

DESENVOLVIMENTO DE MODELO 3D COM CÉLULAS RENAIIS PARA AVALIAÇÃO DE CITOTOXICIDADE

DEVELOPMENT OF A 3D MODEL WITH KIDNEY CELLS FOR EVALUATING CITOTOXICITY

Aline Copa Cussi^{1, i}

Júlia Monteiro Campestrini^{1, ii}

Nathalia Ramalho Moreira^{3, iii}

Marta Marques Maia^{3, iii}

Thaís Alves da Costa Silva^{4, iii}

RESUMO

O presente estudo teve como objetivo a produção de modelo 3D/esferóides com células renais oriundas de rim de macaco verde (VERO). Para a produção dos esferóides foi utilizada diferentes concentrações de células/micromolde (microtissues-MERCK). Foram testadas duas densidades celulares: 10^5 e 10^6 células/micromolde. Observou-se que a concentração de 10^6 células foi mais eficaz na formação de esferóides homogêneos, compactos e morfologicamente estáveis, enquanto a concentração de 10^5 células resultou em estruturas irregulares. Além disso, foi realizado um ensaio de citotoxicidade com metanol em diferentes concentrações. Os resultados demonstraram que mesmo na máxima concentração testada (10%) não houve efeito citotóxico sobre os esferóides formados, indicando a viabilidade do modelo e mostrando a maior resistência a agentes tóxicos do que o modelo 2D.

Palavras-chave: esferóides, cultivo 3D, VERO, modelo

ABSTRACT

The present study aimed to produce a 3D model/spheroids using kidney cells derived from the African green monkey kidney (VERO) cells. To produce the spheroids, different cell concentrations per micromold (Microtissues – MERCK) were used. Two cell densities were tested: 10^5 and 10^6 cells/micromold. It was observed that the concentration of 10^6 cells was more effective in forming homogeneous, compact, and morphologically stable spheroids, whereas the 10^5 cell concentration resulted in irregular structures. Additionally, a cytotoxicity assay was performed using methanol at different concentrations. The results showed that even at the highest concentration tested (10%), there was no cytotoxic effect on the formed spheroids, indicating the viability of the model and demonstrating greater resistance to toxic agents compared to the 2D model.

Keywords: spheroids, 3D culture, VERO, MODEL

¹ Técnica em Biotecnologia SENAI – Bom Retiro. E-mail: copaaline6@gmail.com; ² Técnica em Biotecnologia SENAI – Bom Retiro. E-mail: juliamcampestrini@gmail.com; ³ Coordenadora na Escola SENAI de Biotecnologia. E-mail: nathalia.moreira@sp.senai.br; ⁴ Instrutora III na Escola SENAI de Biotecnologia. E-mail: marta.maia@sp.senai.br; ⁵ Instrutora III na Escola SENAI de Biotecnologia. E-mail: thais.costa@sp.senai.br.

INTRODUÇÃO

Os rins desempenham um papel essencial na filtração do sangue, na eliminação de resíduos, na regulação de eletrólitos e no controle da pressão arterial. Qualquer comprometimento de sua função pode resultar em consequências graves para o organismo (PERAZELLA et al., 2019). Diversos fármacos estão associados à nefrotoxicidade, podendo causar lesões renais agudas ou crônicas (FANOS; CATALDI, 2001). Diante disso, estudos *in vitro* utilizando modelos celulares tornam-se ferramentas importantes para a avaliação da citotoxicidade. Tradicionalmente, a maioria dessas pesquisas é realizada em sistemas de cultivo bidimensional (2D), nos quais as células crescem aderidas a superfícies rígidas, como frascos ou placas de petri tratados de forma que favorecem a adesão e a proliferação celular (SANTOS, 2018). O cultivo celular consiste na manutenção e multiplicação de células fora do organismo de origem, sob condições controladas como: meio de cultura, pH e temperatura, permitindo análises funcionais e testes biológicos (CAVALCANTI, 2007).

Nos últimos anos, têm ganhado destaque os modelos tridimensionais (3D), como os esferoides, por mimetizarem de forma mais fiel o microambiente celular *in vivo* (LIN; CHANG, 2008; RYU et al., 2019). No organismo, as células estão inseridas em um ambiente tridimensional, cercadas por outras células, matriz extracelular e complexas interações químicas e físicas, o que não é adequadamente representado nos modelos 2D (RYU et al., 2019). Os modelos 3D promovem maior comunicação célula-célula e célula-matriz, aumentando a sinalização celular e a resposta fisiológica (ISHIGURO et al., 2017). Dessa forma, tornam-se mais adequados para a avaliação da eficácia e toxicidade de novos fármacos, por fornecerem dados mais representativos e comparáveis ao ambiente fisiológico.

