UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE MEDICINA

PAULA BARRETO DA ROCHA

COMPARAÇÃO DO CULTIVO CELULAR 2D VERSUS 3D EM LINHAGEM DE ADIPÓCITOS VISCERAIS HUMANOS TRATADOS COM IRISINA SOBRE OS EFEITOS DO PSEUDO SARS-COV-2

Tese apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Doutora em Fisiopatologia em Clínica Médica

Orientadora: Profa. Dra. Célia Regina Nogueira
Coorientadora: Profa. Dra. Maria Teresa De Sibio

PAULA BARRETO DA ROCHA

COMPARAÇÃO DO CULTIVO CELULAR 2D VERSUS 3D EM LINHAGEM DE ADIPÓCITOS VISCERAIS HUMANOS TRATADOS COM IRISINA SOBRE OS EFEITOS DO PSEUDO SARS-COV-2

Tese apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Doutora em Fisiopatologia em Clínica Médica.

Orientadora: Profa. Dra. Célia Regina Nogueira
Coorientadora: Profa. Dra. Maria Teresa De Sibio

Botucatu
2024

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Rocha, Paula Barreto da.
Comparação do cultivo celular 2D versus 3D em linhagem de adipócitos viscerais humanos tratados com irisina sobre os efeitos do pseudo SARS-COV-2 / Paula Barreto da Rocha. - Botucatu, 2024

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Medicina, Botucatu
Orientador: Célia Regina Nogueira
Coorientador: Maria Teresa De Sibio
Capes: 40100006

1. COVID-19 (Doença). 2. Técnicas de cultura de células em três dimensões. 3. Microscopia confocal. 4. Obesidade.

Palavras-chave: COVID-19; Cultura 3D; Irisina; Microscopia confocal; Obesidade.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Botucatu

ATA DA DEFESA PÚBLICA DA TESE DE DOUTORADO DE PAULA BARRETO DA ROCHA, DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOPATOLOGIA EM CLÍNICA MÉDICA, DA FACULDADE DE MEDICINA.

Aos 05 dias do mês de agosto do ano de 2024, às 14:00 horas, por meio de Videoconferência, realizou-se a defesa de TESE DE DOUTORADO de PAULA BARRETO DA ROCHA, intitulada **Comparação do cultivo celular 2D versus 3D em linhagem de adipócitos viscerais humanos tratados com irisina sobre os efeitos do pseudo SARS-CoV-2**. A Comissão Examinadora foi constituida pelos seguintes membros: Profa. Dra. CELIA REGINA NOGUEIRA DE CAMARGO (Orientador(a) - Participação Presencial) do(a) Depto. de Clínica Médica / FM/Botucatu - Unesp, Profa. Dra. REGIANE MARQUES CASTRO OLIMPIO (Participação Presencial) do(a) Botucatu - SP, Profa. Dra. CORMARIE FERNÁNDEZ PULIDO (Participação Presencial) do(a) Universidad de los Andes (ULA) - Venezuela. Após a exposição pela doutoranda e arguição pelos membros da Comissão Examinadora que participaram do ato, de forma presencial e/ou virtual, a discente recebeu o conceito final: aprovada . Nada mais havendo, foi lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pelo(a) Presidente(a) da Comissão Examinadora.

Profa. Dra. CELIA REGINA NOGUEIRA DE CAMARGO

AGRADECIMENTOS

Antes de mais nada e principalmente, agradeço ao grupo de pesquisa que foi tão importante, presente e paciente nessa caminhada.

Nominalmente, agradeço a Maria Teresa e à Ester pelo trabalho impecável e indispensável na elaboração desse trabalho. Ele é tão seu quanto meu, e eu tenho muito orgulho e me sinto honrada de poder dizer que este é NOSSO trabalho.

Novamente agradeço à Ester, que eu conheço há tantos anos e só tive a sorte de poder chamar de amiga depois de ter entrado no doutorado. Que axé ter nossos caminhos correndo juntos. Você é luz, amiga. Saravá.

À dra. Célia, dra. Regiane e dra. Miriane minha gratidão pela orientação e confiança. Obrigada pela oportunidade e pelo acolhimento.

À Helena, minha parceira de maternidade, de perrengues e de ideais, seguimos juntas!

A minha família, meus pais e irmã, sogra e cunhada, grandes amigos Emilia e Marcos, agradeço o apoio e torcida sempre. Vocês, minha aldeia, são indispensáveis.

Ao Caio, como constava “nos astros, nos búzios, no anúncio, vi no espelho, no evangelho, como garantiram meus Orixás”. Obrigada por ser meu amor, por ser minha paz.

Ao Samuel e à Olivia, afinal de contas a que serve todo o progresso e a ciência se não para garantir um futuro para meus filhotes e seus amores.

Agradeço, por fim, às agências de fomento, à Unesp, à Unipex e ao SUS por viabilizar este trabalho. Viva o SUS!

DEDICATÓRIA

Este trabalho é dedicado ao tio Natanael, grande Tael, que sucumbiu à Covid-19 nos primórdios da pandemia, e aos milhares de brasileiros que perdemos nesta luta.



ROCHA, PB. Comparação do cultivo celular 2D versus 3D em linhagem de adipócitos viscerais humanos tratados com irisina sobre os efeitos do Pseudo Sars-CoV-2. [tese] Botucatu: Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”; 2024.

Resumo

Introdução: Desde o início da pandemia da COVID-19, há um esforço coletivo visando entender o comportamento do vírus SARS-CoV-2 e, assim, desenvolver tratamentos eficazes; entretanto, a literatura acerca da relação do vírus com o tecido adiposo é escassa. A obesidade está entre os maiores fatores de prognóstico negativo dada sua característica pró-inflamatória crônica. A irisina, miocina endógena produzida durante o exercício físico, pode influenciar na infecção viral em indivíduos obesos. Embora estudos de cultura celular monocamada (2D) sejam o padrão para estudos pré-clínicos, a cultura tridimensional (3D) se assemelha mais ao ambiente *in vivo*, viabilizando o desenvolvimento de novos fármacos mimetizando de forma mais fiel as repercussões das diversas interações possíveis. A comparação das técnicas pode viabilizar o desenvolvimento de estudos com reprodutibilidade. **Objetivo:** Comparar os cultivos celulares 2D e 3D da linhagem de adipócitos viscerais humanos tratados com irisina e infectados por Pseudo SARS-CoV-2. **Materiais e Métodos:** Cultura celular em monocamada (2D) e tridimensional (3D) de pré-adipócitos viscerais humanos foram utilizadas para realização do estudo, composto por 4 grupos: **Grupo Controle (C)**: adipócitos sem tratamento**; Grupo ACE2**: adipócitos tratados com *Enzima Conversora de Angiotensina-2* (ACE2)**, Grupo ACE2+PV:** adipócitos tratados com pseudovirus SARS-CoV-2 (PV) e **Grupo ACE2+I+PV**: adipócitos tratados com irisina 20nM por 24h e com Pseudo SARS-CoV-2. Nessas culturas celulares foram mensuradas a captação dos níveis de fluorescência para Pseudo SARS-CoV-2 e ACE2. **Resultados:** O tratamento com irisina promoveu diminuição nos níveis de captação do pseudo SARS-CoV-2 para culturas de adipócitos viscerais humanos 2D (G3, 48796±321 *vs* G4, 44801±328) e 3D (G3, 51540±214 *vs* G4, 47027±165) em ambos os modelos de cultura celular. Para todas as diferenças foi observado $p<0,001$. **Conclusão:** A cultura 3D de adipócitos viscerais humanos apresentou resultados similares àqueles da cultura monocamada, sugerindo que ambas as técnicas podem ser usadas em estudos futuros.

Palavras-chave: Cultura 3D; Obesidade; Covid-19; Irisina; Microscopia confocal.

ROCHA, PB. Comparison of 2D versus 3D cell cultures in human visceral adipocyte lines treated with irisin on the effects of Pseudo Sars-CoV-2. [thesis] Botucatu: School of Medicine, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”; 2024.

Abstract

Introduction: Since the beginning of the COVID-19 pandemic, there has been a collective effort aimed at understanding the behavior of the SARS-CoV-2 virus and, thus, developing effective treatments; however, the literature on the relationship between the virus and adipose tissue is scarce. Obesity is among the biggest negative prognostic factors given its chronic pro-inflammatory characteristic. Irisin, an endogenous myokine produced during physical exercise, can influence viral infection in obese individuals. Although monolayer (2D) cell culture studies are the standard for preclinical studies, three-dimensional (3D) culture is more similar to the *in vivo* environment, enabling the development of new drugs that more faithfully mimic the repercussions of the various possible interactions. Comparison of techniques can enable the development of reproducible studies. **Objective**: To compare 2D and 3D cell cultures of human visceral adipocyte lineage treated with irisin and infected by Pseudo SARS-CoV-2. **Materials and Methods:** Monolayer (2D) and three-dimensional (3D) cell cultures of human visceral pre-adipocytes were used to carry out the study, consisting of 4 groups: Control Group (C): adipocytes without treatment; ACE2 Group: adipocytes treated with Angiotensin-Converting Enzyme-2 (ACE2), ACE2+PV Group: adipocytes treated with SARS-CoV-2 pseudovirus (PV) and ACE2+I+PV Group: adipocytes treated with 20nM irisin for 24h and with Pseudo SARS-CoV-2. In these cell cultures, the uptake of fluorescence levels for Pseudo SARS-CoV-2 and ACE2 was measured. **Results**: Irisin treatment promoted a decrease in pseudo SARS-CoV-2 uptake levels for 2D (G3, 48796±321 vs G4, 44801±328) and 3D (G3, 51540±214 vs G4, 47027±165) in both cell culture models. For all differences, $p<0.001$ was observed. **Conclusion**: 3D culture of human visceral adipocytes showed similar results to those of monolayer culture, suggesting that both techniques can be used in future studies.

