UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE ARARAQUARA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCIÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA

Kelvin Sousa dos Santos

DESENVOLVIMENTO DE MODELO TRIDIMENSIONAL DE CULTURA CELULAR PARA ESTUDOS DE INTERAÇÃO FUNGO-HOSPEDEIRO

Araraquara

2020

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE ARARAQUARA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCIÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA

Kelvin Sousa dos Santos

DESENVOLVIMENTO DE MODELO TRIDIMENSIONAL DE CULTURA CELULAR PARA ESTUDOS DE INTERAÇÃO FUNGO-HOSPEDEIRO

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia aplicadas à Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara – UNESP como pré-requisito para obtenção do título de Mestre.

ORIENTADOR: PROF. DR. ANDREI MOROZ

COORIENTADORA: PROFª. DRª. ANA MARISA FUSCO ALMEIDA

Araraquara

2020

Santos, Kelvin Sousa dos.
S237d Desenvolvimento de modelo tridimensional de cultura celular para estudos de interação fungo-hospedeiro / Kelvin Sousa dos Santos. – Araraquara: [S.n.], 2020.
97 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. "Júlio de Mesquita Filho". Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia. Área de concentração:.

Orientador: Andrei Moroz.
Coorientadora: Ana Marisa Fusco Almeida.

1. Cultura 3D. 2. Alginato de sódio. 3. Interação fungo-hospedeiro. 4. Pérolas de alginato. I. Moroz, Andrei, orient. II. Almeida, Ana Marisa Fusco, coorient. III. Título.

Diretoria do Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP - Campus de Araraquara

CAPES: 33004030081P7
Esta ficha não pode ser modificada

KELVIN SOUSA DOS SANTOS

DESENVOLVIMENTO DE MODELO TRIDIMENSIONAL DE CULTURA CELULAR PARA ESTUDOS DE INTERAÇÃO FUNGO-HOSPEDEIRO

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia aplicadas à Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara – UNESP como pré-requisito para obtenção do título de Mestre.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Andrei Moroz – (Orientador) Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP FCF)

Profa. Dra. Elenice Deffune – Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP FMB)

Profa. Dra. Renata Rosito Tonelli – Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP)

Este trabalho foi desenvolvido na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara/SP – UNESP, sendo o mestrando contemplado com bolsa do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq. O projeto contou, também, com auxílio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP (processo nº 2013/05853-1)

Dedicatória

Dedico este trabalho as pessoas que me permitiram chegar até aqui, a minha mãe Angela que sempre apoiou todas as minhas decisões, e ao meu pai Nilson.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter me dado várias oportunidades na vida, e dentre elas ter me feito escolher essa para esse momento.

Agradeço imensamente a minha mãe Angela por sempre concordar e apoiar todas as minhas escolhas sem questionamentos ou julgamentos, apenas desejando que tudo desse certo, e estando certa em todas as vezes que me aconselhou. Ao meu pai Nilson e todos os ensinamentos que me deu durante a minha vida, esses que guardarei para sempre.

A minha tia Odete Alegre pelos pequenos incentivos na minha educação, desde que era criança e que hoje se tornaram imensuráveis para mim.

A minha professora de ciências Erika Oliveira que já sabia que eu estaria aqui antes mesmo de mim, e que teve um papel enorme na minha vida acadêmica, obrigado por ter me incentivado desde criança a ler as revistinhas de ciência da escola e pelas histórias do seu mestrado e doutorado, mesmo que eu ainda não soubesse muito bem o que isso significava naquela época, e obrigado por sempre ter acreditado em mim.

Ao meu orientador Dr. Prof. Andrei Moroz por ter me recebido em seu laboratório, e ter me dado a oportunidade de trabalhar com o que eu sempre tive vontade de fazer, agradeço pela orientação e todo trabalho que realizamos aqui.

A minha coorientadora Profª Drª Marisa Fusco Almeida, por ter me recebido também no núcleo de proteômica com tanta prontidão e pela importante ajuda no desenvolvimento desse trabalho, deixando seu laboratório de portas abertas para mim, muito obrigado.

A Profª Drª Maria José, pela importante receptividade no núcleo de proteômica, assim como nas reuniões do grupo de Micologia que foram de grande ajuda.

Ao pessoal do meu laboratório por tornar tempos difíceis, em dias mais leves, Marina Fontes por ter me ensinado tanto sobre cultura de celular, sempre vou lembrar de tudo que aprendi com você em cada coisinha que eu fizer, agradeço também a Franciny por toda ajuda, e ao Breno que mesmo a pouco tempo no laboratório ja foi

de grande ajuda, espero que vocês continuem contribuindo para a área de anticorpos monoclonais do nosso laboratório.

As pessoas que me ajudavam nos momentos de maior desespero, Junya Singulani e Lariane Teodoro, Junya muito obrigado por sempre ter tirado todas as minhas dúvidas, mesmo que as vezes a uma grande distância, por sua seriedade e todos os conselhos. Lari muito obrigado por toda a ajuda com o Pb, sempre vou lembrar também de toda a sua ajuda e das histórias compartilhadas entre as nossas graduações que mesmo em lugares diferentes, eram sempre tão parecidas, agradeço da paciência de vocês.

A minha amiga Nathália Fregonezi que passou uma graduação inteira comigo compartilhando dos mesmos sofrimentos diários dos estágios do 4ª ano, e que só a gente sabe como foi. Obrigado por ter me acompanhado nesse mestrado, e por toda a amizade que construímos nesses conturbados 6 anos, olha só quanto tempo já faz. Quem eu vi fazer a matrícula na faculdade mesmo sem me conhecer, e que ainda quase 4 anos depois eu vi casar. Muito obrigado Nat.

As minhas amigas da faculdade da bancada 1, Amanda, Mariana, Giovanna, e Bruna. A Monalisa e a Ju Sorbo também.

Aos meus professores do 4ª ano de biomedicina, que com certeza foram imprescindíveis para que eu pudesse chegar aqui, Miriane, Adilson, Patrícia, Andrezza, Flávia e principalmente a Juliana Monteiro que me ensinou micologia com muito sacrifício a quem não gostava de leveduras, e que sempre ensinou sua disciplina com muito amor pelo que faz.

A Cláudia Tavares, pela ajuda com os equipamentos do laboratório, com as minhas dúvidas de cultura de células, e pelos cafés. Ao pessoal antigo do laboratório que eu tive o prazer de conhecer a tempo, Haroldo, Priscila, Panta e Laranja.

Ao projeto PIPE Fase II 17/50354-4 da FAPESP e a profª Ketylin Migliato que também foi de ajuda nesse projeto, assim como o projeto FAPESP 8/19083-7 do prof Andrei. Ao CNPQ pela bolsa de mestrado. A todos citados meu muito obrigado.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Termodimorfismo. 31

Figura 2. Distribuição geográfica da paracoccidioidomicose no Brasil. 33

Figura 3. Fatores de virulência.. 34

Figura 4. Morfologia das linhagens A549 e MRC-5.. 45

Figura 5. Encapsulação das células em pérolas de alginato. 46

Figura 6. Microscopia invertida de contraste de fase durante o cultivo celular da linhagem A549 registrada após 24 horas de cultivo.. 47

Figura 7. Microscopia invertida de contraste de fase durante o cultivo celular da linhagem A549 registrada após 144 horas de cultivo. 47

Figura 8. Microscopia em campo claro adquirida pelo equipamento *In Cell Analyzer* 2000 das pérolas de alginato..... 48

Figura 9. Viabilidade celular pelo método de *trypan blue*. 49

Figura 10. Gráfico representando a densidade celular avaliada no período de sete dias para monocamada e modelo 3D. 50

Figura 11. Atividade metabólica das células A549. 51

Figura 12. Atividade metabólica das células MRC-5.. 52

Figura 13. Infecção A549 em campo claro, pelo *In Cell Analyzer* 2000, objetiva de 20x. 54

Figura 14. Infecção A549 em campo claro, pelo *In Cell Analyzer* 2000, objetiva de 20x aumento de z-stacks. 54

Figura 15. Infecção A549 em campo claro, pelo *In Cell Analyzer* 2000, objetiva de 20x. 55

Figura 16. Infecção A549 em campo claro, pelo *In Cell Analyzer* 2000, objetiva de 20x aumento de z-stacks. 56

Figura 17. Infecção MRC-5 em campo claro, pelo *In Cell Analyzer* 2000, objetiva de 20x. 57

Figura 18. Infecção MRC-5 em campo claro, pelo *In Cell Analyzer* 2000, objetiva de 20x. 9. 58

Figura 19. Infecção MRC-5 em campo claro, pelo *In Cell Analyzer* 2000, objetiva de 20x aumento de z-stacks. 59

Figura 20. Microscopia em fluorescência adquirida pelo equipamento *In Cell Analyzer 2000* 61

Figura 21. Microscopia em campo claro adquirida pelo equipamento In Cell Analyzer 2000 61

Figura 22. Microscopia em campo claro adquirida pelo equipamento In Cell Analyzer 2000 62

Figura 23. Microscopia em campo claro adquirida pelo equipamento In Cell Analyzer 2000 63

Figura 24. Controle de microscopia em campo claro adquirida pelo equipamento *In Cell Analyzer 2000* 64

Figura 25. Microscopia em campo claro adquirida pelo equipamento *In Cell Analyzer* 2000 65

Figura 26. Microscopia em campo claro adquirida pelo equipamento In Cell Analyzer 2000 65

Figura 27. Controle de microscopia em campo claro adquirida pelo equipamento *In Cell Analyzer 2000* 66

Figura 28. Microscopia confocal de uma pérola de alginato infectada durante o período de 72h horas com o fungo Pb18.. 67

Figura 29. Microscopia confocal de uma pérola de alginato infectada durante o período de 120 horas com o fungo Pb18 (Pb18). 68

Figura 30. Microscopia confocal de uma pérola de alginato infectada durante o período de 120 horas com o fungo Pb18 (Pb18). 69

Figura 31. Isolamento do Pb18 em meio de cultura sólido para contagem de UFC Imagem de placas de petri contendo meio de cultura BHI suplementado com colônias isoladas de Pb18 pós infecção das células A549 e MRC-5.. 70

Figura 32. Gráfico de UFC isolados pós infecção das células em monocamada e modelo 3D. 71

Figura 33. Microscopias em campo claro do modelo 3D de tapete de alginato... 71

Figura 34. Modelo de camadas de alginato MRC-5/A549 0h. Microscopia adquirida pelo *In Cell Analyzer 2000*, dividida em 18 z-stacks, em objetiva de 20x com 0 horas de cultivo. 72

Figura 35. Modelo de camadas de alginato MRC-5/A549 48h. 72

Figura 36. Modelo de camadas de alginato MRC-5/A549 168h.. 74

Figura 37. Modelo de camadas de alginato MRC-5/A549. Microscopia adquirida pelo *In Cell Analyzer* 2000, dividida em 15 *z-stacks*, em objetiva de 20x com 168h horas de cultivo.. 75

Figura 38. Valores de conteúdo de RNA extraídos das amostras de infecção... 96

Figura 39. Gel de agarose do RNA da infecção células-Pb18. 97

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Valores de análise estatística da atividade metabólica A549 (figura 11). 51
Tabela 2. Valores de análise estatística da atividade metabólica A549 (figura 12). 52

LISTA DE ABREVIATURAS

% - porcentagem

14-3-3 – proteína de domínio da família 14-3-3

3D – tridimensional

3D MEC – Tridimensional mais matriz-extracelular

A549 – linhagem celular epitelial de adenocarcinoma pulmonar

ATCC – *American Type Culture Collection*

BCRJ – Banco de Células do Rio de Janeiro

BHI – *brain heart infusion*

cm^{2} - centímetro quadrado

cm^{3} – centímetro cúbico

CN – controle negativo

CO_2 – gás carbônico

CP – controle positivo

CW – *calcofluor white*

DAPI - *4',6'-diamino-2-fenil-indol*

DMEM – *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

FITC - isotiocianato de fluoresceína

GAPDH – *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*

Gp43 – antígeno imunodominante da família *glycosyl hydrolase* 5

h – hora

hrs – horas

*Image*J – *software* para configuração e tratamento de imagens

L – litro

M – monocamada

MEC – matriz-extracelular

mL – mililitro

M MEC – monocamada mais matriz-extracelular

MRC-5 – linhagem celular de fibroblastos normais pulmonares

NaCl – cloreto de sódio

nm – nanômetros

ºC – graus Celsius

Pb – *Paracoccidioides spp.*

Pb18 – cepa de *Pb18*

PBS – *phosphate buffered saline*

PCR – reação em cadeia da polimerase

pH – potencial de hidrogênio

RNA – ácido ribonucleico

rpm – rotações por minuto

SFB – soro fetal bovino

stack – agrupamento de imagens

UFC – unidades formadoras de colônias

UV - ultravioleta

z-stack – fatia de imagem

α - alfa

β - beta

µg - microgramas

µL – microlitros

RESUMO

A cultura em monocamada tem sido um método padrão e bem estabelecido para diferentes análises celulares *in vitro*, tais como testes de citotoxicidade, mutagenicidade, genotoxicidade e infecções celulares por microrganismos para estudos de doenças. Entretanto, uma das desvantagens desse método são as limitações impostas devido às discrepâncias biológicas entre a cultura em monocamada e o organismo vivo, tridimensional (3D). Existem diversos estudos na literatura que exemplifica a alta semelhança entre culturas 3D e organismos vivos, os quais tem o potencial de gerar dados complementares devido a maior complexidade observada nestes modelos propostos. O presente trabalho propõe o desenvolvimento um modelo alternativo para testes celulares, o qual será envolvido por uma matriz polimérica de alginato de sódio, perfazendo, assim, uma cultura de células 3D. Dessa forma, nessa dissertação, propõe-se uma análise adicional da interação fungo-hospedeiro, utilizando o patógeno *Paracoccidioides brasiliensis* (Pb18*)* como o organismo infectante, o qual até então fora estudado em modelos compostos por uma única camada celular, frequentemente denominada de monocamada. Para o preparo do modelo, uma suspensão de células A549 e MRC-5 foram adicionadas a uma solução de alginato de sódio que foi gotejada em outra solução (cloreto de cálcio) causando a microencapsulação das células em pérolas de alginato, as quais foram monitoradas diariamente em microscopia invertida com contraste de fase e fluorescência. Foram avaliados parâmetros como viabilidade celular (citotoxicidade), atividade metabólica, progressão do número de células (proliferação) utilizando diferentes métodos para ambas as células. Após esta caracterização inicial do modelo 3D, este foi infectado com *P. brasiliensis* por tempo a ser padronizado e as pérolas foram divididas para dois experimentos: i) verificação da presença do fungo dentro do arcabouço e sua possível interação com as células indicadas, utilizando microscopia confocal; ii) tentativa do isolamento do fungo de dentro da pérola e subsequente plaqueamento em meio de cultura próprio. O modelo proposto apresentou baixa citotoxicidade às células A549, indícios de aumento da densidade celular (indicativo de proliferação celular) e manutenção da viabilidade celular durante a maior parte do período de cultivo. Durante as análises de infecção utilizando microscopia confocal, foi possível verificar a presença do fungo dentro do arcabouço testado, o qual foi, então, isolado do mesmo e cultivado em meio de cultura, mostrando também que os componentes da matriz extra-celular

possuem influencia no processo de infecção no modelo tridimensional proposto, além da célula A549 ter se mostrado ideal para estudos de interação tanto para o modelo 3D quanto para a monacamada.

Palavras-chave: Cultura 3D. Alginato de sódio. Interação fungo- hospedeiro. Pérolas de alginato.

ABSTRACT

Monolayer culture has been a standard and well-established method for different in vitro cell analyses, such as cytotoxicity, mutagenicity, genotoxicity and cellular infections by microorganisms for disease studies. However, one of the disadvantages of this method is the limitations imposed due to biological discrepancies between monolayer culture and the living tridimensional (3D) organismo. There are several studies in the literature that exemplify the high similarity between 3D cultures and living organisms, which have the potential to generate complementary data due to the greater complexity observed in these proposed models. The present work proposes the development of an alternative model for cellular tests, which will be surrounded by a polymeric matrix of sodium alginate, thus making a culture of 3D cells. Thus, in this dissertation, an additional analysis of the fungus-host interaction is proposed, using the pathogen Paracoccidioides brasiliensis (Pb18) as the infecting organism, which until then had been studied in models composed of a single cell layer, often called monolayer. For model preparation, a suspension of A549 and MRC-5 cells was added to a sodium alginate solution which was dripped into another solution (calcium chloride) causing cell microencapsulation in alginate pearls, which were monitored daily under inverted microscopy with phase contrast and fluorescence. Parameters such as cell viability (cytotoxicity), metabolic activity, progression of the number of cells (proliferation) were evaluated different methods for both cells. After this initial characterization of the 3D model, this was infected with P. brasiliensis for time to be standardized and the pearls were divided for two experiments: i) verification of the presence of the fungus within the framework and its possible interaction with the indicated cells, using confocal microscopy; ii) attempt to isolate the fungus from within the pearl and subsequent plating in its own culture medium. The proposed model showed low cytotoxicity to A549 cells, evidence of increased cell density (indicative of cell proliferation) and maintenance of cell viability during most of the culture time. During the analysis of infection using confocal microscopy, it was possible to verify the presence of the fungus within the tested framework, which was then isolated from it and grown in culture medium, also was observed that the components of the extra-cellular matrix have

an influence on infection process in the three-dimensional model, in addition to the A549 cell presentes an ideal type of culture for interaction studies as the 3D model as the monolayer.

Keywords: 3D culture. Sodium alginate. Fungus-host interaction. Alginate beads.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 23
1.1 Modelos de cultura 3D para pesquisa em ciências biomédicas 23
1.1.1 Órgão em um chip (*organ on a chip*) 25
1.1.2 Esferóides 26
1.1.3 Arcabouços (*scaffolds*): rígidos ou semi-sólidos 27
1.1.4 Cultura em botão celular (*cell pellet*) 27
1.1.5 Encapsulação 28
1.2 Uso de culturas 3D como modelo de infecção para microrganismos 29
1.3 Paracoccidioidomicose 30
1.4 Problemática das doenças fúngicas 32
1.5 Patogenia e Fatores de Virulência 33
2. OBJETIVOS 36
2.1 Objetivo Geral 36
2.2 Objetivos Específicos 36
3. MATERIAIS E MÉTODOS 37
3.1 Expansão das células pulmonares e confecção do banco de células 37
3.2 Padronização da encapsulação celular em alginato 37
3.3 Caracterização do arcabouço 3D em pérola 38
3.3.1 Avaliação da viabilidade celular em câmara de Neubauer 38
3.3.2 Avaliação da densidade celular em câmara de Neubauer 38
3.3.3 Acompanhamento do cultivo celular por microscopia de contraste de fase e microscopia em campo claro (*In Cell Analyzer* 2000) 38
3.3.4 Monitoramento da viabilidade celular utilizando o método colorimétrico resazurina 39

3.3.5 Cultivo de *Paracoccidioides brasiliensis* 39
3.3.6 Infecção do modelo tridimensional com *Paracoccidioides brasiliensis*. 39
3.3.8 Microscopia confocal do experimento de infecção 41
3.3.9 Isolamento do Paracoccidioides brasiliensis pós infecção do modelo 3D 42
3.3.10 Extração RNA para análise de expressão de adesinas..... 42
3.4 Padronização do modelo de tapete celular em arcabouço de alginato 43
3.4.1 Acompanhamento do cultivo celular do modelo arcabouço em tapete de alginato por microscopia de contraste de fase e microscopia em campo claro (*In Cell Analyzer* 2000) 43
3.5 Análises estatísticas..... 44
4. RESULTADOS 45
4.1 Padronização da encapsulação celular em alginato 45
4.2 Acompanhamento do cultivo celular por microscopia de contraste de fase e microscopia em campo claro (*In Cell Analyzer* 2000) 47
4.3 Avaliação da viabilidade celular em câmara de Neubauer..... 48
4.4 Avaliação da densidade celular em câmara de Neubauer 49
4.5 Monitoramento da viabilidade celular através da atividade metabólica 50
4.6 Cultivo de *Paracoccidioides brasiliensis* 53
4.7 Microscopias pelo *In Cell Analyzer* 2000 do experimento de infecção 53
4.7.1 Microscopia em campo claro do modelo de peróla de alginato pelo *In Cell Analyzer 2000* 53
4.7.2 Microscopia de fluorescência do modelo de pérola de alginato pelo *In Cell Analyzer* 2000 60
4.8 Microscopia confocal do experimento de infecção..... 66
4.9 Isolamento do *Paracoccidioides brasiliensis* após infecção do modelo 3D. 70
5. DISCUSSÃO 76
6. CONCLUSÃO..... 82

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS 83
8. ANEXO 93

1. INTRODUÇÃO

1.1 Modelos de cultura 3D para pesquisa em ciências biomédicas

Diversos métodos de ensaios *in vitro* foram desenvolvidos com base em cultura de células e tecidos humanos, a maioria destes baseados em células depende do crescimento ancorado das mesmas como monocamadas bidimensionais (2D). Estas células, geralmente imortalizadas, permitem etapas de trabalho em culturas simples e eficientes (VERJANS, et. al, 2018). As culturas de células 2D servem como o principal método *in vitro* da pesquisa celular básica e frequentemente são empregadas para estudos de atividade, metabolismo e toxicidade de fármacos antes das etapas *in vivo* (OECD No. 129, 2010). Para o rastreio de medicamentos oncológicos, os ensaios de citotoxicidade são tipicamente realizados em linhagens celulares tumorais estabelecidas, cultivadas em culturas de monocamada, pois estas possuem uma rápida velocidade de proliferação, além disso, faz-se o uso também de linhagens celulares transformadas (ADAN; KIRAZ; BARAN, 2016). Esses tipos de células imortalizadas geralmente não se assemelham à função celular nativa encontrada nas células primárias normais, mas são selecionados para um objetivo específico de pesquisa, devido ao aumento da capacidade proliferativa ou maior eficiência de revestimento (da HORA, et. al, 2019).

A introdução de coculturas, onde células de diferentes fenótipos são cultivadas no mesmo ambiente, representa um maior grau de semelhança *in vivo* em comparação com a cultura em monocamada. (BAKER; CHEN, 2012). Estes sistemas mais avançados são particularmente úteis em estudos que visam entender as interações entre células tumorais epiteliais e células estromais (MOROZ, et. al, 2013[2]) e em estudos nos quais é importante a interação célula-célula para a correta diferenciação de células-tronco ou a manutenção do fenótipo diferenciado de células-tronco que passaram pelo processo de diferenciação (MOROZ, et. al, 2013[1]).

Especificamente, os tecidos epiteliais (tecido de interesse da presente dissertação) são compostos de células dispostas em folhas com fortes ligações intercelulares, que formam barreiras físicas revestindo as cavidades dos principais órgãos (pulmão, pele, intestino, etc.) e os protegem de ações físicas, químicas e

microbianas externas (SCHIMEK, et. al, 2018; BARKAUSKAS, et. al, 2017). Muitos tecidos epiteliais possuem arquitetura espacial tridimensional (3D), como tecidos alongados, tecidos compactos, invaginações, evaginações e morfologias onduladas. Tais estruturas complexas podem gerar gradientes de fatores bioquímicos que conduzem à compartimentalização dos diferentes tipos de células e são determinantes para funções específicas de órgãos (TORRAS, et al, 2018). Modelos funcionais *in vitro* de monocamada são importantes para pesquisa básica, modelagem de doenças, descoberta de medicamentos e substituição de tecidos perfazendo uma demanda crescente por modelos *in vitro* que são capazes de reproduzir a complexa arquitetura epitelial dos tecidos *in vivo.* No entanto, ainda que os modelos 2D possam fornecer informações úteis sobre respostas biológicas precoces e sejam adequados para a triagem de medicamentos de alto rendimento, eles possuem limitada capacidade preditiva (XU; FARACH-CARSON; JIA, 2015).

Atualmente, a maioria dos ensaios com culturas de células em monocamadas as cultivam em substratos planos e rígidos, porém as células raramente encontram tais situações (SKROBANSKA, et. al, 2014); ao contrário, normalmente situam-se em ambientes 3D e são cercadas por outras células e componentes de matriz extracelular (MEC) em todas as direções. Portanto, embora a cultura 2D ainda seja um método importante para estudos baseados em células, pois gera resultados rápidos, suas limitações foram gradativamente observadas em relação às culturas 3D (DAUD, et. al, 2012; SKROBANSKA, et. al, 2014; YI, et. al, 2017; LIN, et. al, 2020). Em um esforço para superar essas limitações e em uma espécie de mudança de paradigma, surgiram modelos 3D que capturaram, de maneira mais fiel, as respostas fisiológicas complexas *in vitro*, mimetizando o ambiente natural do tecido (EDMONDSON, et. al, 2014). Existem muitas características pelas quais esses modelos se assemelham a tecidos sadios e a tumores *in vivo*, incluindo interações célula-célula, presença de componentes de matriz, hipóxia, necrose central e resistência a medicamentos (DAUD, et. al, 2012; EDMONDSON, et. al, 2014; XU; FARACH-CARSON; JIA, 2015; YI, et. al, 2017).

Como as matrizes de células 3D representam melhor o ambiente de sinalização física e química, elas atraíram a atenção da comunidade científica e foram utilizadas para diversas aplicações biomédicas/biotecnológicas, tais como como engenharia de tecidos e medicina regenerativa (RAVI, et. al, 2014). Estudos de eficácia terapêutica associados com modelos 3D também apresentaram diferenças marcantes nas respostas quando os mesmos são confrontados com culturas em monocamada (CHEN, et. al, 2016). Além disso, modelos 3D são vastamente utilizados para estudos de *screening* de fármacos, muitas vezes buscando gerar similaridades com tumores sólidos a fim de reproduzir algumas das situações que acontecem *in vivo* (GODUGU, et. al, 2013).

Atualmente, existem diversas maneiras de se realizar um cultivo 3D: **i)** órgão em um *chip* (*organ on a chip*); **ii)** esferoides; **iii)** uso de arcabouços porosos rígidos; **iv)** culturas em botão celular (*cell pellet*) e **v)** encapsulação em arcabouços líquidos-sólidos, revisados abaixo.

1.1.1 Órgão em um *chip* (*organ on a chip*)

Órgãos em *chips* são sistemas de cultura de células em sistemas microfluídicos que recapitulam, *in vitro*, a estrutura, função, fisiologia e patologia dos órgãos humanos. Eles foram originalmente fabricados se embasando em métodos adaptados da fabricação de *microchips* de computadores (BEIN, et. al, 2018). O modelo se baseia inicialmente na produção de uma pastilha de silício gerada por fotolitografia coberta com material fotorresistente a luz ultravioleta. O polidimetilsiloxano (PDMS) é então derramado nesse molde, criando assim uma cópia positiva e, posteriormente, essa cópia é selada em uma lâmina de vidro, formando canais de circuito fechado. Todo esse processo é conhecido como litografia refinada. O PDMS é comumente utilizado na miniaturização de órgãos devido às suas propriedades de biocompatibilidade, facilidade em moldar e transparência, permitindo sua fácil visualização (MITTAL, et. al, 2018). Esses dispositivos contêm micro canais ocos criados em microdispositivos poliméricos ou de vidro, revestidos por células vivas (MITTAL, et. al, 2019). Huh, et al. (2012) criaram um chip de pulmão capaz de simular um edema pulmonar a fim de direcionar estudos de medicamentos para esses modelos, enquanto GAO, et al.

(2013) utilizaram células imortalizadas de intestino (CACO-2) para estudos de permeabilização de fármacos, todos esses estudos procuram usar modelos mais complexos com a intenção de aprimorar as respostas obtidas em culturas em monocamada.

1.1.2 Esferoides

Os primeiros relatos de organização celular em esferóides surgiram de acordo com Harmer, (1922); Ellison, (1922); Howarth, (1931), pelo relato de casos de carcinoma onde as lesões apresentavam condições esféricas e se classificavam com essa denominação. Atualmente esse termo compreende técnicas de agregamento de células que tem como principal objeto de estudo a mimetização de tumores com a finalidade de estudar potenciais fármacos (CESAZRS; TAMAMÁ, 2016). A cultura 3D em esferoides se define por manter algumas características fisiológicas mais preservadas (KIM, et. al, 2018). Para a formação desse modelo, as células precisam ser cultivadas em uma condição que não lhes permita aderir a uma superfície sólida e Friedrich, et. al, (2009) descreveu um importante método de fácil execução para formação de esferoides, além de citar linhagens celulares com possíveis dificuldades em se organizarem nessas condições. Posteriormente, publicações também descreveram atualizações e guias sobre maneiras de realizar *screening* de fármacos com estes modelos, citando vantagens tais como observação da massa tumoral, presença de zonas com baixas concentrações de oxigênio - também presentes em tumores *in vivo* - e a similaridade encontrada nos tecidos em relação a dificuldade de acesso de fármacos antineoplásicos. É citado também que neste modelo a resposta das células cancerígenas às intervenções terapêuticas é melhor reproduzida na cultura esferoidal *in vitro* do que na cultura aderente 2D (FRIEDRICH, et. al, 2007[1]; FRIEDRICH, et. al, 2007[2]). Quanto às limitações desse método citam-se que devido a sua estrutura esferoidal, a difusão de nutrientes, oxigênio e resíduos pelo interior dos esferoides é comprometida dependendo do tamanho dos esferoides (CESAZRS; TAMAMÁ, 2016).

1.1.3 Arcabouços (*scaffolds*): rígidos ou semi-sólidos

Culturas utilizando arcabouços - ou andaimes -, podem ser geradas usando vários polímeros naturais (colágeno, gelatina, elastina, fibroína, quitosana, quitina, fibrina, fibrinogênio, plasma rico em plaquetas, celulose, etc.) além de materiais sintéticos (MOROZ, et. al, 2013[1]; MOROZ, et. al, 2013[2]; RAVI, et. al, 2014). Alguns destes possuem sua porosidade variada de forma que ela possa ser grande o suficiente para acomodar uma célula, porém suficiente para a difusão de nutrientes, uma vez que as células estão contidas dentro deste andaime (SATO, et. al, 2002). A natureza do comportamento das células nos sistemas 3D pode ser influenciada pelo tipo de arcabouço ou matriz utilizada e muitos tipos foram desenvolvidos atualmente para uso de cultura de células 3D. Além disso, o tipo de arcabouço ou matriz dependerá do tipo de célula que está sendo cultivada e também conforme determinado pelo objetivo e natureza do estudo (ABE, et. al, 2004; UEMURA, et. al, 2003; TAKEZAWA, et. al, 2004). Ainda existem grupos que utilizam matrizes extracelulares naturais e sintéticas, tecidos descelularizados, híbridos naturais e sintéticos, metais, cerâmicas, vidros bioativos e nanotubos de carbono, onde cada um dos arcabouços e matrizes possuem propriedades características e podem ser usados para uma aplicação específica, suprindo alguma necessidade específica para aquele microambiente (EVARISTO, et. al, 2014; BERTANHA, et. al, 2014; AAMODT; GRAINGER, 2016; JÍMENEZ-GASTÉLUM, 2019; LERMAN, et. al, 2018; CIRALDO, et. al, 2018; FAN; STAUFER; ACCARDO, 2019).

