco) na garrafa, que, posteriormente, foi incubada na estufa, onde ficou em temperatura ideal para ação da enzima (37 °C) por 2-3 minutos.

Após este tempo, a tripsina foi neutralizada com meio de cultivo com 10% de SBF e as células foram transferidas para um tubo, que foi centrifugado a 2000 rpm (rotações por minuto), por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o pellet formado foi ressuspensionado em meio e utilizado para contagem, plaqueamento ou congelamento, de acordo com a necessidade.

4.2 Preparação da microplaca para o ensaio de viabilidade

Em uma microplaca de 96 poços foram adicionados 40-50 µl de pré-gel em alguns poços e posteriormente colocou-se a placa na estufa a 37°C para geleificação do pré-gel. Esse biomaterial em sua forma geleificada corresponde ao *scaffold* analisado nesse trabalho. Após 15 minutos de incubação foram adicionados 100 µl de solução antibiótica/antimicótica (Gibco) sob o gel recém-formado a fim de garantir a descontaminação do material e a placa foi colocada novamente na estufa para uma incubação mínima de 48 horas que, em outros experimentos, se mostrou eficaz para descontaminação (dados não mostrados).

4.3 Determinação de densidade celular

A contagem de células foi realizada antes do plaqueamento e, para incluir somente células viáveis, foi utilizado o azul de tripan. Para isto, recolheu-se uma amostra de célula em suspensão e diluiu-se com azul de tripan (0,4 %) em um tubo eppendorf com diluição de 1:1, tendo assim um fator de diluição (FD) de 2x. Após a homogeneização, 10 µl foram colocados na câmara de Neubauer, que foi observada ao microscópio. A determinação da densidade celular, considerando apenas células viáveis foi realizada por meio do método de exclusão de azul de tripan, a qual é definida pela seguinte equação:

$$densidade\ celular\ /ml = \frac{n^{\circ}\ de\ células\ viáveis}{n^{\circ}\ de\ quadrantes} \times FD \times 10^4$$

4.4 Ensaio de viabilidade celular utilizando Alamar Blue (Resazurina)

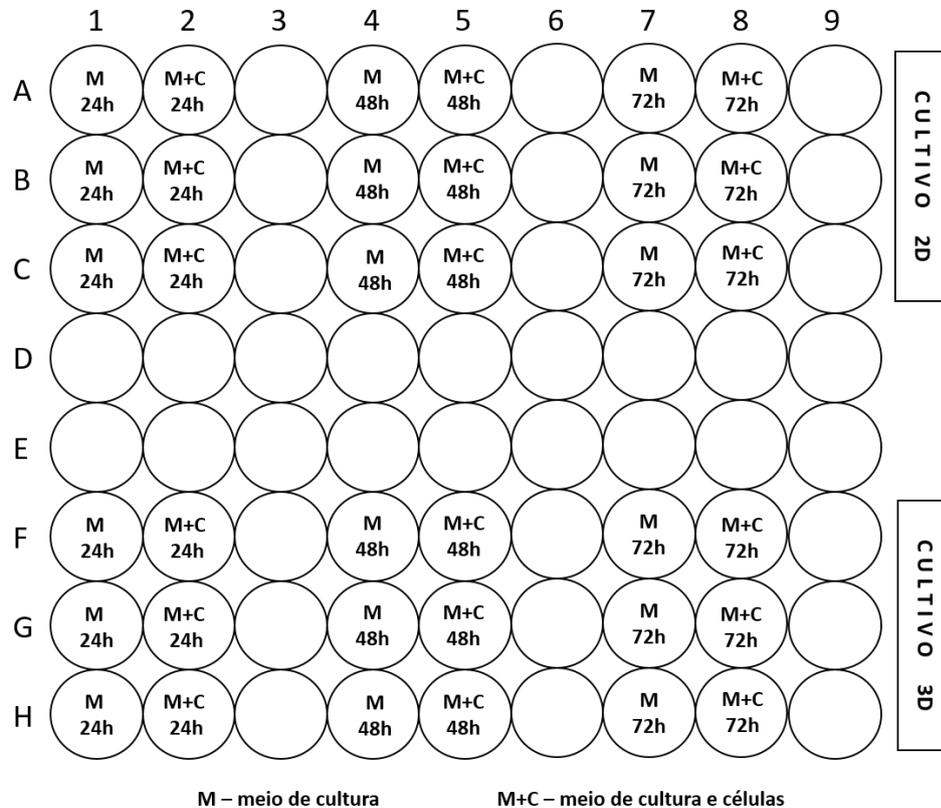
A verificação se o contato com o gel altera a viabilidade celular de células A549 foi feita de acordo com o protocolo do ensaio fluorimétrico com resazurina (RISS et al., 2016).