Keywords: 3D Culture. Obesity. Covid-19. Irisin. Confocal microscopy.

Impacto esperado ou potencial das dissertações e teses defendidas no Programa de Pós-graduação em Fisiopatologia em Clínica Médica na sociedade, de acordo com a Portaria Unesp 117/2022 e Instrução AT/PROPG 02/2022.

Objetivos de Desenvolvimento Sustentável: **COMPARAÇÃO DO CULTIVO CELULAR 2D VERSUS 3D EM LINHAGEM DE ADIPÓCITOS VISCERAIS HUMANOS TRATADOS COM IRISINA SOBRE OS EFEITOS DO PSEUDO SARS-COV-2.**

Sabemos que o impacto da pandemia da Covid-19 permanece sendo sentido pela comunidade, mesmo que os níveis de infecção tenham diminuído. Ainda não existem tratamentos comprovados, e pessoas com doenças crônicas, como a obesidade, têm maiores chances de desenvolver a Covid-19 longa e vir a óbito. A universidade pública se mantém firme no propósito de elaborar soluções para os problemas da sociedade, visando sempre a qualidade de vida e o desenvolvimento sustentável; assim, nosso grupo de pesquisa comparou a eficácia de dois modelos de cultura celular (2D e 3D) para montar um protocolo de infecção pelo vírus SARS-CoV-2 e de tratamento com irisina (hormônio produzido pelo músculo durante o exercício) que pudesse ser reproduzido por outros grupos e, assim, contribuir para o combate à doença.

A cultura 3D de células é uma tecnologia relativamente nova que ainda está caminhando, mas promete representar o organismo de maneira mais fidedigna se comparada às culturas celulares tradicionais (2D), diminuindo as incertezas. Neste estudo, o uso de cultura 3D não conferiu vantagens adicionais sobre a cultura 2D em termos de resposta ao tratamento com irisina na infecção por Pseudo SARS-CoV-2. Para certos tipos de estudos e condições, as abordagens mais tradicionais em 2D podem ser tão eficazes quanto as mais complexas e custosas culturas em 3D, facilitando a replicabilidade e acessibilidade da pesquisa científica.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS
DEDICATÓRIA
OBJETIVOS DE DESENVOLVIMENTO SUSTENTÁVEL
1 – **INTRODUÇÃO** 7
2 – **JUSTIFICATIVA** 11
3 – **HIPÓTESE** 12
4 – **OBJETIVO** 13
4.1 OBJETIVO GERAL 13
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 13
5 - **MATERIAIS E MÉTODOS** 14
5.1 ESTUDO *IN VITRO* 14
5.1.1 Diferenciação de pré-adipócitos em adipócitos: culturas bidimensional (2D) e tridimensional (3D) **15**
5.2 COLORAÇÃO *OIL RED* 16
5.3 INFECÇÃO COM PSEUDO SARS-COV-2 16
5.4 MICROSCOPIA CONFOCAL 17
5.5 CAPTAÇÃO DE PSEUDO SARS-COV-2 E ACE2 17
6 – **ANÁLISE ESTATÍSTICA** 19
7 – **RESULTADOS** 20
7.1 CARACTERIZAÇÃO DA DIFERENCIAÇÃO 20
7.2 MICROSCOPIA CONFOCAL 20
7.3 CAPTAÇÃO DOS NÍVEIS DE PSEUDO SARS-COV-2 21
7.4 CAPTAÇÃO DOS NÍVEIS DE ACE2 22
8 – **DISCUSSÃO** 24
9 – **CONCLUSÃO** 28
10 – **REFERÊNCIAS** 29
11 – **ANEXOS** 32
11.1 ANEXO 1 32
11.2 ANEXO 2 36
11.3 ANEXO 3 46

1. INTRODUÇÃO

A pandemia da Covid-19, iniciada em dezembro de 2019 em Wuhan, China com um caso de pneumonia de causa desconhecida (SOHRABI et al., 2020) e que se estendeu por três anos, foi declarada como “não mais uma emergência de saúde pública de interesse global” em 2023 pela OMS somando 6.948.764 mortes até junho do mesmo ano. Apesar de ter tido sua denominação alterada, os casos de Covid-19 continuam constituindo uma pandemia com alta incidência em todo o mundo, e sem uma terapêutica eficaz (OMS, 2023).

Desde o início da pandemia, vários esforços têm sido feitos para entender o comportamento do vírus e, assim, desenvolver tratamentos e profilaxia. O estudo básico do vírus depende, em larga escala, de modelos experimentais *in vitro*, visto a necessidade da infecção e replicação viral (CHEN et al., 2022). Atualmente há numerosos estudos de cultura celular usando como base os tecidos pulmonar, renal, hepático e intestinal (KRONEMBERGER et al., 2021; KUMAR et al., 2021), assim como células-tronco e organoides (BOROOJERDI et al., 2023; CHEN et al., 2022; DAWOODY NEJAD; JULIAN, 2023); entretanto, os estudos com tecido adiposo são escassos, embora importantes (QUARANTA et al., 2024). A relação entre a Covid-19 e a obesidade vai além da capacidade do vírus de adentrar o organismo via adipócitos, pois estudos demonstram que o tecido adiposo branco pode funcionar como uma reserva funcional para liberação prolongada de vírus (POMA et al., 2024) e contribuir diretamente para um prognóstico negativo (COLLELUORI et al., 2022).

O SARS-CoV-2 invade as células humanas por meio da ligação da glicoproteína *spike*, localizada em sua superfície, à enzima de conversão da angiotensina 2 (ACE2), localizada nas células humanas, incluindo aquelas do

tecido adiposo (VADUGANATHAN et al., 2020). Este tecido, além de servir como reserva energética, tem papéis endócrinos e metabólicos importantes no organismo (KRAMS et al., 2020); entretanto, o tecido adiposo visceral (TAV) tem relação direta com prognósticos piores e maiores taxas de internação em pacientes com Covid-19 (FÖLDI et al., 2021; MALAVAZOS et al., 2020), assim como períodos mais longos de hospitalização (KELLER et al., 2022), devido a seu potencial pró inflamatório (COOMES; HAGHBAYAN, 2020; KRAMS et al., 2020).

Recentemente, um estudo molecular com características de 700 amostras de transcriptoma pulmonar de pacientes com comorbidades associadas à Covid-19 grave demonstrou que a ACE2 é mais expressa nesses indivíduos se comparados com o grupo controle (PINTO et al., 2020).

Oliveira et al. realizou um estudo com adipócitos subcutâneos humanos na presença e ausência de irisina e por meio de análise do transcriptoma global identificou 14857 genes expressos nessas células, entre esses ADAM10, TLR3, HAT1, HDAC2, KDM5B, SIRT1, RAB1A, FURIN e DPP4. Neste estudo, a irisina diminuiu a expressão desses genes nos adipócitos (DE OLIVEIRA et al., 2020). Desta forma, a presença desses genes pode caracterizar o tecido adiposo como alvo para SARS-CoV-2 e a atuação da irisina em diminuir a expressão desses alvos sugere que seu uso pode diminuir a interação entre o vírus e a ACE2.

Métodos de estudo pré-clínicos para compreensão e desenvolvimento de novas moléculas, toxicidade e metabolismo são classicamente baseados em culturas celulares monocamada (2D) e modelos animais (JENSEN; TENG, 2020; KRONEMBERGER et al., 2021; SAKALEM et al., 2021); a cultura 2D tem sido usada por décadas devido a sua facilidade de manipulação e relativo baixo custo.

Todavia, essa cultura não é capaz de mimetizar o microambiente *in vivo* com todas as suas interações e complexidades (KRONEMBERGER et al., 2021), além de sofrer alterações morfológicas e genotípicas. Não obstante, a experimentação animal encontra não apenas entraves éticos e financeiros (BIJU; PRIYA; FRANCIS, 2023), mas também limitações na diferença de resposta a patógenos e cursos distintos de doenças em comum (SAKALEM et al., 2021).

Considerando-se que mais da metade das novas drogas em fase de estudo não chegam ao mercado devido a falhas em eficácia e preocupação acerca de sua segurança (JENSEN; TENG, 2020; SAKALEM et al., 2021), é imperativo que se desenvolvam e aprimorem novas técnicas de cultura celular replicáveis que viabilizem estudos pré-clínicos mais fiéis ao microambiente *in vivo* e diminuam a necessidade do uso de modelos animais.