1.1.4 Cultura em botão celular (*cell pellet*)

Outro método 3D de estudos de células é a cultura em botão, método que compreende o ato de centrifugação de um conjunto de células, em tubo cônico, com o intuito das mesmas se agregarem formando um botão (em inglês, *pellet)* no fundo do tubo. Composto por agregados celulares, esse método viabiliza aumentar a complexidade da cultura em relação a culturas em monocamada (ZHANG, et. al, 2004). Muitos estudos que utilizam esse processo estão direcionados a estudos de condrócitos (ZHANG, et. al, 2004; CAPITO; SPECTOR, et. al, 2006; STEWART, et. al, 2009; PARK, et. al, 2006). Nestes

estudos, foi observado que na cultura em monocamada os condrócitos frequentemente mudam seu fenótipo para fibroblastoide e passam a secretar colágeno tipo I, perdendo a capacidade de expressar colágeno tipo II, típico do tecido cartilaginoso hialino (SCHNABEL, et. al, 2002). Ao reintroduzirem as células em ambiente 3D, usando a cultura em *pellet*, os autores observaram a reversão do efeito: as células voltaram a expressar colágeno tipo II.

Capito e Spector (2006) utilizaram os *pellets* para avaliação da diferenciação de condrócitos, e observaram que culturas em monocamada produziam pouca quantidade de glicosaminoglicanos (GAGs) mesmo quando utilizado um meio de cultura ricamente suplementado, enquanto as culturas em *pellets* produziam altas concentrações de GAGs, *agrecam* e colágeno tipo II, sem a necessidade de suplementação utilizada no cultivo em monocamada.

Outro estudo comparativo relatou que os componentes de MEC que são gerados durante o cultivo em *pellets* não são observados em culturas de explantes, mostrando que estes são inferiores quando comparados com o método 3D em *pellet* (STEWART, et. al, 2009). Corroborando estes resultados, Zhang, et. al, (2004) compararam *pellets* e explantes e observaram aumento da densidade de condrócitos nos *pellets* duas vezes maior em relação à cultura de explantes.

1.1.5 Encapsulação

Dentre os métodos citados para sistemas de cultura de células 3D, o encapsulamento celular é uma alternativa promissora para formar um esferoide celular com uso de um arcabouço e tem potencial significativo para aplicações de engenharia de tecidos ou modelos de triagem de drogas (MOROZ, et. al, 2013[1]; EDMONDSON, et. al, 2014; MAROUNEK, et. al, 2017). Das potenciais substâncias utilizadas, o alginato de sódio se destaca, sendo um material constituído por cadeias poliméricas individualizadas, que está associada a um íon de sódio (CALIARI; BURDICK, 2016; MELVIK; DORNISH, 2004; DESAI; PARK, 2005). Quando o alginato de sódio é misturado com o cloreto de cálcio ($CaCl_2$), para cada íon de cálcio que interage com as cadeias de alginato, a mesma perde dois íons de sódio. Essa troca de íons tem como consequência a formação de

cadeias associadas entre si por um íon de cálcio (duas a duas) que antes estavam individualizadas (ANDERSEN; AUK-EMBLEM; DORNISH, 2015). O polímero formado possui uma constituição mais densa, sendo assim mais rígido. Essa reação química é instantânea, reversível, e por isso há a formação de pérolas observadas imediatamente após esse contato das soluções (TODD, 1970; LIMA; SOLDI; BORSALI, 2009), as quais podem ser posteriormente desfeitas para recuperação das células encapsuladas.

O material deve resistir ao processo de cultivo sem liberar seu conteúdo. Além disso, seu principal diferencial é a porosidade da matriz, a qual permite a difusão de nutrientes provenientes do meio de cultura, além de permitir o acúmulo de componentes produzidos pelas células encapsuladas (principalmente MEC) e, dependendo do tamanho dos poros, migração celular. O tamanho dos poros presentes no arcabouço pode ser alterado mediante a modificação da estrutura do gel, com combinação de diferentes tipos de biopolímeros, que agrega o aproveitamento das vantagens da composição química de cada composto, ou pela concentração de alginato utilizada (BITTENCOURT, et. al, 2009; PATIL et. al, 2010; SZEKALSKA, et. al, 2016).

1.2 Uso de culturas 3D como modelo de infecção para microrganismos

Como demonstrado, muitas vezes, métodos de cultivos 3D podem ser mais eficientes do que a cultura em monocamadas e um dos primeiros relatos de modelos 3D para estudar infecções, neste caso, virais, foi publicado por Long, et. al, (1998) e para infecções bacterianas por Nickerson, et. al, (2001). Como exemplo, o método de cultura *rotating-wall vessel* induz as células a manterem seu fenótipo, sem perda do mesmo; a constante rotação do aparelho permite também que as células se aglomerem através da rotação, aumentando a interação célula-célula e reforçando a agregação. Isso se dá devido a produção de importantes proteínas associadas com a ligação entra as células como ocludina, E-caderina e β-catenina. Além disso, também é observado o acúmulo de colágeno tipo IV, um importante constituinte da membrana basal. Comparativamente, seria necessário adicionar muitos compostos de MEC a uma

cultura em monocamada para se atingirem resultados semelhantes aos citados acima. Outros pesquisadores notaram que durante a infecção de agregados formados por rotação, foi observado que cepas de *P. aeruginosa* não possuem uma taxa de invasão tão eficaz quando comparada aos resultados obtidos em monocamadas, e precisam de um tempo maior de contato para causar danos severos aos grupos de células (CARTERSON, et. al, 2005).

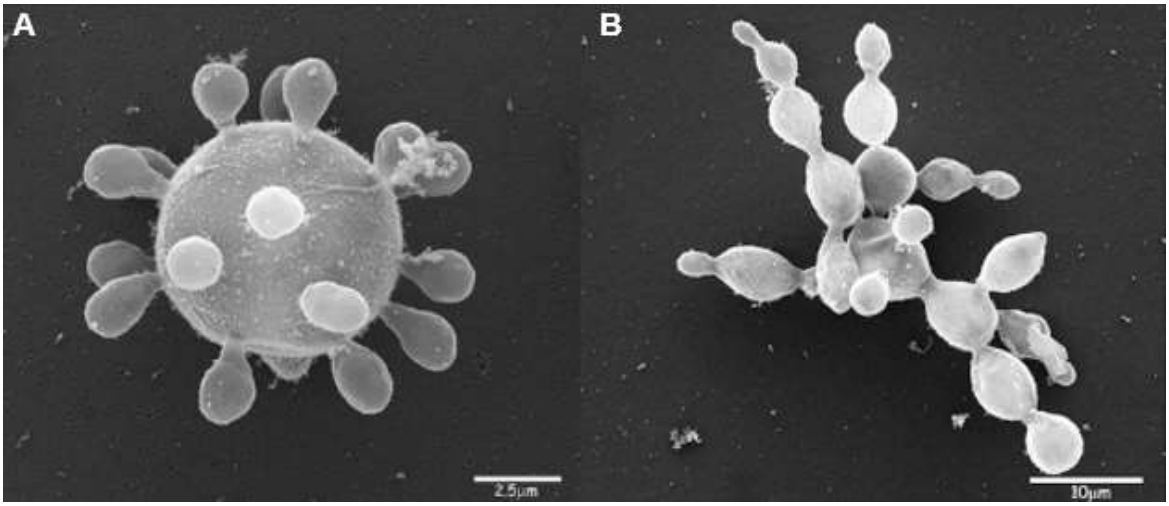
Diferentes métodos para culturas 3D já foram propostos. Segundo Wilkinson et. al, (2019), é possível realizar a co-cultura de diferentes tipos celulares envolvidos por hidrogéis - a presença dessa variedade de células gera uma organização complexa que é denominada pelos autores como organoides (DRIESSCHE, et. al, 2017). Chandorkar, et. al, (2017) recomendam o uso de células primárias em sistemas 3D pois, em comparação com linhagem celulares já estabelecidos, estas exibem maior semelhança com as células e tecidos originais. Foi demonstrado, em estudo que buscava mimetizar porções do pulmão, que as células dendríticas inseridas no modelo 3D eram capazes de migrar em resposta à ação de *Aspergillus.* No entanto, a obtenção de culturas primárias é um processo trabalhoso e complicado, requer tecido viável de biópsias, os quais são de difícil obtenção, portanto, muitos autores utilizam as linhagens para estes fins (DIAS, et. al, 2018).

1.3 Paracoccidioidomicose

A paracoccidioidomicose é uma doença fúngica que faz parte da lista de micoses endêmicas composta pela histoplasmose, blastomicose e coccidioidomicose, paracoccidioidomicose, sendo a última predominante em países da América Latina. Seu agente etiológico, denominado *Paracoccidoides spp.* é um fungo termodimórfico, que possui a capacidade de se converter de uma fase micelial, onde o fungo cresce em uma temperatura aproximada de 25ºC (temperatura ambiente), apresentando hifas septadas hialinas com artroconídios e clamidósporos, Figura 1); para a fase leveduriforme, que é encontrada a 37ºC (temperatura do corpo humano), possuindo uma célula de morfologia arredondada com multibrotamentos característicos dessa fase do microrganismo, Figura 1) (MARTINEZ, 2015).

Essa habilidade de variação morfológica é amplamente descrita na literatura como um fator de virulência fúngica. Esse patógeno é capaz de causar uma infecção que pode progredir para doença granulomatosa sistêmica com doença tegumentar e visceral. Além disso, também é descrita uma outra espécie denominada P. *lutzii* identificada no gênero *Paracoccidioides* com alta variabilidade antigênica, cuja área endêmica envolve as regiões Centro-Oeste e Norte do Brasil (MARTINEZ, 2015; SHIKANAI-YASUDA, 2017).

Figura 1: Termodimorfismo. A) Morfologia fúngica de levedura encontrada na temperatura de 37ºC; **B)** Morfologia fúngica da hifa encontrada em temperaturas de aproximadamente 25ºC.



Fonte: Adaptado de Gegembauer et al., 2014. Serology of Paracoccidioidomycosis due to *Paracoccidioides lutzii*. PLoS Neglected Tropical Diseases. vol.8 no.7, p. 3

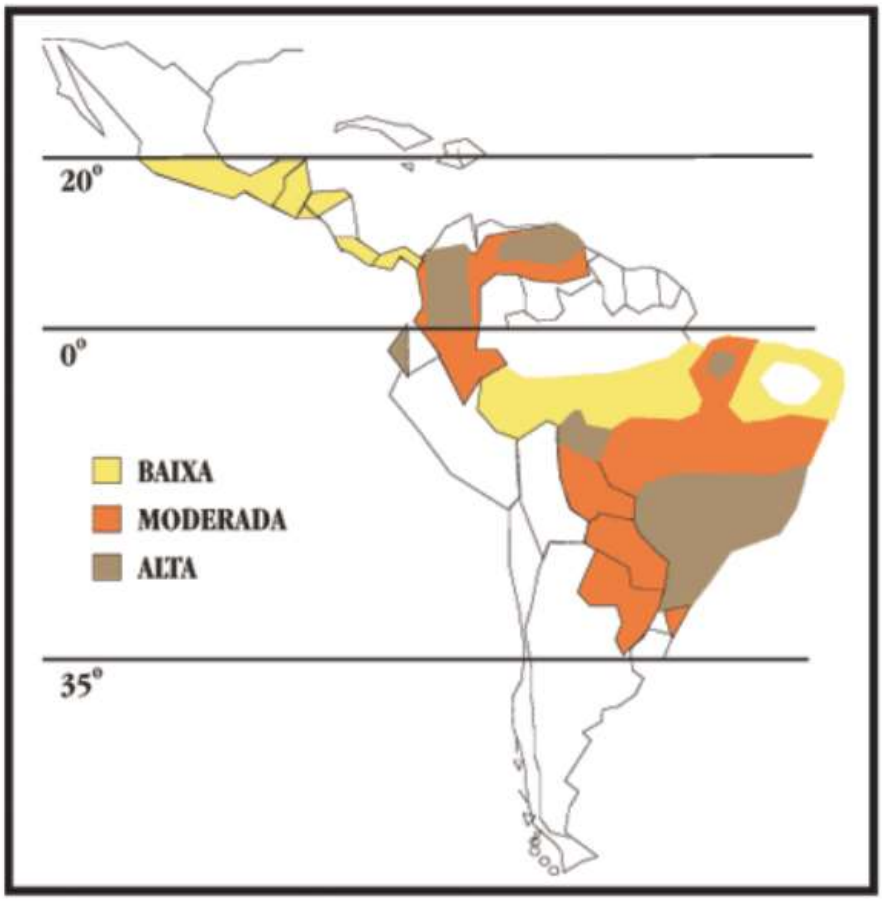
O curso natural da infecção por *P. brasiliensis* ocorre em homens e animais e é adquirida pela via respiratória após a inalação de conídios fúngicos suspensos no ar, que atingem a via respiratória chegando até o pulmão, importante local de tropismo do fungo (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010). Dentre as formas clínicas da paracoccidioidomicose, se categorizam: i) forma aguda ou subaguda (forma juvenil, frequente em indivíduos jovens), que representa em torno de 25% dos casos da doença, possui uma evolução rápida com a disseminação do fungo por vários órgãos e atuação do sistema fagocítico mononuclear, responsável pelo evidenciamento dos sintomas, dentre eles linfadenomegalia localizada ou

generalizada, que pode, na evolução, apresentar supuração, fistulização e hepatoesplenomegalia, além de manifestações digestivas, lesões cutâneas (ou de mucosas), envolvimento osteoarticular e, raramente, comprometimento pulmonar (FORTES, et. al, 2011; SHIKANAI-YASUDA, et. al, 2017); ii) forma crônica (frequente em adultos) que tem predominância de 74 a 96% dos casos no sexo masculino, a qual se instala de forma mais lenta, com duração da sintomatologia acima de quatro meses. Esse curso silencioso da doença dificulta o diagnóstico que, quando feito, se deve a *check-ups* realizados pelo paciente. Uma característica importante desse estágio é o comprometimento pulmonar presente em 90% dos casos. (SHIKANAI-YASUDA, et. al, 2017). Infecções por *Paracocidioides* também apresentam um perfil comum de manifestação clínica oral, com presença de lesões com úlceras granulomatosas na mucosa labial fazendo com que a doença seja frequentemente diagnosticada por dentistas (MARQUES, et. al, 1983; SPOSTO, et. al, 1994; MARQUES, 2008; TOLENTINO, et. al, 2010).

1.4 Problemática das doenças fúngicas

Há sugestões de que a endemicidade da paracoccidioidomicose prevaleça na América Latina (Figura 2), pois os casos distantes desse local referem-se a pessoas que alguma vez residiram na América (SHIKANAI-YASUDA, et. al, 2009). Além disso, é notório que sua frequência se destaque em trabalhadores rurais, agricultores, operários da construção civil e que sua incidência seja maior em homens do que em mulheres, devido a presença de uma proteína citosólica no fungo que é capaz de se ligar ao hormônio 17-β-estradiol, onde a ação desse hormônio dificulta a periodicidade da transformação da fase micelial para a fase leveduriforme, reduzindo assim a hegemonia da doença no sexo feminino (RESTREPO, et. al, 1984). É conhecido que a ação do estrógeno estimula a produção de IL-12; Pinzam, et al. (2010) correlacionaram que durante a ação da paracoccina produzida pelo fungo no período da infecção são produzidos um conjunto de citocinas (IL-12. IFN-γ e TNF-α) em resposta a mesma, que tem relação com o desenvolvimento de um perfil protetivo de resistência a doença, uma vez que há o impedimento da transformação do fungo em levedura.

Figura 2: Distribuição geográfica da paracoccidioidomicose no Brasil. Representação dos níveis de distribuição da doença nas américas, sendo o Brasil uma área endêmica da doença



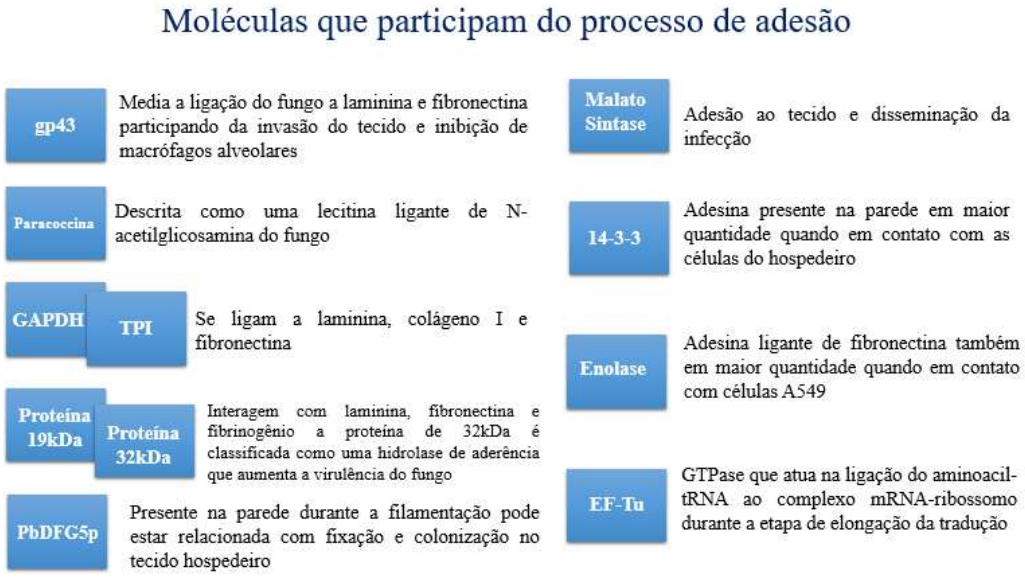
Fonte: Shikanai et al., 2006. Consenso em paracoccidioidomicose. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. vol.39 no.3, p. 297-310.

1.5 Patogenia e fatores de virulência

Os agentes de micoses possuem alguns aspectos que podem auxiliar o seu crescimento em condições adversas e favorecer o estabelecimento da patologia. O estudo de determinantes que participam desse processo de virulência pode facilitar a compreensão de eventos característicos das doenças causadas por fungos (CAMACHO; NIÑO-VEJA, 2017). Além de eventos relacionados a essa interação fungo-hospedeiro, também se ressalta o estudo para possíveis alvos terapêuticos que podem ser representados por moléculas que são expressas na superfície da membrana fúngica, que da mesma forma

podem direcionar pontos de estudo ao combate da doença (SARDI, et. al, 2015; MARCOS et. al, 2016; BERNARDI, et. al, 2017; SINGULANI, et. al, 2017; MARCOS, et. al, 2019). Descrito como um mecanismo complexo, a interação fungo-hospedeiro é um processo que influencia diretamente nos fatores que contribuem para a virulência do fungo (Figura 3), através de moléculas que estabelecem uma conexão até o tecido do hospedeiro (OLIVEIRA, et. al, 2015). Adesinas e proteínas semelhantes a adesina são componentes da superfície celular e/ou do metabolismo de alguns microrganismos que os conferem a capacidade de fixação às células, tecidos e/ou superfícies abióticas. Elas são as primeiras moléculas responsáveis pelo contato do patógeno para posterior invasão da célula hospedeira e, portanto, indispensáveis e determinantes de sua virulência. Devido à sua importância na invasão da célula hospedeira, adesinas são frequentemente estudadas justamente por também servirem como potenciais alvos para intervenção terapêutica (fármacos e/ou vacinas). Assim, abordagens diferenciais, como modelos de cultura 3D, abrem caminho para análises de novas moléculas que podem ser expressas em diferentes condições para o mesmo microrganismo (SILVA, et. al, 2011[1]).

Figura 3. Fatores de virulência. Importantes moléculas que participam do processo de adesão do fungo *Paracoccidioides spp.* durante o processo de infecção.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Estudos prévios demonstraram capacidade significativa de maior adesão de *P. brasiliensis* a pneumócitos quando comparado a *P. lutzii.* Também foi demonstrado que *P. brasiliensis* é mais virulento que *P. lutzii*, de acordo com dados obtidos usando um modelo *in vivo*. Isto suporta o fato de que a aderência e a virulência estão intimamente relacionadas e reforça a importância da adesão no processo de infecção desses fungos (OLIVEIRA, et. al, 2015).

O *Paracoccidioides spp*. é capaz de reconhecer várias moléculas do hospedeiro, como componentes da MEC (SILVA, et. al, 2011[2]). A MEC é um conjunto complexo de componentes, dentre os quais cita-se o colágeno, fibras de elastina, GAGs, proteoglicanos (PGs), fibronectina, laminina, sulfato de heparano, hialuronato, sulfato de condroitina, dentre outros. Alguns destes componentes são importantes no processo de infecção do fungo, a ligação pode se estabelecer com adesinas ou invasinas classificados também como fatores de virulência responsáveis pela ligação de estruturas do fungo com essas proteínas de matriz, todos esses componentes servem como substrato para a fixação de microrganismos colonizadores (DUNSMORE; RANNELS, 1996; MENDES-GIANNINI, et. al, 2004; MENDES-GIANNINI, et. al, 2005; MENDES-GIANNINI, et. al, 2006; BALESTRINI; NIKLASON, 2015).

Comparando a adesão aos componentes da MEC de duas espécies de *Paracoccidioides brasiliensis*, de Oliveira et. al, (2015) também demonstraram que *P. brasiliensis* adere mais à fibronectina em contraste com *P. lutzii,* que apresentou tropismo para os colágenos tipo I e IV ligação mediada pela malato sintase, enquanto a laminina é um proteína de matriz que permite maior adesão a cepa de Pb 01 (*Paracoccidioides lutzii*), enquanto a fibronectina auxilia a maior adesão do Pb18, todas estas fazendo uma conexão do fungo para que o mesmo possa exercer a infecção.

Outro exemplo de fator de virulência recentemente descrito foi a capacidade de *Pb18* em liberar vesículas extracelulares (VE): esse comportamento tem como consequência a liberação de epítopos antigênicos que podem ser reconhecidos em soros de pacientes com a doença, além de sugerir a influência deste mecanismo na resposta imune adaptativa (ZAMITH-MIRANDA et. al, 2018; SILVA, et. al, 2010; VALLEJO, et. al, 2012; SILVA, et. al, 2015; MUKHERJEE, et. al, 2016; GARCÍA-CARNERO, 2018).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O objetivo desta dissertação é desenvolver um modelo de cultura 3D que mimetize parcialmente as condições do pulmão para estudos de interação fungo-hospedeiro utilizando a cepa Pb18 de *Paracoccidioides brasiliensis.*

2.2 Objetivos Específicos

1. Padronizar o arcabouço de pérolas de alginato para as células A549 (epiteliais) e MRC-5 (fibroblastos);
2. Realizar o cocultivo dos fungos juntamente as células pulmonares, nos arcabouços;
3. Analisar o perfil de expressão de proteínas de interesse após o contato fungo-células (14-3-3 e GP43).
4. Padronizar o arcabouço de tapete de alginato para células MRC5 (fibroblastos) com camada de células A549 sobreposta

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Expansão das células pulmonares e confecção do banco de células

As culturas de células foram feitas utilizando a linhagem A549 (célula epitelial de adenocarcinoma pulmonar - BCRJ-0033) e MRC-5 (fibroblasto pulmonar humano normal - ATCC® CCL-171™), que foram cultivadas em garrafas de poliestireno, $2x10^4$ céls./cm^2, com tratamento de superfície para adesão celular, utilizando meio de cultura DMEM (Sigma®) suplementado com 10% de soro bovino fetal (SFB) (GIBCO®) e 100µg/mL de penicilina-estreptomicina (Invitrogen®) a 37 °C em atmosfera úmida de 5% de CO_2. Ao atingirem uma confluência de 75%, as células foram lavadas com solução salina tamponada com fosfato (PBS) e depois removidas dos frascos por adição de 0,25% de tripsina/EDTA e lavadas duas vezes com PBS. Após remover as células do frasco, estas foram criopreservadas em nitrogênio líquido, em solução de 10% dimetilsufóxido (DMSO)/SFB. Uma nova placa foi mantida em cultura e este processo foi realizado até a obtenção de 12 criotubos, os quais compuseram o banco de células necessário à realização de todos os outros experimentos.

3.2 Padronização da encapsulação celular em alginato

As pérolas de alginato foram produzidas utilizando uma solução de alginato (Sigma®) diluído em NaCl (Sigma®) na concentração 1,5% de alginato v/v. Esta solução de alginato foi pipetada sobre o *pellet* de células, perfazendo uma densidade inicial de $5x10^5$ células/mL. Então, as células foram homogeneizadas na solução de alginato, que foi gotejada em uma placa de Petri sobre a solução de gelificação ($CaCl_2$). A densidade calculada foi de $2x10^4$ células por pérola. As pérolas de alginato, que possuíam em média 40µL, foram lavadas com PBS e incubadas em placas de 96 poços durante os períodos dos experimentos utilizando meio de cultura DMEM suplementado com 10% de SFB e 100µg de penicilina-estreptomicina (Invitrogen®) por mL a 37 °C em atmosfera de 5% de CO_2. Algumas pérolas foram retiradas para se medir o diâmetro médio, utilizando-se uma régua graduada em cm/mm.

3.3 Caracterização do arcabouço 3D em pérola

3.3.1 Avaliação da viabilidade celular em câmara de Neubauer

Para definir se o modelo proposto era citotóxico, foi realizado monitoramento da viabilidade celular. Para isso, 10 pérolas de alginato por replicata experimental foram incubadas diariamente em banho maria a 37º C durante 40min em um microtubo para a dissolução, e o *pellet* formado foi centrifugado a 1500 rpm por 10 min a 22º C. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspendido em 200µL de meio de cultura + 200 µL de solução *trypan blue* 0,4% (Sigma®) e levados para avaliação em câmara de Neubauer (KASVI®). Células translucidas, as quais não incorporaram o corante, foram contadas como células viáveis. Células opacas, azuis, as quais incorporaram o corante, foram contadas e consideradas células mortas (inviáveis).

3.3.2 Avaliação da densidade celular em câmara de Neubauer

Após contagem em câmara de Neubauer, ao final da avaliação da viabilidade, o número total de células também foi calculado simultaneamente ao experimento anterior, utilizando regras clássicas.

3.3.3 Acompanhamento do cultivo celular por microscopia de contraste de fase e microscopia em campo claro (*In Cell Analyzer* 2000)

As pérolas contendo células ($2x10^4$ células/pérola) foram cultivadas nas placas de 96 poços e observadas diariamente com o microscópio ótico invertido com contraste de fase (Zeiss Primovert®), além de terem sido avaliadas e fotografadas em microscopia de campo claro utilizando o equipamento *In Cell Analyzer* 2000 (GE *Healthcare*®). Foram avaliados diferentes campos, aproximadamente 10 campos por pérola.

3.3.4 Monitoramento da viabilidade celular utilizando o método colorimétrico resazurina

A investigação da atividade metabólica foi realizada utilizando o método do ensaio da resazurina, onde uma solução de resazurina (SIGMA®) de coloração azul é colocada em contato com as células e, através da reação bioquímica de oxidoredução, as mesmas transformam a resazurina em risofurina, que possui coloração rosa. Essa reação foi avaliada qualitativamente por absorbância no espectro de 530nm – 590nm utilizando a leitora de microplacas (Microplate Reader Epoch 2, BioTek™, Software Gen5 2.09). O método foi padronizado de acordo com dados publicados por Xiao et. al, (2010), com uso de controle negativo de morte induzido por DMSO, controle negativo não contendo células, controle positivo e branco para que os cálculos pudessem ser realizados de acordo com a leitura. O tempo de incubação do composto foi de 8-10h por dia e as leituras foram realizadas diariamente, os valores de *background* do meio de cultura foram descontados da leitura.

3.3.5 Cultivo de *Paracoccidioides brasiliensis*

O cultivo de *Paracoccidioides brasiliensis* foi feito com o isolado Pb18 (São Paulo - Micoteca do Lab. Micologia Clínica - FCF – UNESP/Araraquara) na fase leveduriforme, mantido regularmente em meio Fava-Netto sólido e repicado para BHI (HiMedia®) em estufa a 37º C, repicado a cada sete dias. Para realização dos experimentos o cultivo foi realizado em meio BHI líquido com 1 % de glicose (Beckton Dickinson and Company®), a 37º C, sob agitação de 150 rpm, por três dias (fase exponencial de crescimento), seguido de centrifugação, ajuste do inóculo em câmara de Neubauer, e homogeneização das leveduras com seringa.

3.3.6 Infecção do modelo tridimensional com *Paracoccidioides brasiliensis*

Para infecção do modelo foi feito um ensaio piloto no qual foram dispostas 10 pérolas de alginato, cada uma contendo $2x10^4$ células, em uma placa de 24 poços, que foi incubada por 72h horas com a mesma densidade de células

fúngicas (1:1), em incubadora de CO_2, utilizando o meio DMEM. Portanto, as células fúngicas foram adicionadas após a gelificação das pérolas de alginato. Após este período, as pérolas foram lavadas 3x em solução PBS para retirada de fungos, e adicionado a placa uma solução de citrato de sódio nos poços contendo as pérolas. Estas foram incubadas por 45min a 37ºC na própria placa para dissolução das pérolas. Após esse período, o sobrenadante foi coletado e transferido para um tubo cônico de 15mL que foi centrifugado a 1500 rpm durante 10 minutos a 22ºC. O *pellet* formado pela centrifugação foi utilizado para a análise descrita no item *3.9*. Algumas pérolas foram mantidas intactas para observação ao microscópio confocal.