Para o preparo da solução de resazurina de alta pureza (Sigma) foi dissolvida em PBS 1X em uma concentração de 3 mM. Esta solução foi filtrada e esterilizada através de um filtro de 0,22 µm para um recipiente estéril e foi armazenada protegida da luz em temperatura de 4 °C.

As células em confluência de 70-80% foram tripsinizadas e contadas conforme descrito nos itens 4.1 e 4.3, em triplicata. Para esse experimento foram planejados dois grupos. No grupo controle, as células foram semeadas diretamente sobre a placa, em monocamada (cultivo 2D), em contato com o plástico da placa cultivo. De forma alternativa, no segundo grupo as células foram semeadas diretamente sobre o gel (cultivo 3D em *scaffold*).

Na placa previamente preparada de acordo com o item 4.2, a solução antibiótica/antimicótica foi retirada e foram adicionados 100 µl de meio DMEM/F-12 com 10% de SFB nos poços contendo o gel e colocou-se a placa na estufa por 15 minutos para hidratação do material com meio de cultivo. Após a incubação, o meio de cultura foi retirado da placa. Em determinados poços da placa foram adicionados 100 µl do mix de células (meio de cultura e células) resultando em 1×10^4 células por poço e, em outros poços, foram adicionados somente 100 µl de meio de cultura, seguindo o seguinte layout (Figura 1):

Figura 1: Layout da placa de 96 poços usada para ensaio de viabilidade celular com células A549 durante períodos de 24, 48 e 72 horas de contato com *scaffolds*. M = meio de cultura e M+C = meio de cultura e células.



Após 24, 48 e 72 horas de contato com o gel, ao meio de cultura foi adicionado solução de resazurina a 0,3 mM (concentração final) por poço e a placa foi incubada por 4 horas a 37°C. Passado o período de incubação, o sobrenadante foi recolhido e transferido para outra placa para leitura em fluorímetro (EnSpire, PerkinElmer) com um espectro de luz de excitação a 560 nm e de emissão a 590 nm. Além disso, as células foram fotografadas em microscópio Evos XL (ThermoFisher Scientific) para verificação da morfologia celular.