A cultura celular tridimensional tem se tornado um dos modelos de escolha para desenvolvimento de fármacos, pois permite interações célula-célula e célula-matriz celular mais semelhantes àquelas *in vivo* (JENSEN; TENG, 2020). Conceitualmente, uma cultura celular tridimensional visa promover um ambiente ideal para crescimento, diferenciação e funções celulares, criando, *in vitro*, um arcabouço semelhante ao tecido propriamente dito (KNIGHT; PRZYBORSKI, 2015). Este modelo de cultura apresenta células em estágios distintos de diferenciação (LANGHANS, 2018) e com acesso variado a nutrientes de acordo com sua posição no tecido, como no caso dos esferoides, que apresentam uma camada de células expostas ao ambiente externo enquanto outras camadas estão em contato com a matriz ou rodeadas por outras células, criando um gradiente de oxigênio e nutrientes que simula o ambiente *in vivo* (URZÌ et al., 2023).

As técnicas de cultura 3D podem ser divididas em dois grandes grupos: métodos cultivados em estrutura polimérica (*scaffold*) usando hidrogeis ou polímeros estruturais, e agregados celulares flutuantes livres, geralmente denominados esferóides (sem *scaffolds*) (JENSEN; TENG, 2020; KNIGHT; PRZYBORSKI, 2015). A escolha do método depende principalmente da natureza das células propriamente ditas, além dos objetivos da cultura.

Este estudo utilizou o método de cultivo em *scaffold* de hidrogel pois ele possibilita a modificação do microambiente para incorporação de moléculas biologicamente ativas (KNIGHT; PRZYBORSKI, 2015) para que pudéssemos mimetizar o organismo do individuo obeso, que expressa mais ACE-2, e avaliar os efeitos da irisina sobre a infecção pelo vírus SARS-CoV-2, comparando os resultados com a cultura 2D tradicional para padronização da técnica e validação de resultados.

2. JUSTIFICATIVA

Devido à necessidade de promover um ambiente ideal para o crescimento celular em estudos com SARS-CoV-2, faz-se necessário realizar o cultivo 3D e compará-lo ao 2D para verificação de sua reprodutibilidade biológica e metodológica.

3. HIPÓTESE

O cultivo celular 3D em linhagem de adipócitos viscerais humanos tratados com irisina e infectados por Pseudo SARS-CoV-2 apresenta reprodutibilidade biológica e metodológica enquanto mostra vantagens morfológicas e funcionais quando comparado à cultura monocamada.

4. OBJETIVO

4.1. OBJETIVO GERAL

Comparar os cultivos celulares 2D e 3D da linhagem de adipócitos viscerais humanos tratados com irisina na infecção por Pseudo SARS-CoV-2.

4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenvolver a cultura 2D e 3D de adipócitos viscerais humanos;
- Caracterizar a diferenciação adipogênica em cultura celular 2D e 3D de adipócitos viscerais humanos;
- Comprovar, por meio de microscopia confocal, a efetividade da entrada do Pseudo SARS-CoV-2 em cultura celular 2D e 3D de adipócitos viscerais humanos;
- Verificar os níveis de captação de ACE2 e Pseudo SARS-CoV-2 na presença e ausência de irisina em culturas 3D de adipócitos viscerais humanos.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1. ESTUDO *IN VITRO*

O trabalho foi aprovado pelo CEP da Faculdade de Medicina de Botucatu - FMB/UNESP, sob o número de parecer 34806620.1.0000.5411.

Os experimentos e análises foram realizados na Unidade Experimental de Pesquisa (UNIPEX) da Faculdade de Medicina de Botucatu, por meio da utilização dos laboratórios e equipamentos multiusuários. Para o estudo *in vitro,* utilizamos a linhagem de pré-adipócitos viscerais humanos (Poietics™ *Human Visceral Adypocites*, Lonza, Walkersville/MD, EUA #PT-5005) obtidos da *Cell Applications*, Inc. (San Diego, CA) por intermédio da Sigma-Aldrich (Carlsbad, CA). As células foram mantidas em cultura até atingirem uma confluência de aproximadamente 70%, a uma temperatura de 37°C sob uma atmosfera de 5% de CO_2 em meio de crescimento de pré-adipócitos específico (*Preadipocyte Basal Medium-2* (PBM2), Lonza, Walkersville/MD, EUA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS), 1% de L-glutamina e 1% de uma associação de antibióticos contendo penicilina-estreptomicina (Sigma, P07981), conforme protocolo fornecido pela empresa (anexo 1). Após a confluência, os pré-adipócitos foram tripsinizados com EDTA-0,25% (Gibco) e transferidos para placas de cultura de 96 poços com concentração de 10.000 células/poço.

5.1.1. Diferenciação de pré-adipócitos em adipócitos: culturas bidimensional (2D) e tridimensional (3D)

Os pré-adipócitos foram mantidos em placas de cultura de 96 poços para cultivo em monocamada (2D) ou em Matriz Tridimensional (3D) CellFate® (Biocelltis, Florianópolis/SC, Brasil), utilizando meio de crescimento. As células foram mantidas a 37°C e 5% de CO_2 até a confluência de aproximadamente 90%, para que os pré-adipócitos fossem induzidos à diferenciação em adipócitos viscerais maduros com a utilização de PBM2 suplementado com kit de diferenciação fornecido contendo 2% de insulina recombinante (*h-Insulin*), 0,2% de dexametasona, 0,4% de indometacina e 0,2% de isobutilmetilxantina (IBMX - *3-Isobutyl-1-methylxanthine*). As células foram mantidas com o mesmo meio de diferenciação por 10 dias para evitar a ruptura dos vacúolos lipídicos, conforme recomendação do fabricante (anexo 2). O processo de diferenciação foi acompanhado pela observação microscópica dos vacúolos lipídicos intracelulares, que começaram a aparecer no 4°dia após a indução e continuaram a aumentar em número e tamanho nas células induzidas.

Ao final deste período, a cultura celular em monocamada (2D) e tridimensional (3D) de pré-adipócitos subcutâneos humanos foram utilizadas para realização do estudo seguindo o delineamento experimental composto por 4 grupos:

- **Grupo 1**: adipócitos sem tratamento (C);
- **Grupo 2**: adipócitos tratados com *Enzima Conversora de Angiotensina-2 (*ACE2*)*;

- **Grupo 3:** adipócitos tratados com ACE2 e *Pseudovirus SARS-CoV-2* (ACE2+PV);
- **Grupo 4**: adipócitos tratados com Irisina 20nM por 24h, ACE2 e Pseudovirus (ACE2+I+PV).

5.2. COLORAÇÃO *OIL RED*

Para confirmar a diferenciação e avaliar os efeitos dos tratamentos, realizamos a coloração com *Oil Red* (Sigma, O1391). Inicialmente, as células foram lavadas com PBS e fixadas com formaldeído 10% ou paraformaldeido a 4% (PFA) por 10 minutos, em temperatura ambiente; então, adicionamos 300ul de corante *Oil Red* e às células, que foram incubadas por 2 horas a 37°C. Em seguida, as células foram observadas no microscópio, para constatarmos a diferenciação através da coloração das gotículas lipídicas em vermelho.

5.3 INFECÇÃO COM PSEUDO SARS-COV-2 E ACE2

Os kits *ACE2 Red Reporter* e *Pseudo SARS-CoV-2 Green Reporter* foram adquiridos da Montana Molecular (Montana, EUA) e utilizados com o objetivo de aumentar os níveis de ACE2 nos adipócitos e observar os efeitos do tratamento com irisina mensurando os níveis de ACE2 e do Pseudo SARS-CoV-2 nestas células. Realizados segundo instruções do fabricante (anexo 2), esses efeitos foram mensurados pela leitura de fluorescência em leitor de placa e por imagens de fluorescência.

5.4 MICROSCOPIA CONFOCAL

As imagens foram obtidas usando um microscópio confocal Leica TCS SP8 (Leica do Brasil Importação e Comércio Ltda., São Paulo, Brasil), equipado com o Software LAS X, objetiva de 20x, zoom de 0,75x. As imagens foram capturadas com o uso do Laser de 552nm e janela de detecção 583 a 649 (canal vermelho) e com uso do Laser de 488nm e janela de detecção em 510 a 536nm.

5.5 CAPTAÇÃO DE PSEUDO SARS-COV-2 E ACE2

Os adipócitos, diferenciados em placa de 96 poços na ausência ou presença da Matriz 3D CellFate®, foram incubados pela reação de transdução usando o ensaio *ACE2-Red Reporter*. 5 µL do fluorescente ACE2 BacMam foi adicionado a 0,6 µL da solução de butirato de sódio (SB) 500 mM e 44,4 µL do meio de cultura completo para adipócitos, para um volume total de 50 µL. Em seguida, a solução de reação de transdução foi adicionada aos poços com as células juntamente com mais 100ul de meio de cultura (50ul reação de transdução + 100ul meio) e mantidos por 5 minutos em temperatura ambiente. As células foram então incubadas durante 24h sob condições padrão de crescimento celular. Em seguida, estas foram tratadas com irisina a uma concentração de 20nM por 24 horas.

100 µL de meio contendo 8x107 genes virais de Pseudo SARS-CoV-2 foram adicionados a cada poço da solução estoque de 2x1010 genes virais por ml e incubadas por 12h no escuro, em condições normais de crescimento celular. Antes da leitura da fluorescência, as células foram lavadas com 100 µL de PBS.

Mensuramos a captação dos níveis de fluorescência por leitor de placas em 506/517 (Ex / Em) para pseudovirus (*Green Reporter assay*) e 558/603 (Ex / Em) para ACE2 (*Red Reporter assay*).