Entre as linhagens celulares comumente utilizadas em pesquisas destaca-se a linhagem VERO, derivada do rim de macaco-verde africano (*Cercopithecus aethiops*) (LIN; CHANG, 2008). Ensaios de citotoxicidade geralmente empregam métodos colorimétricos, como MTT e resazurina, que avaliam a viabilidade celular com base na atividade metabólica (COSTA-SILVA et al., 2019). Apesar da ampla utilização dos modelos 2D, esses testes apresentam limitações. Já os modelos 3D oferecem heterogeneidade na distribuição de nutrientes e oxigênio, simulando com maior fidelidade as condições encontradas *in vivo* (RODRIGUES, 2022). Os esferoides apresentam três zonas distintas: a região mais interna, ou zona necrótica, com baixa disponibilidade de oxigênio e nutrientes; a zona intermediária, composta por células quiescentes; e a região mais externa, formada por células em proliferação, que têm maior acesso aos nutrientes e ao oxigênio (RODRIGUES, 2022).

Diante desse cenário, o presente trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de um modelo 3D com células renais para a avaliação da citotoxicidade, buscando representar de forma mais realista o ambiente fisiológico renal e contribuir para a redução do uso de modelos animais.

1.1 Problema de pesquisa

O estudo da citotoxicidade é essencial no desenvolvimento e na avaliação de fármacos, cosméticos, agentes químicos e terapias biológicas. A busca

por modelos que mimetizam com maior fidelidade as condições *in vivo* é de grande relevância, especialmente por contribuir para a redução do uso de modelos animais. Nesse contexto, o uso de células de origem renal se destaca, considerando a complexidade e a importância fisiológica dos rins. Tais modelos permitem a avaliação da nefrotoxicidade e o estudo dos mecanismos de lesão renal, contribuindo para a segurança e eficácia de novas substâncias.

2 METODOLOGIA

2.1 Obtenção e manutenção das células de mamífero

As células VERO (ATCC - *American Type Culture Collection*) foram gentilmente doadas pelo Instituto Adolfo Lutz – São Paulo. O processo de subcultivo celular foi realizado em garrafas apropriadas, com meio 199 suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), conforme as etapas descritas na figura 1

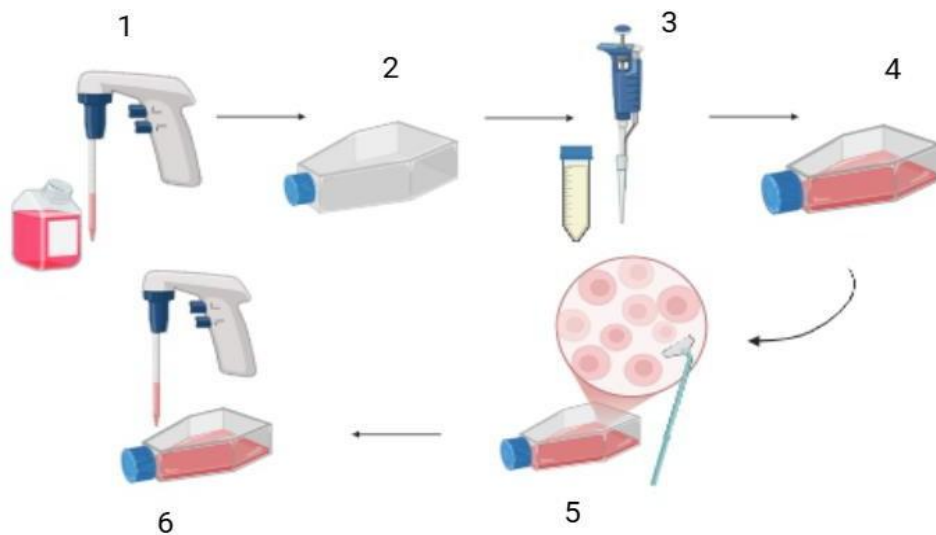


Figura 1. Manutenção das células VERO. 1. Pipetagem do meio de cultura; 2. Transferência para garrafa estéril; 3. Adição de 10% SFB; 4. Homogeneização; 5. Raspagem da cultura celular; 6. Pipetagem das células para a garrafa com meio novo. Fonte: próprios autores (2025).