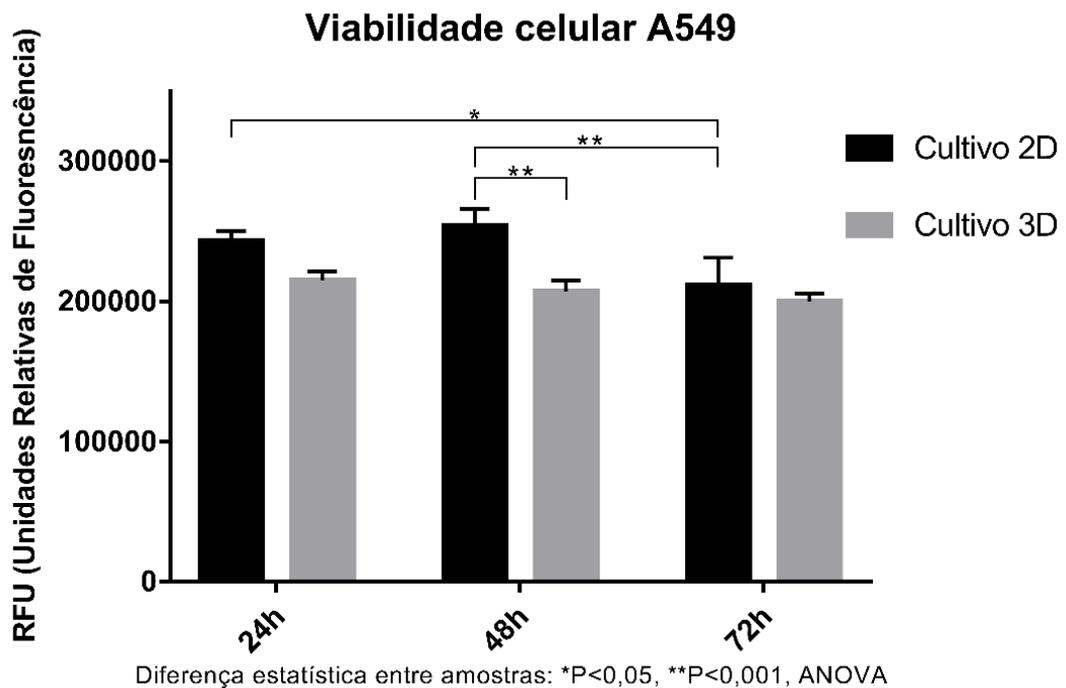
4.5 Análise estatística

A análise de dados foi realizada utilizando análise de variância (ANOVA) com nível de significância $\alpha = 0,05$ no programa GraphPad Prism 7 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA).

5. RESULTADOS

Nesse estudo foi investigada a influência do *scaffold* sobre a viabilidade celular e morfologia de células A549. Os resultados obtidos no ensaio de viabilidade celular pelo método de Alamar Blue (resazurina) são apresentados na Figura 2.

Figura 2: Comparação da viabilidade celular da linhagem A549 semeada em cultivo 2D (monocamada) e em cultivo 3D (*scaffold* biológico).



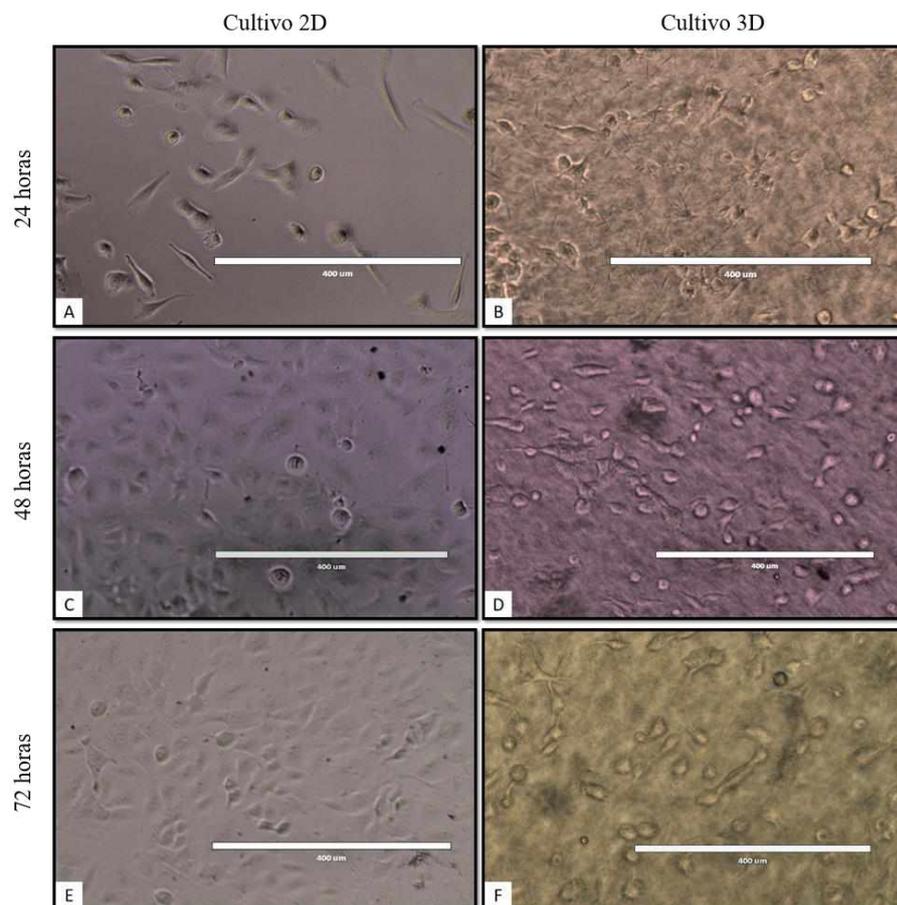
Quando se comparam somente os resultados das células cultivadas no *scaffold*, observou-se que não há diferença estatisticamente significativa de viabilidade entre os 3 tempos de cultivo avaliados ($p > 0,05$ pelo teste de ANOVA). Em contrapartida, a viabilidade das células cultivadas por 72 horas diretamente sobre o plástico de cultivo (2D) foi menor que a viabilidade de células cultivadas por 24 e 48 horas sobre o mesmo substrato ($p < 0,05$ e $p < 0,001$ pelo teste de ANOVA, respectivamente).