6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

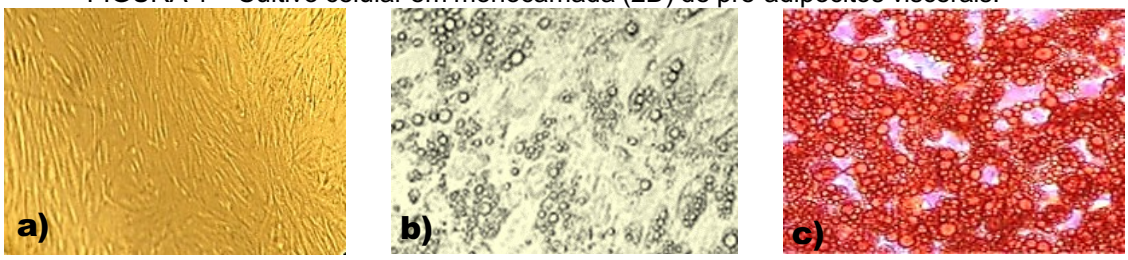
Os dados foram expressos como média ± desvio padrão. Os tratamentos dentro dos grupos foram comparados por análise de variância (ANOVA) para modelos de dois fatores, complementada por teste de comparações múltiplas de Tukey. Valor de $p<0,05$ foi considerado estatisticamente significante.

7. RESULTADOS

7.1. CARACTERIZAÇÃO DA DIFERENCIAÇÃO

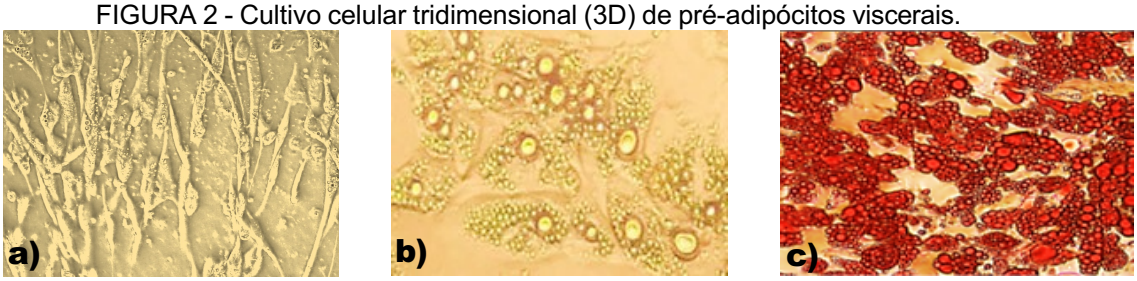
Para comprovação da diferenciação, as células de pré-adipócitos viscerais humanos foram plaqueadas, diferenciadas e coradas com *Oil Red*, respectivamente figuras 1 e 2.

FIGURA 1 – Cultivo celular em monocamada (2D) de pré-adipócitos viscerais.



a) Plaqueamento b) Diferenciação c) Coloração *Oil Red*.

FIGURA 2 - Cultivo celular tridimensional (3D) de pré-adipócitos viscerais.

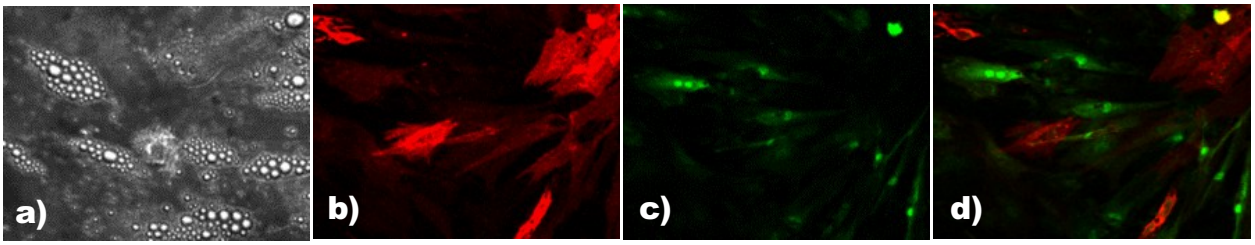


a) Plaqueamento b) Diferenciação c) Coloração *Oil Red*.

7.2. MICROSCOPIA CONFOCAL - IMAGENS

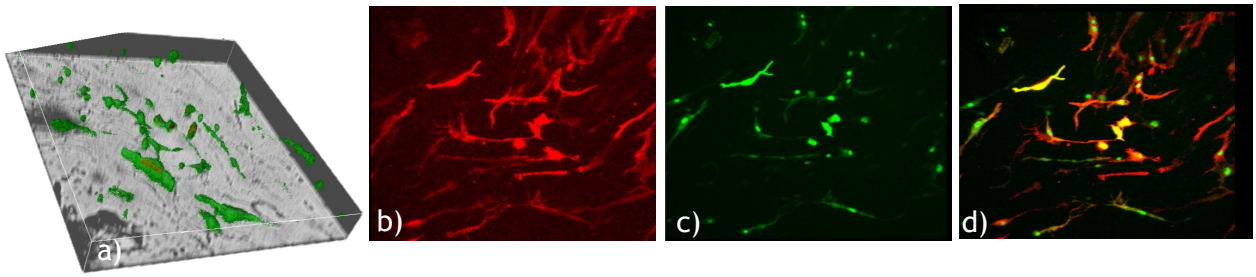
Evidenciamos a infecção efetiva pelo Pseudo SARS-CoV-2 nas células de adipócitos viscerais humanos em cultivo em monocamada (2D) e tridimensional (3D), respectivamente figuras 3 e 4.

FIGURA 3 - Microscopia Confocal. Cultivo celular em monocamada (2D) de pré-adipócitos viscerais humanos infectados com Pseudo SARS-CoV-2.



a) Adipócitos viscerais humanos sem tratamento (C); b) Enzima Conversora de Angiotensina-2 (*Red Reporter assay*) (ACE2); c) Pseudovirus: SARS-CoV-2 (*Green Reporter assay*) (PV) e d) Enzima Conversora de Angiotensina-2 + SARS-CoV-2 (ACE2+PV).

FIGURA 4 - Microscopia Confocal. Adipócitos viscerais humanos infectados com Pseudo SARS-Cov-2 em membrana tridimensional (3D).

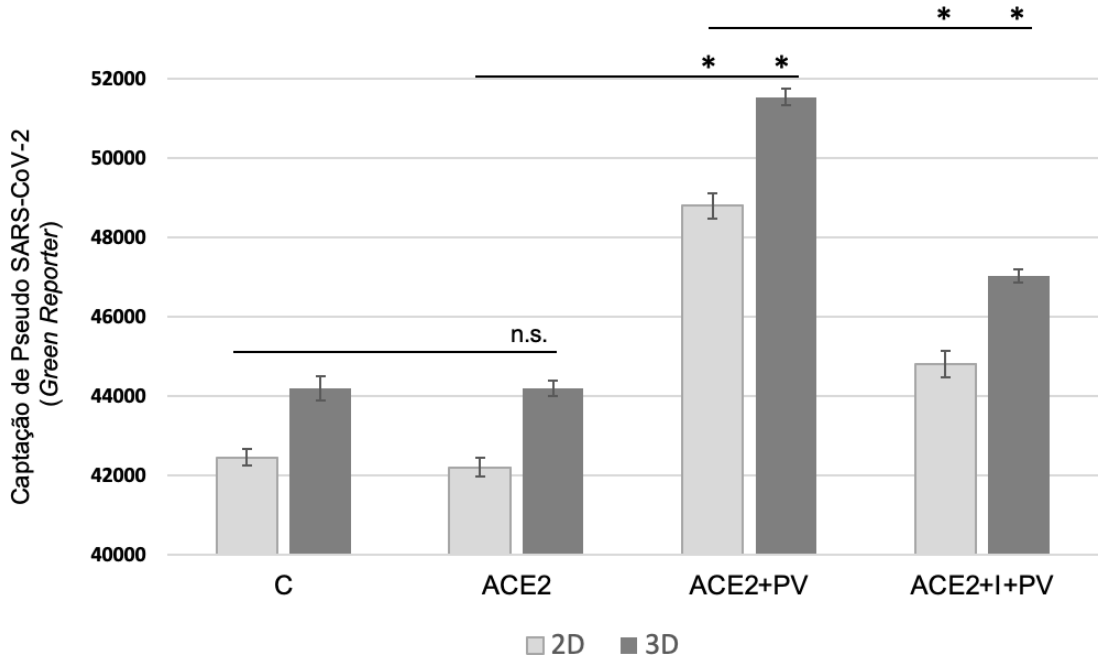


a) Foto de Microscopia Confocal utilizando recurso tridimensional para comprovar a profundidade e aderência celular em cultura 3D. **b)** Enzima Conversora de Angiotensina-2 (*Red Reporter assay*) com marcação vermelha na membrana celular (**ACE2**); c. Pseudovirus: SARS-CoV-2 (*Green Reporter assay*) **(PV)** com marcação verde no núcleo. d)Enzima Conversora de Angiotensina-2 + SARS-CoV-2 **(ACE2+PV)**.