3.3.7 Microscopia de fluorescência pelo *In Cell Analyzer* 2000

3.3.7.1 Infecção das células em monocamada

Para infecção das células A549 e MRC-5 em monocamada, as mesmas foram cultivadas em garrafas de cultura de 75 cm² e expandidas até atingirem 75% de confluência, essas células foram tripsinizadas (0,25 % SIGMA) uma vez que atingiram a confluência desejada. Após isso foi feita a lavagem das células com meio de cultura DMEM High Glucose (Sigma) e centrifugadas a 2000 rpm durante 5min a 22º C, então foi avaliada a viabilidade celular pelo método de Trypan Blue, a densidade celular foi ajustada para 1 x 10^4 células que foram plaqueadas em placa de 24 poços. Para os poços contendo MEC foi adicionado no dia anterior um mix de proteínas contendo fibronectina, fibrinogênio, colágeno tipo I, e colágeno tipo IV todos esses contendo 50 µg/mL. Depois do período de aderência das células, uma alíquota 1 x 10^5 de *P. brasiliensis* (Pb18), que previamente foi corado com *Calcofluor White* (SIGMA^{TM}) 0,1%, por 30 min, foi adicionado aos poços na relação de 10 (fungo) :1 (célula). O tempo de interação das leveduras com as células foi de 24 horas, seguido de 2 lavagens com PBS, para que fosse retirado leveduras que não estavam interagindo/aderidas nas células. Após isso a placa foi levada para análise no equipamento *In Cell Analyzer* 2000 da UNESP FCF (Núcleo de Proteômica), utilizando os canais de campo claro e DAPI para o CW.

3.3.7.2 Infecção das células em modelo 3D

A infecção dos modelos tridimensionais foi realizada utilizando as células descritas anteriormente, com a densidade de fungos ajustada para 1 x 10^6 em relação a 1 x 10^4 células por pérola de alginato disposta em 10 pérolas por poço em placa de 24 poços. Para a infecção em modelos com MEC, o mix de proteínas (fibronectina, fibrinogênio, colágeno I e colágeno IV) foi adicionado à solução de alginato e homogeneizado antes do período de gelificação, fazendo com que as células fossem encapsuladas em um gel contendo proteínas da MEC. O tempo de interação do experimento também foi de 24 horas, seguido de lavagens com PBS e análise no *In Cell Analyzer* 2000. O controle desse experimento foi feito com a encapsulação das leveduras/células ao mesmo momento para que fosse possível comparar o perfil de visualização das leveduras que estivessem dentro do gel.

3.3.8 Microscopia confocal do experimento de infecção

Para essa análise, foi utilizado o microscópio de fluorescência confocal (Carl Zeiss® LSM 800), da Faculdade de Odontologia de Araraquara (UNESP). O processamento das imagens foi realizado utilizando o Software *Zen Blue*™. Após a infecção das pérolas no experimento citado anteriormente, o poço escolhido para análise também foi lavado 3x com solução PBS para que as leveduras que não estivessem interagindo com o gel fossem retiradas durante as lavagens. Então, após essa etapa, foi adicionado o corante *Calcofluor White* 0,1% por 30 min seguido da adição de FITC - isotiocianato de fluoresceína por mais 30min.

Esse corante foi escolhido pois cora componentes da parede celular fúngica como *α*-1-3 glucana, *β*-1-3 glucana e quitinas, diferenciando, portanto, as leveduras de células de mamífero. Utilizando os comprimentos de onda em 350nm de excitação e 420nm para emissão, as pérolas foram fotografadas. Após lavar as pérolas, para retirada do *calcofluor white*, foi adicionado o corante FITC e as pérolas foram fotografadas utilizando o comprimento de onda de 490nm para

excitação e 515nm para emissão, para corar as células A549 contidas no gel. Através da análise de renderização, foram estabelecidas duas barras, uma superior e uma lateral, representativas da espessura da amostra.

3.3.9 Isolamento do *Paracoccidioides brasiliensis* pós infecção do modelo 3D

O conteúdo obtido, após a dissolução das pérolas de alginato/células A549, que foram colocadas em contato com as leveduras, foi semeado em ágar BHI sólido suplementado para isolamento de colônias do fungo após infecção. Estas foram identificadas por características de suas colônias, após o período de incubação de 168 horas. Após este período as colônias foram contabilizadas e expressas em gráficos. Esse experimento foi realizado em duas replicatas experimentais.

3.3.10 Extração RNA para análise de expressão de adesinas

Para extração de RNA, foi realizado um experimento de infecção em placa de 24 poços utilizando a relação de levedura-células 10:1 respectivamente. Após 24h de infecção as placas foram lavas com PBS e submetidas a diferentes tratamentos para coleta do material a ser extraído. Para as células em monocamada, as células foram maceradas com a ponta de uma pipeta P1000, no poço que anteriormente fora adicionado 1mL de água destilada gelada, essa técnica foi empregada para a lise das células e para recuperar leveduras que talvez estivessem localizadas dentro da célula. Para o modelo 3D foi adicionado 1mL de citrato de sódio a 37º C em seguida a placa foi encubada em estufa CO2 por 45min para que o alginato fosse desfeito e liberassem as células dentro do gel. Após a realização desses passos o sobrenadante total foi coletado e separados em tubos com trizol (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad CA) que ficaram congelados até o dia da extração.

No momento da extração do RNA, foram adicionadas pérolas de vidro nos tubos contendo o sobrenadante congelado em trizol, sendo realizados ciclos de

homogeneização em vortex e gelo durante 15 minutos. Então, após a lise, foi adicionado clorofórmio seguida de centrifugação que permitiu a separação da solução em fase aquosa orgânica. O RNA permanece exclusivamente na fase aquosa. Em seguida, após a transferência da fase aquosa, o RNA foi recuperado por precipitação com isopropanol, seguido da lavagem com etanol 70%. A quantificação das amostras foi realizada em espectrofotômetro *NanoVuePlus* (GE Healthcare^{TM}) obtendo-se a concentração em ng/µL. Além disso, a pureza do RNA extraído foi analisada com base na razão de absorbância A260nm/A280nm, sendo a pureza ideal aquela no intervalo de 1,8 a 2,0. Posteriormente, a integridade do gel foi verificada através de gel de agarose. Resultados apresentados no Anexo II, página 90.

3.4 Padronização do modelo de tapete celular em arcabouço de alginato

O modelo 3D de camadas de alginato foi inicialmente preparado a partir de uma preparação de *pellet* celular de células MRC-5 na densidade de $1x10^5$ células em solução de alginato 0,5 % v/v. Essa solução (50 µL) foi pipetada em um poço de uma placa de 96 poços (Kasvi), que continha 50 µL de solução de cloreto de cálcio previamente pipetada. As soluções foram homegeneizadas com a ponta da pipeta até a completa gelificação do gel. Então, foi adicionado uma nova quantidade de $1x10^5$ células A549 sobre o tapete formado, com adição de mais 100µL de meio de cultura DMEM com 10% de SFB. As células foram cultivadas durante um curto período para observação microscópica.

3.4.1 Acompanhamento do cultivo celular do modelo arcabouço em tapete de alginato por microscopia de contraste de fase e microscopia em campo claro (*In Cell Analyzer* 2000)

A análise foi conduzida seguindo o mesmo princípio no item 3.3.3, descrito anteriormente.

3.5 Análises estatísticas

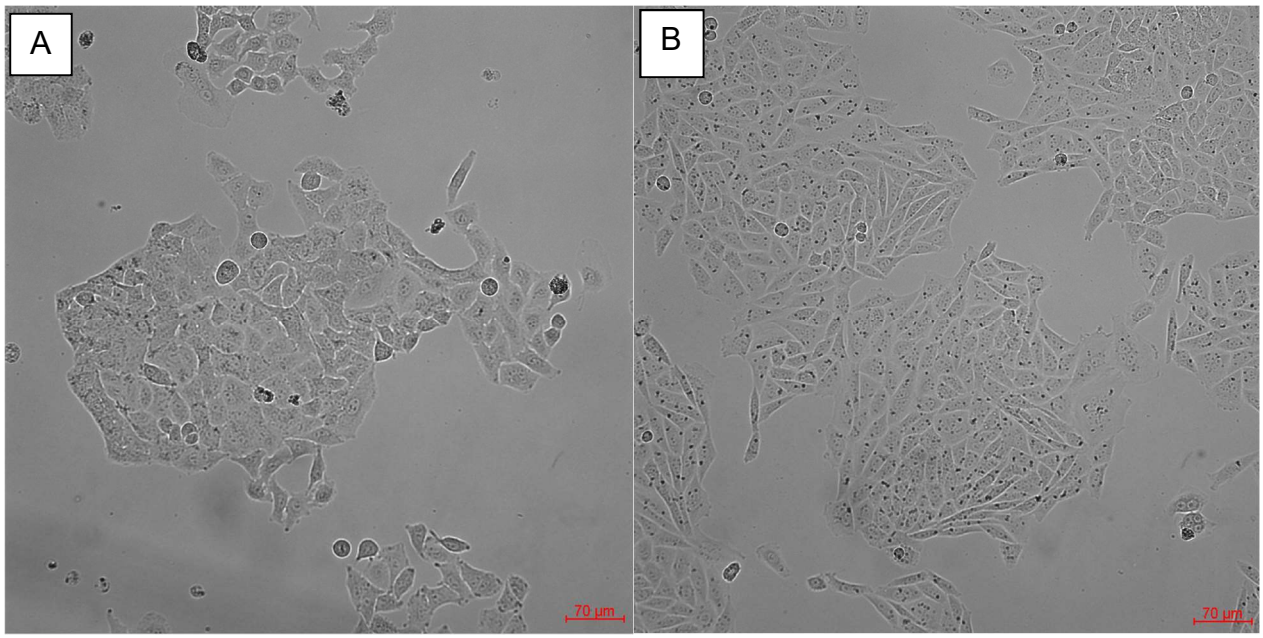
As análises estatísticas dos experimentos: viabilidade celular por *Trypan blue* e número de células por *Trypan blue* foram realizadas utilizando-se o teste de Kruskall-Wallis, com múltiplas comparações por Dunn's. Os experimentos de atividade metabólica e contagem de UFC foram realizados com *two-way* ANOVA com pós teste de Bonferroni. Todos os experimentos foram verificados quanto a normalidade dos dados. As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o *software* GradPadPrism 7 e o valor de *p* adotado foi $p<0.05$.

4. RESULTADOS

4.1 Padronização da encapsulação celular em alginato

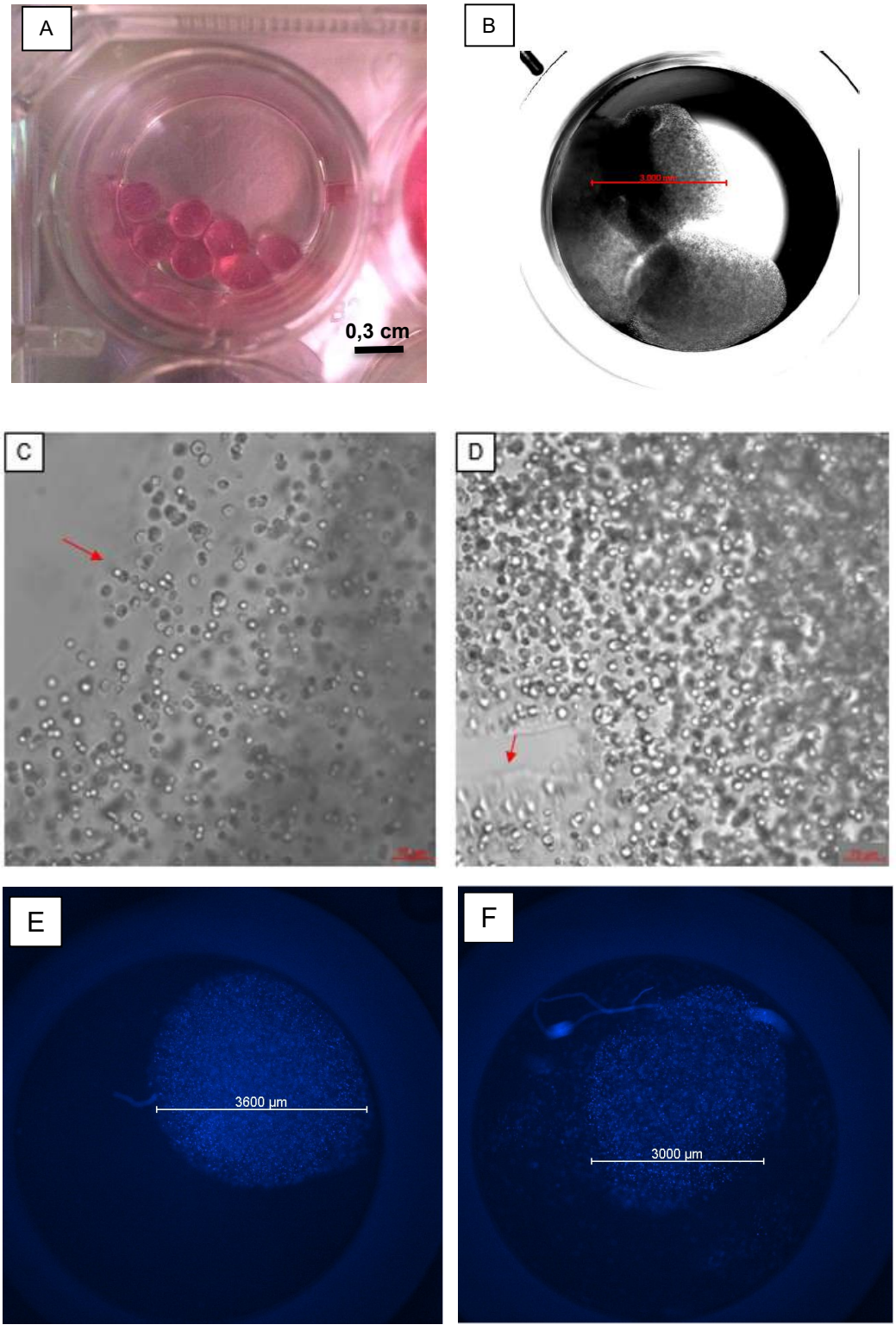
Aproximadamente 15 dias antes do experimento, uma ampola foi descongelada e as células A549 e MRC-5 foram expandidas em monocamada para obtenção de número suficiente de células. Neste período, as células apresentaram características do fenótipo epitelial, como abundante contato célula-célula (Figura 4 A e B). Então, foram preparadas pérolas de aproximadamente 40µL (Figura 5 A-D) mediante o gotejamento da solução contendo células A549 em $CaCl_2$. Ocorreu gelificação instantânea e, como mencionado, a concentração foi de $1x10^5$ células/pérola. Foram obtidas pérolas arredondadas, com coloração rósea após adição do meio de cultura (Figura 5-A). Estas pérolas mantiveram-se estáveis, tinham diâmetro aproximado de 0,3cm (Figura 5-B) e não dissolveram durante o período de cultivo, que foi de aproximadamente 7 dias. Ao microscópio invertido, percebeu-se alta celularidade, distribuída de forma homogênea em toda a área visualizada (Figura C e D).

Figura 4. Morfologia das linhagens A549 e MRC-5. A). Linhagem A549 – células poligonais, com muita granulosidade citoplasmática, núcleos bem definidos, presença de 2-4 nucléolos e contatos célula-célula bem estabelecidos. A coloração é resultado do filtro de contraste de fase utilizado**. B).** Linhagem MRC-5 – células mais alongadas com morfologia fibroblastóide, granulosidade citoplasmática e contato célula-célula assim como a anterior.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 5. Encapsulação das células em pérolas de alginato. A) Visão macroscópica das pérolas de alginato sem microscopia. A coloração rosa se deve à absorção do meio de cultura DMEM e a presença de vermelho de fenol em sua composição. **B)** Visão microscópica em lente de menor aumento 2x, da pérola de alginato através do *In Cell Analyzer 2000*, a granulosidade no interior da amostra equivale a densidade celular em seu interior. **C)** e **D)** Visão microscópica em aumento de 20x das células A549 Figura C e MRC-5 Figura D, as setas vermelhas indicam a delimitação do gel. **E)** e **F)** visão microscópica em lente de menor aumento 2x, da pérola de alginato coradas com DAPI, apresentando distribuição uniforme pelo gel E (A549), F (MRC-5).

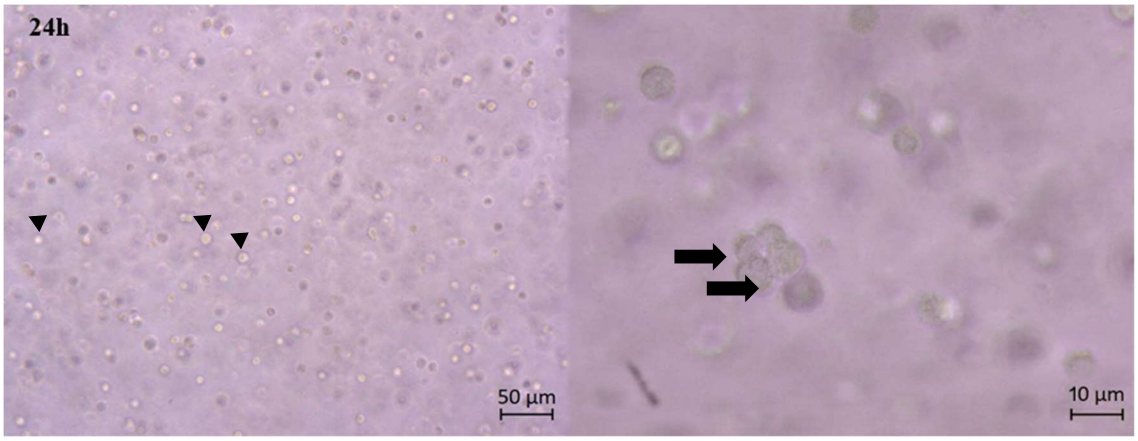


Fonte: Elaborado pelo autor.

4.2 Acompanhamento do cultivo celular por microscopia de contraste de fase e microscopia em campo claro (*In Cell Analyzer* 2000)

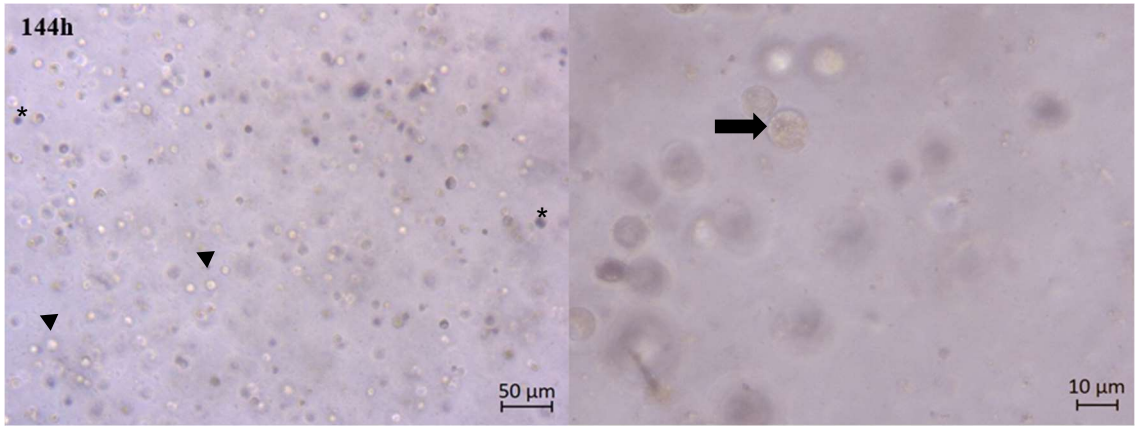
Após a padronização das concentrações das soluções de alginato de sódio e cloreto de cálcio para encapsulação, as células A549 foram mantidas em cultura utilizando meio DMEM com 10% de SFB e 5% de CO_2 a fim de se observar a morfologia e possíveis contaminações microbiológicas. Pôde-se observar alta celularidade, células translúcidas e arredondadas, (Figura 6) após 24h de cultivo. Após 144h de cultivo, ao término do experimento, as células estavam mais opacas, porém mantiveram a morfologia arredondada (Figura 7).

Figura 6. Microscopia invertida de contraste de fase durante o cultivo celular da linhagem A549 registrada após 24 horas de cultivo. Microscopia invertida de contraste de fase durante o cultivo celular da linhagem A549 registrada após 24 horas de cultivo (início do experimento). À esquerda, em menor aumento (10x), percebe-se alta celularidade, células translúcidas e homogênea distribuição das células (ponta de seta) por toda a extensão do gel de alginato. À direita, em maior aumento (40x), percebe-se morfologia arredondada de um grupo de 5 células (seta).



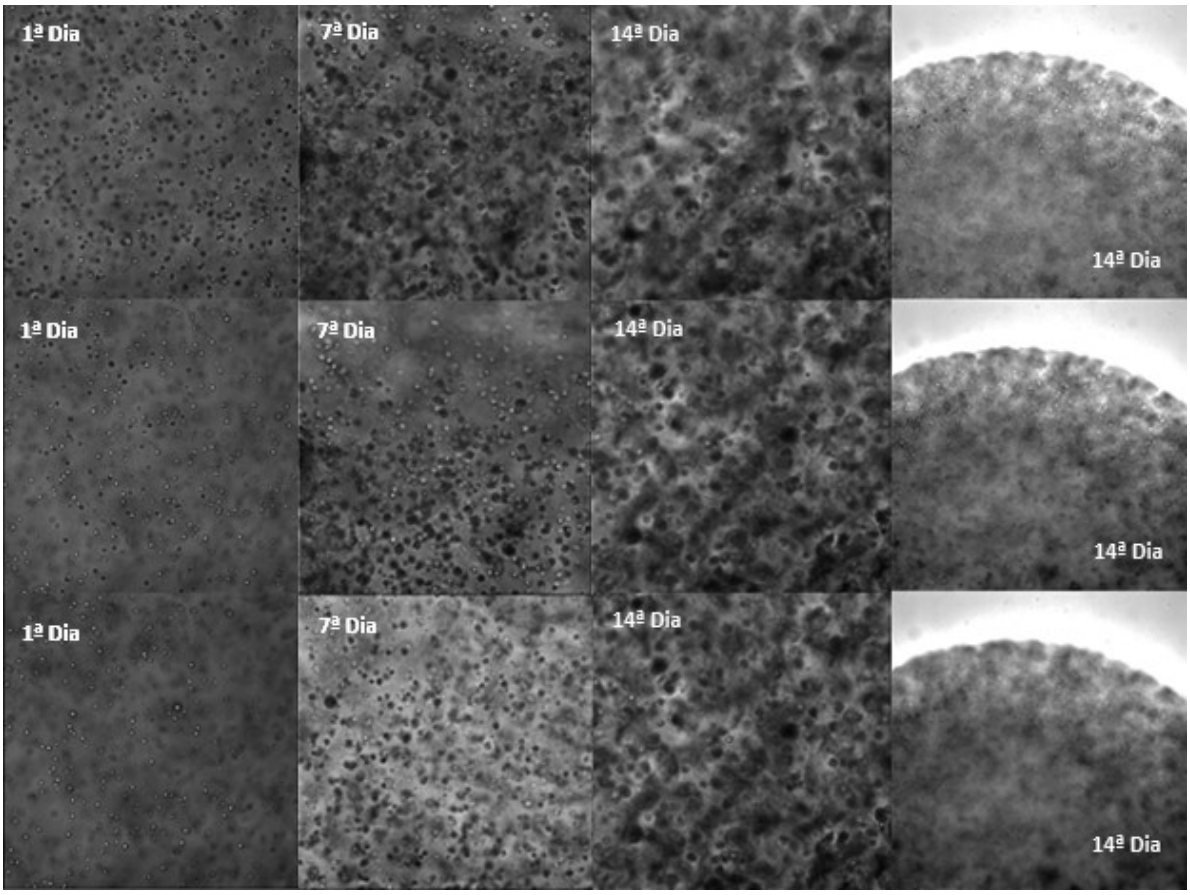
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 7. Microscopia invertida de contraste de fase durante o cultivo celular da linhagem A549 registrada após 144 horas de cultivo. À esquerda, em menor aumento (10x), ainda se percebe homogênea distribuição das células (ponta de seta), porém algumas células estão mais opacas (asterisco). À direita, em maior aumento (40x), percebe-se morfologia das células (seta) término do experimento.



Fonte: Elaborado pelo autor

Figura 8. Microscopia em campo claro adquirida pelo equipamento *In Cell Analyzer* 2000 das pérolas de alginato. A imagem mostra crescente proliferação celular (A549) dos dias 1, 7, e 14 As colunas representando o primeiro sétimo e décimo quarto dia são três fatias diferentes da mesma amostra em objetivas de 20x. Na coluna da direita pode-se observar uma porção da esfera de hidrogel de alginato, no décimo quarto dia de cultivo, com distribuição celular homogênea desde a periferia ao centro objetiva de 2x. A falta de foco observada no dia décimo quarto dia (terceira coluna) é característica de alta densidade celular, o que dificulta a nitidez e a resolução da imagem, demostrando o aumento da população celular

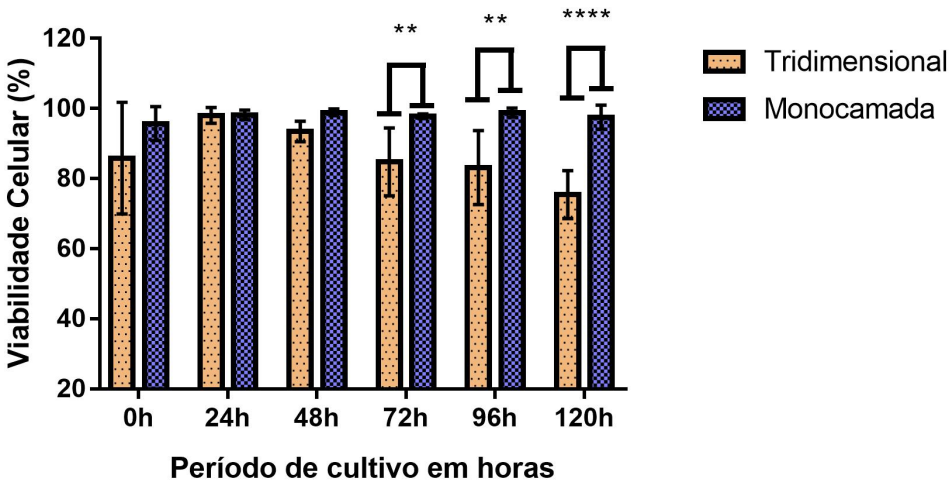


Fonte: Elaborado pelo autor.

4.3 Avaliação da viabilidade celular em câmara de Neubauer

O método de viabilidade celular de exclusão utilizando o corante azul de *trypan* foi realizado de acordo com Bittencourt et. al, (2009). O modelo 3D apresentou alta viabilidade, acima de 75% até o ponto de 120h (Figura 9), que inicia em decréscimo após este período de cultivo. Foi necessário utilizar 10 pérolas de alginato para dissolução em cada replicata de amostra a fim de obter um *pellet* com células suficientes para contagem e câmara de Neubauer.

Figura 9. Viabilidade celular pelo método de *trypan blue*. Gráfico representando a viabilidade celular em monocamada e modelo 3D durante o período de cinco dias, do início do experimento, até o ponto de 120h, a viabilidade se mantém acima de 75%, demonstrando o caráter não citotóxico do arcabouço. Valores dados pela média ± D.P. são resultados de uma análise two-way ANOVA. **P<0,01 3D x monocamada (72h e 96h) e ****P<0,001 3D x monocamada (120h)



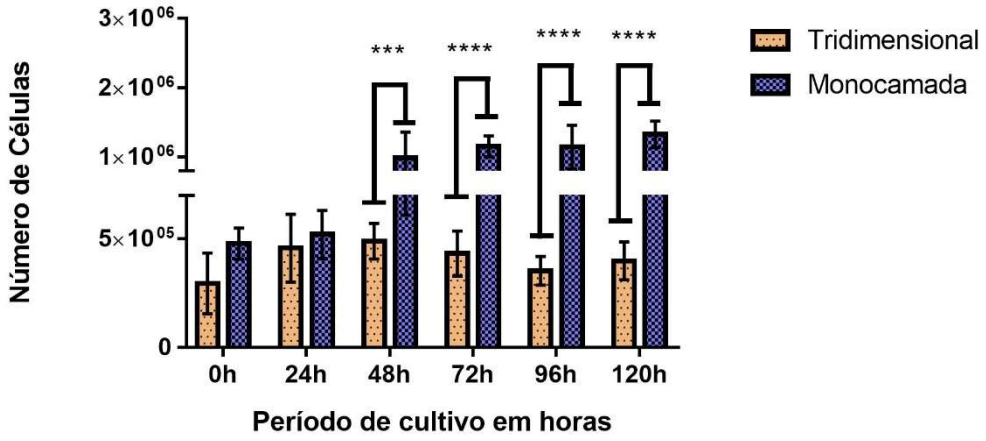
Fonte: Elaborado pelo autor.

4.4 Avaliação da densidade celular em câmara de Neubauer

A contagem do número total de células, para avaliação de proliferação celular, foi avaliada simultaneamente ao teste de viabilidade celular. Como controle, foi realizada cultura em monocamada. Percebeu-se maior quantidade de células final, em relação a quantidade de células inicial, no sistema de monocamadas, indicativo de maior proliferação celular. Embora o nosso modelo 3D não tenha obtido tal performance, ainda foi possível perceber a duplicação do número de células durante todo o experimento (Figura 10). Foi avaliada pela comparação entre número inicial de células plaqueadas e número final de células obtidas. A diferença entre os valores se dá por processos de aumento no número de células (mitoses) e diminuição (apoptose/necrose). Percebeu-se alta proliferação celular no modelo em monocamada, embora o modelo 3D tenha sido

capaz de duplicar o número de células inicialmente plaqueadas (comparar 0h com 168h).