2.2 Produção dos Micromoldes de agarose e hidrogel.

Os hidrogéis foram produzidos em micromolde (microtissues – MERCK) com agarose à 2% em solução NaCl (0,9%) estéril. Cada agarose foi micromoldada e desinformada sobre o poço de uma placa estéril de 6 poços e foi fixada com 2 mL da solução de agarose ao fundo da placa. Foram esperados 20 minutos para solidificação e na sequência, adicionados 2 mL de meio 199 aos poços para ambientação sob estufa à 37°C com 5% de CO₂ por 15 minutos. Posteriormente, o meio foi retirado e o procedimento repetido com 4 mL de meio. Este processo foi feito para a produção do hidrogel antes do plaqueamento da suspensão de células (Figura 2).

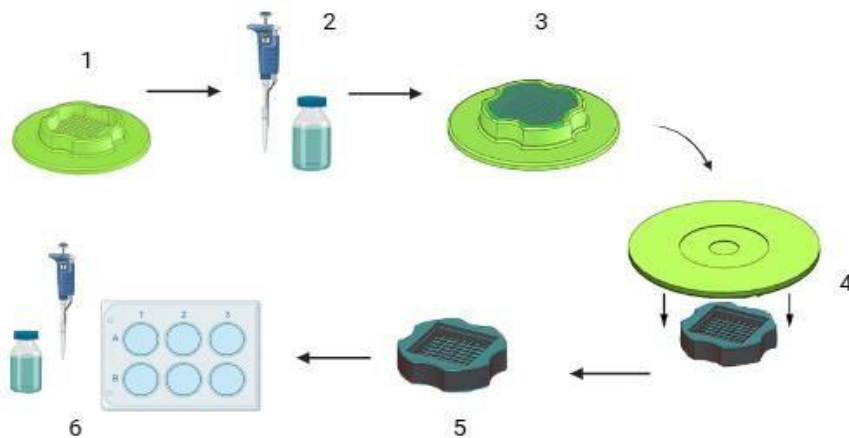


Figura 2. Produção de moldes de agarose em MicroTissues® para a produção de esferoides. 1. Micromolde; 2. Pipetagem da solução de agarose; 3. Micromolde com agarose/solidificação; 4. Desmoldagem da agarose micromoldada; 5. Molde isolado; 6. Pipetagem de agarose para fixação do molde em placa de 6 poços. Fonte: Adaptado pelos próprios autores (2025) de Przyborski, Cap. 05, 2017.

2.3 Produção dos esferoides

Foram selecionadas apenas culturas com confluência acima de 90%. Tripsina foi utilizada para desprender as células das garrafas de cultivo e a contagem celular foi realizada em câmara de Neubauer no equipamento Millicell (MERCK). Assim foram utilizadas concentrações de 10^5 e 10^6 células/molde e observados os tempos de 24, 48 e 72 de incubação para formação dos esferoides em estufa de CO_2 à $37^\circ C$.

2.4 Análise de citotoxicidade 3D

Os esferóides formados na concentração de 1×10^6 por 48 horas foram transferidos para uma microplaca de 96 poços. Em seguida, foram tratados com metanol nas concentrações de 10%, 8%, 6%, 5%, 2,5%, 1,25% e 0,625% (duplicate) e incubados à $37^\circ C$ com 5% de CO_2 pelo período de 24 horas. Em todos os ensaios foram utilizados poços controle: esferóides não tratados (controle positivo) e branco (meio de cultivo). Após o período de incubação foi adicionado 20 μL do corante resazurina (0,11mg/mL), que avalia atividade metabólica da célula seguido de incubação à $37^\circ C$ com 5% de CO_2 por 24 horas. Após esse período a atividade metabólica foi avaliada pela leitura da absorbância no equipamento *Varioskan™ LUX multimode microplate reader* ($\lambda = 570$ nm).

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

A padronização na produção de esferoides na área biotecnológica está em constante avanço, podemos encontrar na literatura padronização de esferoides por diversos métodos. De acordo com resultados obtidos por Rodrigues (2022), é possível ver a formação de esferoides compactos com a linhagem celular MCF-7 a partir de 5000 células. Porém, é importante salientar que esta linhagem é de cancer de mama e pode apresentar um ciclo celular mais acelerado. No presente trabalho o tempo mínimo de observação de formação esferóides foi de 24 horas de incubação, e o máximo foi de 72 horas. Foi visualmente notório que os esferoides na concentração de

10^6 células/molde tiveram um formato esférico e compacto durante o período estudado, desde o primeiro período de avaliação (24 horas) (Figura 3).