7.3. CAPTAÇÃO DOS NÍVEIS DE PSEUDO SARS-COV-2

Comprovando a eficácia do tratamento com Pseudo SARS-CoV-2 (*Green Reporter assay*), evidenciamos a infecção efetiva pelo pseudo vírus nas células pré-adipócitos viscerais humanos em cultivo em monocamada (2D) e tridimensional (3D) e, como consequência dessa infecção, observamos que o tratamento com irisina promoveu diminuição nos níveis de captação do Pseudo SARS-CoV-2 para culturas adipócitos viscerais humanos 2D (ACE2+PV, 48796±321 vs ACE2+PV+I, 44801±328) e 3D (ACE2+PV, 51540±214 vs ACE2+PV+I, 47027±165).

GRÁFICO 1. Captação do Pseudo SARS-CoV-2.

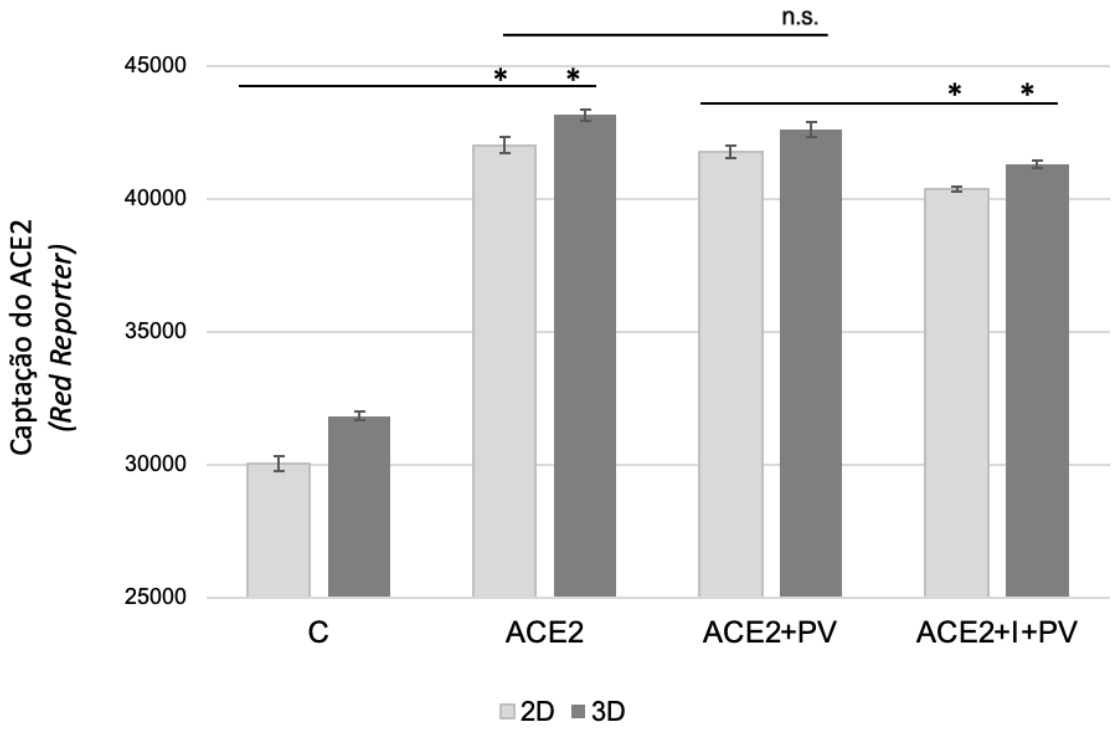


Níveis de fluorescência por leitor de microplaca na excitação de 506nm e emissão de 517nm para Pseudo SARS-CoV-2 (*Green Reporter assay*) em Cultura 2D e 3D de pré-adipocitos viscerais humanos. **C**: Controle Células sem tratamento; ACE2: Enzima Conversora de Angiotensina-2 (*Red Reporter assay*), Pseudo SARS-CoV-2 (*Green Reporter assay*); (ACE2+PV); (ACE2+I+PV) com 20nM de irisina por 24h. Foram analisados pelo teste ANOVA complementada por Tukey. *P <0,05 considerado estatisticamente significativo.

7.4. CAPTAÇÃO DOS NÍVEIS DE ACE2

Comprovamos a eficácia do tratamento com ACE2 (*Red Reporter assay*) nos pré-adipocitos viscerais humanos em cultivo em 2D e 3D e, como consequência dessa infecção, observamos que tratamento com irisina promoveu diminuição nos níveis de captação do ACE2 nessas células tanto em cultura 2D (ACE2+PV, 41776±235 vs ACE2+PV+I, 40360±95) quanto 3D (ACE2+PV, 42638±277 vs ACE2+PV+I, 41317±122).

GRÁFICO 2. Captação do ACE2.



Foi mensurado os níveis de fluorescência por leitor de microplaca na excitação 540nm e emissão 580 nm para ***ACE2****: Enzima Conversora de Angiotensina-2 (Red Reporter assay),* em Cultura 2D e 3D de pré-adipocitos viscerais humanos. **C**: Controle Células sem tratamento; ACE2: Enzima Conversora de Angiotensina-2 (*Red Reporter assay*), Pseudo SARS-CoV-2 (*Green Reporter assay*); (ACE2+PV); (ACE2+I+PV) com 20nM de irisina por 24h. Foram analisados pelo teste ANOVA complementada por Tukey. *P <0,05 considerado estatisticamente significativo.

8. DISCUSSÃO

Estudos funcionais de adipócitos e sua desregulação sob diferentes condições são cruciais para a compreensão da regulação metabólica sistêmica; no entanto, os estudos de adipócitos maduros são dificultados por uma série de obstáculos técnicos, incluindo o elevado teor lipídico destas células que as faz flutuar em suspensão e a sua curta vida *ex vivo*. Além disso, compreender a adipogênese e os mecanismos que impulsionam a diferenciação dos adipócitos requer um sistema celular que permita avaliações temporais detalhadas e a capacidade de seguir células/grupos de células individuais (DUFAU et al., 2021).

O desequilíbrio custo-benefício é o principal gargalo que dificulta o desenvolvimento e as aplicações da tecnologia 3D; gastos podem vir dos múltiplos aspectos da cultura tridimensional: maiores quantidades de células, maiores necessidades nutricionais, maior consumo de materiais e equipamentos de cultura mais complexos (WANG; XU; YIN, 2023). Por ser uma tecnologia relativamente nova, ainda há poucos métodos de cultura 3D padronizados, o que se apresenta como mais uma das limitações importantes desse modelo (PARK; HUH; KANG, 2021).

A escolha do ensaio adequado pode ser difícil, e o manuseio dessas culturas é tecnicamente mais desafiador pois os agregados podem ser facilmente danificados, exigindo o uso de placas e *scaffold*s caros (DUFAU et al., 2021).

No presente estudo, realizamos ensaios monocamada e tridimensionais da mesma linhagem de pré adipócitos viscerais humanos para avaliarmos seu desenvolvimento e viabilidade celular, viabilizando estudo posterior com irisina e

pseudovirus.

Em modelos de cultura monocamada, tradicionalmente a microscopia de campo claro é largamente utilizada, alcançando taxas de 45 a 97% de adoção em estudos em farmacologia e biologia molecular (REIGOTO et al., 2021). Para culturas tridimensionais, entretanto, é necessário lançar mão de tecnologias como a microscopia confocal de fluorescência.

A microscopia confocal é uma tecnologia capaz de realizar o isolamento óptico de alta resolução em amostras relativamente espessas, com até 100µm (GRAF; BOPPART, 2010). A profundidade de penetração nessas amostras é limitada pelo fato de que a dispersão na amostra faz com que o feixe de iluminação fique desfocado, diminuindo a quantidade de luz que passa por meio do *pinhole* à medida que a profundidade da imagem aumenta. Geralmente, a luz de comprimento de onda mais longo penetra mais profundamente em uma amostra devido à menor absorção e dispersão (GRAF; BOPPART, 2010). Pela marcação fluorescente de componentes celulares com repórteres vitais ou coloração exógena, a microscopia de fluorescência confocal (CFM) é uma técnica de imagem poderosa que possui contraste molecular altamente específico para evidenciar estruturas-alvo (MICHIEL MULLER, 2006). Com base nos espectros de absorção e emissão das proteínas ou corantes fluorescentes, o CFM utiliza um conjunto de filtros ópticos para excitar e detectar seletivamente os comprimentos de onda da luz que contrastam os componentes marcados com fluorescência (SHYAM; REDDY; PALANIAPPAN, 2023; WANG; XU; YIN, 2023).

Ao constatar a diferenciação de pré-adipócitos em adipócitos em ambas as culturas realizadas, confirmamos a viabilidade técnica do ensaio tridimensional. Conforme observado na figura 2, os pré adipócitos viscerais

humanos se diferenciaram em adipócitos e foram, então, tratados com irisina.

Assim, ao confirmar o sucesso tratamento com ACE2 e infecção com o pseudovirus em cultura monocamada e 3D através de marcação com ACE2-Red e Pseudo SARS-CoV-2 *Green reporter*, cujas expressões foram captadas na microscopia confocal de fluorescência observadas nas figuras 3 e 4, o exame final de análise de reprodutibilidade foi realizado comparando-se o comportamento desses adipócitos em cada grupo experimental. Análises comparativas são ferramentas fundamentais para o estabelecimento de diretrizes metodológicas (ANDILLA et al., 2017).