Figura 10. Gráfico representando a densidade celular avaliada no período de sete dias para monocamada e modelo 3D. Valores dados pela média ± D.P. são resultados de uma análise two-way ANOVA. ***P<0,001 3D x monocamada (72h e 96h) e ****P<0,001 3D x monocamada (120h)

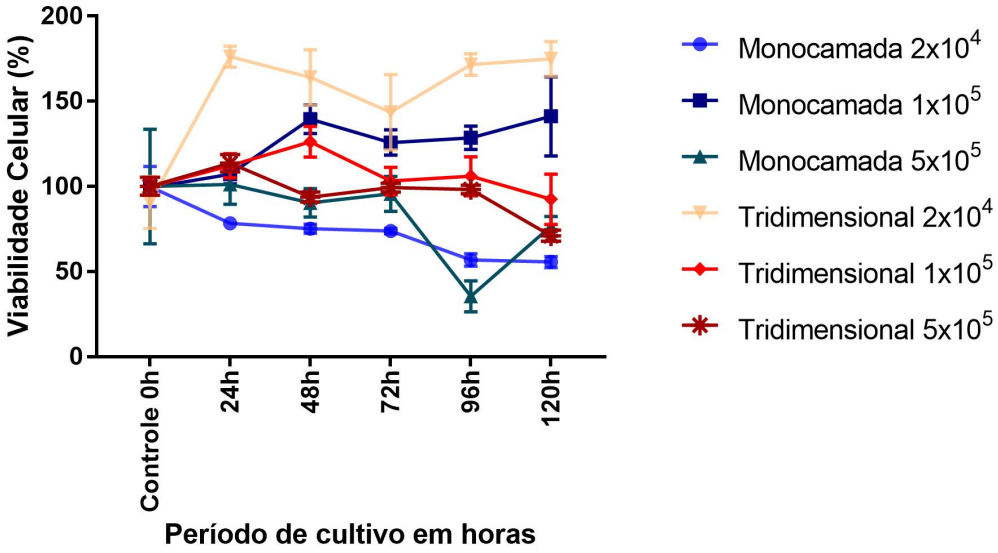


Fonte: Elaborado pelo autor.

4.5 Monitoramento da viabilidade celular através da atividade metabólica

Inicialmente, fora medido um ponto de absorbância definido como 0h (controle). Para o modelo 3D, este significa a adição de resazurina imediatamente após a encapsulação e após a conversão do corante a leitura dos poços em leitora de microplaca. A partir daí todos os dias o conteúdo convertido nos poços foi recolhido e passado para uma placa Kasvi estéril de 96 poços de acordo com as fileiras referentes aos dias de análise, essa placa foi armazenada em geladeira 8º C, após o final do período de cultivo os níveis de absorbância foram medidos e comparados com o valor obtido inicialmente. Foram realizados, também, ensaios para monocamada, como controle, que foram comparados aos níveis de absorbância do modelo 3D seguindo esse mesmo padrão. Para ambas análises foram feitas diferentes densidades celulares a fim de avaliar qual melhor se adaptava ao cultivo em alginato preservando sua viabilidade.

Figura 11. Atividade metabólica das células A549.Dentre as densidades celulares testadas é possível observar todas as curvas se iniciando a partir de 100% de viabilidade (controle). As curvas seguem padrões distintos de viabilidade celular baseada na atividade metabólica e capacidade das células de converter o corante resazurina.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 1. Valores de análise estatística da atividade metabólica A549 (figura 11). A Tabela a seguir representa resultados de análise estatística realizados para o experimento referente a (figura 11), para as três densidades celulares utilizados. Os valores de P estão descritos mostrando valores estatisticamente significativos.

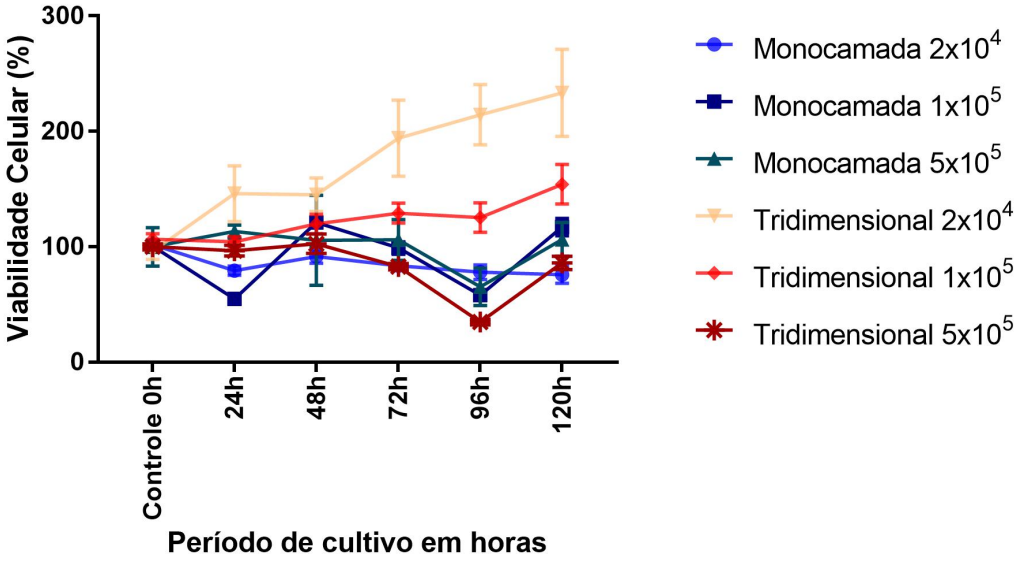
A549 $2x10^4$	Valor de P
Controle 0hM x Controle 0h 3D	-
24h M x 24h 3D	**** <0,0001
48h M x 48h 3D	**** <0,0001
72h M x 72h 3D	** 0.0022
96h M x 96h 3D	**** <0,0001
120h M x 120h 3D	**** <0,0001

A549 $1x10^5$	Valor de P
Controle 0h M x Controle 0h 3D	-
24h M x 24h 3D	-
48h M x 48h 3D	-
72h M x 72h 3D	-
96h M x 96h 3D	-
120h M x 120 3D	** <0,0081

A549 5x10^5	Valor de P
Controle 0h M x Controle 0h 3D	-
24h M x 24h 3D	-
48h M x 48h 3D	-
72h M x 72h 3D	-
96h M x 96h 3D	**** <0,0001
120h M x 120 3D	-

Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 12. Atividade metabólica das células MRC-5. Dentre as densidades celulares testadas é possível observar todas as curvas se iniciando a partir de 100% de viabilidade (controle). As curvas seguem também apresentam padrões distintos de viabilidade celular baseada na atividade metabólica e capacidade das células de converter o corante resazurina.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 2. Valores de análise estatística da atividade metabólica MRC-5 (figura 12). A Tabela a seguir representa resultados de análise estatística realizados para o experimento referente a (figura 12), para as três densidades celulares utilizados. Os valores de P estão descritos mostrando valores estatisticamente significativos.

MRC-5 2x10^4	Valor de P
Controle 0hM x Controle 0h 3D	-
24h M x 24h 3D	-
48h M x 48h 3D	-
72h M x 72h 3D	*** 0.0004
96h M x 96h 3D	**** <0,0001
120h M x 120 3D	**** <0,0001

MRC-5 1x10^5	Valor de P
Controle 0h M x Controle 0h 3D	-
24h M x 24h 3D	*** 0.0002
48h M x 48h 3D	-
72h M x 72h 3D	-
96h M x 96h 3D	**** <0.0001
120h M x 120 3D	** 0,0094

MRC-5 5x10^5	Valor de P
Controle 0h M x Controle 0h 3D	-
24h M x 24h 3D	-
48h M x 48h 3D	-
72h M x 72h 3D	** 0,0070
96h M x 96h 3D	-
120h M x 120 3D	-

Fonte: Elaborado pelo autor.

4.6 Cultivo de *Paracoccidioides brasiliensis*

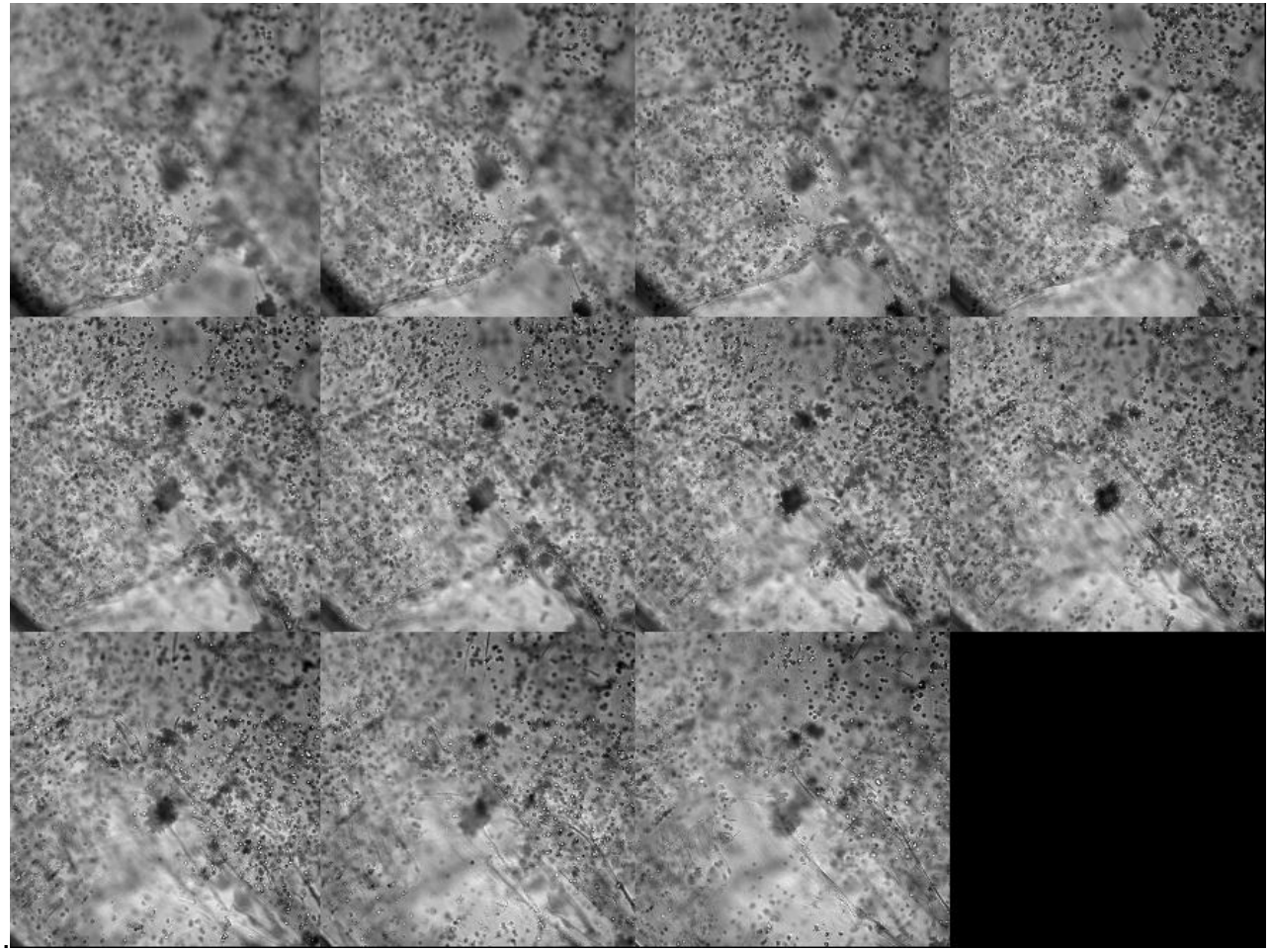
Foi necessária a manutenção regular da cultura do Pb18, que fora repicado semanalmente e mantido em meio Fava-Netto. Para a execução dos experimentos, o fungo foi cultivado em meio liquido por três dias antes de cada experimento, mantendo um crescimento exponencial. O fungo foi cultivado sem problemas.

4.7 Microscopias pelo *In Cell Analyzer* 2000 do experimento de infecção

4.7.1 Microscopia em campo claro do modelo de peróla de alginato pelo *In Cell Analyzer 2000*

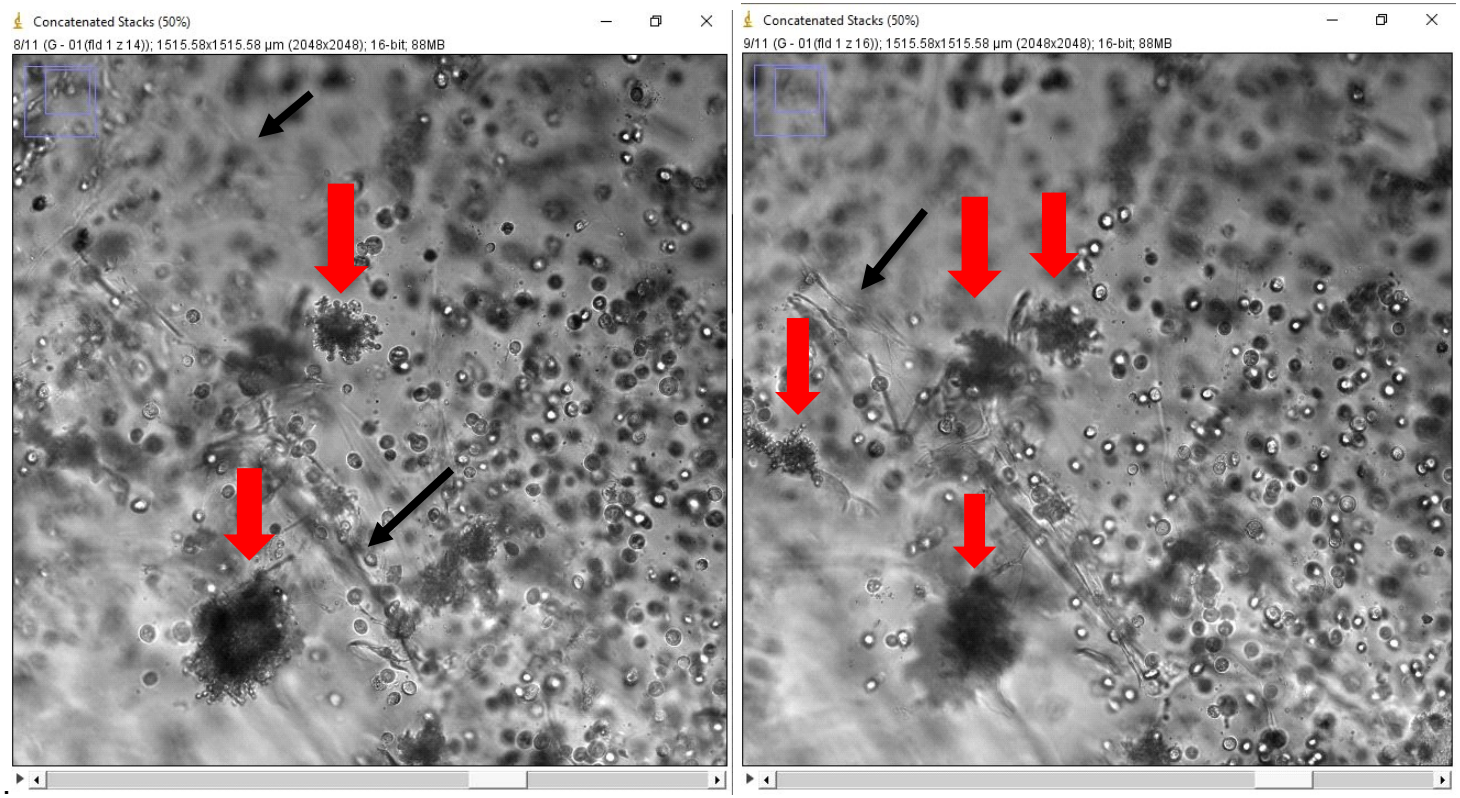
Para melhor visualização do experimento de infecção as placas foram levadas ao *In Cell Analyzer* 2000, pós período de infecção, que fornecia imagens em campo claro de melhor qualidade para que fosse possível observar as estruturas fúngicas. As imagens foram adquiridas para o modelo 3D e cultivo de células em monocamada.

Figura 13. Infecção A549 em campo claro, pelo *In Cell Analyzer* 2000, objetiva de 20x. Quadro de imagens obtidas através do *In Cell Analyzer* 2000, divididas em 11 *z-stacks* da infecção da célula A549 **não contendo componentes da MEC**, destacando-se dois *z-stacks* 8 e 9 (destacados na figura 14), onde é possível observar aglomerados de Pb18 em dois locais do gel referente ao campo analisado.



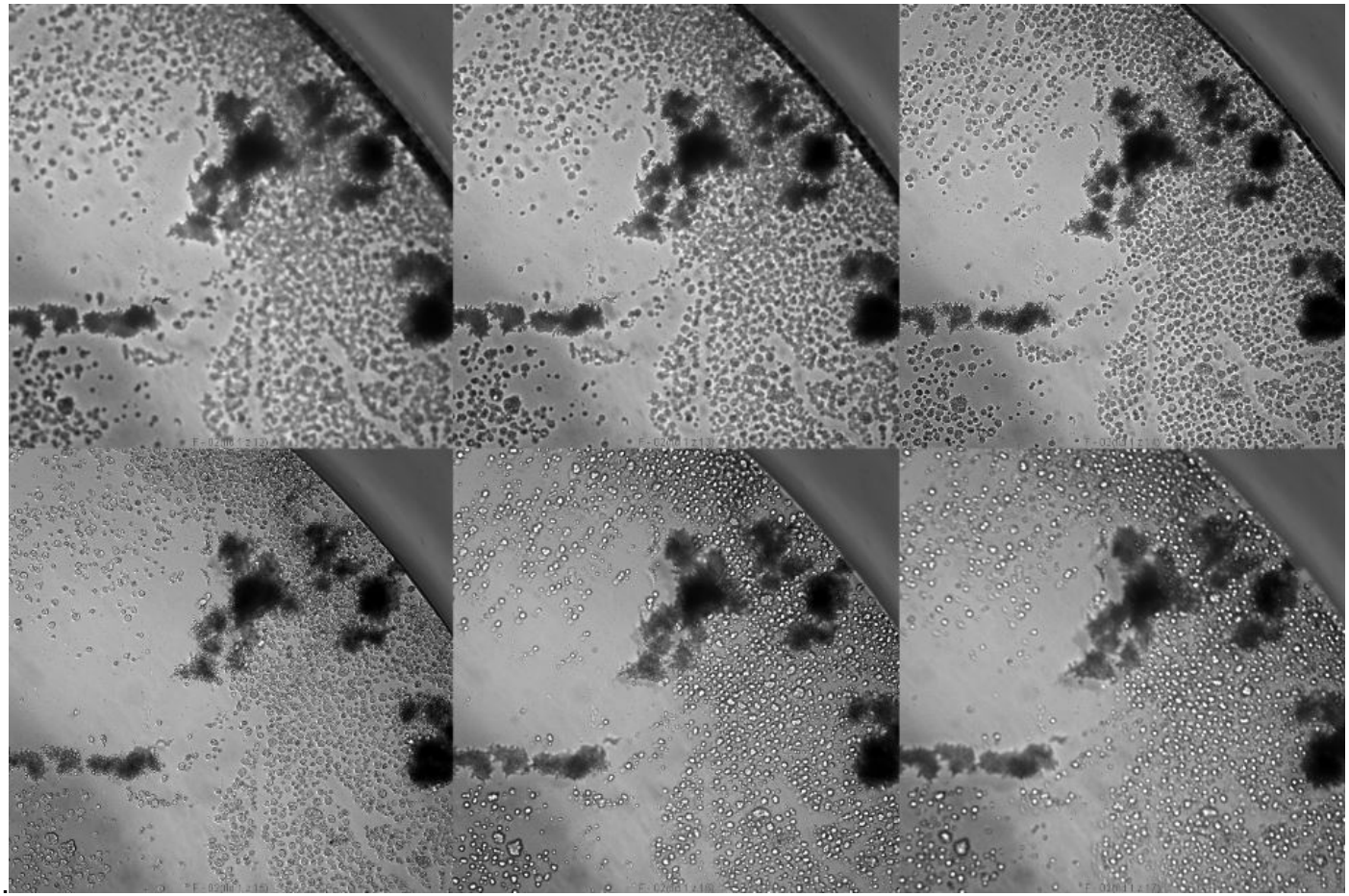
Fonte: Elaborado pelo autor

Figura 14. Infecção A549 em campo claro, pelo *In Cell Analyzer* 2000, objetiva de 20x aumento de *z-stacks*. Imagens obtidas através do *In Cell Analyzer 2000*, com aumento de dois *z-stacks* (8 e 9), as setas vermelhas indicam regiões do gel onde é possível observar aglomerados de leveduras, as setas pretas indicam dobras formadas no gel.



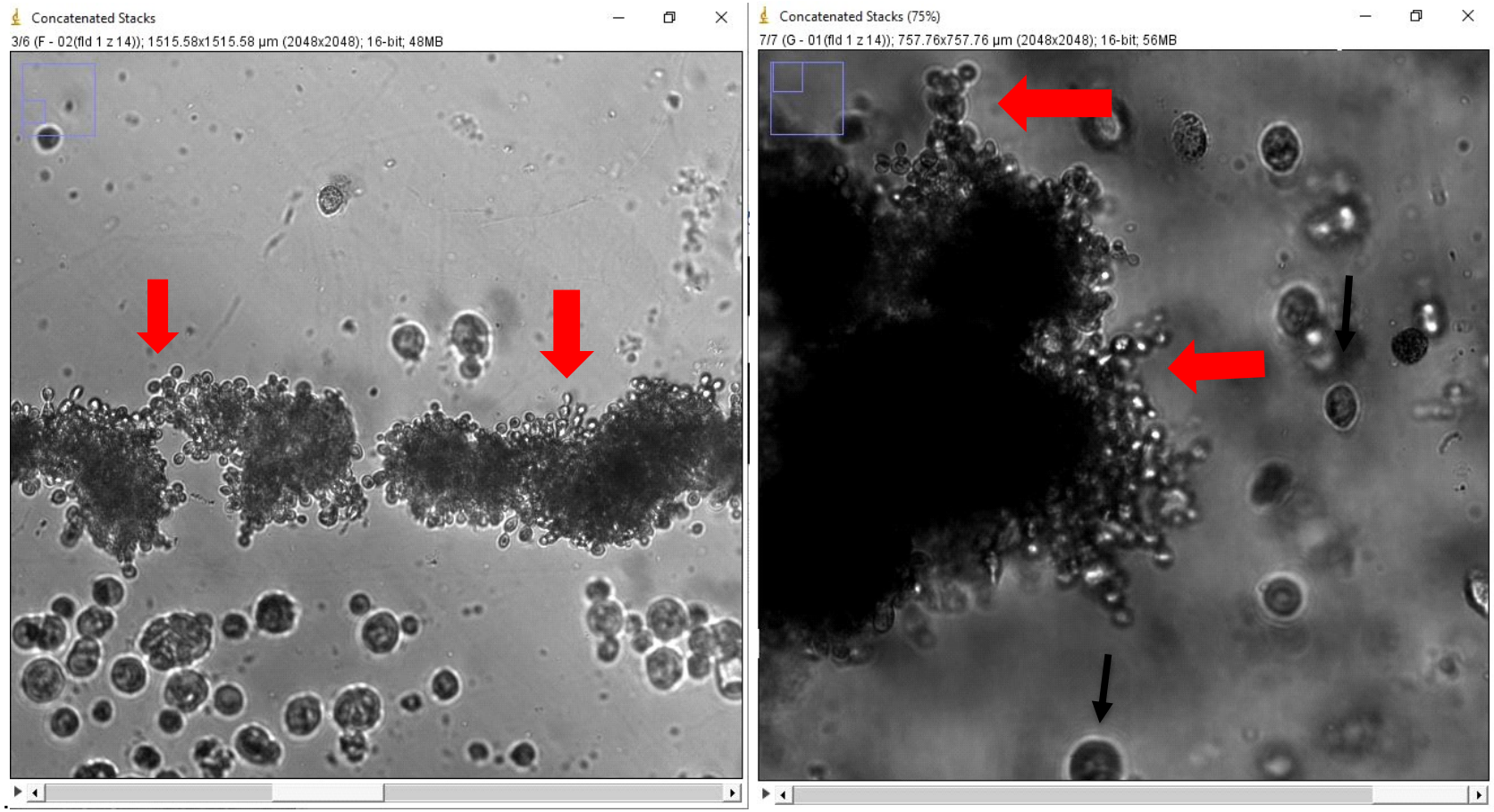
Fonte: Elaborado pelo autor

Figura 15. Infecção A549 em campo claro, pelo *In Cell Analyzer* 2000, objetiva de 20x. Quadro de imagens obtidas através do *In Cell Analyzer* 2000, divididas em 6 *z-stacks* da infecção da célula A549 **contendo componentes da MEC**, destacando-se dois *z-stacks* 3 e 6 (destacados na figura 16), onde é possível observar volumosos aglomerados de Pb18 nos campos analisados.



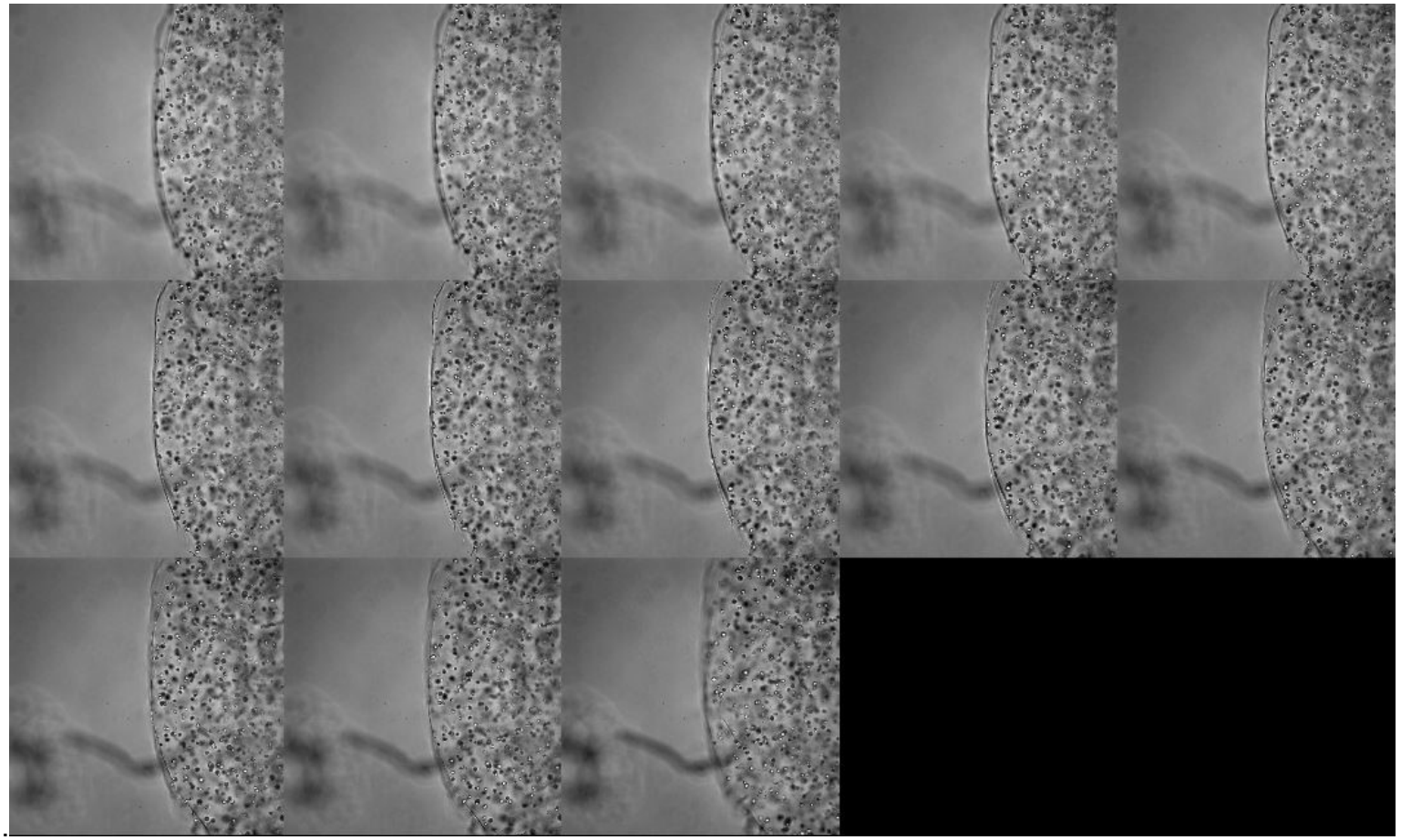
Fonte: Elaborado pelo autor

Figura 16. Infecção A549 em campo claro, pelo *In Cell Analyzer* 2000, objetiva de 20x aumento de z-stacks. Imagens obtidas através do *In Cell Analyzer 2000*, com aumento de dois z-stacks (3 e 6). As setas vermelhas indicam regiões de aglomerados de leveduras onde é possível observar melhor nas extremidades outras leveduras com características de Pb18 com multibrotamentos gerados a partir de uma célula central, as setas pretas indicam células que foram encapsuladas no gel. Observar que as leveduras estão no mesmo campo (foco) das células, as quais estão localizadas no interior do alginato.



