

PESQUISAS CIENTÍFICAS - AQUELAS QUE SÃO FRUTO DE PESQUISA EMPÍRICA DENTRO DOS PARÂMETROS DO MÉTODO CIENTÍFICO. - TECNOLOGIAS, GESTÃO E POLÍTICAS PÚBLICAS - USO INTELIGENTE E INOVADOR DE CONHECIMENTOS E RECURSOS TECNOLÓGICOS PARA DESENVOLVER PRODUTOS E PROCESSOS SUSTENTÁVEIS, BUSCANDO PROMOVER A SUSTENTABILIDADE AMBIENTAL E A PRESERVAÇÃO DA BIODIVERSIDADE. O RECONHECIMENTO E VALORIZAÇÃO DA SABEDORIA ACUMULADA PELOS SISTEMAS BIOLÓGICOS E PELAS COMUNIDADES TRADICIONAIS, APLICADO NA GESTÃO DE PROJETOS, ORGANIZAÇÕES E EM POLÍTICAS PÚBLICAS, PARA O BENEFÍCIO DA SOCIEDADE, DESENVOLVENDO AÇÕES, PRODUTOS, MATERIAIS E SISTEMAS NA BUSCA DE SOLUÇÕES DE PROBLEMAS SOCIOAMBIENTAIS. EX: TECNOLOGIAS SOCIAIS, ECONOMIA CIRCULAR, TECNOLOGIAS VERDES, BIODESIGN, ARQUITETURA VERNACULAR, BIOMIMÉTICA, BIOPLÁSTICOS, BIOCOMBUSTÍVEIS, BIOFERTILIZANTES, SABERES TRADICIONAIS APLICADOS À CONSERVAÇÃO DOS ALIMENTOS, ETC.

ANÁLISE DA PADRONIZAÇÃO DE PRODUÇÃO DE ESFEROIDES DE FIBROBLASTOS HUMANOS PARA O CULTIVO 3D

Maria Eduarda Cordebello Gall (dudacordebello@gmail.com)

Priscila Grion De Miranda Borchio (priscilaborchio@unifase-rj.edu.br)

Wanderson De Souza (wstudzel@gmail.com)

José Mauro Granjeiro (jmgranjeiro@inmetro.gov.br)

Rosana Bizon Vieira Carias (rosanabizon@prof.unifase-rj.edu.br)

Introdução: Devido à crescente demanda por modelos mais representativos do ambiente *in vivo*, as tecnologias de cultura tridimensional (3D) têm se destacado como uma alternativa promissora, permitindo que as células interajam tanto com o ambiente ao seu redor quanto entre si. Esse tipo de cultivo reproduz o ambiente *in vivo*, fazendo com que as células se comportem de maneira semelhante ao tecido original. Favorecendo a interação entre as células e a matriz extracelular, facilitando processos biológicos cruciais, como proliferação, migração e sinalização celular. Um dos principais exemplos de cultivo 3D são os esferoides, estruturas formadas por agregados multicelulares que reproduzem com maior fidelidade as interações célula-célula e célula-matriz. Esferoides cultivados representam um sistema *in vitro* útil para avaliação de fármacos, agentes moduladores, entre outros. A sua padronização é parte necessária do seu processo de regularização como método validado. Ao seguir as diretrizes padronizadas e as boas práticas do cultivo de célula é possível aumentar a confiabilidade dos resultados, facilitando a reprodutibilidade desses estudos por outros pesquisadores e laboratórios.

Objetivo: Visando isso, neste estudo vamos produzir esferoides a partir de fibroblastos obtidos de prepúcio humanos para determinar os principais mensurados para a padronização, como: volume, área e morfologia dos esferoides.

Metodologia: As células utilizadas foram processadas no Laboratório de Medicina Regenerativa, conforme aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, com CAAE 46799215.1.0000.5283. As células foram cultivadas com meio DMEM F12 suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB). Para a formação dos esferoides foi utilizada uma placa de 96 poços com fundo U revestida de uma fina camada de agarose ultrapura estéril. As células foram semeadas em diferentes concentrações (6250; 12500; 25000; 50000 células / poço) e analisadas nos tempos experimentais de 3,7,14 e 21 dias. As análises foram realizadas em duas condições: esferoides fixados com Formaldeído 4% e não fixados. Através da câmera monocromática do microscópio invertido Evos-M5000, foi adquirida uma imagem representativa de cada esferoide, nos 10 poços, em cada densidade citada anteriormente. A calibração do aparelho contou com uma segunda verificação através do software de imagens ImageJ, onde a resolução de pixels presentes no frame em relação a largura e altura é de 0,6192257 μm , em seguida realizamos as medições de maior e menor diâmetro pela régua do microscópio Evos-M5000.

Os dados obtidos foram compilados para obtenção da média entre o maior e menor diâmetro desses esferoides, a média desses diâmetros calculados, o raio obtido a partir da fórmula considerando a média dos diâmetros (média dos diâmetros/2), a área utilizando a fórmula ($4 * 3,14159 * R^2$), e o volume utilizando a fórmula ($4/3 * 3,14159 * R^3$). No software ImageJ realizamos seis medições do maior e do menor diâmetro, para cada esferoide. Os dados obtidos foram compilados para obter a média entre o maior e o menor diâmetro desses esferoides, a média desses diâmetros, o raio obtido a partir da fórmula considerando a média dos diâmetros (média dos diâmetros/2), a área utilizando a fórmula ($4 * 3,14159 * R^2$), e o volume utilizando a fórmula ($4/3 * 3,14159 * R^3$). Resultados e Discussão: É possível observar que a área e o volume dos esferoides, tanto fixados, como não fixados, aumentaram de acordo com o aumento da densidade de células e, ainda, que os fixados obtiveram maior área e maior volume do que os não fixados. Ambos os tipos de esferoides, até a densidade de 12500 células não apresentaram diferenças estatísticas em relação ao volume e a área. A partir da densidade de 22500 células houve um aumento do volume e da área com diferença estatística significativa ($p < 0,0001$). A densidade de 50000 apresentou diferença estatística com $p < 0,0001$ para o volume entre ambas as condições e com $p = 0,006$, para área. As análises de tamanho foram realizadas nas condições de esferoides fixados e não fixados, pois a fixação é uma etapa realizada na maioria dos ensaios de análise morfológica, devido aos métodos utilizados de coloração, bem como para permitir a análise após a realização de experimentos. Conclusão: Os resultados deste estudo demonstram que o aumento da densidade celular está diretamente relacionado ao crescimento da área e do volume dos esferoides, tanto em condições fixadas ou não fixadas. Esferoides fixados apresentaram maior volume e área em comparação aos não fixados, quando encontrados em densidades mais altas de células, como nas condições de produção com 22500 e 50000 células / esferoides. A análise estatística mostrou diferenças significativas entre as duas condições, sugerindo que o processo de fixação, embora necessário para ensaios morfológicos, impacta a medição do volume dos esferoides. Esses achados são fundamentais para a padronização de esferoides em culturas tridimensionais, auxiliando no desenvolvimento de modelos mais robustos para estudos biomédicos e farmacêuticos na área toxicologia e medicina regenerativa.

Palavras-chave: cultivo tridimensional; esferoides; análises morfológicas; padronização.