Comparando-se os grupos de células cultivadas sobre *scaffold* com células cultivadas diretamente sobre o plástico de cultivo observa-se que a presença do *scaffold* não alterou a viabilidade das células A549 ($p > 0,05$ pelo teste de ANOVA) nos tempos de 24 e 72 horas. Já no tempo de 48 horas existiu diferença estatística significativa entre os dois modelos, sendo a viabilidade das células sobre o *scaffold* um pouco menor. Ainda que, no tempo de 48 horas houve diminuição de cerca de 20% da viabilidade, essa diminuição de viabilidade

não necessariamente pode ser atribuída ao *scaffold*, uma vez que no tempo de 24 e 72 horas as células possuem viabilidade similar ao controle somente com células.

Segundo a ATCC (*American Type Culture Collection*) as células A549 apresentam característica morfológica poligonal quando em alta confluência e morfologia fusiforme em baixa confluência. As imagens obtidas no microscópio evidenciam que as células cultivadas sobre *scaffolds* sofreram alteração morfológica, perdendo seu formato poligonal/fusiforme e passando a apresentar formato esferoide. Os resultados de análise morfológica estão apresentados na Figura 3.

Figura 3: Diferenças morfológicas de células A549 cultivadas por 24, 48 e 72 horas em cultivo 2D e em cultivo 3D. Barra de escala = 400 μm . Aumento da objetiva: 10x.



Observando-se as células em menor aumento percebe-se que as células possuem algum tipo de preferência por determinadas regiões do *scaffolds*, preferência que foi observada utilizando-se outros tipos celulares (dados não mostrados).

6. DISCUSSÃO

A matriz extracelular é composta por estrutura fibrosa e proteínas adesivas como colágeno, elastina e fibronectina. *In vivo*, a matriz regula vários aspectos do microambiente celular, afetando de forma direta a proliferação, sobrevivência, morfologia, migração e diferenciação celular (SHOEN; MITCHELL, 2013). Sabe-se que o cultivo celular 2D não consegue mimetizar de forma precisa esse microambiente e, desse modo, se faz necessário o uso de outros modelos de cultivo que propiciem um desenvolvimento celular mais similar ao encontrado *in vivo*. O cultivo celular 3D em biomateriais vem se mostrando cada vez mais eficaz em simular o microambiente vivenciado pelas células no organismo, pois modificam a expressão de fatores de crescimento, alteram a resistência de células tumorais contra drogas anti-tumorais e interferem também em outros aspectos como viabilidade, proliferação e morfologia devido ao fato de apresentarem compostos naturais encontrados *in vivo* (EDMONDSON et al., 2014).

No cultivo 3D espera-se que o *scaffold* forneça as condições químicas, estruturais e morfológicas apropriadas para direcionar o crescimento celular de acordo com o propósito esperado. Estudos relatam que *scaffolds* colagenosos afetam a diferenciação celular, bem como expressão de substâncias de vital importância para a célula como citocinas e fatores de crescimento (LI et al., 2015; TAMADDON et al., 2017; FANG et al., 2017; DONG; LV, 2016).

Com 48 horas de contato, as células em cultivo 2D apresentaram maior viabilidade (cerca de 20% a mais) do que células em cultivo 3D (*scaffolds*). Já a morfologia das células sofreu alteração em todos os períodos de contato com o *scaffold*, passando do formato poligonal/fusifor-me para o formato esférico.

Neste trabalho verificamos que a viabilidade das células A549 cultivadas em *scaffold* não foi alterada nos tempos de 24 e 72 horas em relação aos controles em cultivo 2D. Assim como nesse trabalho, WANG, D. et al. (2016) também descrevem estudos com células da linhagem A549 em gel de colágeno. Esses testes mostraram que após 11 dias de contato com o gel a maioria das células apresentava boa viabilidade, sendo que entre os dias 5 e 11 as células em cultura 3D proliferaram mais em relação ao cultivo 2D. INGRAM et al. (2007) também estudou a interação de células A549 semeadas em *scaffold* biológico, além de também testar a interação de tenócitos com esse material. O grupo mostrou que não houve

diferença estatística significativa ao se comparar a viabilidade de células cultivadas (A549 e tenócitos) diretamente sobre o *scaffold* descelularizado com a viabilidade do grupo controle (células cultivadas diretamente sobre o plástico de cultivo).