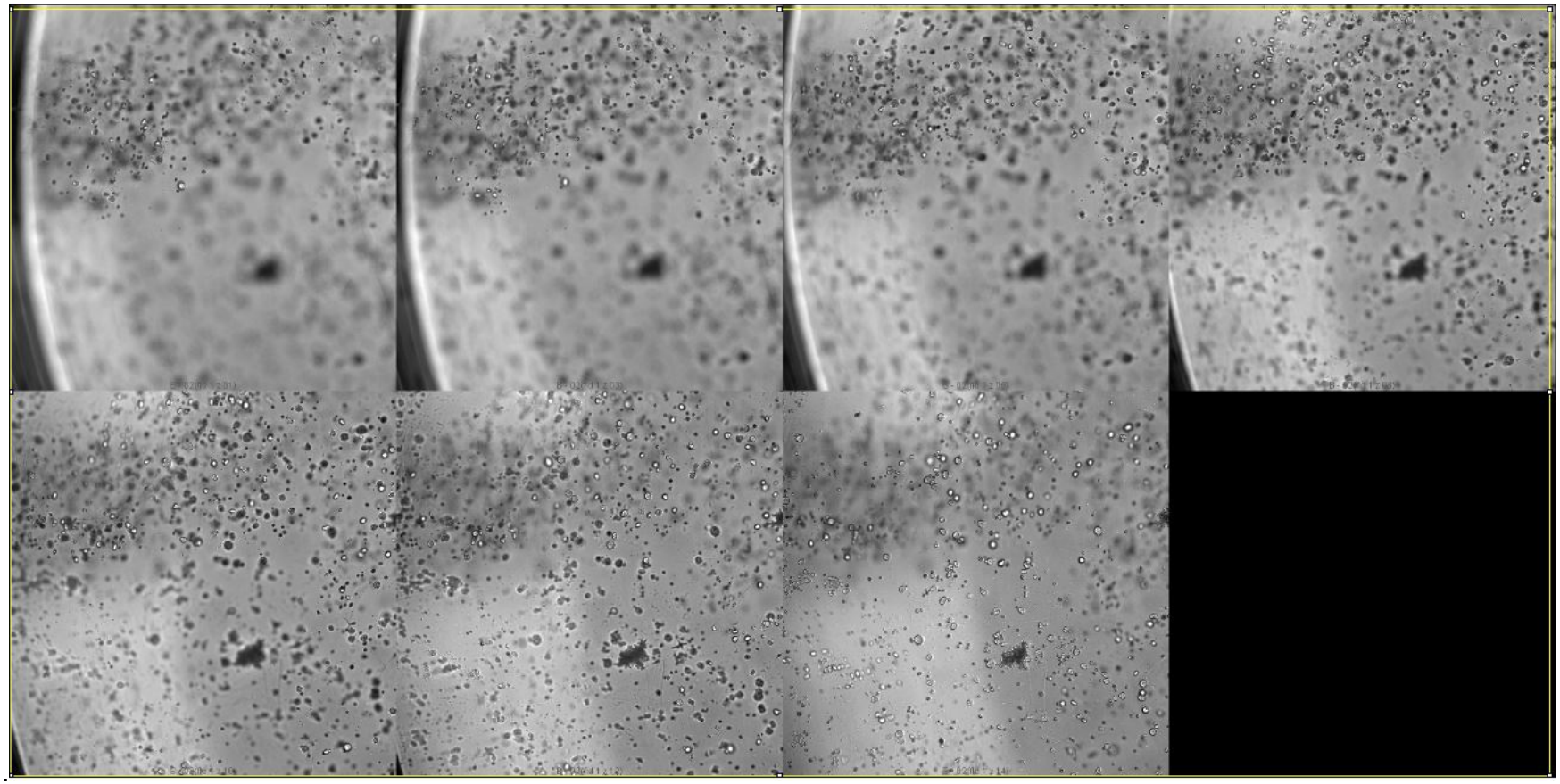
Fonte: Elaborado pelo autor

Figura 17. Infecção MRC-5 em campo claro, pelo *In Cell Analyzer* 2000, objetiva de 20x. Quadro de imagens obtidas através do *In Cell Analyzer* 2000, divididas em 13 *z-stacks* da infecção da célula MRC-5 **não contendo componentes de MEC**, aqui não se destacam imagens, pois dentre todas as replicatas experimentais realizadas não foram observadas leveduras para esse modelo 3D contendo fibroblastos MRC-5. A imagem apresenta diferentes secções do mesmo campo analisado



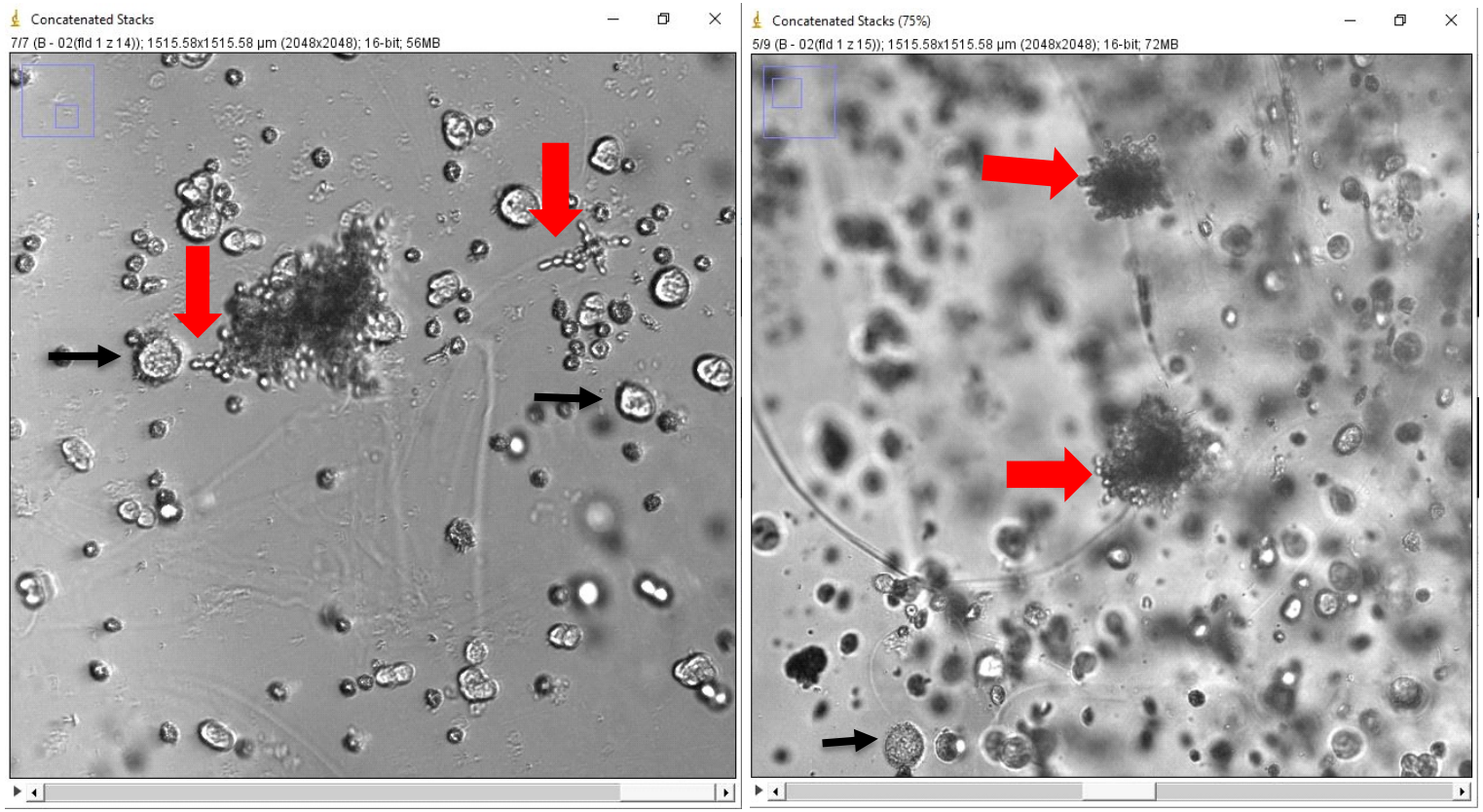
Fonte: Elaborado pelo autor

Figura 18. Infecção MRC-5 em campo claro, pelo *In Cell Analyzer* 2000, objetiva de 20x. Quadro de imagens obtidas através do *In Cell Analyzer* 2000, divididas em 7 z-stacks da infecção da célula MRC-5 **contendo componentes da MEC**, alguns campos do gel durante a infecção de Pb18 com esses fibroblastos + MEC, apresentavam aglomerados de leveduras, esses destacados na figura 19.



Fonte: Elaborado pelo autor

Figura 19. Infecção MRC-5 em campo claro, pelo *In Cell Analyzer* 2000, objetiva de 20x aumento de z-stacks. Imagens obtidas através do *In Cell Analyzer 2000*, com aumento de dois *z-stacks* (7 e 8) de diferentes experimentos sendo a imagem da esquerda referente ao resultado anterior, as setas vermelhas indicam regiões dos aglomerados de leveduras, e leveduras soltas próximas as células de fibroblasto. Aqui como nas imagens anteriores observa-se melhor as leveduras nas extremidades dos aglomerados de Pb18 com multibrotamentos gerados a partir de uma célula central, as setas pretas indicam células que foram encapsuladas no gel.



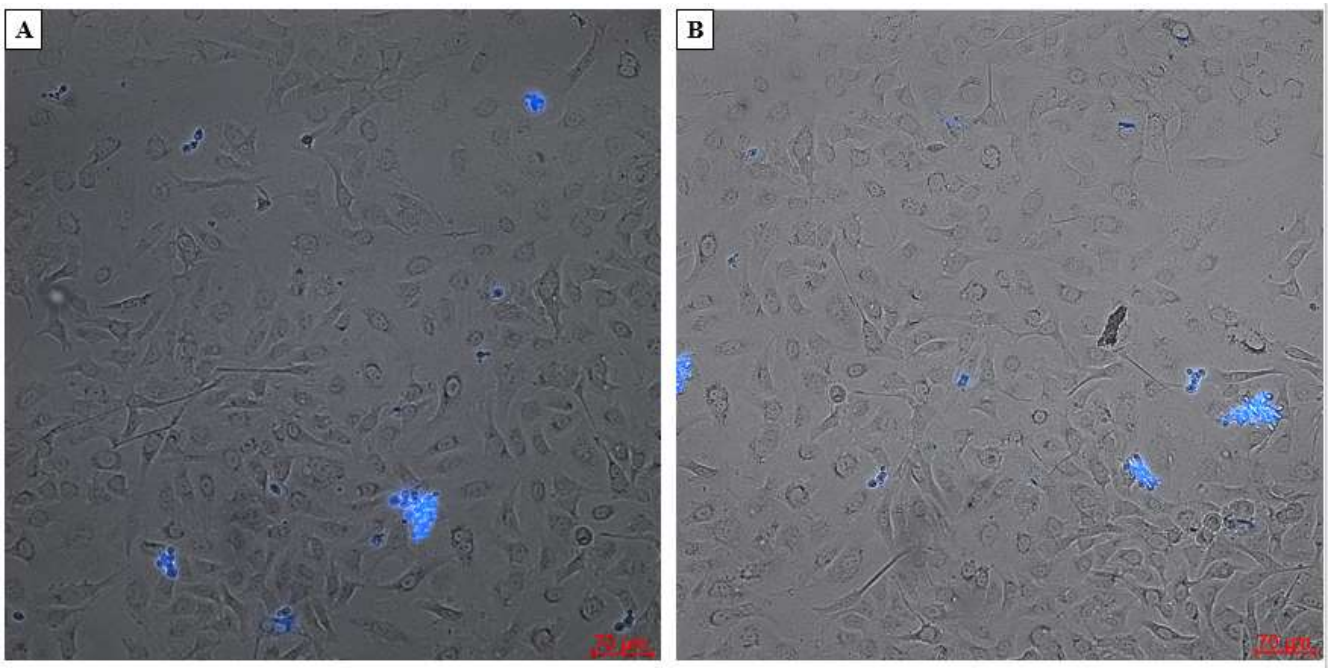
Fonte: Elaborado pelo autor

4.7.2 Microscopia de fluorescência do modelo de pérola de alginato pelo *In Cell Analyzer* 2000

Para que fosse possível avaliar a diferença de interação fungo-células entre as condições estabelecidas foi realizado experimento de microscopia por fluorescência, onde seria possível analisar qualitativamente a presença do microrganismo no modelo 3D. Inicialmente foi realizado uma dupla coloração com FITC-Faloidina que atua corando uma porção do citoesqueleto celular, e *calcofluor white* (CW), corante que age se ligando a componentes da parede de células fúngicas como α–glucana, β-glucana e quitinas, porém durante as tentativas de padronização de visualização da interação fungo-células, o corante FITC-Faloidina de acumulava no interior do gel gerando um excesso de fluorescência o qual não se conseguia diminuir (eliminando o *background*), isso dificultava a visualização das células, além de que o arcabouço possui uma espessura de 0,3 cm o que dificulta a passagem de luz durante a microscopia de fluorescência, isso não permitia a visualização nítida dos dois canais.

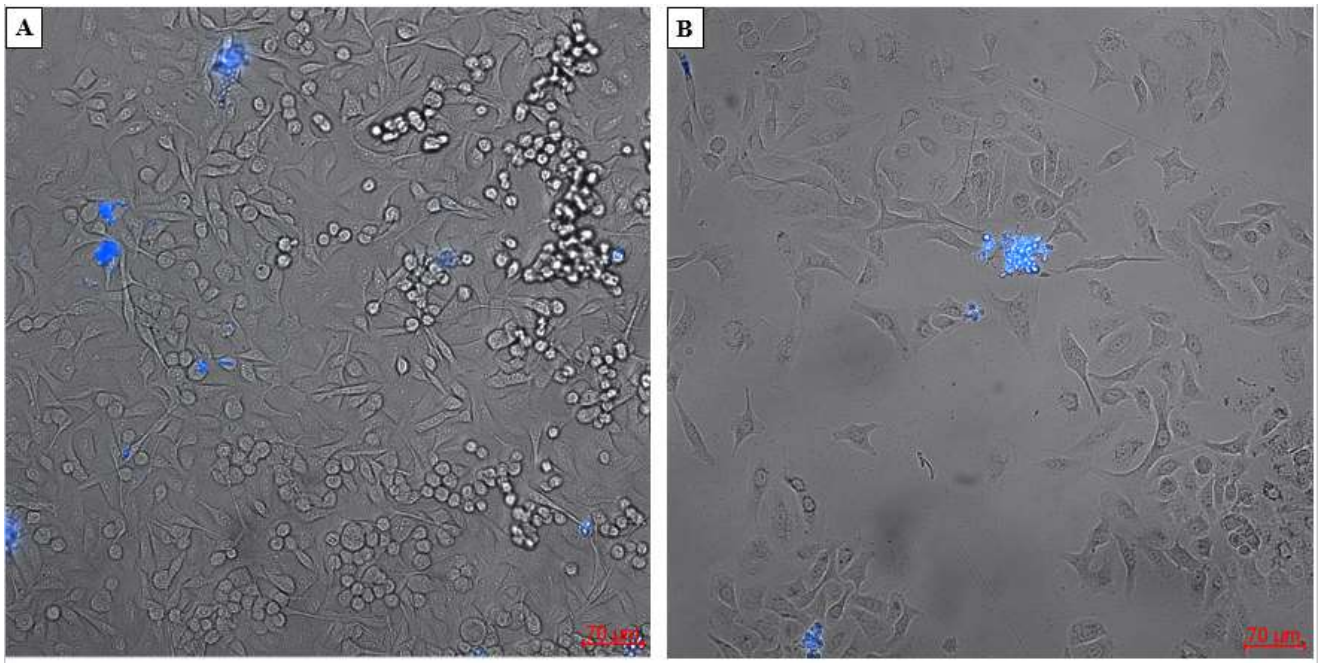
Então o experimento foi conduzido apenas com o corante *calcofluor white*, onde as células de Pb18 foram coradas previamente e após a coloração foram dispostas sobre o modelo 3D para incubação, assim as células A549 e MRC-5, foram visualizadas em campo claro (preto e branco), com as leveduras coradas em azul.

Figura 20. Microscopia em fluorescência adquirida pelo equipamento *In Cell Analyzer 2000* A-B) Células A549 cultivadas em monocamada **não contendo componentes da MEC**, infectadas com Pb18 (azul), corado com *calcofluor white*. Em campo claro observamos as células aderidas ao poço



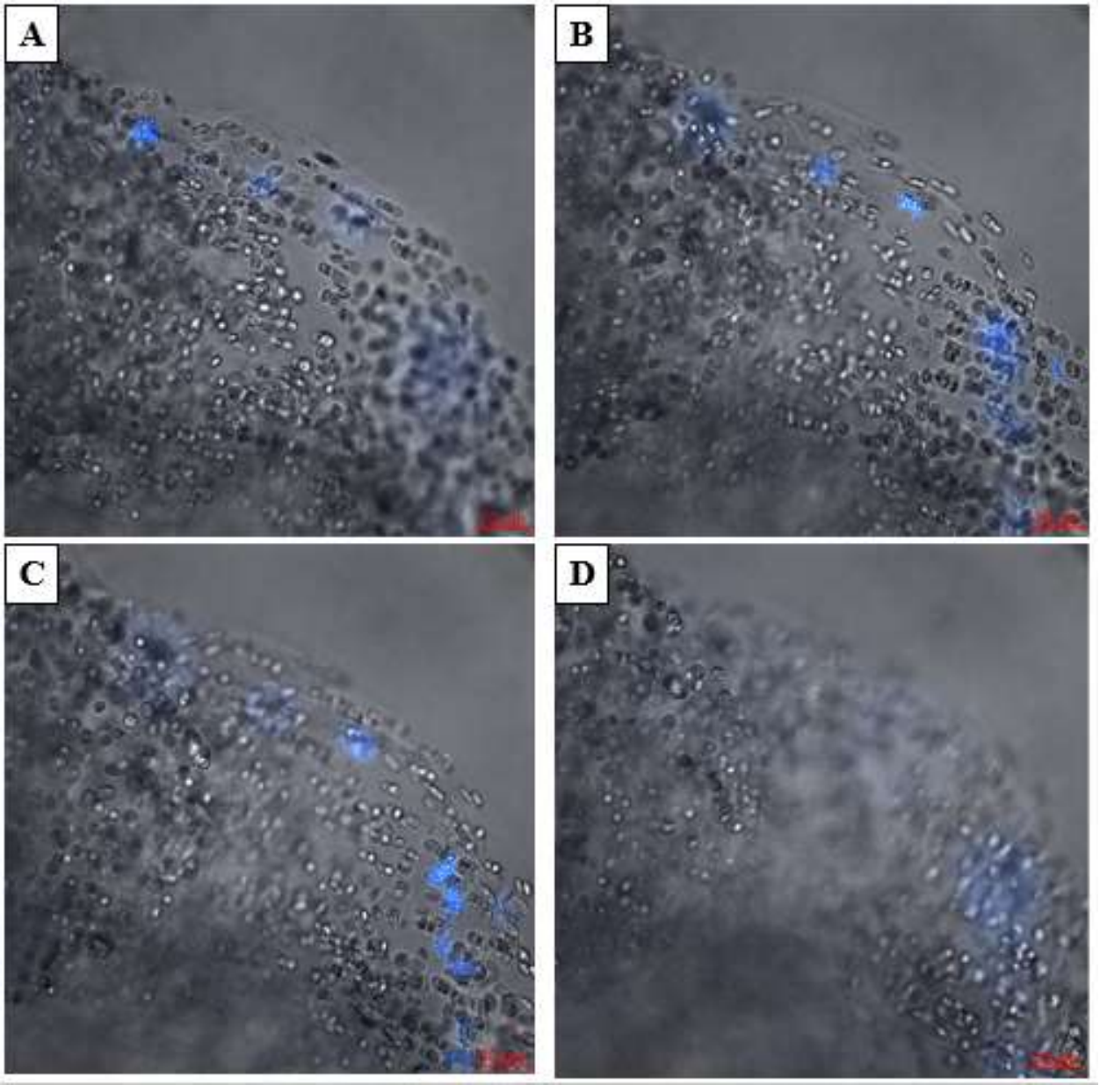
Fonte: Elaborado pelo autor

Figura 21. Microscopia em campo claro adquirida pelo equipamento In Cell Analyzer 2000 A-B) Células A549 cultivadas em monocamada **com adição de proteínas da MEC**, infectadas com Pb18 (azul) corado com *calcofluor white*.



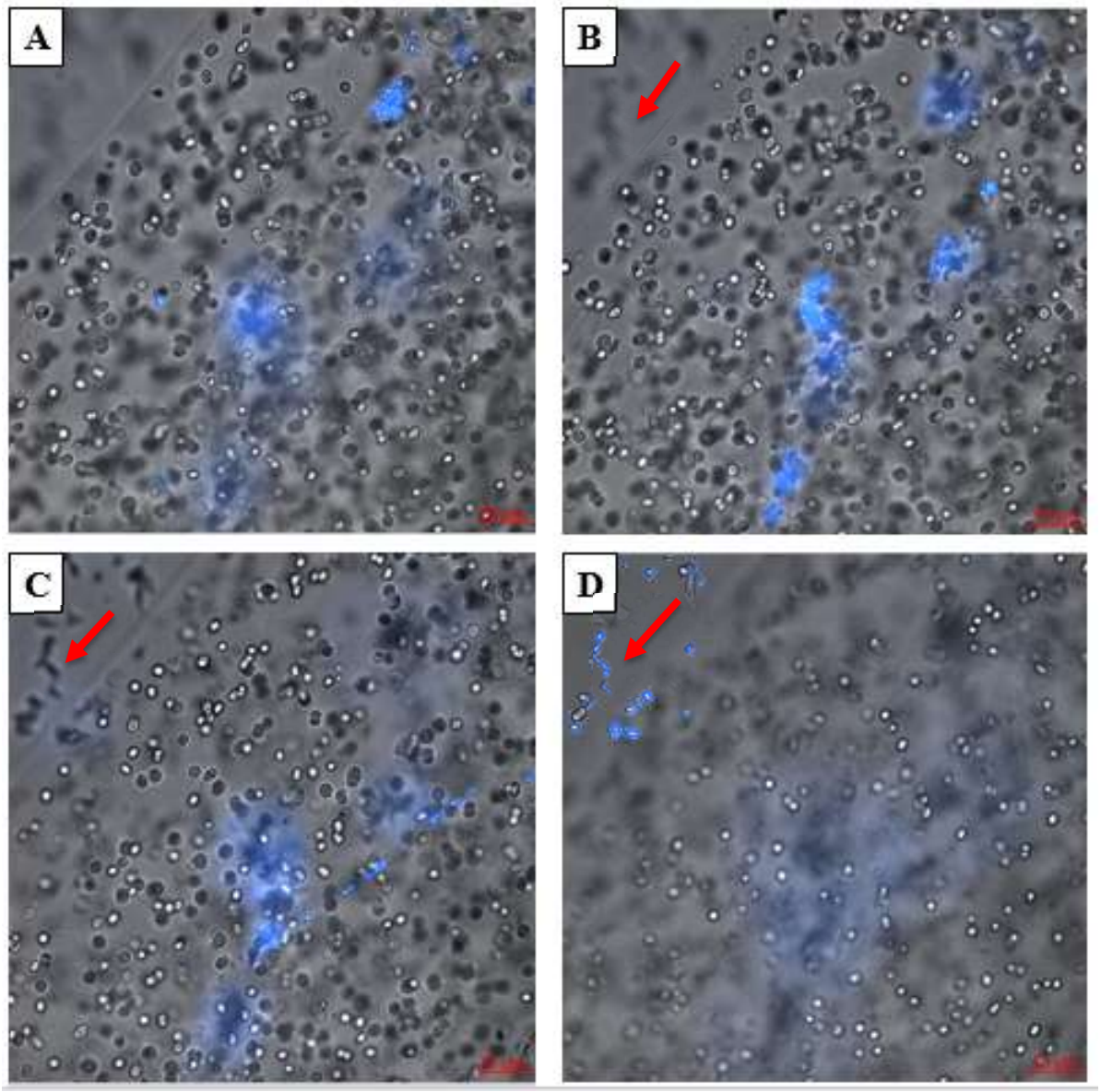
Fonte: Elaborado pelo autor

Figura 22. Microscopia em campo claro adquirida pelo equipamento In Cell Analyzer 2000 A-D) Células A549 cultivadas em arcabouço 3D, infectadas com Pb18 (azul) corado com *calcofluor white* **não contendo componentes de MEC** no gel, a imagem representa diferentes secções do mesmo campo analisado, evidenciando a presença de Pb18 em diferentes localizações da amostra.



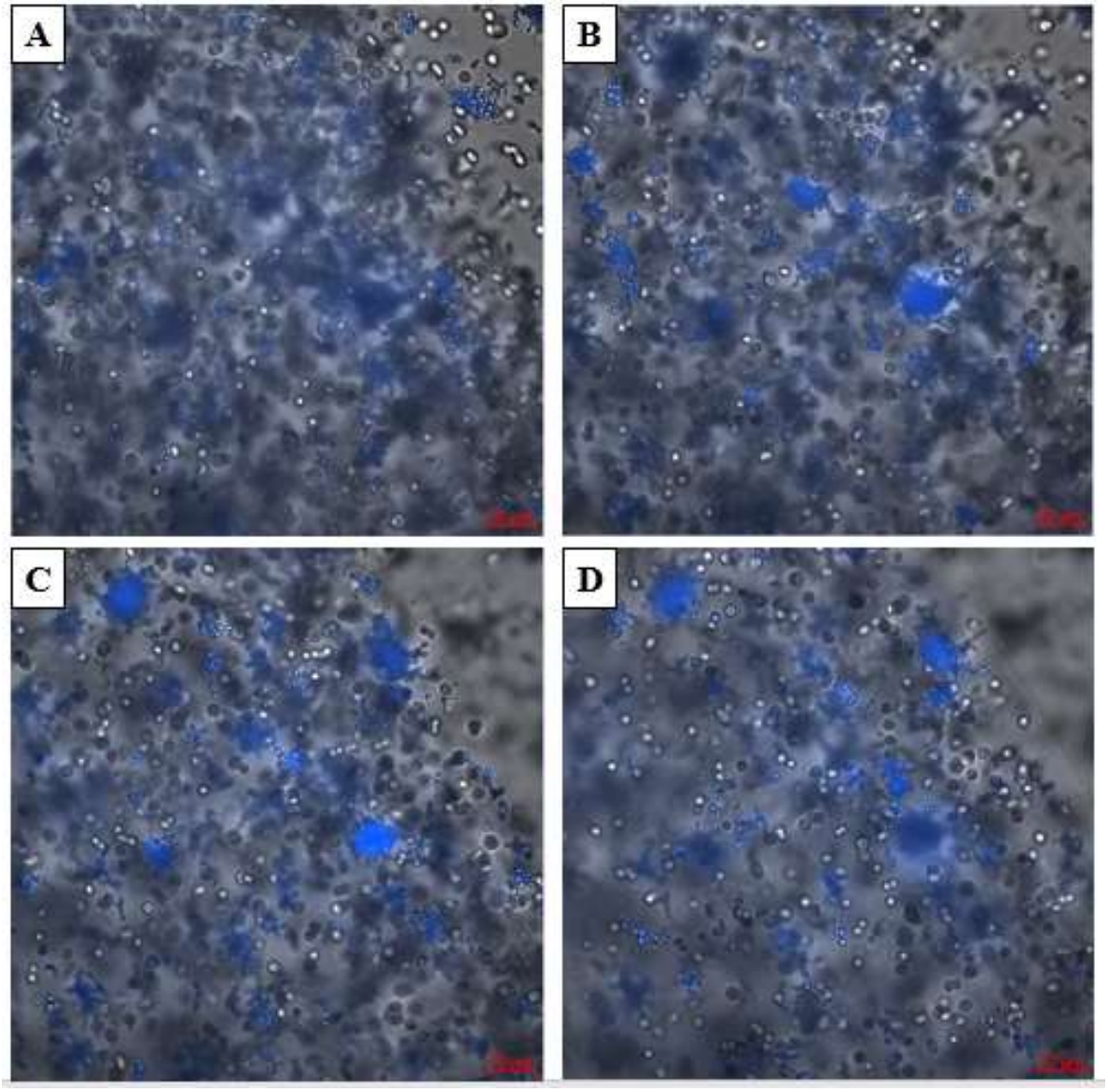
Fonte: Elaborado pelo autor

Figura 23. Microscopia em campo claro adquirida pelo equipamento In Cell Analyzer 2000 A-D) Células A549 cultivadas em arcabouço **contendo componentes de MEC**, infectadas com **Pb18** (azul) corado com *calcofluor white*, a imagem representa diferentes secções do mesmo campo analisado, evidenciando a presença de *P. brasiliensis* em diferentes localizações da amostra. A seta vermelha indica o fundo do poço, sendo possível observar a diferença entre leveduras que interagem com o alginato, de leveduras que sedimentaram.



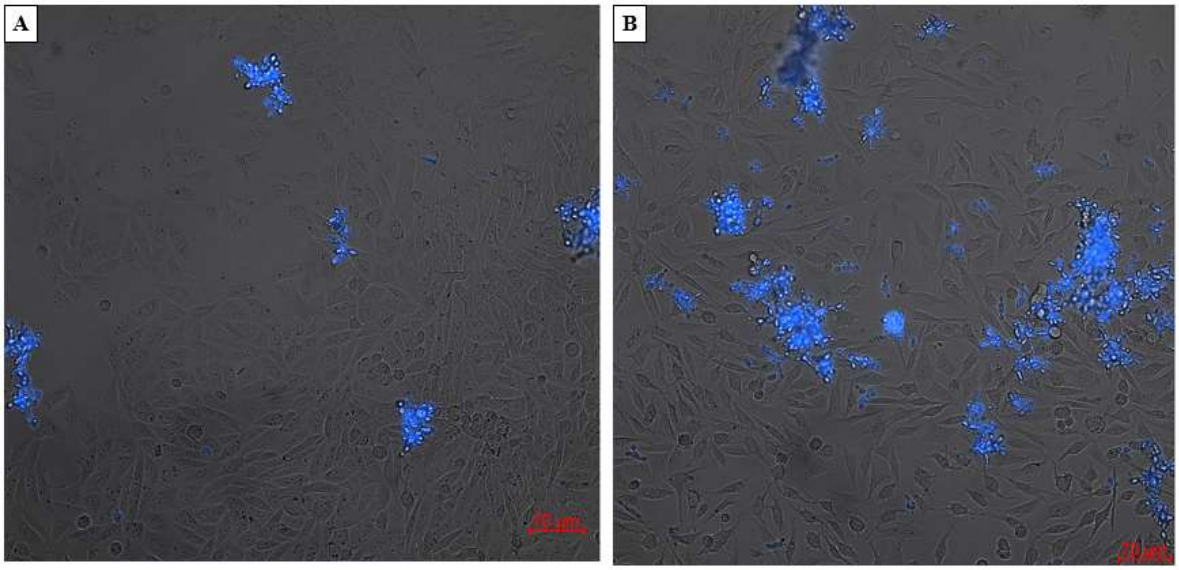
Fonte: Elaborado pelo autor

Figura 24. Controle de microscopia em campo claro adquirida pelo equipamento *In Cell Analyzer 2000* A-D) Células A549 *e* Pb18 encapsulados em conjunto, fungo corado com *calcofluor white* anteriormente a deposição do mesmo no poço onde se encontrava as células encapsuladas, a imagem representa diferentes secções do mesmo campo analisado, evidenciando a presença de *P. brasiliensis* em diferentes localizações da amostra.