Tanto na cultura 2D quanto na 3D as células responderam de forma semelhante à infecção por pseudovirus e ao tratamento com irisina. O gráfico 1 evidencia que o tratamento com irisina diminuiu a infecção viral nas células. O gráfico 2, por sua vez, mostra que o tratamento com irisina diminuiu também a expressão de ACE2, que é considerado um dos fatores necessários para a infecção viral, nesses adipócitos.

Apesar das culturas 3D oferecerem uma maior relevância fisiológica ao mimetizar mais fielmente o ambiente celular *in vivo*, os custos associados à sua implementação podem ser significativamente mais altos, o que inclui a necessidade de equipamentos especializados, maior tempo de preparação e análise. A cultura 2D apresenta como vantagem, quando comparada à cultura tridimensional, o fato de demandar menos investimentos iniciais e operacionais, uma vez que não necessita de equipamentos sofisticados como a microscopia confocal. Isso torna a cultura monocamada uma opção viável para laboratórios com orçamento limitado. Além disso, a simplicidade e a facilidade de manutenção dessas culturas permitem uma análise mais rápida e eficiente dos

resultados. Assim, a escolha entre culturas 2D e 3D deve ser ponderada de acordo com os objetivos específicos do estudo e os recursos disponíveis.

9. CONCLUSÃO

O uso de cultura 3D não conferiu vantagens adicionais sobre a cultura 2D em termos de resposta ao tratamento com irisina na infecção por Pseudo SARS-CoV-2. Esta conclusão é importante pois indica que, para determinados tipos de estudos e condições, as abordagens tradicionais em 2D podem ser tão eficazes quanto as mais complexas e custosas, facilitando a replicabilidade e acessibilidade da pesquisa científica.

10. REFERÊNCIAS

ANDILLA, J. et al. Imaging tissue-mimic with light sheet microscopy: A comparative guideline. **Scientific Reports**, v. 7, 21 mar. 2017.

BIJU, T. S.; PRIYA, V. V.; FRANCIS, A. P. **Role of three-dimensional cell culture in therapeutics and diagnostics: an updated review**. **Drug Delivery and Translational Research**Springer, , 1 set. 2023.

BOROOJERDI, M. H. et al. **Insights into organoid-based modeling of COVID-19 pathology**. **Virology Journal**BioMed Central Ltd, , 1 dez. 2023.

CHEN, D. et al. **Human Organoids as a Promising Platform for Fighting COVID-19**. **International Journal of Biological Sciences**Ivyspring International Publisher, , 2022.

COLLELUORI, G. et al. Visceral fat inflammation and fat embolism are associated with lung's lipidic hyaline membranes in subjects with COVID-19. **International Journal of Obesity**, v. 46, n. 5, p. 1009–1017, 1 maio 2022.

COOMES, E. A.; HAGHBAYAN, H. **Interleukin-6 in Covid-19: A systematic review and meta-analysis**. **Reviews in Medical Virology**John Wiley and Sons Ltd, , 1 nov. 2020.

DAWOODY NEJAD, L.; JULIAN, L. M. **Stem cell-derived organoid models for SARS-CoV-2 and its molecular interaction with host cells**. **Molecular Biology Reports**Springer Science and Business Media B.V.,1 dez. 2023.

DE OLIVEIRA, M. et al. Irisin modulates genes associated with severe coronavirus disease (COVID-19) outcome in human subcutaneous adipocytes cell culture. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 515, 15 set. 2020.

DUFAU, J. EMY et al. In vitro and ex vivo models of adipocytes. **American Journal of Physiology - Cell Physiology**, v. 320, n. 5, p. C822–C841, 1 maio 2021.

FÖLDI, M. et al. Visceral Adiposity Elevates the Risk of Critical Condition in COVID-19: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Obesity**, v. 29, n. 3, p. 521–528, 1 mar. 2021.

GRAF, B. W.; BOPPART, S. A. Imaging and analysis of three-dimensional cell culture models. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, v. 591, p. 211–227, 2010.

JENSEN, C.; TENG, Y. **Is It Time to Start Transitioning From 2D to 3D Cell Culture? Frontiers in Molecular Biosciences** Frontiers Media S.A., , 6 mar. 2020.

KELLER, K. et al. Obesity and Its Impact on Adverse In-Hospital Outcomes in Hospitalized Patients With COVID-19. **Frontiers in Endocrinology**, v. 13, 2 maio 2022.

KNIGHT, E.; PRZYBORSKI, S. **Advances in 3D cell culture technologies enabling tissue-like structures to be created in vitro**. **Journal of Anatomy** Blackwell Publishing Ltd, 1 dez. 2015.

KRAMS, I. A. et al. COVID-19: Fat, obesity, inflammation, ethnicity, and sex differences. **Pathogens**, v. 9, n. 11, p. 1–10, 1 nov. 2020.

KRONEMBERGER, G. S. et al. **Spheroids and organoids as humanized 3D scaffold-free engineered tissues for SARS-CoV-2 viral infection and drug screening**. **Artificial Organs**John Wiley and Sons Inc, , 1 jun. 2021.

KUMAR, S. et al. Clinically relevant cell culture models and their significance in isolation, pathogenesis, vaccine development, repurposing and screening of new drugs for SARS-CoV-2: a systematic review. **Tissue and Cell**, v. 70, 1 jun. 2021.

LANGHANS, S. A. **Three-dimensional in vitro cell culture models in drug discovery and drug repositioning**. **Frontiers in Pharmacology** Frontiers Media S.A., 23 jan. 2018.

MALAVAZOS, A. E. et al. **Targeting the Adipose Tissue in COVID-19**. **Obesity**Blackwell Publishing Inc., 1 jul. 2020.

MICHIEL MULLER. **Introduction to confocal fluorescence microscopy**. SPIE press, 2006.

Organização Mundial da Saúde (OMS) https://www.who.int/news/item/05-05-2023-statement-on-the-fifteenth-meeting-of-the-international-health-regulations-(2005)-emergency-committee-regarding-the-coronavirus-disease-(Covid-19)-pandemic [Internet]. [cited 2023 Jul 26].

PARK, Y.; HUH, K. M.; KANG, S. W. **Applications of biomaterials in 3d cell culture and contributions of 3d cell culture to drug development and basic biomedical research**. **International Journal of Molecular Sciences**MDPI AG, 1 mar. 2021.

PINTO, B. G. G. et al. ACE2 expression is increased in the lungs of patients with comorbidities associated with severe COVID-19. **Journal of Infectious Diseases**, v. 222, n. 4, p. 556–563, 1 ago. 2020.

POMA, A. M. et al. SARS-CoV-2 spread to endocrine organs is associated with obesity: an autopsy study of COVID-19 cases. **Endocrine**, v. 83, n. 1, p. 110–117, 1 jan. 2024.

QUARANTA, P. et al. SARS-CoV-2 Infection Alters the Phenotype and Gene Expression of Adipocytes. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 25, n. 4, 1 fev. 2024.

REIGOTO, A. M. et al. A comparative study on the use of microscopy in pharmacology and cell biology research. **PLoS ONE**, v. 16, n. 1 January, 1 jan. 2021.

SAKALEM, M. E. et al. **Historical evolution of spheroids and organoids, and possibilities of use in life sciences and medicine**. **Biotechnology Journal**John Wiley and Sons Inc, 1 maio 2021.

SHYAM, R.; REDDY, L. V. K.; PALANIAPPAN, A. **Fabrication and Characterization Techniques of In Vitro 3D Tissue Models**. **International Journal of Molecular Sciences**MDPI, 1 fev. 2023.

SOHRABI, C. et al. **World Health Organization declares global emergency: A review of the 2019 novel coronavirus (COVID-19)**. **International Journal of Surgery**Elsevier Ltd, 1 abr. 2020.

URZÌ, O. et al. **Three-Dimensional Cell Cultures: The Bridge between In Vitro and In Vivo Models**. **International Journal of Molecular Sciences**Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI), 1 ago. 2023.

VADUGANATHAN, M. et al. **Renin-Angiotensin-Aldosterone System Inhibitors in Patients with Covid-19**. [s.l: s.n.].

WANG, H.; XU, T.; YIN, D. **Emerging trends in the methodology of environmental toxicology: 3D cell culture and its applications**. **Science of the Total Environment**Elsevier B.V., 20 jan. 2023.

11. ANEXOS

11.1 ANEXO 1

Lonza Walkersville, Inc.
Walkersville, MD 21793-0127 USA
U.S. Scientific Support: 800 521 0390
scientific.support@lonza.com
EU/ROW Scientific Support: +32 87 321 611
scientific.support.eu@lonza.com
Document # AA-1050-7 10/12
www.lonza.com
© 2012 Lonza Walkersville, Inc.

Poietics™ Human Visceral Preadipocytes

HPrAD - Instructions for Use

Introduction

Primary Human Visceral Preadipocytes are isolated from visceral (kidney and bladder) adipose tissue by enzymatic digestion and selective culturing techniques. Unpassaged Primary Human Visceral Preadipocytes are cryopreserved in a solution containing EGM™-2 MV, FBS and DMSO.