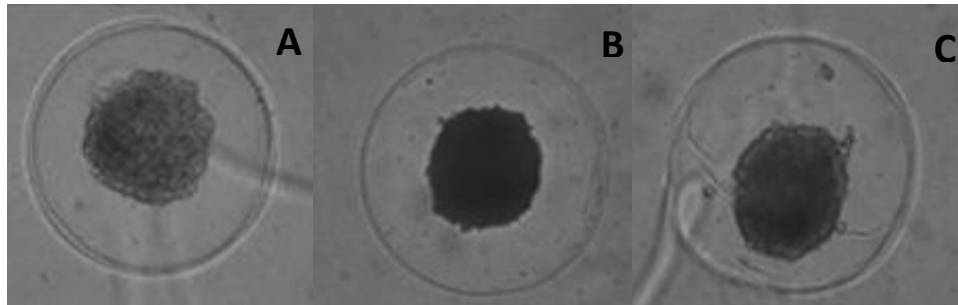


Figura 3. Crescimento dos esferóides produzidos com células VERO nas concentrações de 10^6 , nos períodos de 24 hs (A), 48 hs (B) e 72 hs (C). Todas as imagens estão na escala de 200 μ m.

Em relação aos resultados obtidos com a concentração de 10^5 células/molde, os esferóides formados foram heterogêneos. Houve formação de pequenos agregados todos e até ausência de formação (Figura 6).

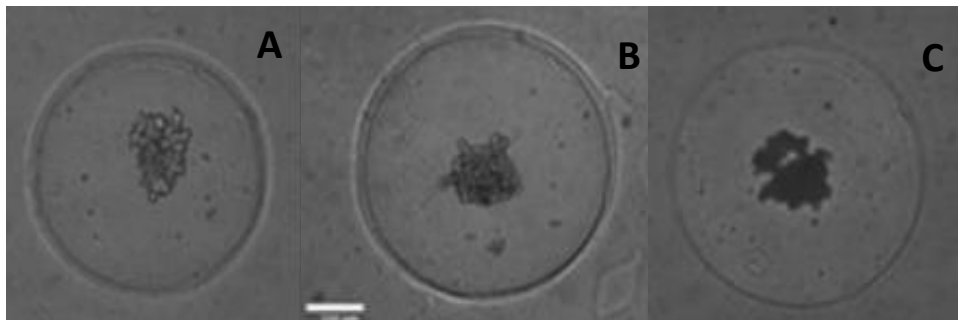


Figura 6. Crescimento dos esferóides produzidos com células Vero nas concentrações de 10^5 , nos períodos de 24 hs (A), 48 hs (B) e 72 hs (C). Todas as imagens estão na escala de 200 μ m.

Segundo Maia et al., 2024, não foi reprodutível a produção de esferóides com a linhagem VERO, nas concentrações de 1×10^5 e 1×10^6 , o que é contraditório aos resultados encontrados aqui. Porém, uma modificação metodológica foi efetuada no presente trabalho, adição de soro fetal bovino, fato que provavelmente auxiliou na compactação e formação do esferóide. Em relação a análise de citotoxicidade no modelo 3D, foi possível observar que metanol, mesmo na máxima concentração testada (10% do volume líquido que o esferóide se encontrava) não foi tóxico para o mesmo. Um estudo realizado por POHANKA e colaboradores em 2015 destaca que esta molécula é altamente tóxica, com alta incidência de envenenamento. Assim, o modelo 3D reforça como uma molécula sabidamente tóxica tem mais dificuldade de penetrar para o interior do esferóide para inferior a sua ação.

4 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste estudo demonstram que a concentração celular de 10^6 foi mais eficiente para a formação de esferóides renais 3D, apresentando maior uniformidade, integridade estrutural e viabilidade em comparação à concentração 10^5 . Além disso, o teste de citotoxicidade indicou que a concentração máxima de metanol (10%) não apresentou efeitos tóxicos sobre os esferóides, assim estudos futuros com maiores concentrações precisam ser feitos a fim de validação do teste.