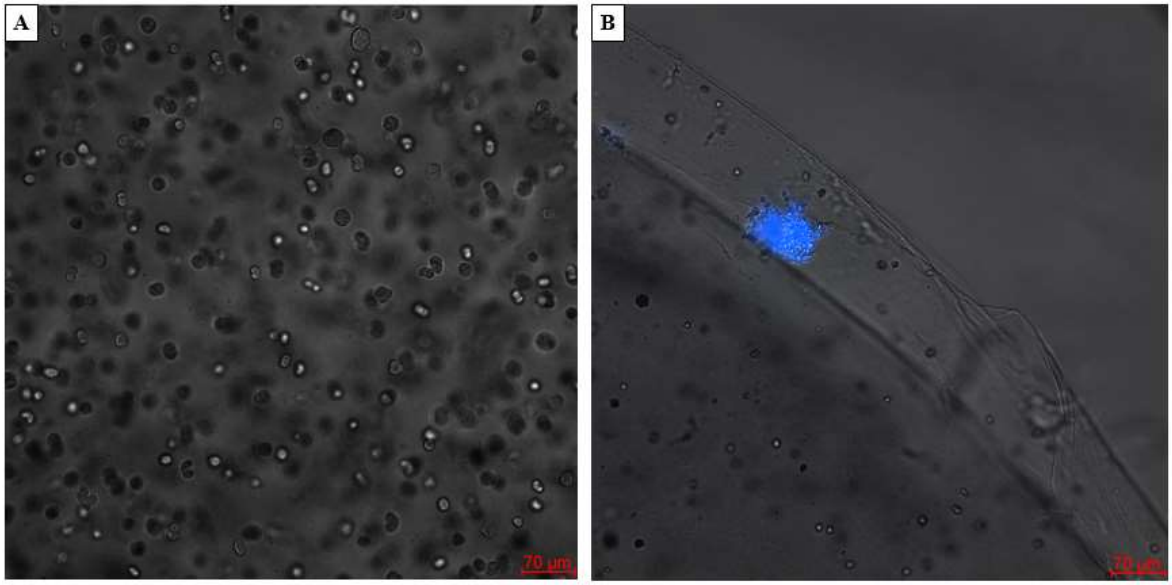
Fonte: Elaborado pelo autor

Figura 25. Microscopia em campo claro adquirida pelo equipamento *In Cell Analyzer* 2000 A) Células MRC-5 cultivadas em monocamada **não contendo componentes de MEC**, infectadas com Pb18 corado com *calcofluor white*. **B) C**élulas MRC-5 cultivadas em monocamada, **contendo componentes de MEC**, infectadas com Pb18 corado com *calcofluor white.* A seta vermelha indica levaduras no sobrenadante do poço



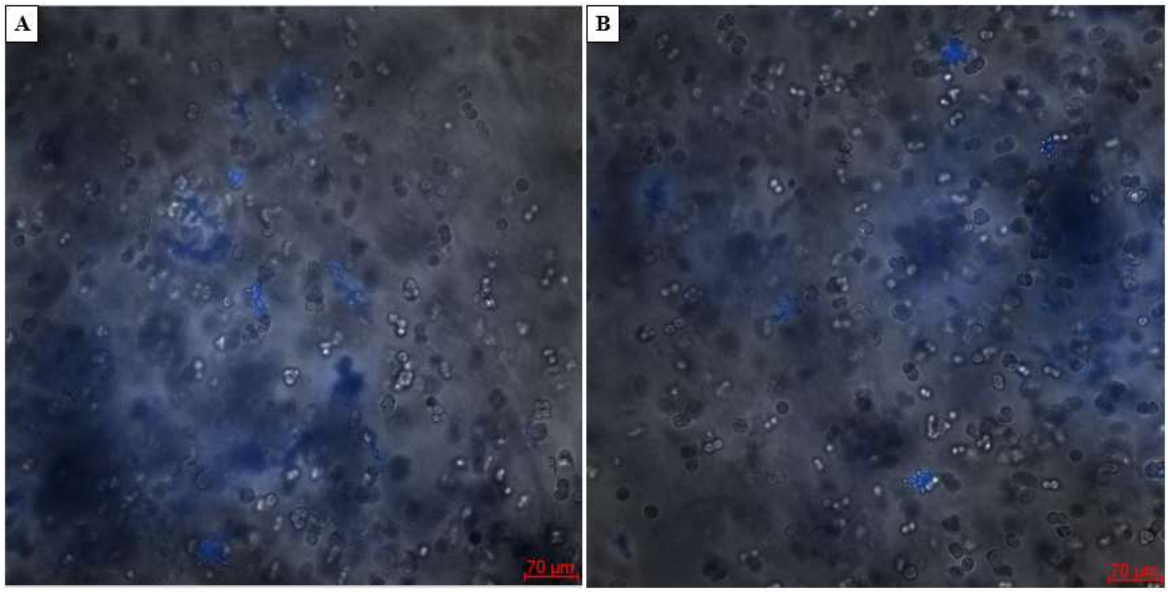
Fonte: Elaborado pelo autor

Figura 26. Microscopia em campo claro adquirida pelo equipamento In Cell Analyzer 2000 A). Células MRC-5 cultivadas em arcabouço **não contendo componentes de MEC**, infectadas com Pb18 corado com *calcofluor white*. **B)** Células MRC-5 cultivadas em arcabouço, **contendo componentes da MEC**, infectadas com Pb18 corado com *calcofluor White*



Fonte: Elaborado pelo autor

Figura 27. Controle de microscopia em campo claro adquirida pelo equipamento *In Cell Analyzer 2000* A-B). Células MRC-5 *e* Pb18 encapsulados em conjunto, fungo corado com *calcofluor White* (azul), a imagem representa diferentes secções do mesmo campo analisado, evidenciando a presença de *P. brasiliensis*.

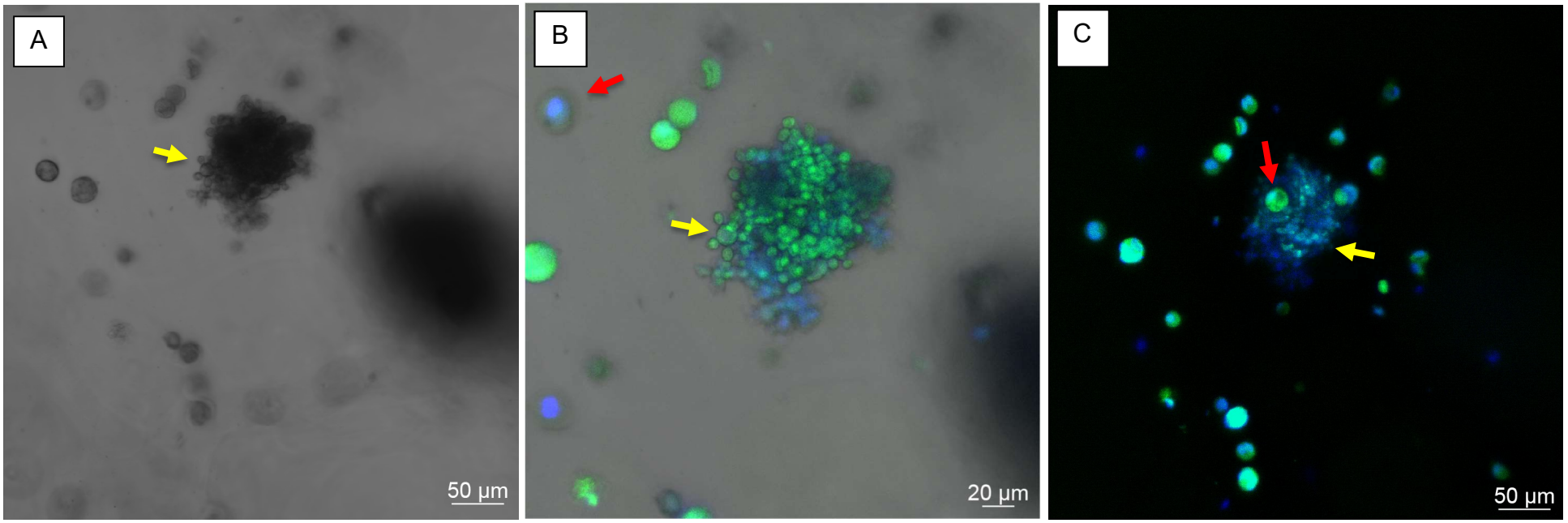


Fonte: Elaborado pelo autor

4.8 Microscopia confocal do experimento de infecção

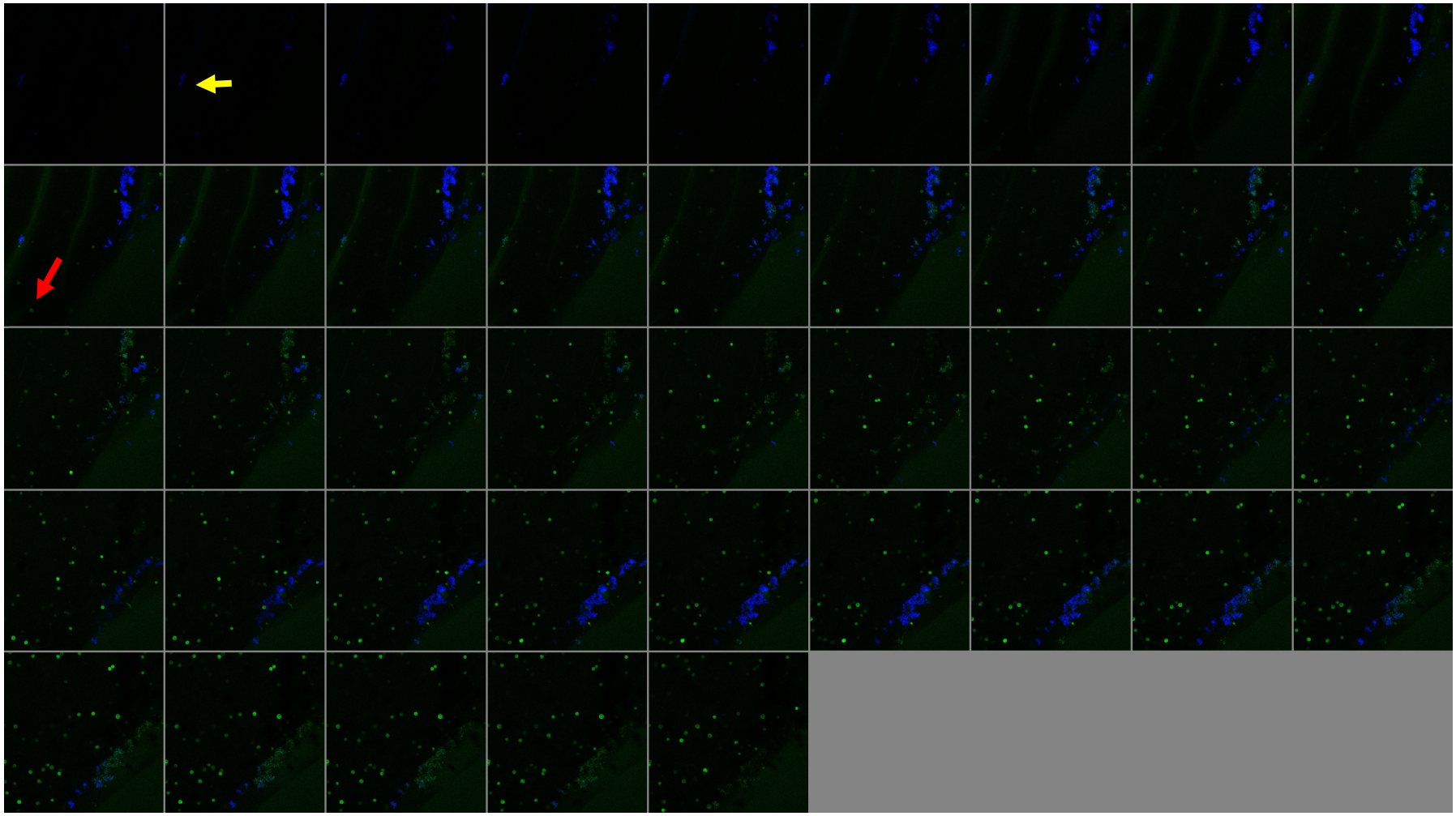
Neste ensaio, buscava-se avaliar: **(i)** se as leveduras conseguiam adentrar nas pérolas de alginato e **(ii)** se as mesmas interagiam com as células A549 que estavam dentro do arcabouço. Neste sentido, foi tomado o máximo de cuidado para se retirar as leveduras que não estivessem dentro do gel, através de cuidadosas lavagens com PBS. Durante a análise foi escolhido um ponto focal da amostra que evidenciou leveduras dentro do gel de alginato (Figura 28 e 29, pontas de seta), demonstrando que as mesmas conseguem entrar e migrar, uma vez que estavam no exterior. Foram identificadas, também, leveduras próximas às células A549 (Figura 28 e 29 seta), no entanto não se pode afirmar com precisão se houve interação entre as mesmas. Nas barras lateral e superior, verifica-se a presença de células fúngicas em toda a espessura da amostra, confirmando que as mesmas estavam no interior do gel. É interessante notar, também, que há pontos de sobreposição entre as cores verde e azul, evidenciando o íntimo contato entre as células A549 e as leveduras (Figura 12, barras superior e lateral, asterisco).

Figura 28. Microscopia confocal de uma pérola de alginato infectada durante o período de 72h horas com o fungo Pb18. A) Microscopia em campo claro da pérola de alginato a seta amarela indica um aglomerado de células de pb18 onde na extremidade é possível observar uma levedura com multibrotamentos característica de *Paracoccidioides* sp. **B)** merge dos corantes FITC-DAPI sendo observado atuação dos dois corantes tanto para as células (seta vermelha) quanto leveduras (seta amarela). **C)** merge dos corantes DAPI-FITC, sendo observado células com morfologia arredondada (seta vermelha) presentes no meio de um aglomerado de leveduras (seta amarela).



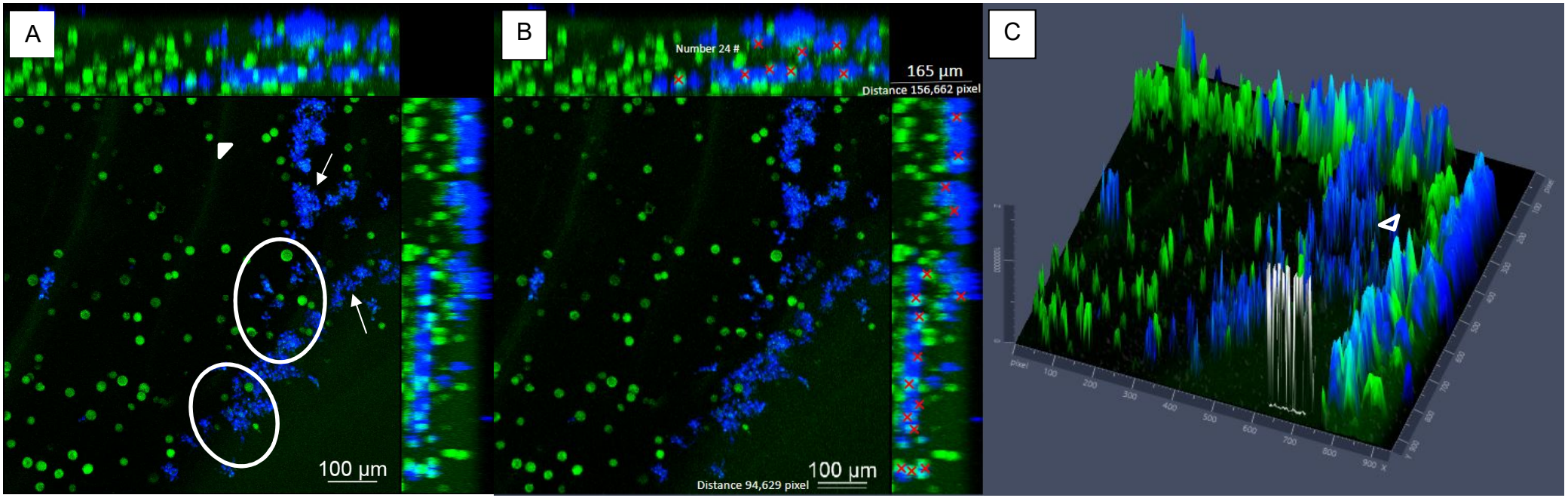
Fonte: Elaborado pelo autor

Figura 29. Microscopia confocal de uma pérola de alginato infectada durante o período de 72 horas com o fungo *Paracoccidioides brasiliensis* (Pb18). A imagem apresenta os 41 *z-stacks* adquiridos durante a análise de um ponto focal da amostra). Em verde estão representadas células A549 coradas com FITC, e em azul estão as leveduras coradas com o *calcofluor white*. É possível observar a partir do *z-stack* 2 (seta amarela) as leveduras de Pb18 aparecendo em um ponto do gel seguindo pelas secções subsequentes da amostra, as células em verde coradas com FITC aparecem a partir do *z-stack* 10 (seta vermelha), é importante ressaltar que as células permanecem no interior do gel após a gelificação, sendo visualizado nas porções do meio das imagens a presença do fungo e células no mesmo quadro.



Fonte: Elaborado pelo autor

Figura 30. Microscopia confocal de uma pérola de alginato infectada durante o período de 120 horas com o fungo Pb18 (Pb18). A) em verde estão representadas células A549 coradas com FITC (ponta de seta), e em azul estão as leveduras coradas com o *calcofluor white*. Se verifica alta concentração de leveduras no interior do gel (seta) e proximidade entre células hospedeiras A549 e células fúngicas (circulos). Não é possível, entretanto, afirmar que houve interação direta entre as mesmas. **B)** percebe-se, nas marcações em "x", pontos de sobreposição das cores azul e verde, evidenciando o contato próximo entre as células A549 e as leveduras somando 24 pontos, também se observa a espessura da porção analisada foi de 165µm, medidas obtidas a partir do *software* ZenBlue. **C)** Imagem 2,5D gerada no software ZenBlue mostrando a altura dos pontos presentes na amostra, observa-se que existem diferentes alturas entre leveduras e células, o que é explicado devido a 3Didade da amostra que resulta na distribuição em diferentes porções do gel, além disso observa-se também alguns pontos de sobreposição de cores (ponta de seta) na extremidade inferior direita.

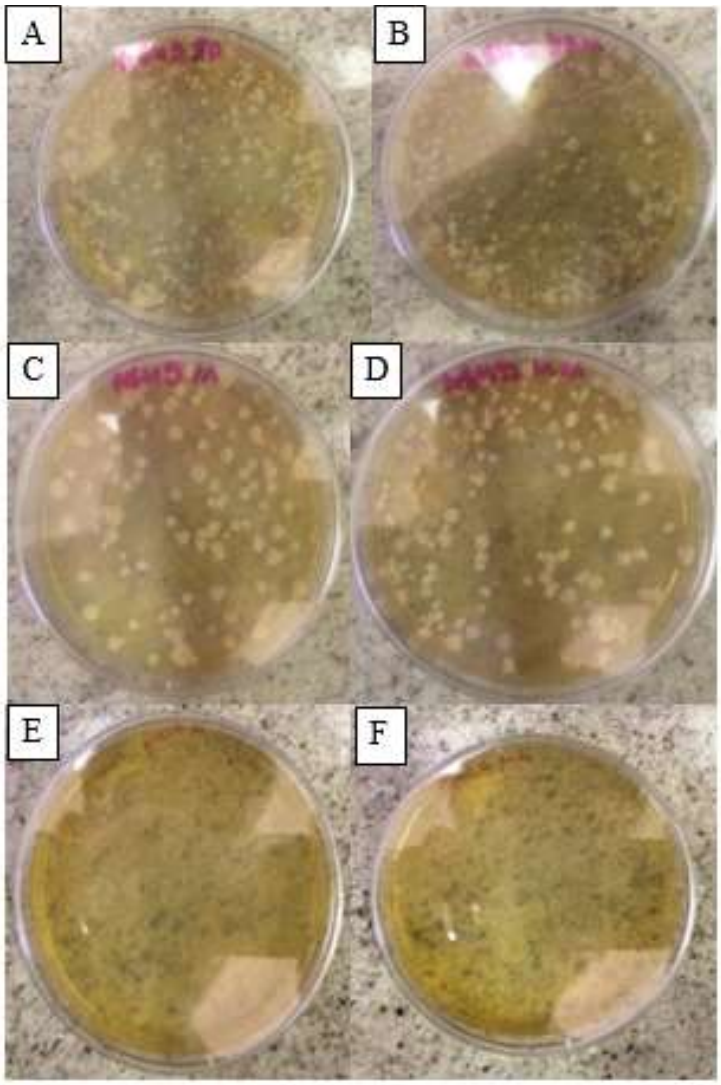


Fonte: Elaborado pelo autor

4.9 Isolamento do *Paracoccidioides brasiliensis* após infecção do modelo 3D

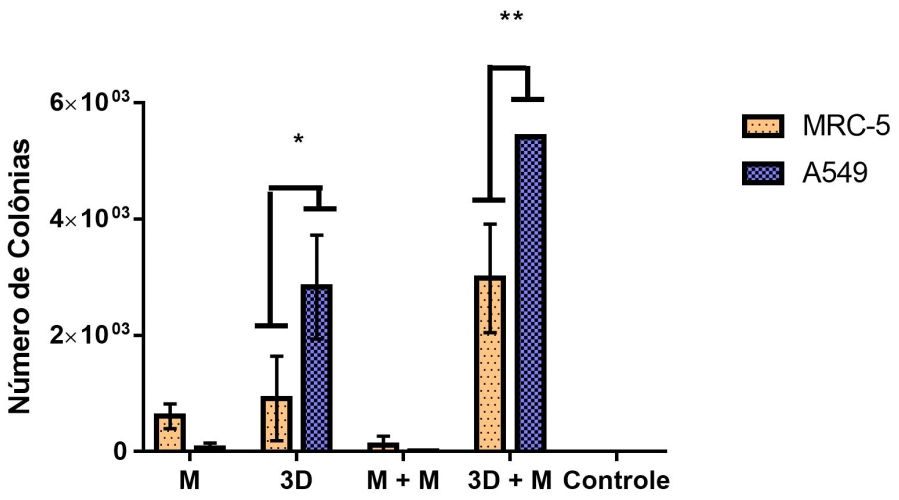
Foi verificado um crescimento consistente de células fúngicas após 24 horas de incubação (Figura 31), viabilizando a proposta para de um ensaio de isolamento de colônias para averiguar o crescimento do microrganismo na presença e ausência de componentes da MEC, aqui observa-se que predominância de isolamento para as células A549 sem mais proeminente a visualização de colônicas quando o modelo contenho componentes da MEC. A analise também foi realizada de forma semi-quantitativa expressa em gráfico representado na (Figura 32).

Figura 31. Isolamento do Pb18 em meio de cultura sólido para contagem de UFC Imagem de placas de Petri contendo meio de cultura BHI suplementado com colônias isoladas de Pb18 pós infecção das células A549 e MRC-5. A) colônias isoladas a partir do modelo 3D utilizando as células A549, **B)** colônias isoladas a partir do modelo 3D de células A549 contendo componentes da MEC. **C)** colônias isoladas a partir das células A549 cultivadas em monocamada. **D)** colônias isoladas a partir das células A549 em monocamada contendo componentes da MEC. **E)** placa de petri pós semeadura do Pb18 em células MRC-5 monocamada. **F)** placa de petri pós semeadura do Pb18 em células MRC-5 monocamada contendo componentes da MEC.



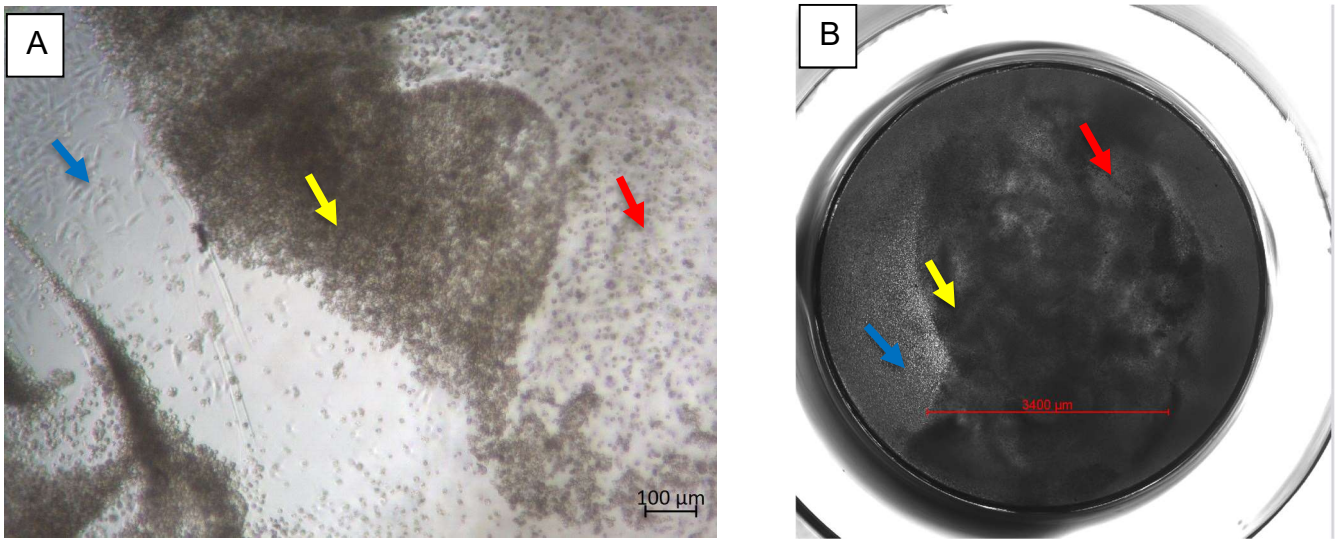
Fonte: Elaborado pelo autor

Figura 32. Gráfico de UFC isolados pós infecção das células em monocamada e modelo 3D. Experimento semi-quantitativo realizado em duplicata experimental com valores de números de colônias isoladas de acordo com cada condição de cultivo sendo M (monocamada), M+M (monocamada com adição de MEC), 3D (3D), e 3D+M (3D com adição de MEC). Valores dados pela média ± D.P. são resultados de uma análise *two-way* ANOVA. * P = 0,0123, ** P = 0,0023.



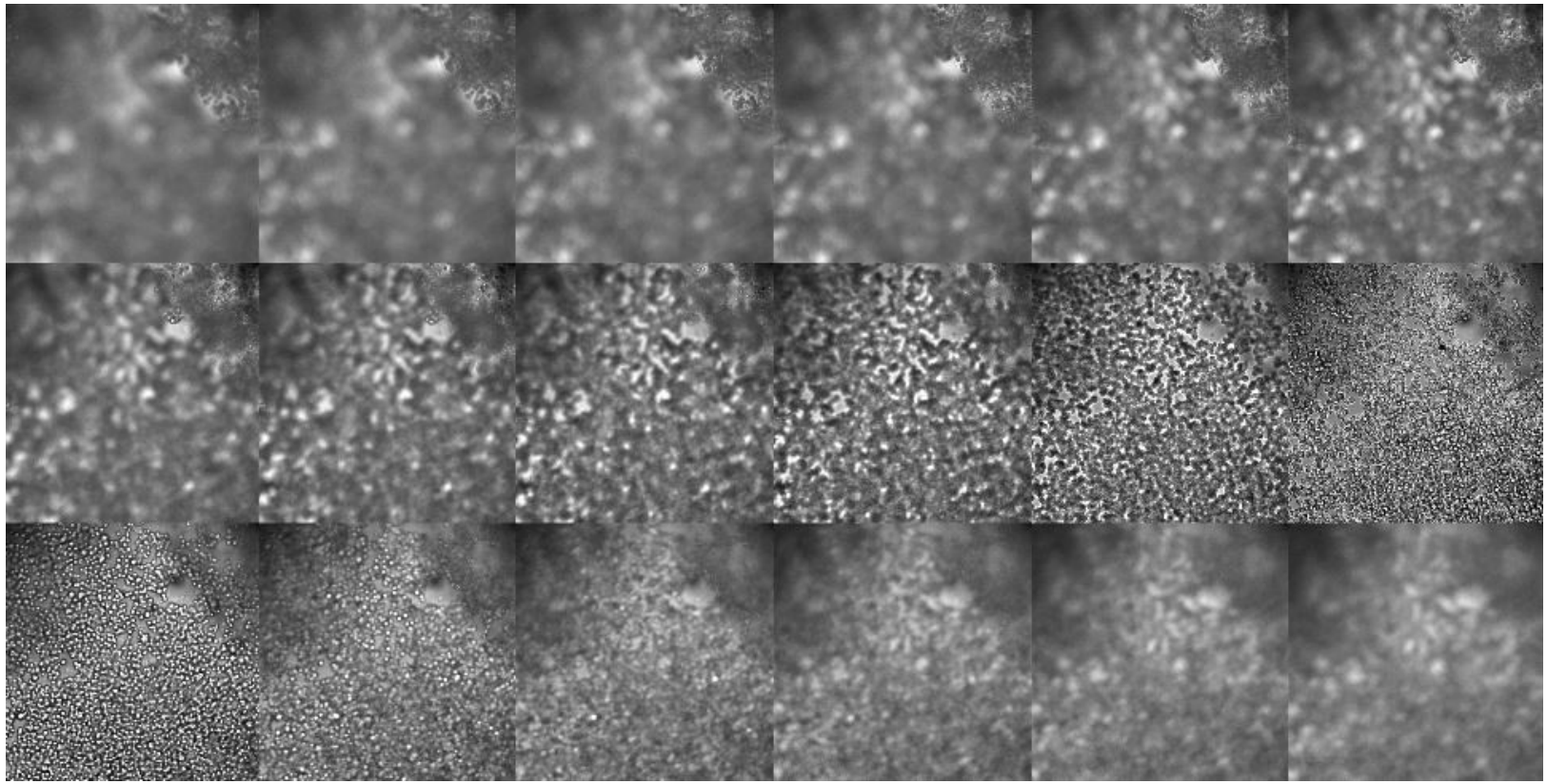
Fonte: Elaborado pelo autor

Figura 33. . Microscopias em campo claro do modelo 3D de tapete de alginato. A) Microscopia em campo claro utilizando microscópio invertido em objetiva de 10x com 24h de cultivo. **B)** Microscopia em campo claro utilizando o *In Cell Analyzer* 2000 em objetiva de 2x. A seta azul indica célula no fundo do poço, sendo na imagem A possível observar células MRC-5 aderidas, a seta amarela indica células A549 semeadas por cima do gel, enquanto a seta vermelha indica células encapsuladas no gel morfologicamente com características já apresentadas anteriormente.