Unpacking and Storage Instructions

1. Check all containers for leakage or breakage.
2. For cryopreserved cells – remove cryovials from the dry ice packaging and immediately place into liquid nitrogen storage. Alternatively, thaw and use the cells immediately. If no dry ice remains, please contact Customer Service.
3. BulletKit™ Instructions: Upon arrival, store basal medium at 4-8°C and SingleQuots™ at 20°C in a freezer that is not self-defrosting. If thawed upon arrival, growth factors can be stored at 4°C and added to basal medium within 72 hours of receipt. After SingleQuots™ are added to basal medium, use within one month. Do not re-freeze.

Using media or reagents other than what is recommended will void the cell warranty. Please contact Scientific Support if you need help selecting media and/or reagents.

4. Dulbecco's Phosphate Buffered Saline can be stored at ambient temperature. The Trypsin/EDTA Solution is sterile filtered and then stored at -20°C until shipment. Trypsin/EDTA may thaw during transport. It may be refrozen once. Trypsin/EDTA Solution has a limited shelf life or activation at 4°C. If, upon arrival, Trypsin/EDTA is thawed, immediately aliquot and refreeze at -20°C.

NOTE: To keep Trypsin/EDTA fresh and active after thawing, you may aliquot it into sterile centrifuge tubes and re-freeze at -20°C.

Using media or reagents other than what is recommended will void the cell warranty. Please contact Scientific Support if you need help selecting media and/or reagents.

Preparation of Media

1. Use pre-warmed (37°C), supplemented medium for culturing preadipocytes
2. Decontaminate the external surfaces of a 500 ml bottle of Preadipocyte Basal Medium-2 with 70% v/v ethanol or isopropanol.
3. Make up Preadipocyte Growth Medium-2 by adding the entire contents of the FBS, L-glutamine, GA-1000 SingleQuots™ to the bottle of Preadipocyte Basal Medium-2 (The final concentrations of the supplements will be 10%, 2 mM, 30 μg/ml and 15 ng/ml respectively). Reserve 100 ml of Preadipocyte Growth Medium-2 for subsequent preparation of differentiation medium.

Thawing of Cells / Initiation of Culture Process

NOTE: The thawing procedure described below has been developed to provide optimal recovery and cell viability. Failure to follow this protocol will result in lower yields of viable progenitor cells.

1. Remove the cryovial of cells from liquid nitrogen storage and thaw rapidly in a 37°C water bath for no more than 2 minutes. Decontaminate the external surfaces of the cryovial of cells with 70% v/v ethanol or isopropanol.

Lonza

2. Using a micropipette, gently add the thawed cell suspension to 50 ml of pre-warmed Preadipocyte Growth Medium-2.
3. Rinse the cryovial with medium and add the rinse to the cell suspension.
4. Centrifuge at 300 x g for 10 minutes at room temperature.
5. When washing the cells, do not attempt to remove too much of the wash. Leave a minimum of 1 ml of wash at the bottom of the tube. If the final cell count is low, some of the pellets may have been removed with the wash.
6. Add 2 or 3 ml of Preadipocyte Growth Medium-2 to the 1 ml of wash and resuspend the pellet of cells. Dilute 20 µl of the cell suspension in 20 µl of 0.4% Trypan Blue; do a cell count and determine % viability. Recovery should be approximately 90%.

If the cells are to be expanded prior to use for assays:

7. Plate the preadipocytes at approximately 9,000 cells/cm^2 in 0.2 ml medium/cm^2 growth area in tissue culture flasks and gently rock to disperse the cell suspension over the growth surface.
8. Human primary preadipocytes will appear round when first plated. Within four hours, greater than 90% of the cells should be attached and will begin to flatten and elongate. Within 24-36 hours, the cells will be adherent, elongated and spindle shaped. As preadipocytes begin to divide, they will round up. During mitosis, the cells stay loosely attached and once division is completed, will again flatten and elongate.
9. Preadipocyte cultures should be fed every 3-4 days after plating.
10. The preadipocyte culture will have a doubling time of approximately 36 to 48 hours. Preadipocyte cultures should be cultured to 70% confluency – do not allow the cells to become confluent as they will undergo growth arrest, a precursor to differentiation. At this point, the cells can be harvested and either used in assays or subcultured.

Subculturing

1. Aseptically remove and discard all of the spent media from the flasks.
2. Wash the attached cell layer with Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (# 17-512F) or an equivalent calcium and magnesium free balanced salt solution. Add the wash solution to the side of the flask opposite the attached cell layer. Rinse by rocking the flask back and forth several times. Aseptically remove and discard the wash solution.
3. Add a sufficient volume of Clonetics™ Trypsin-EDTA solution, (CC-3232), to cover the cell layer (approx. 25 µl/cm^2). Gently rock the flask(s) to ensure that the cells are covered by the trypsin solution.
4. Incubate at room temperature for 3 minutes, then observe under a microscope. If the cells are less than 90% detached, continue incubating and observe every minute. Tapping the flask or plate will expedite cell detachment. Do not incubate the cells longer than 15 minutes.
5. Once >90% of the cells are rounded and detached, stand the flasks on end and add temperature equilibrated Preadipocyte Growth Medium-2 to each flask (approximately 0.2 ml/cm^2). Disperse the solution by pipetting over the cell layer surface several times.
6. To remove the trypsin, centrifuge cells at approximately 300 x g for 10 minutes at room temperature.
7. Resuspend the cell pellet(s) in a minimal volume of temperature equilibrated Growth medium and remove a sample for counting.
8. Count the cells with a hemacytometer or cell counter and calculate the total number of cells. Make a note of cell yield for later use.
9. Primary human preadipocytes should not be passaged more than once.

If the cells are to be assayed immediately:

10. Resuspend the preadipocytes at 100,000 cells/ml in Preadipocyte Growth Medium-2 and plate the preadipocytes at 10,000 cells/well of a 96-well cell culture plate in 0.1 ml of Preadipocyte Growth Medium-2.
11. Incubate at 37°C, 5% CO_2 and >90% humidity until the cells are confluent.

Maintenance / Differentiation

To Prepare Adipocyte Differentiation Medium

1. Add the entire contents of the SingleQuots™ of insulin, dexamethasone, indomethacin and isobutyl-methylxanthine to 100 ml of

Lonza

Preadipocyte Growth Medium-2 prewarmed to 37°C.

The PGM™-2 contains insulin and that elimination of the insulin SingleQuots™ in the Differentiation Medium will not make the resulting Differentiation Medium insulin-free.

NOTE: The 100 ml of Differentiation Medium will be "2X" – the concentrations of the differentiation agents will be diluted 2-fold when added to the pre-plated cells.

Differentiation of Cells

1. Induce the preadipocytes to begin differentiating into adipocytes with the addition of 0.1 ml of Adipocyte Differentiation Medium to each well. Note that the differentiation agents in the Differentiation Medium will be diluted 2-fold.
2. If the cells are to be treated with a series of test samples, set up several 24-well dilution plates with the appropriate volume of Preadipocyte Differentiation Medium/well and make the required serial dilutions of the test samples. Add 0.1 ml of each different concentration of test samples to wells of the pre-seeded confluent preadipocytes. Each assay should be done in triplicate.
3. We suggest that "control" wells be set up which contain 1) 100 µl of Preadipocyte Growth Medium-2 instead of Differentiation Medium 2) no added test sample and 3) "solvent only" if the test samples were dissolved in solvents such as DMSO, ethanol, etc.
4. No further additions or medium changes are required. Differentiated adipocytes are delicate and care should be used to avoid disrupting the numerous lipid vacuoles in the cells.
5. The extent of adipocyte differentiation may be noted by microscopic observation of lipid vacuoles in the induced cells. The intracellular lipid vacuoles will begin to appear 4 to 5 days after induction and will continue to increase in number and size for 7 to 10 days. Non-induced cells will have few, if any, lipid vacuoles.
6. To document adipocyte differentiation, cultures may be carefully rinsed with PBS, fixed with 10% buffered formalin and stained with Oil Red O. Poietics™ AdipoRed™ Reagent (PT-7009) is a recommended and convenient reagent for the high-throughput assay of *in vitro* preadipocyte differentiation. Alternatively, adipocyte differentiation can be measured by immunoassays or mRNA amplification assays to quantify the expression of proteins such as leptin, AP2 or PPARγ that have been used as "markers" of the differentiated adipocyte.

Quality Control (QC)

For detailed information concerning QC testing, please refer to the Certificate of Analysis.

Ordering Information

Cryopreserved Cells

Cat. No.	Product	Description
PT-5005	HPrAD-vis, Visceral Preadipocytes	≥ 1,000,000 cells
PT-5023	HPrAD-vis, Visceral Preadipocytes (Diabetes Type I)	≥ 1,000,000 cells
PT-5024	HPrAD-vis, Visceral Preadipocytes (Diabetes Type II)	≥ 1,000,000 cells

Related Products

Preadipocyte Growth Media (Must be purchased separately)

Cat. No.	Product	Description
PT-8002	PGM™-2 BulletKit™	Kit which contains a 500 ml bottle of PBM-2, (PT-8202) and PGM™-2 SingleQuots™ (PT-9502).
PT-8202	PBM-2	Preadipocyte Basal Medium-2 (no growth factors) (500 ml)
PT-9502	PGM™-2 SingleQuots™	Supplements and growth factors (FBS, L-glutamine, GA-1000, Insulin, Dexamethasone, Indomethacin, 3- Isobutyl-1-methylxanthine)
PT-7009	AdipoRed™ Test Kit	5 X 4.0 ml

Subculturing Reagents (sold separately)

Cat. No.	Product	Description
17-512F	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline	500 ml
CC-3232	Trypsin/EDTA Solution	100 ml

Product Warranty

CULTURES HAVE A FINITE LIFESPAN IN VITRO. Lonza guarantees the performance of its cells only if Poietics™ Media and Reagents are used exclusively, and the recommended protocols are followed. The performance of cells is not guaranteed if any modifications are made to the complete Cell System. Cryopreserved PrAD-vis cells are assured to be viable and functional when thawed and maintained properly.