Outros grupos também verificaram manutenção da viabilidade celular estudando outros tipos celulares interagindo com *scaffolds* de colágeno. Em 2012, CHEN et al., executaram experimentos utilizando células tumorais de câncer de mama MCF-7 semeadas sobre *scaffolds* de colágeno. Assim como WANG, D. et al. (2016), CHEN et al. (2012) observou que nenhuma diferença estatística entre as taxas de proliferação celular em cultivos 2D e 3D foi notada durante os primeiros dias sendo que, do 7º até o 13º dia, células no cultivo 3D proliferaram mais. WANG, J. et al. (2016) também trabalhando com MCF-7, em um *scaffold* de quitosana/colágeno/alginato, mostrou que essas células cresceram mais rápido no *scaffold* do que em cultivo 2D.

Nossos dados também mostram que, em 48 horas, há uma alteração da viabilidade das células A549 em contato com o *scaffold* em comparação com as células cultivadas pelo mesmo período no plástico. MAHMOUDZADEH & MOHAMMADPOUR (2016), por exemplo, ao analisarem a viabilidade de células da linhagem tumoral 4T1 (carcinoma mamário) cultivadas em *scaffolds* de colágeno e quitosana verificaram que as células apresentaram taxas menores de crescimento após 48 e 72 horas de contato com o biomaterial. JIA et al. (2018) mostrou que células de glioma cresceram de forma mais vagarosa nos *scaffolds* 3D do que em culturas monocamada, chegando a apresentar diferença estatística significativa no 5º e no 10º dia de cultivo ao se comparar os dois grupos.

Esses dados da literatura corroboram com o artigo de revisão de EDMONDSON et al., 2014, que mostra que a proliferação e viabilidade celular normalmente são mais elevadas em cultivos 2D do que *in vivo*, mas isso pode variar de acordo com o tipo celular e/o modelo de cultivo 3D.

Nosso trabalho também mostrou que a morfologia das células A549 alterou-se em contato com o *scaffold*. WANG, D. et al. (2016), trabalhando com esse mesmo tipo celular, mostrou que seu gel de colágeno altera a morfologia celular de células que em 2D apresentavam forma de fuso passaram a apresentar forma esférica em cultivo 3D. Em 2012, CHEN et al., trabalhando com células MCF-7 semeadas sobre *scaffolds* de colágeno mostrou que houve uma diversificação de morfologia celular: de formatos triangulares e poligonais em cultivo 2D para formatos esferoides, alongados, triangulares e fusiformes no cultivo 3D.

FANG et al. (2017) também observou alterações estruturais em células dendríticas regulatórias quando cultivadas sobre o *scaffold*. Analisando células de glioma, JIA et al. (2018) mostra que as células cultivadas em 2D se apresentavam fusiformes ou poligonais, achatadas e semelhantes a fibroblastos ou células epiteliais. Já as células cultivadas em 3D tinham tamanho menor, apresentavam formato redondo e formavam conglomerados ovoides. Tanto os resultados da literatura quanto os desse trabalho são condizentes com os achados citados na revisão de EDMONDSON et al. (2014) que discute que, normalmente, as células apresentam formato achatado e alongado em culturas 2D, enquanto em cultivo 3D células tendem a apresentar formato esferoide e formar conglomerados.

7. CONCLUSÃO

Os *scaffolds* ricos em colágeno utilizados nesse estudo são biocompatíveis, pois não apresentam citotoxicidade e induzem um formato esferoide nas células que crescem sobre ele, podendo ser utilizados como biomaterial para estudos com células A549.