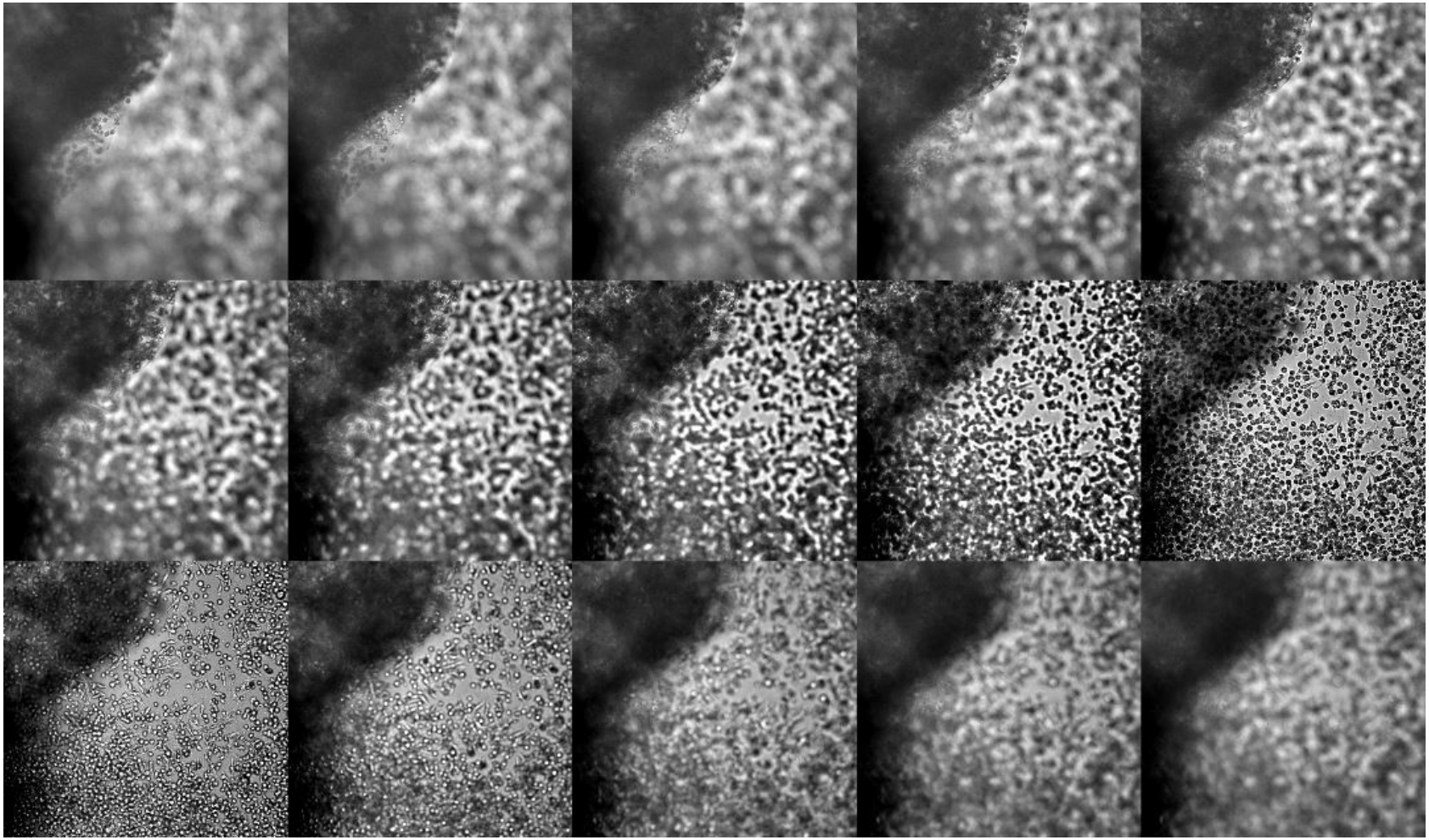
Fonte: Elaborado pelo autor

Figura 34. Modelo de camadas de alginato MRC-5/A549 0h. Microscopia adquirida pelo *In Cell Analyzer 2000*, dividida em 18 *z-stacks*, em objetiva de 20x com 0 horas de cultivo.



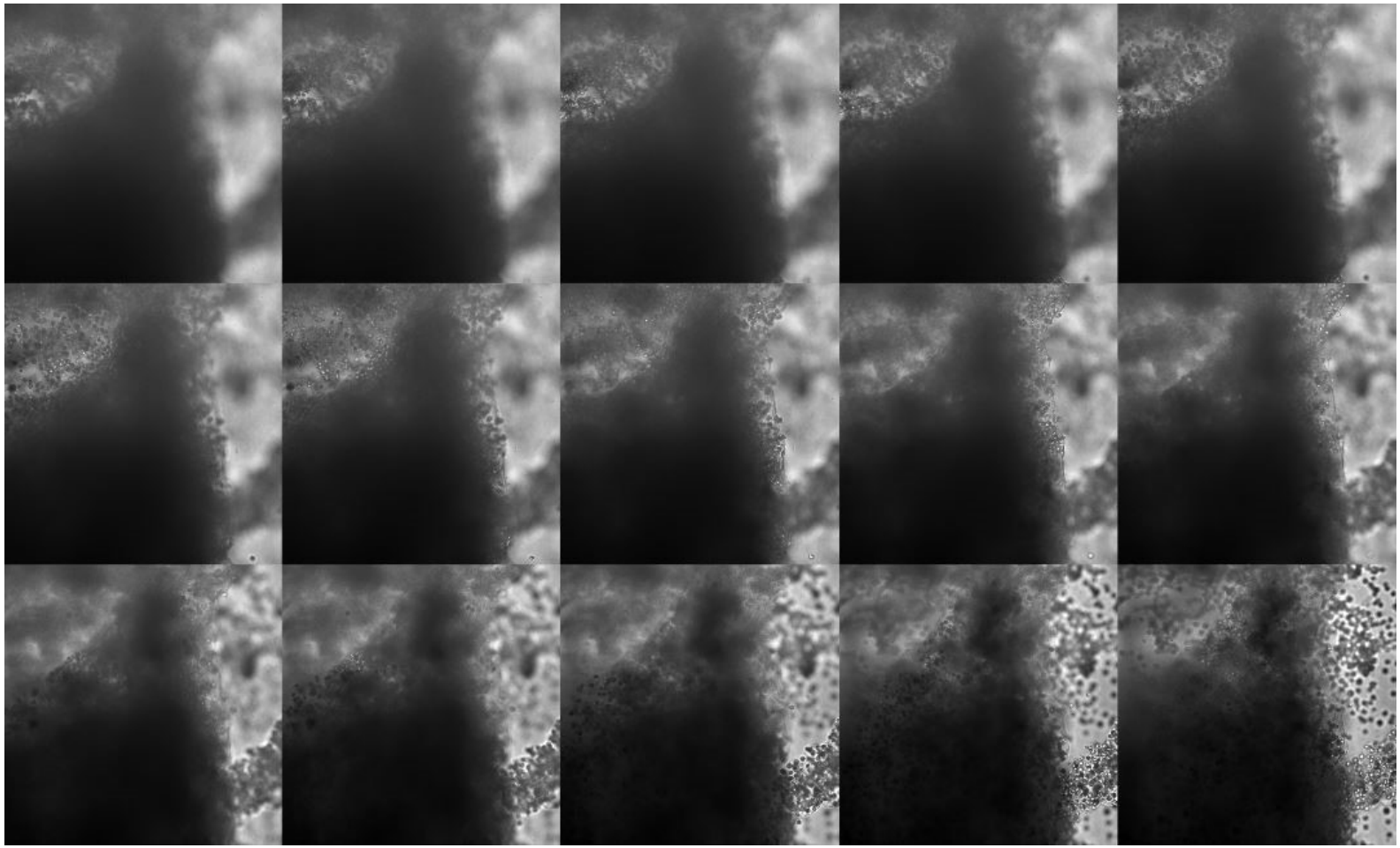
Fonte: Elaborado pelo autor

Figura 35. Modelo de camadas de alginato MRC-5/A549 48h. Microscopia adquirida pelo *In Cell Analyzer 2000*, dividida em 15 *z-stacks*, em objetiva de 20x com 48h horas de cultivo. As setas vermelhas indicam células em morfologia aderente com células em morfologia circular.



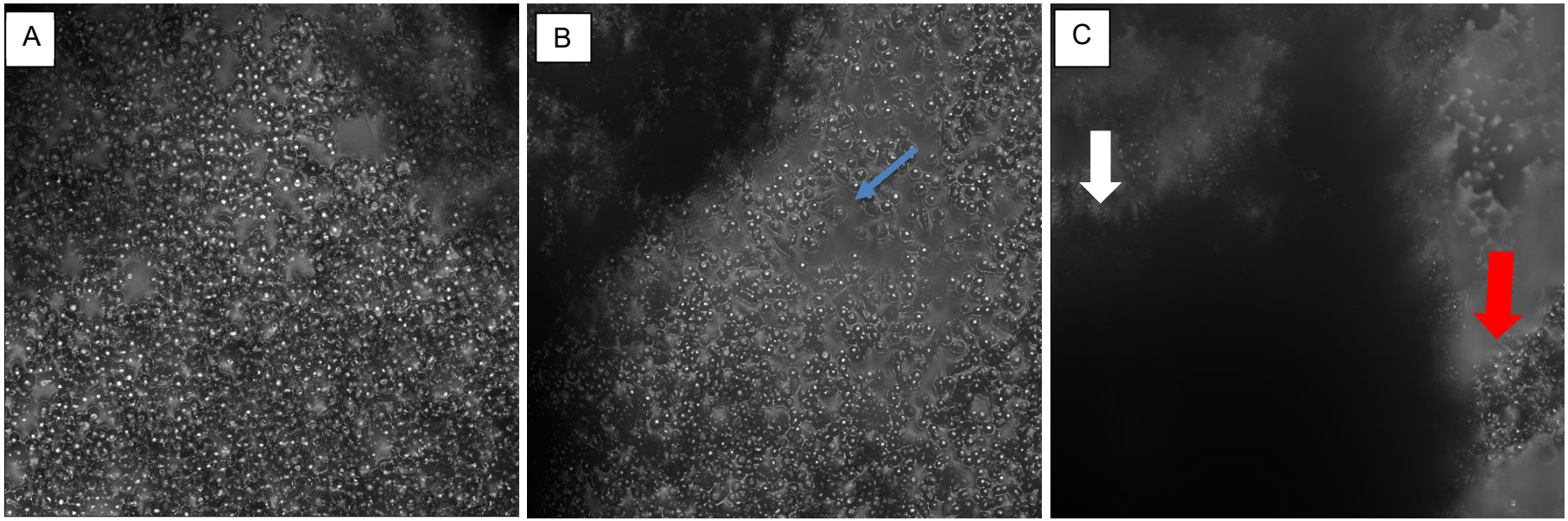
Fonte: Elaborado pelo autor

Figura 36. Modelo de camadas de alginato MRC-5/A549 168h. Microscopia adquirida pelo *In Cell Analyzer 2000*, dividida em 15 ***z-stacks***, em objetiva de 20x com 168h horas de cultivo. As setas vermelhas indicam células em morfologia aderente com células em morfologia circular.



Fonte: Elaborado pelo autor

Figura 37. Modelo de camadas de alginato MRC-5/A549. Microscopia adquirida pelo *In Cell Analyzer* 2000, dividida em 15 *z-stacks*, em objetiva de 20x com 168h horas de cultivo. **A)** *Concatenaded* gerado pelo Image J de todos os *z-stacks* do tempo de 0h, onde observamos densa população celular. **B)** *Concatenaded* dos z-stacks refrentes ao tempo de 24h, nesse tempo observamos algumas células com morfologia característica de monocamada em meio as células com morfologia arredondada como descrito na figura 34 indicado pela seta azul. **C)** *Concatenaded* do tempo de 168h, onde a seta branca indica uma densa população de células encapsuladas e a seta vermelha indica células em uma porção diferente com morfologia arredondada.



Fonte: Elaborado pelo autor

5. DISCUSSÃO

O uso da linhagem A549 (Figura 4A), para desenvolvimento do modelo 3D, foi delineado baseando-se no histórico de trabalhos produzidos no Núcleo de Proteômica, que historicamente utiliza essa linhagem celular como modelo *in vitro* de estudo para interações fungo-hospedeiro. Seu uso foi iniciado quando a célula ficou disponível no Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ), a partir disso a A549 sempre apresentou resultados satisfatórios em experimentos *in vitro* conduzidos para estudos de fungos, que tem como alvo o sistema respiratório (BERNARDI, et. al, 2017; SCORZONI, et. al, 2017; de OLIVEIRA, et. al, 2016; SILVA, et. al, 2015; del VECCHIO, et. al, 2009; da SILVA, et. al, 2007) . Trabalhos de outros pesquisadores também utilizaram está linhagem com a mesma finalidade (del VECCHIO, et. al, 2009; HERNÁNDEZ, et. al, 2010; SILVA, et. al, 2015; OLIVEIRA, et. al, 2015). Trabalhos prévios do grupo demonstraram, também, que essa linhagem possui plena capacidade de interação com as células fúngicas, uma vez que seu fenótipo tumoral leva à expressão de mais proteínas e ligantes de adesão, que em células não tumorais são pouco expressas (da SILVA, et. al, 2013). Outros grupos de pesquisadores demonstraram, independentemente, a importância desta linhagem durante a detecção de uma parte dos mecanismos de ação na interação entre as células fúngicas e as células hospedeiras, via fibronectina e fibrinogênio (GONZALES, et. al, 2008).

Além disso, seu uso também se justifica devido ao tropismo do *Pb18* por células pulmonares observado em pacientes, uma vez que esse é o seu principal sítio de infecção, que se inicia através de conídios contidos no solo liberados pela sua fase micelial presente no ambiente (SHIKANAI-YASUDA, et. al, 2018). Quando o fungo adentra o organismo do hospedeiro, ele pode atingir os pulmões onde estão presentes pneumócitos e fibroblastos pulmonares, além de componentes da MEC do pulmão (de OLIVEIRA, et. al, 2014; MARCOS, et. al, 2012; SILVA, et. al, 2011; MENDES-GIANNINI, et. al, 2006) . Portanto, buscamos construir um modelo *in vitro,* 3D, que mimetize, da melhor maneira possível, essas condições encontradas pelo fungo no organismo vivo (OLIVEIRA, et. al, 2015)

A padronização do desenvolvimento do modelo 3D de alginato (Figura 5 A-F) foi feita de acordo com resultados prévios publicados pelo grupo do professor orientador (BITTENCOURT, et. al, 2009; MOROZ, et. al, 2009), quando fora utilizada uma concentração de 1.5 % alginato, sendo essa suficiente para a troca de nutrientes necessária para as células cultivadas, que eram condrócitos ou células mesenquimais (BITTENCOURT, et. al, 2009) . A curva de viabilidade celular realizada por azul de Trípano (Figura 9) utilizando a linhagem celular A549 apresentou uma redução de aproximadamente 25% da viabilidade após o período de 7 dias de cultivo em gel utilizando a concentração de 1,5%, com as trocas de meio sendo realizadas a cada 48h. Avaliando-se a viabilidade após três dias de cultivo (72h Figura 9), percebe-se que esta é de aproximadamente 84%. Dois dias depois (120h), a viabilidade ainda se encontra acima de 75%. Desta forma, podemos concluir que o alginato não gera citotoxicidade excessiva às células encapsuladas. É importante citar que a maioria dos experimentos de triagem da citotoxicidade de fármacos, utilizando modelos *in vitro*, geralmente dura no máximo 72h, momento no qual a viabilidade aferida está dentro dos padrões aceitáveis. Porém, devido a essa redução significativa da viabilidade observada nas células no modelo 3D quando comparadas com a cultura de células em monocamada, novos experimentos foram conduzidos com um valor menor de concentração do gel 0,5% v/v a fim de promover um ambiente mais relaxado com poros maiores para acesso de nutrientes para as células promovendo assim uma melhor condição de cultivo. (NAM, et. al, 2019; NING, et. al, 2016; MOHANTY, et. al, 2016).

Verificando a viabilidade obtida com os resultados provenientes do método da resazurina para a célula A549 (Figura 11), representada em porcentagem, nota-se variações das curvas entre as diferentes densidades celulares avaliadas, uma das curvas para a célula A549 contendo $2x10^4$ células por pérola apresenta alta viabilidade baseada na atividade metabólica, porém esse evento acontece devido a não conversão total do corante no tempo 0h (controle), isso faz com que a comparação das medidas dos dias subsequentes ficam com um padrão exacerbado gerando consequentemente alta variância estatística como observado na (Tabela 1), isso pode acontecer devido à falta de exposição da superfície de contato celular, ou ao número reduzido de células equivalente a essa densidade

(BONNIER, et. al, 2015). Quando observamos a curva referente a densidade de $1x10^5$ células A549 (figura 11), verifica-se que a mesma acompanha parcialmente a viabilidade celular do cultivo em monocamada até o período de 72h, sendo também a densidade celular que apresenta menos variância estatística (Tabela 1). Estudos da literatura como de Wang et. al, (2018) apresentam semelhança entre o resultado de atividade metabólica, para a cultura 3D, apresentando o mesmo perfil gráfico obtido neste experimento. No caso da densidade de $5x10^5$ células A549, essa pode sugerir a princípio um maior contato célula-célula devido ao alto número de células encapsulada, porém no caso do modelo 3D as células apresentam um resultado de atividade metabólica um pouco abaixo da densidade anterior, também apresentando uma variância estatística um pouco maior. Outro fator importante a se analisar a respeito dessa curva é que devido ao alto número de células com maiores tempos de cultivo pode ser que aconteça uma perca total de viabilidade devido ao alto consumo de nutrientes e a alta excreção de metabólitos (SMITH, et. al, 2017).

Analisando a viabilidade celular pelo método da resazurina com a célula MRC-5 (Figura 12) observamos um perfil gráfico com curvas mais aproximadas entre as densidades, exceto pela densidade de $2x10^4$ que, assim como na célula A549, apresenta valores elevados. Isso reforça a suspeita de que essa densidade celular que usualmente é utilizada para células em monocamada não seja ideal para modelos tridimensionais devido ao impedimento de obtenção de padrão de viabilidade por métodos colorimétricos. Seguindo a análise estatística realizada para essa linhagem celular (tabela 2) a densidade que menos apresentou diferença estatística quando comparada com a monocamada foi a de $5x10^5$.

Comparando-se os dados obtidos da viabilidade, ambos os métodos utilizados (aferição em câmara de Neubauer e resazurina) geraram resultados favoráveis para ambas as células até o quinto dia de cultivo, ou seja, alta viabilidade das células encapsuladas nas pérolas de alginato. Assim, estes resultados reforçam a possibilidade de uso deste modelo em pesquisas biomédicas.

Em relação ao número total de células, que foram contadas em câmara de Neubauer para célula A549, percebe-se que a cultura de monocamada gera mais células, no entanto, as pérolas de alginato foram capazes de dobrar o número de

células iniciadas com aproximadamente $2,0x10^4$ células por pérola e em 168h apresentaram $4,0x10^4$, quando comparado o número inicialmente plaqueado e o recuperado ao término do experimento. Assim, embora não abundante, pode-se afirmar que o modelo foi capaz de permitir a proliferação das células encapsuladas.

Com relação aos achados morfológicos, nas imagens adquiridas com o *In Cell Analyzer*, foi observada alta celularidade, que inclusive dificultou a passagem de luz, gerando artefato na imagem (opacidade), fato que corrobora os resultados anteriormente discutidos. Além disso, as imagens obtidas na microscopia de contraste de fase (Figuras 6 e 7) mostram nitidamente a alta concentração das células em menor aumento, corroborando o resultado obtido no *In Cell Analyzer.* Percebe-se, também, comparando-se as imagens em menor aumento dos dois pontos temporais, que praticamente todas as células encontram-se translúcidas em 24h, e aproximadamente 50% das células tornaram-se opacas em 144h, o que pode ser resultado do aumento de granulosidade interna.

Seguindo as análises quantitativas e resultados estatísticos descritos anteriormente, os experimentos de infecção da cepa Pb18 foram conduzidos em pérolas de alginato contendo $1x10^5$ células por pérola, para células A549 e MRC-5. O experimento realizado com células A549 não contendo componentes da MEC em modelo 3D (Figuras 13 e 14) apresentaram estruturas aglomeradas morfologicamente distintas das células onde em maior aumento observamos leveduras com características de Pb. No modelo 3D contendo componentes da MEC foi observado que o este apresenta um número ainda maior de estruturas leveduriformes, o que faz todo sentido, devido às interações entre o fungo e a MEC. O mesmo experimento, desta vez com o inóculo fúngico corado anteriormente com *calcofluor white* (Figuras 23 e 24), corroboram os resultados anteriores, uma vez que este corante fluorescente tem atuação em estruturas da parede fúngica, diferenciando assim as leveduras de células animais (SANKETH; PATIL; RAO, 2016). Seguindo com a célula MRC-5 no modelo 3D foram observadas raras leveduras presentes no modelo (Figuras 18,19 e 26), porém ainda assim presentes como observado em maior aumento. Isso sugere a hipótese de que as células A549, assim como citada em referências anteriores, sejam um modelo celular excelente para estudos de Pb. Quando comparadas as

infecções de monocamada com modelo 3D vimos que há uma presença considerável (valores qualitativos), de leveduras na monocamada. Outra verificação interessante nas imagens é que nos modelos tridimensionais, para ambas as células, as leveduras são encontradas nas dobras criadas durante o processo de gelificação do alginato (CALIARI; BURDICK, 2016). Em apoio aos resultados obtidos sem e com fluorescência utilizando o *calcofluor white* também foi realizado uma análise confocal de uma pérola de alginato de células A549 infectadas com Pb18 não contendo componentes da MEC.

O experimento de infecção das pérolas de alginato revelou alta quantidade de células fúngicas no interior do arcabouço (Figura 30) e pontos de contato entre células fúngicas e células A549, mediante a verificação de: **i)** presença de abundante coloração azulada, proveniente do corante específico a componentes químicos presente na parede celular deste microrganismo, ausente na composição das células A549, tanto na imagem principal (Figura 12, pontas de seta) quanto nas barras (Figura 12, barras superior e lateral); **ii)** óbvia proximidade entre as células fúngicas e A549, notado tanto na imagem principal (Figura 12, setas) quanto nas barras, notado pela sobreposição das colorações verde (células A549) e azul (fungo) (Figura 12, barras superior e lateral, asterisco). Embora esta análise não seja capaz de determinar com certeza se houve interação direta, via moléculas de adesão nas células fúngicas e ligantes nas células-alvo, é incontestável o fato que há, em abundância, células fúngicas dentro do arcabouço. Uma vez que estas foram adicionadas após a gelificação, a única maneira de chegarem às camadas mais profundas do arcabouço é por migração.

Corroborando o afirmado acima, o resultado da (Figura 32) de um experimento de plaqueamento do conteúdo pós infecção para obtenção de número de colônias, mostra que o fungo foi isolado, de dentro das pérolas de alginato, após o experimento de infecção, o que permite diversas possibilidades de uso do modelo proposto em pesquisa biomédica. Por exemplo, as evidências coletadas permitem sugerir que o modelo proposto pode ser utilizado para estudos de interação fungo-hospedeiro, no qual fármacos poderiam ser triados quanto sua capacidade de modular a expressão de moléculas de adesão nas

células fúngicas, uma vez que é relativamente simples recuperar as mesmas e então realizar análises moleculares.

Além disso, verificamos que a adição de componentes da MEC tem uma influência na presença/interação das leveduras de Pb18 com o modelo 3D (Figura 32) sendo estatisticamente significativos os valores obtidos apenas para os modelos tridimensionais, com ou sem adição de componentes da MEC. Ainda analisando esse resultado podemos ver que o isolamento de colônias pós infecção foi muito maior dentre as células A549 que as células MRC-5, reforçando ainda mais a viabilidade destas células para estudo do Pb em modelos tridimensionais.

Outra estratégia utilizada foi a confecção de um outro tipo de modelo tridimensional, dessa vez em forma de tapete, onde as células são posicionadas em camadas. Foi realizado experimento piloto (Figuras 33, 34, 35, 36 e 37) onde nas análises microscópicas realizadas até o presente, o modelo mostrou indícios de células com aspectos morfológicos aderentes, além de também apresentar permeabilidade para absorção de nutrientes da cocultura A549/MRC-5. Com o passar do tempo de cultivo foi observado o mesmo evento verificado nas pérolas de alginato onde o modelo apresenta uma densa população de células que é um indicativo de proliferação, assim como já indicado em resultados anteriores. Novos experimentos, com a adição de MEC na camada contendo as células MRC-5, a fim de simular uma lâmina basal, serão realizados pelo grupo.

Até o presente momento, nosso modelo agrega algumas características desejáveis para um eficiente modelo de estudo in vitro: **i)** tridimensionalidade; **ii)** porosidade; **iii)** permite proliferação celular, uma vez que o número de células foi contado; **iv)** permite migração celular, uma vez que foram identificadas células fúngicas nas pérolas.

6. CONCLUSÕES

- O modelo de cultura 3D foi padronizado para as células A549 e MRC-5, fornecendo condições para o cultivo das mesmas e permitindo troca de nutrientes e proliferação celular, sendo a taxa de viabilidade relacionada com o tempo de cultivo das células, linhagem celular e densidade celular utilizada no modelo de hidrogel. Foi observado que as células cultivadas no modelo permanecem estáticas, porém ativas metabolicamente apesar da viabilidade sofrer um decréscimo após 120h.

- Foi realizado o cocultivo de células e fungos, havendo indícios de que o fungo é capaz de permear o gel e encontrar as células, que são o sítio de infecção do mesmo; as células epiteliais de adenocarcinoma pulmonar A549 são mais indicadas do que o fibroblasto MRC-5, uma vez que o Pb18 aparentemente estaria em maior quantidade no modelo criado com essa célula; a presença de componentes da MEC favorece a presença do fungo. Também foi constatado que é possível re-isolar o fungo após a infecção no modelo proposto tornando assim viáveis análises de pós infecção.

- Apesar do sucesso do re-isolamento, a quantidade necessária obtida de RNA foi menor do que 200 µg/mL. Assim, novos experimentos serão necessários a fim de confirmar se realmente há uma alteração de expressão de fatores de virulência do fungo quando em contato com um modelo tridimensional.

- Foi desenvolvido, também, um modelo 3D de cultura utilizando duas linhagens celulares, sobrepostas em forma de tapete.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

ABE, M. et al. Cartilage-scaffold composites produced by bioresorbable β-chitin sponge with cultured rabbit chondrocytes. **Tissue engineering**. v. 10, n. 3-4, p. 585-594, 2004.

ADAN, A.; KIRAZ, Y.; BARAN, Y. Cell Proliferation and Cytotoxicity Assays. **Current Pharmaceutical Biotechnology**. v. 17, n. 14, p. 1213 - 1221, 2016.

ANDERSEN, T. AUK-EMBLEM, P.; DORNISH, M. 3D cell culture in alginate hydrogels. **Microarrays**, v. 4, n. 2, p. 133-161, 2015.

BAKER, M. B.; CHEN, C. S. Deconstructing the third dimension – how 3D culture microenvironments alter cellular cues. **Journal of Cell Science**. v. 125, n. 13, p. 3015 – 3024, 2012.

BALESTRINI, J. L.; NIKLASON, L. E. Extracellular matrix as a driver for lung regeneration**. Annals of Biomedical Engineering**, v. 43, n. 3, p.568-576, Março de 2015.

BARKAUSKAS, C. E. et al. Lung organoids: current uses and future promise. **Development**. v. 144, n. 6, p. 986 – 997, 2017.

BEIN, A. et al. Microfluidic Organ-on-a-Chip Models of Human Intestine. **Cellular and molecular gastroenterology and hepatology**, v. 5, n. 4, p. 659–668, 2018.

BERNARDI, T. et al. Anti-apoptotic effects of decyl gallate on the induction of apoptosis in A549 pneumocytes by *Pb18* gp43. **Medical mycology**, v. 55, n. 8, p. 890-894, 2017.

BERNARDI, T. et al. Anti-apoptotic effects of decyl gallate on the induction of apoptosis in A549 pneumocytes by Pb18 gp43. **Medical Mycology**, v. 55, n. 8, p. 890-894, 2017.

BERTANHA, M. et al. Morphofunctional characterization of decellularized vena cava as tissue engineering scaffolds. **Experimental Cell Research**, v. 326, p. 103-11. 2014.

BITTENCOURT, R. A. C., et al. Chondrocyte cultures in 3D scaffold: alginate hydrogel. **Acta Ortopédica Brasileira**, v. 17, n. 4, p. 242-246, 2009.

CALIARI, S. R.; BURDICK, J. A. A Practical Guide to Hydrogels for Cell Culture. **Nature Methods**, v. 13, n. 5, p. 405–414. Abril de 2016.

CALIARI, Steven R.; BURDICK, Jason A. A practical guide to hydrogels for cell culture. Nature methods, v. 13, n. 5, p. 405-414, 2016.

CAMACHO, E.; NIÑO-VEGA, G. A. *Paracoccidioides spp*.: virulence factors and immune-evasion strategies. **Mediators of inflammation**, v. 2017, 2017.

CAPITO, R.M.; SPECTOR M. Effect of expansion medium on ex vivo gene transfer and chondrogenesis in type II collagen-glycosaminoglycan scaffolds in vitro. **Osteoarthritis Cartilage**. v. 14, n. 12 p. 1203–1213, 2006.

CARTERSON, A. J. et al. A549 lung epithelial cells grown as three-dimensional aggregates: alternative tissue culture model for Pseudomonas aeruginosa pathogenesis. **Infection and Immunity**, v. 73, n. 2, p. 1129-1140, 2005.

CESAZRS. Z. Spheroid Culture of Mesenchymal Stem Cells. **Stem Cells International.** v. 2016, 2016.

CHANDORKAR, P. et al. Fast-track development of an in vitro 3D lung/immune cell model to study Aspergillus infections. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 1-13, 2017.

CHEN, Y. W. et al. Surface modified alginate microcapsules for 3D cell culture. **Surface Science**, v. 648, p. 47-52, Junho de 2016.