REFERÊNCIAS

- CAVALCANTI**, Patrícia Fernandes. Cultivo de células de mamíferos. In: LOPES, Valcler Rangel; ALMEIDA, Maria Cecília de Souza Minayo de (org.). *Ensaios clínicos: ética e boas práticas*. Rio de Janeiro: EPSJV/Fiocruz, 2007. v. 2, cap. 5, p. 121–136.
- COSTA-SILVA**, T. A. et al. Antileishmanial activity and immunomodulatory effect of secosubamolide, a butanolide isolated from *Nectandra oppositifolia* (Lauraceae). *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*, Botucatu, v. 25, e20190008, 19 ago. 2019.
- FANOS**, Vassilios; CATALDI, L. Renal transport of antibiotics and nephrotoxicity: a review. *Journal of Chemotherapy*, v. 13, n. 5, p. 461–472, 2001.
- ISHIGURO**, T. et al. Tumor-derived spheroids: relevance to cancer stem cells and clinical applications. *Cancer Science*, v. 108, n. 3, p. 283–289, mar. 2017.
- LIN, R. Z.; CHANG, H. Y.** Recent advances in three-dimensional multicellular spheroid culture for biomedical research. *Biotechnology Journal*, v. 3, n. 9–10, p. 1172–1184, out. 2008.
- MAIA**, Marta Marques et al. Padronização da produção de esferóides pelo método de flutuação forçada. In: CONGRESSO UNISENAI-SP DE EDUCAÇÃO, **TECNOLOGIA E INOVAÇÃO**, 1., 2024, São Paulo. *Anais...* São Paulo: SENAI Ipiranga, 2024. Disponível em: <https://www.even3.com.br/anais/congressosenai>. Acesso em: [05/08/2025].
- PERAZELLA**, M. A. Drug-induced acute kidney injury: diverse mechanisms of tubular injury. *Current Opinion in Critical Care*, v. 25, n. 6, p. 550–557, dez. 2019.
- RYU**, Na-Eun; LEE, Seung Hwan; PARK, Hee-Soo. Spheroid culture system methods and applications for mesenchymal stem cells. *Cells*, Basel, v. 8, n. 12, p. 1620, 12 dez. 2019.
- RODRIGUES**, Mileni Fátima. *Padronização de protocolos de cultivo de células tridimensional (3D) pela técnica de sobreposição líquida para a avaliação de citotoxicidade em linhagens de câncer de mama*. 2022. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2022.
- SANTOS**, Diogo Peres dos. *Produção de esferóides de células tumorais de câncer de bexiga num biorreator de vórtice de Taylor*. 2018. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2018.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos à Escola **SENAI de Biotecnologia**, pelo apoio técnico e estrutura oferecida ao longo deste trabalho.

SOBRE O(S)AUTOR(ES)

i **ALINE COPA CUSSI**



Possui curso Técnico em Biotecnologia pela escola SENAI de Biotecnologia (2025).

ii **JÚLIA MONTEIRO CAMPESTRINI**



Possui curso Técnico em Biotecnologia pela escola SENAI de Biotecnologia (2025).

iii **NATHALIA RAMALHO MOREIRA**



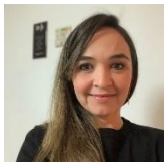
Graduação em Bioquímica. Mestrado e doutorado em Ciências pela USP. Especialista em Controle de qualidade (ISO 9001) e formações em técnicas de negociação, facilitação, técnicas de vendas e marketing pelo Instituto Fraunhofer IPK da Alemanha. Certificação em Gestão de Projetos (SENAI-PR) e especialização em Engenharia de Bioprocessos (Escola Politécnica - USP). Estruturou a implantação do Instituto SENAI de Inovação em Biotecnologia. Atualmente atua coordenadora técnica de uma unidade operacional do SENAI-SP na área de Biotecnologia.

v **MARTA MARQUES MAIA**



Graduação em Biomedicina, possui Mestrado e Doutorado em Ciências pelo programa Pesquisas Laboratoriais em Saúde Pública (CCD-SES) do Instituto Adolfo Lutz. Possui experiência em microbiologia, imunologia, cultivo de células e biologia molecular. Atualmente atua como Instrutora de Formação Profissional III na Escola Dr. Celso Charuri- SENAI de Biotecnologia.

iv **THAIS ALVES DA COSTA SILVA**



Graduação em Biologia. Mestrado e doutorado em Ciências pela Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo (CCD-SES). Pós-doutorado no Instituto Adolfo Lutz com estágio sanduíche na Ohio State University (EUA) e pelo Programa de Pós Graduação em Ciência & Tecnologia/Química da UFABC. Foi professora temporária em Parasitologia na USP (ICB) e professora auxiliar na PUC-SP - Departamento de Morfologia e Patologia. Atualmente é Instrutora III no Instituto SENAI de Biotecnologia - São Paulo - SP.