8. PERSPECTIVAS

Como perspectivas desse trabalho, os *scaffolds* poderão ser avaliados por Microscopia Eletrônica de Varredura, a fim de avaliar a disposição das fibras de colágeno e a maneira como as células se organizam no *scaffold*. Ainda com relação ao material, pretende-se quantificar os diferentes tipos de colágeno e a elastina presentes. Uma vez determinado, pode-se realizar diluições seriadas do material a fim de observar o comportamento de diferentes tipos celulares de acordo com a composição do material, incluindo a avaliação de efeito citotóxico. Com relação à interação de células com o *scaffold*, pretende-se avaliar o efeito desse *scaffold* biológico em outros tipos celulares e em períodos maiores de tempo. Também espera-se enviar os *scaffolds* para análise histológica a fim de verificar a presença de células infiltradas no interior do gel.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BRESLIN, S.; O'DRISCOLL, L. Three-dimensional cell culture: the missing link in drug discovery. **Drug discovery today**, v. 18, 240-249, 2013.
- BROWN, T.; LEMAY, H. E.; BURSTEN, B. E. **Química: a ciência central**. 9 ed. Prentice-Hall, 2005.
- CEYLAN, S. & BOLGEN, N. A review on three dimensional *scaffolds* for tumor engineering. **Biomaterials and Biomechanics in Bioengineering**, v. 3(3), 141-155, 2016.
- CHEN, L.; XIAO, Z.; MENG, Y.; ZHAO, Y.; HAN, J.; SU, G.; CHEN, B.; DAI, J. The enhancement of cancer stem cell properties of MCF-7 cells in 3D collagen *scaffolds* for modeling of cancer and anti-cancer drugs. **Biomaterials**, v. 33, 1437-1444, 2012.
- DEBNATH, J.; MUTHUSWAMY, S.K.; BRUGGE, J.S. Morphogenesis and oncogenesis of MCF-10A mammary epithelial acini grown in three-dimensional basement membrane cultures. **Methods**, v. 30, 256–268, 2003.
- DHIMAN, H. K.; RAY, A.R.; PANDA, A. K. Three-dimensional chitosan *scaffold*-based MCF-7 cell culture for the determination of the cytotoxicity of tamoxifen. **Biomaterials**, v. 26, 979–986, 2005.
- DONG, C.; LV, Y. Application of collagen *scaffold* in tissue engineering: recent advances and new perspectives. **Polymers**, v. 8(2), s/p., 2016.
- DUTTA, R. C. & DUTTA, A. K. Cell-interactive 3D-*scaffold*; advances and applications. **Biotechnology Advances**, v. 27(4), 334–339, 2009.
- EDMONDSON, R.; BROGLIE, J. J.; ADCOCK, A. F.; YANG, L. Three-dimensional cell culture systems and their applications in drug discovery and cell-based biosensors. **Assay and drug development technologies**, v. 12, 207-218, 2014.
- ELLIOTT, N. T. & YUAN, F. A Review of Three-Dimensional In Vitro Tissue Models for Drug Discovery and Transport Studies. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 100(1), 59–74, 2011.
- FANG, Y.; WANG, B.; ZHAO, Y.; XIAO, Z.; LI, J.; CUI, Y.; HAN, S.; WEI, J.; CHEN, B.; HAN, J.; MENG, Q.; HOU, X.; LUO, J.; DAI, J.; JING, Z. Collagen *scaffold* microenvironments modulate cell lineage commitment for differentiation of bone marrow cells into regulatory dendritic cells. **Scientific reports**, v. 7, s/p., 2017.
- FISCHBACH, C.; CHEN, R.; MATSUMOTO, T.; SCHMELZLE, T.; BRUGGE, J. S.; POLVERINI, P. J.; MOONEY, D. J. Engineering tumors with 3D *scaffolds*. **Nature Methods**, v. 4(10), 855–860, 2007.
- GILPIN, A.; YANG, Y. Decellularization Strategies for Regenerative Medicine: From Processing Techniques to Applications. **BioMed Research International**, v. 2017, s/p., 2017.
- GODOY, P.; HEWITT, N. J.; ALBRECHT, U.; ANDERSEN, M. E. ANSARI, N.; BHATTACHARYA, S.; BODE, J. G.; BOLLEYN, J.; BORNER, C.; BOETTGER, J.; et al., Recent advances in 2D and 3D in vitro systems using primary hepatocytes, alternative hepatocyte sources and non-parenchymal liver cells and their use in investigating

mechanisms of hepatotoxicity, cell signaling and ADME. **Archives of toxicology**, v. 87, 1315-1530, 2013.

GURSKI, L. A.; PETRELLI, N. J.; JIA, X.; FARACH-CARSON, M. C. 3D Matrices for Anti-Cancer Drug Testing and Development. **Oncology Issues**, v. 25(1), 20–25, 2010.

HUTMACHER, D. W. Biomaterials offer cancer research the third dimension. **Nature Materials**, 9(2), 90–93, 2010.

INGRAM, J. H.; KOROSSIS, S.; HOWLING, G.; FISHER, J.; INGHAM, E. The use of ultrasonication to aid recellularization of acellular natural tissue *scaffolds* for use in anterior cruciate ligament reconstruction. **Tissue engineering**, v. 13, 1561-1572, 2007.