CIRALDO, F. E. et al. Tackling bioactive glass excessive in vitro bioreactivity: Preconditioning approaches for cell culture tests. **Acta biomaterialia**, v. 75, p. 3-10, 2018.

da HORA, C.C. et al. Patient-Derived Glioma Models: From Patients to Dish to Animals. **Cells**, v. 8, p. 1177-96, 2019.

DA SILVA, J. L. M. et al. Epithelial cells treated with genistein inhibit adhesion and endocytosis of Pb18. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 92, n. 1, p. 129-135, 2007.

da SILVA, J.F. et al. Paracoccidoides brasiliensis 30 kDa adhesin: identification as a 14-3-3 protein, cloning and subcellular localization in infection models. **PLoS One,** v. 8, p. e62533, 2013.

DAUD, M. F. et al. An aligned 3D neuronal-glial co-culture model for peripheral nerve studies. **Biomaterials**, v. 33, n. 25, p. 5901-5913. 2012.

DE OLIVEIRA, H. C. et al. Peptides derived from a phage display library inhibit adhesion and protect the host against infection by Pb18 and Paracoccidioides lutzii. **Frontiers in pharmacology**, v. 7, p. 509, 2016.

DEL VECCHIO, A. et al. Induction of apoptosis in A549 pulmonary cells by two Pb18 samples. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 5, p. 749-754, 2009.

DESAI, K. G. H.; PARK, H. J. P. Recent Developments in Microencapsulation of Food Ingredients. **Drying Technology**, v. 23, p. 7, 2005.

DIAS, K. C. et al. Development and characterization of a 3D oral mucosa model as a tool for host-pathogen interactions. **Journal of microbiological methods**, v. 152, p. 52-60, 2018.

DRIESSCHE, V. D. et al. Evaluation of Combination Therapy for *Burkholderia cenocepacia* Lung Infection in Different *in vitro* and *in vivo* models. **PLoS One**. v. 12, n. 3, Março de 2017.

DUNSMORE, S. E.; RANNELS, D. E. Extracellular matrix biology in the lung. **American Journal of Physiology,** v. 270, n. 1, p. 3-27, 1996.

EDMONDSON, R. et al. Three-dimensional cell culture systems and their applications in drug discovery and cell-based biosensors. **Assay and Drug Development Technologies**, v. 12, n. 4, p. 207-218, 2014.

ELLISON, J. Case of Squamous-celled Carcinoma of the Cervix Uteri associated with a Nodule of Spheroidal-celled Carcinoma in the Body. **Proceedings of the Royal Society of Medicine**. v. 15, section. Gynaecol Section, p. 10-11, 1922.

EVARISTO, T.C. Light-emitting diode effects on combined decellularization of tracheae. A novel approach to obtain biological scaffolds. **Acta Cirúrgica Brasileira**. v. 8, p. 485-92, 2014.

FAN, D. STAUFER, U.; ACCARDO, A. Engineered 3D Polymer and Hydrogel Microenvironments for Cell Culture Applications. **Bioengineering**, v. 6, n. 4, p. 113, 2019.

FORTES, M. R. P. et al. Imunologia da Paracoccidioidomicose. **Anais Brasileiros de Dermatologia**. v. 86, n. 3, p. 516-524, 2011.

FRIEDRICH, J. EBNER, R.; KUNZ-SCUGHART, L. A. Experimental Anti-Tumor Therapy in 3-D: Spheroids--Old Hat or New Challenge**? International Journal of Radiation Biology**. v. 83, n. 11-12, p. 849-871. Novembro-Dezembro de 2007.[1]

FRIEDRICH, J. et al. A Reliable Tool to Determine Cell Viability in Complex 3-d Culture: The Acid Phosphatase Assay. **Journal of Biomolecular Screening**. v. 12, n. 7, p. 927-937. 2007.[2]

FRIEDRICH, J. et al. Spheroid-based drug screen: considerations and practical approach. **Nature Protocols**. v. 4, p. 309 – 324. 2009.

GAO, D. et al. Characterization of Drug Permeability in Caco-2 Monolayers by Mass Spectrometry on a Membrane-Based Microfluidic Device. **Lab on a Chip**. v. 13, n. 5, p. 978–985. 2013.

GARCÍA-CARNERO, L. C. et al. Current trends to control fungal pathogens: exploiting our knowledge in the host-pathogen interaction. **Infection and Drug Resistance**. v. 11, n. 3, p. 903-913, 2018.

GODUGU, C. et al. AlgiMatrix™ based 3D cell culture system as an in-vitro tumor model for anticancer studies. **PloS one**, v. 8, n. 1, 2013.

GONZALES, A. et al. Pb18 conidia recognize fibronectin and fibrinogen which subsequently participate in adherence to human type II alveolar cells: involvement of a specific adhesin. **Microbiology and Pathogens**. v. 44, p. 389-401. 2008.

HARMER. W. D. Spheroidal-celled Carcinoma of Nasal Fossa and Antrum. **Proceedings of the Royal Society of Medicine**. v. 15, section. Laryngol Section, p. 33. 1922.

HERNÁNDEZ, O. et al. A 32-Kilodalton Hydrolase Plays an Important Role in Pb18 Adherence to Host Cells and Influences **Pathogenicity. Infection and Immunity**, v. 78, n. 12, p. 5280-5286, 2010.

HOWARTH, W. Spheroidal-celled Carcinoma of Superior Maxilla. **Proceedings of the Royal Society of Medicine**. v. 25, n.2, p. 227–229.1931.

HUH, D. et al. A human disease model of drug toxicity–induced pulmonary edema in a lung-on-a-chip microdevice. **Science translational medicine**, v. 4 n. 159. 2012.

JIMÉNEZ-GASTÉLUM, G. R. et al. Antimicrobial Properties of Extracellular Matrix Scaffolds for Tissue Engineering. **BioMed Research International**, v. 2019, 2019.

KIM, M. et al. Three-Dimensional Spheroid Culture Increases Exosome Secretion from Mesenchymal Stem Cells. **Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine**. v. 15, n. 4, p. 427–436. Agosto de 2018.

LERMAN, M. J. et al. The evolution of polystyrene as a cell culture material. **Tissue Engineering Part B: Reviews**, v. 24, n. 5, p. 359-372, 2018.

LIMA, A. M. F; SOLDI, V.; BORSALI, R. Dynamic light scattering and viscosimetry of aqueous solutions of pectin, sodium alginate and their mixtures: effects of added salt, concentration, counterions, temperature and chelating agent. **Journal of the Brazilian Chemical Society**. v. 20, n. 9, São Paulo, 2009.

LIN, A. et al. 3D cell culture models and organ-on-a-chip: Meet separation science and mass spectrometry. **Electrophoresis**, n. 41, p. 56-64, 2020.

LONG, J. P. PIERSON, S.; HUGHES, J. H. Rhinovirus Replication in HeLa Cells Cultured Under Conditions of Simulated Microgravity. **Aviation, Space and Enviromental Medicine**. v. 69, n. 9, p. 851-6 Setembro de 1998.

MARCOS, C. M. et al. Decreased expression of 14-3-3 in Pb18 confirms its involvement in fungal pathogenesis. **Virulence**. v. 7, n. 2, p. 72-84, 8 de Dezembro de 2016.

MARCOS, C. M. et al. *Pb18* 14-3-3 protein is important for virulence in a murine model. **Medical mycology**, v. 57, n. 7, p. 900-904, 2019.

MARCOS, C. M. et al. Surface-expressed enolase contributes to the adhesion of Pb18 to host cells. **FEMS yeast research**, v. 12, n. 5, p. 557-570, 2012.

MAROUNEK, M. et al. Comparative study of the hypocholesterolemic and hypolipidemic activity of alginate and amidated alginate in rats. **International Jornal of Biological Macromolecules**. v. 105, n. pt 1, p. 620-624, Dezembro de 2017.

MARQUES, S. A. et al. Aspectos Epidemiologicos da Paracoccidioidomicose na Área Endêmica de Botucatu (São Paulo - Brasil). **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**. v. 25, n. 2, p. 87-92, 01 de Janeiro de 1983.

MARQUES, S. A. Paracoccidioidomicose: centenário do primeiro relato de caso. **Anais Brasileiros de Dermatologia**. v. 83, n. 3, p. 271-273, 2008.

MARTINEZ, R. Epidemiology of Paracoccidioidomycosis. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**. v. 57, n. 19, p. 11-20, 2015.

Medicine. **Bentham Science Publishers.** v. 12, n. 233 – 246, 2017.

MELVIK, J. E.; DORNISH, M. Alginate as a Carrier for Cell Immobilisation. **Fundamentals of Cell Immobilisation Biotechnology**. v. 8, p.33-51, 2004.

MENDES-GIANNINI, M. J. S. et al. Binding of extracellular matrix proteins to *Pb18*. **Microbes and Infection**. v. 8, n. 6, p. 1550-1559, 8 de Maio de 2006.

MENDES-GIANNINI, M. J. S. et al. Binding of extracellular matrix proteins to Pb18. **Microbes and infection**, v. 8, n. 6, p. 1550-1559, 2006.

MENDES-GIANNINI, M. J. S. et al. Interaction of pathogenic fungi with host cells: Molecular and cellular approaches. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**. v. 45, n. 3, p. 383-394, 1 de September de 2005.

MENDES-GIANNINI, M. J. S. et al. Invasion of epithelial mammalian cells by Pb18 leads to cytoskeletal rearrangement and apoptosis of the host cell. **Microbes and Infection**. v. 6, n. 10, p. 882-891, 6 de Agosto de 2004.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Doenças Infecciosas e Parasitárias. **Guia de Bolso 8ª Edição Revista**. p. 328, Brasília, 2010.

MITTAL, R. et al. Organ-on-chip Models: Implications in Drug Discovery and Clinical Applications. **Journal of Cellular Physiology**. v. 234, n. 6. p. 8352-8380, 2019.

MITTAL, R. et al. Organ-on-chip models: Implications in drug discovery and clinical applications. **Journal of Cellular Physiology**. v. 234, n. 6. p. 8352-8380, 2018.

MOHANTY, S. et al. Impact of alginate concentration on the viability, cryostorage, and angiogenic activity of encapsulated fibroblasts. **Materials Science and Engineering: C**, v. 65, p. 269-277, 2016.

MOROZ, A. et al. Fibronectin induces MMP2 expression in human prostate cancer cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. v. 25, p. 1319-21, 2013.[2]

MOROZ, A. et al. Platelet gel: 3D scaffold for cell culture. **Acta Ortopédica Brasileira.** v. 17, n. 2, p. 43-45, São Paulo, 2009.

MOROZ, A. et al. Platelet lysate 3D scaffold supports mesenchymal stem cell chondrogenesis: an improved approach in cartilage tissue engineering. **Platelets.** v. 24, p. 219-25. 2013.[1]

MUKHERJEE, S. et al. TLR2 and TLR4 mediated host immune responses in major infectious diseases: a review. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**. v. 20, n. 2, p. 193-204, Abril de 2016.

NAM, S.et al. Varying PEG density to control stress relaxation in alginate-PEG hydrogels for 3D cell culture studies. **Biomaterials**, v. 200, p. 15-24, 2019.

NICKERSON, C. A. et al. Three-dimensional Tissue Assemblies: Novel Models for the Study of Salmonella Enterica Serovar Typhimurium Pathogenesis. **Infection and Immunity**. v. 69, n.11, p. 7106-20 Novembro de 2001.

NING, L. et al. Influence of mechanical properties of alginate-based substrates on the performance of Schwann cells in culture. **Journal of Biomaterials science, Polymer edition**, v. 27, n. 9, p. 898-915, 2016.

OECD No. 129. Guidance Document on Using Cytotoxicity Tests to Estimate Starting Doses for Acute Oral Systemic Toxicity Tests. **Series on Testing and Assessment,** n. 129, 2010.

OLIVEIRA, H. C. et al. Paracoccidioides-host Interaction: An Overview on Recent Advances in the Paracoccidioidomycosis. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, p. 1319, novembro de 2015.

PARK, K. et al. Scaffold-free, engineered porcine cartilage construct for cartilage defect repair—in vitro and in vivo study. **Artificial organs**, v. 30, n. 8, p. 586-596, 2006.

PATIL, J. S. et al. Ionotropic Gelation and Polyelectrolyte Complexation: The Novel Techniques to Design Hydrogel Particulate Sustained, Modulated Drug Delivery System: a Review. **Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures**. v. 5, n. 1, p. 241-248, Março de 2010.

PINZAN, C. F. et al. Immunological basis for the gender differences in *murine Pb18* infection. **PLoS One**, v. 5, n. 5, 2010.

RAVI, M. et al. 3D Cell Culture Systems: Advantages and Applications. **Journal of Cellular Physiology**. v. 230, n. 1, p. 16-26, 2014.

RESTREPO, A. et al. Estrogens inhibit mycelium-to-yeast transformation in the fungus Pb18: implications for resistance of females to paracoccidioidomycosis. **Infection and immunity**, v. 46, n. 2, p. 346-353, 1984.

SANKETH, D. S.; PATIL, Shankargouda; RAO, Roopa S. Estimating the frequency of Candida in oral squamous cell carcinoma using Calcofluor White fluorescent stain. Journal of investigative and clinical dentistry, v. 7, n. 3, p. 304-307, 2016.

SARDI, J. C. O. et al. In vitro *Pb18* biofilm and gene expression of adhesins and hydrolytic enzymes. **Virulence**. v. 6, n. 6, p. 642-651, 2015.

SATO, M. et al. An atelocollagen honeycomb-shaped scaffold with a membrane seal (ACHMS-scaffold) for the culture of annulus fibrosus cells from an intervertebral disc. **Journal of Biomedical Materials Research**. v. 64A, n. 2, p. 248-256, 2003.

SCHIMEK, K. et al. Bioengineering of a Full-Thickness Skin Equivalent in a 96-Well Insert Format for Substance Permeation Studies and Organ-On-A-Chip Applications. **Bioengineering (Basel)**. v. 5, n. 2, Junho de 2017.

SCHNABEL, M. et al. Dedifferentiation-associated changes in morphology and gene expression in primary human articular chondrocytes in cell culture. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 10, n. 1, p. 62-70, 2002.

SCORZONI, L. et al. Can passage in Galleria mellonella activate virulence factors of Pb18 as in the murine model?. **Medical Mycology**, v. 56, n. 3, p. 374-377, 2018.

SHIKANAI-YASUDA, M. A. et al. II Consenso Brasileiro em Paracoccidioidomicose – 2017, **Epidemiologia e Serviço de Saúde**. v. 27, n. spe, 2017.

SHIKANAI-YASUDA, M. A. et al. II consenso brasileiro em paracoccidioidomicose-2017. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 27, p. e0500001, 2018.

SILVA, J. F. et al. Influence of the Pb1814-3-3 and gp43 proteins on the induction of apoptosis in A549 epithelial cells. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 4, p. 476-484, 2015.

SILVA, J. F. et al. Differentially expressed proteins in *Pb18* involved in extracellular matrix adhesion. Biochemistry and Molecular Biology, Abril de 2011.[1]

SILVA, J. F. et al. Differentially expressed proteins in Pb18 involved in extracellular matrix adhesion. **FASEB Journal**, p. 1, 2011.

SILVA, J. F. et al. Influence of the *Pb18* 14-3-3 and gp43 proteins on the induction of apoptosis in A549 epithelial cells. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 110, n. 4, p. 476-484, Junho de 2015.

SILVA, R. F. Capítulo 8 - Infecções fúngicas em imunocomprometidos. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**. v. 36, n. 1, p. 142-147, 2010.

SILVA, R. P. et al. Differential gene expression analysis of *Pb18* during keratinocyte infection. **Journal of medical microbiology**, v. 60, n. 3, p. 269-280, 2011.[2]

SINGULANI, J. L. et al. Preliminary evaluation of circulating microRNAs as potential biomarkers in paracoccidioidomycosis. **Biomedical reports**, v. 6, n. 3, p. 353-357, 2017.

SKROBANSKA, R. et al. Cell proliferation in in vivo-like three-dimensional cell culture is regulated by sequestration of ERK 1/2 to lipid rafts. **Cell proliferation**, n. 47, v. 4, p. 336-346. 2014.

SMITH, K. E. et al. Acute ischemia induced by high-density culture increases cytokine expression and diminishes the function and viability of highly purified human islets of langerhans. Transplantation, v. 101, n. 11, p. 2705, 2017.

SPOSTO, M. R. et al. Paracoccidioidomycosis manifesting as oral lesions: clinical, cytological and serological investigation. **Journal of Oral Pathology & Medicine**. v. 23, n. 2, p. 85-87, 1994.

STEWART, C. M. et al. Phenotypic Stability of Articular Chondrocytes In Vitro: The Effects of Culture Models, Bone Morphogenetic Protein 2, and Serum Supplementation. Journal of Bone and Mineral Research. v. 15, n. 1, p. 166-174. 2009.

SZEKALSKA, M. et al. Alginate: current use and future perspectives in pharmaceutical and biomedical applications. **International Journal of Polymer Science**, v. 2016, 2016.

TAKEZAWA, T. et al. Collagen Vitrigel: A Novel Scaffold That Can Facilitate a Three-Dimensional Culture for Reconstructing Organoids. **Cell Transplantation**. v. 13, p. 463 – 473, 2004.

TODD, R. D. Micro Encapsulation and Flavor Industry. **Flavour Industry**. v. 1, p. 768-771, 1970.

TOLENTINO, E. S. et al. Manifestações Bucais da Paracoccidioidomicose: Considerações Gerais e Relato de Caso. **Revista da Faculdade de Odontologia – UPF**. v. 15, n. 1, p. 71-76, 2010.

TORRAS, N. et al. Mimicking Epithelial Tissues in Three-Dimensional Cell Culture Models. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**. v. 6, p. 197, Dezembro de 2018.

UEMURA, T. et al. Transplantation of cultured bone cells using combinations of scaffolds and culture techniques. **Biomaterials**. v. 24, n. 13, p. 2277-2286, 2003.

VALLEJO, M. C. et al. Vesicle and vesicle-free extracellular proteome of Pb18: comparative analysis with other pathogenic fungi. **Journal of Proteome Research**. v. 11, n. 3, p. 1676-1685, Março de 2012.

VECCHIO, A. et al. Induction of apoptosis in A549 pulmonary cells by two Pb18 samples. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 104, n. 5, p. 749-754, Rio de Janeiro, Agosto de 2009.

VERJANS, E. T. et al. Three-dimensional cell culture models for anticancer drug screening: Worth the effort ?. **Journal of cellular physiology**, v. 233, n. 4, p. 2993-3003, 2018.

WANG, X. et al. Tumor-like Lung Cancer Model Based on 3D Bioprinting. **3 Biotech**. v. 8, n. 12, p. 501, Dezembro de 2018.

WILKINSONS, D. C. et al. Development of a Three-Dimensional Bioengineering Technology to Generate Lung Tissue for Personalized Disease Modeling. **STEM CELLS Translational Medicine**. v. 6, n. 2, p. 622-633, 2017.

XIAO, J.et al. Monitoring of cell viability and proliferation in hydrogel-encapsulated system by resazurin assay. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 162, n. 7, p. 1996-2007, 2010.

XU, X.; FARACH-CARSON, M. C.; JIA, X. Three-Dimensional In Vitro Tumor Models for Cancer Research and Drug Evaluation. **Biotechnology Advances**. v. 32, n. 7, p. 1256 – 1268. 2015

YASUDA-SHIKANAI, M. A. et al. Imunologia das Micoses. **Tratado de Infectologia.** 2009.

YI, S. et al. Extracellular Matrix Scaffolds for Tissue Engineering and Regenerative. **Current Stem Cell Research & Therapy**. v. 12, n. 3, p. 233-246, 2017.

ZAMITH-MIRANDA, D. et al. Fungal extracellular vesicles: modulating host-pathogen interactions by both the fungus and the host. **Microbes and Infection**. v. 20, n. 9-10, p. 501-504, 2018.

ZHANG, Z. et al. Hyaline cartilage engineered by chondrocytes in pellet culture: histological, immunohistochemical and ultrastructural analysis in comparison with cartilage explants. **Journal of anatomy**, v. 205, n. 3, p. 229-237, 2004.

8. ANEXO

Anexo 1:

Em outubro de 2019, o laboratório de anticorpos monoclonais realizou um rastreio a fim de detectar possíveis contaminações de *Mycoplasma sp*. Nas células utilizadas na rotina laboratorial. Sendo a célula A549 utilizada nesse projeto positiva para o mesmo.

Então foi conduzido 5 ciclos de tratamento desta célula com o antibiótico BM-Cyclina (SIGMA), e após esse período a célula foi submetida a um novo teste de PCR para detectar a eficácia do tratamento, sendo bem-sucedido e garantindo a qualidade dos experimentos realizados com a cultura celular *in vitro*.

Resultado da testagem das células do laboratório para *Mycoplasma sp*. (A549 em destaque).



LABORATÓRIO DE DIAGNÓSTICO MOLECULAR VETERINÁRIO
CNPJ: 26.782.173/0001-00
Caixa Postal 545
CEP 18618 970
Botucatu / SP
diagnostico@ldmvet.com.br
(14) 99624-0385

Botucatu, 10 de outubro de 2019

RESULTADO DE EXAME

Nome requisitante: Prof Dr Andrei Moroz

Amostra de sobrenadante de cultivo celular

Identificação	Exame		Resultado
HDFa	Mycoplasma	Real time PCR (qPCR)	Positivo
HepG2	Mycoplasma	Real time PCR (qPCR)	Positivo
HaCaT	Mycoplasma	Real time PCR (qPCR)	Positivo
MC3T3-E1	Mycoplasma	Real time PCR (qPCR)	Positivo
A549	Mycoplasma	Real time PCR (qPCR)	Positivo

Dra. Marianna Vaz Rodrigues
Medica Veterinária – CRMV: 23143/SP

Resultados do tratamento da célula A549 que havia testado positivo para *Mycoplasma sp.*



LABORATÓRIO DE DIAGNÓSTICO MOLECULAR VETERINÁRIO
CNPJ: 26.782.173/0001-00
Caixa Postal 545
CEP 18618 970
Botucatu / SP
diagnostico@ldmvet.com.br
(14) 99624-0385

Botucatu, 11 de novembro de 2019

RESULTADO DE EXAME

Nome requisitante: Prof Dr Andrei Moroz

Amostra de sobrenadante de cultivo celular

Identificação	Exame		Resultado
PC3SS ASO	Mycoplasma	Real time PCR (qPCR)	Positivo
RWPE-1	Mycoplasma	Real time PCR (qPCR)	Negativo
PC-3	Mycoplasma	Real time PCR (qPCR)	Positivo
HDFo	Mycoplasma	Real time PCR (qPCR)	Negativo
A549	Mycoplasma	Real time PCR (qPCR)	Negativo
HaCaT	Mycoplasma	Real time PCR (qPCR)	Negativo
MC3T3	Mycoplasma	Real time PCR (qPCR)	Positivo

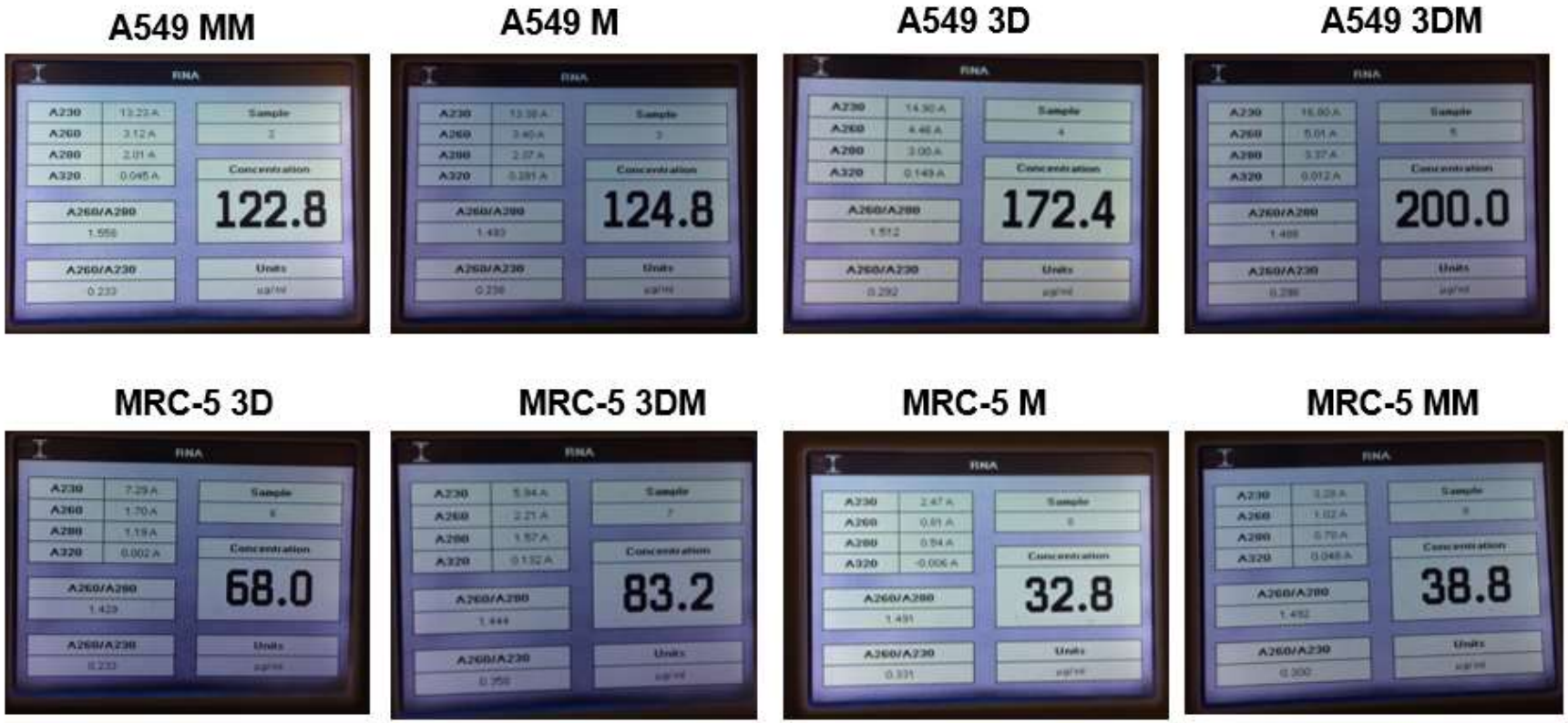
Dra. Marianna Vaz Rodrigues
Médica Veterinária – CRMV: 23143/SP

Anexo 2:

Extração RNA para análise de expressão de adesinas

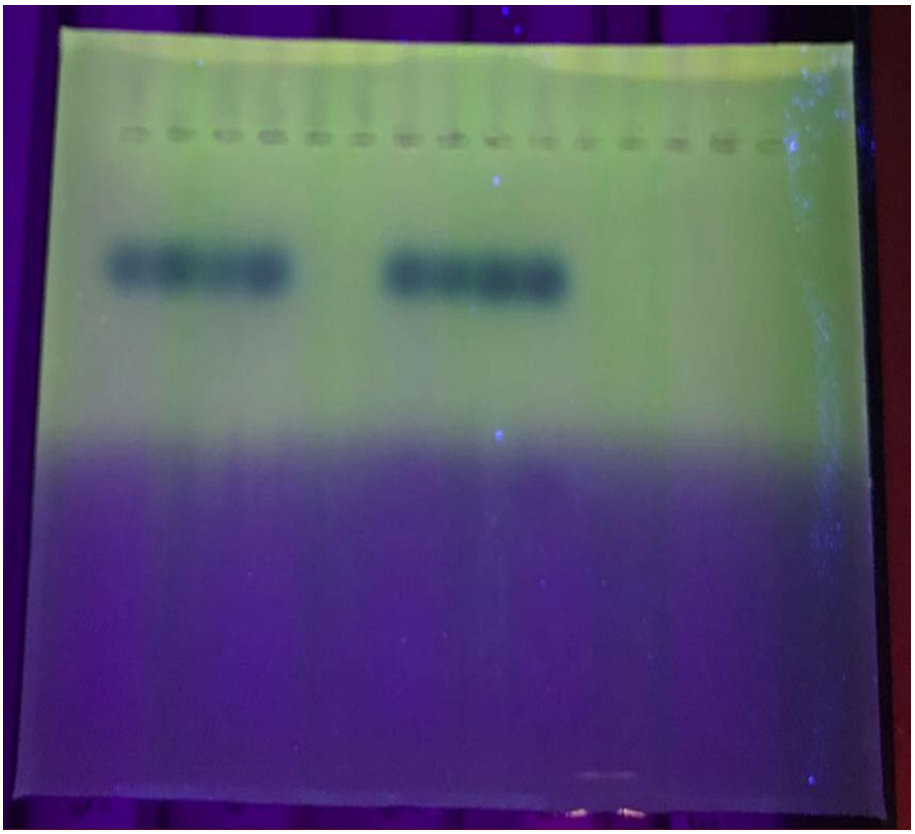
Durante o experimento de infecção o RNA das células com fungo foi extraído (RNA total da infecção), com a finalidade de analisar as proteínas 14-3-3, e gp43 expressas pelo Pb18 durante o processo de infecção. Porém apesar das amostras referentes a célula A549 terem fornecido uma quantidade maior de RNA não foi possível realizar a verificação da integridade do RNA até o presente durante a primeira tentativa de extração. As células MRC-5 forneceram menos material durante a extração, porém esses resultados ainda se mostram interessantes pois corroboram com o que já foi descrito anteriormente, que o Pb18 está presente em maior quantidade onde há presença de células A549. A seguir estão apresentados os resultados das dosagens e uma imagem do gel corrido com o material extraído. Vale ainda ressaltar que a pureza do RNA não ficou entre a estimativa esperada, indicando a necessidade de uma possível purificação do material, ainda assim esse resultado servirá para guiar experimentos que serão conduzidos no futuro.

Figura 38. Valores de conteúdo de RNA extraídos das amostras de infecção. Imagem contendo os valores obtidos a partir da extração de RNA total da infecção para as células A549 e MRC-5, grau de pureza das amostras descritos na faixa de absorbância entre A260/A280 nm.



Fonte: Elaborado pelo autor

Figura 39. Gel de agarose do RNA da infecção células-Pb18. Imagem do gel confeccionado para verificação da integridade do RNA extraído, observamos que mesmo o material extraído das células A549 sendo maior nenhuma banda foi apresentada durante a corrida.



Fonte: Elaborado pelo autor