JIA, W.; JIANG, X.; LIU, W.; WANG, L.; ZHU, B.; ZHU, H.; LIU, X.; ZHONG, M.; XIE, D.; HUANG, W.; JIA, W.; LI, S.; LIU, X.; ZUO, X.; CHENG, D.; DAI, J.; REN, C. Effects of three-dimensional collagen *scaffolds* on the expression profiles and biological functions of glioma cells. **International journal of oncology**, v. 52, 1787-1800, 2018.

KOH, C. J.; ATALA, A. Tissue engineering, stem cells, and cloning: opportunities for regenerative medicine, **Journal of the American Society Nephrology**, v. 15, 1113-1125, 2004.

LEE, G.Y.; KENNY, P.A.; LEE, E.H.; BISSELL, M.J. Three-dimensional culture models of normal and malignant breast epithelial cells. **Nature Methods**, v. 4, 359–365, 2007.

LI, Y. Y., CHOY, T. H., HO, F. C., CHAN, P. B. *Scaffold* composition affects cytoskeleton organization, cell–matrix interaction and the cellular fate of human mesenchymal stem cells upon chondrogenic differentiation. **Biomaterials**, v. 52, 208-220, 2015.

MAHMOUDZADEH, A.; MOHAMMADPOUR, H. Tumor cell culture on collagen–chitosan *scaffolds* as three-dimensional tumor model: A suitable model for tumor studies. **Journal of food and drug analysis**, v. 24, 620-626, 2016.

PARENTEAU-BAREIL, R.; GAUVIN, R.; BERTHOD, F. Collagen-Based Biomaterials for Tissue Engineering Applications. **Materials**, v. 3, 1863-1887, 2010.

RATNER, B.D.; HOFFMAN, A.S.; SCHOEN, F.J.; LEMONS, J.E. Biomaterials Science: an introduction to materials in medicine. 2 ed. **Elsevier Academic Press**, 2004.

REPROCELL GLOBAL CORPORATE OFFICES. **Reprocell**. Alvetex Protocols. Disponível em: < <https://www.reprocell.com/alvetex-protocols-i109>>. Acesso em: 20 de maio de 2019.

RISS, T. L., MORAVEC, R. A., NILES, A. L., DUELLMAN, S., BENINK, H. A., WORZELLA, T. J.; MINOR, L. Cell viability assays. Assay Guidance Manual, 2016. Encontrado em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK144065/>. Último acesso em: 21 de maio de 2019.

SCHOEN, F. J.; MITCHELL, R. N. Tissues, the extracellular matrix, and cell–biomaterial interactions. **Biomaterials Science**, Academic Press, 452-474, 2013.

SOUZA, A. G.; SILVA, I. B. B.; CAMPOS-FERNANDEZ, E.; BARCELOS, L. S.; SOUZA, J. B.; MARANGONI, K.; GOULART, L. R.; ALONSO-GOULART, V. Comparative Assay of 2D and 3D Cell Culture Models: Proliferation, Gene Expression and Anticancer Drug Response. **Current pharmaceutical design**, v. 24, 1689-1694, 2018.

TAMADDON, M.; BURROWS, M.; FERREIRA, S. A.; DAZZI, F.; APPERLEY, J. F.; BRADSHAW, A.; BRAND D. D.; CZERNUSZKA J.; GENTLEMAN, E. Monomeric,

porous type II collagen *scaffolds* promote chondrogenic differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells in vitro. **Scientific reports**, v. 7, 43519, 2017.

WANG, D.; LIU, W.; CHANG, J.; CHENG, X.; ZHANG, X.; XU, H.; FENG, D.; YU, L.; WANG, X. Bioengineering three-dimensional culture model of human lung cancer cells: an improved tool for screening EGFR targeted inhibitors. **RSC Advances**, v. 6, 24083–24090, 2016.

WANG, J. Z.; ZHU, Y. X.; MA, H. C.; CHEN, S. N.; CHAO, J. Y.; RUAN, W. D.; WANG, D.; DU, F. G.; MENG, Y. Z. Developing multi-cellular tumor spheroid model (MCTS) in the chitosan/collagen/alginate (CCA) fibrous *scaffold* for anticancer drug screening. **Materials Science and Engineering**, v. 62, 215-225, 2016.