Safety Statements

THESE PRODUCTS ARE FOR RESEARCH USE ONLY. Not approved for human or veterinary use, for application to humans or animals, or for use in clinical or i*n vitro* procedures.

WARNING: CLONETICS™ AND POIETICS™ PRODUCTS CONTAIN HUMAN SOURCE MATERIAL, TREAT AS POTENTIALLY INFECTIOUS. Each donor is tested and found non-reactive by an FDA approved method for the presence of HIV-I, Hepatitis B Virus and Hepatitis C Virus. Where donor testing is not possible, cell products are tested for the presence of viral nucleic acid from HIV, Hepatitis B Virus, and Hepatitis C Virus. Testing cannot offer complete assurance that HIV-1, Hepatitis B Virus, and Hepatitis C Virus are absent. All human sourced products should be handled at the Biological Safety Level 2 to minimize exposure of potentially infectious products, as recommended in the CDC-NIH Manual, Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, 5th Edition. If you require further information, please contact your site Safety Officer or Scientific Support.

All trademarks herein are marks of Lonza Group or its subsidiaries.

Biocelltis
Human Cell and Tissue Engineering

MATRIZ 3D CELLFATE®

GUIA DE USO

Sistema para cultura de células em ambiente tridimensional

ATENÇÃO! Leia as recomendações descritas neste guia e use equipamentos de proteção individual adequados.

INFORMAÇÕES DO PRODUTO

As matrizes 3D CellFate® oferecem um microambiente tridimensional (3D) natural livre de interferentes biológico, permitindo a avaliação da atividade metabólica, perfil proliferativo e viabilidade celular mimetizando o microambiente in vivo.



Cat. Nº	Quant. (unid)	Formato	Dimensões (unid)	Armazenamento	Validade
BC01006	6	6 poços	34 mm Ø x 3 mm	4 °C a 26 °C	24 meses*
BC01012	12	12 poços	21 mm Ø x 2,5 mm		
BC01024	24	24 poços	15 mm Ø x 2 mm		
BC01048	48	48 poços	10 mm Ø x 1,5 mm		
BC01096	96	96 poços	6 mm Ø x 1 mm		

* A validade é determinada a partir da data de fabricação.

NOTAS IMPORTANTES

1. As matrizes 3D CellFate® suportam a propagação e manutenção in vitro de vários tipos de células animais, entre culturas primárias, linhagens e células imortalizadas, incluindo: HDFa, L929, HaCat, SK-MEL-28, B16F10, HUVEC, 4T1, MCF-7, MDA-MB-231, HASMC e HAEC. As matrizes 3D CellFate® tem sido utilizadas extensivamente com fibroblastos dérmicos primários e fibroblastos L929 em ensaios de citotoxicidade de moléculas ativas. As matrizes 3D CellFate® estão sendo testadas continuamente para cultura de diferentes tipos de células animais e sua eficiência depende das características de cada tipo celular. Utilize este protocolo como referência ao usar outros tipos de células não mencionadas neste guia.

2. As matrizes 3D CellFate® possuem duas superfícies porosas distintas entre si. Sabe-se que a porosidade das matrizes influencia o comportamento das células, desta forma é importante utilizar sempre a mesma superfície durante um experimento, pois as células podem apresentar diferentes respostas celulares.

Produto para Uso Exclusivo em Pesquisa
For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures

Biocelltis
Human Cell and Tissue Engineering

VISÃO GERAL DO PROCESSO

Processo simplificado em 4 etapas:

● Consulte: "Dicas e sugestões de uso"

Preparação das matrizes (~40 min) → Semeadura das células → Tempo de adesão (2h - 4h) → Adição de meio de cultivo

PROTOCOLO

Atenção: Todas as etapas de manuseio das matrizes e/ou células devem ser realizadas em ambiente estéril (fluxo laminar, cabine de segurança biológica, etc.)

Você receberá as matrizes 3D CellFate® esterilizadas em um tubo contendo água ultrapura. Antes de iniciar o experimento siga rigorosamente os passos a seguir:

1. PREPARAÇÃO DAS MATRIZES

1.1. Em ambiente estéril, retire as matrizes que serão utilizadas no estudo do tubo contendo água ultrapura com o auxílio de uma pinça estéril com pontas planas ou espátulas planas para evitar danos ao biomaterial (Fig. 1) e coloque cuidadosamente as matrizes 3D com a superfície onde as células serão semeadas voltada para cima nos poços da placa de cultivo. 1

1.2. Após acomodar as matrizes nos poços será necessário substituir a água ultrapura presente na estrutura do biomaterial por meio de cultivo.

Para que ocorra a troca da água por meio de cultivo, cubra as matrizes com o meio que será utilizado no experimento e mantenha na incubadora de CO_2 por no mínimo 30 minutos. 2

Importante: sempre mantenha as matrizes úmidas, o ressecamento poderá danificar o material.



Figura 1

2. SEMEADURA DAS CÉLULAS

2.1. Ocorrida a troca da água por meio de cultivo, remova cuidadosamente todo o meio presente no poço com uma ponteira posicionada na lateral do mesmo, permanecendo apenas a matriz 3D CellFate poços. É importante que todo o meio seja retirado nesta etapa. 3

2.2. Em seguida, deixe a placa de cultivo, contendo as matrizes, aberta no fluxo de ar em ambiente estéril por no mínimo 30 minutos para que o meio que ainda possa estar excedente nas matrizes evapore. Não é aconselhável ultrapassar o tempo de 1h para evitar o ressecamento das matrizes. 4

For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures

Biocelltis
Human Cell and Tissue Engineering

3. Prepare a suspenção celular, com a concentração de células apropriada, de acordo com as práticas já estabelecidas em seu laboratório. Verifique se as matrizes estão posicionadas corretamente nos poços e semeie as células no volume de suspensão adequado. A tabela ao lado fornece exemplos de faixas de volume para suspensão. (5)

Formato	Volume para suspensão
6 poços	250-500 µL
12 poços	100-200 µL
24 poços	50-100 µL
48 poços	30-50 µL
96 poços	20 µL

3. TEMPO DE ADESÃO

3.2. Após a semeadura das células, coloque a placa na incubadora de CO_2 por no mínimo 2h.

Nota: Este tempo pode variar dependendo do tipo celular (normalmente de 2 a 4h).

4. ADIÇÃO DO MEIO DE CULTIVO

4.1. Após aguardar o tempo de adesão celular, retire as placas contendo as matrizes com células aderidas da incubadora e acrescente o volume de meio de cultivo suficiente para cobrir as matrizes em condições estéreis de cultivo.

FINALIZADA ESTA ETAPA, SIGA SEU PROTOCOLO EXPERIMENTAL

DICAS E SUGESTÕES DE USO

(1) As matrizes 3D animais possuem duas superfícies distintas, o lado superior e o lado inferior (ver diferenças entre os lados na Figura 2), provenientes de seu processo produtivo. Uma das superfícies possui porosidade maior que a outra, por esse motivo é muito importante utilizar a mesma superfície durante um experimento para que não ocorram respostas celulares diferentes. Para facilitar a visualização das superfícies deposite o conteúdo do tubo (matrizes com água ultrapura) em uma placa de Petri estéril. Desta maneira ao levantar a matriz com uma pinça estéril ela formará uma curvatura que permite distinguir entre o lado convexo e o côncavo. O lado convexo, com menor porosidade é o lado superior, enquanto o lado côncavo, de porosidade maior é o lado inferior.

A Lado Superior / Convexo B Lado inferior / Côncavo

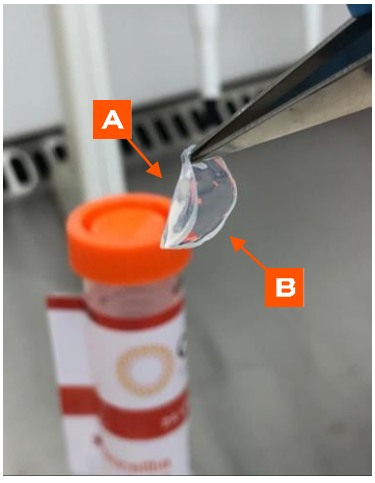


Figura 2

(2) A troca de água ultrapura presente nas matrizes pelo meio de cultivo precisa ser de pelo menos 30 minutos, podendo se estender por um período maior dependendo da necessidade do pesquisador, por exemplo *overnight* (caso o pesquisador queira preparar as matrizes no dia anterior).
Obs: Caso seja notada alteração do pH do meio de cultivo ou alteração de cor do meio, realize trocas sucessivas até que o pH estabilize ou o meio não altere mais a coloração.

For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures

Biocelltis
Human Cell and Tissue Engineering

3. É importante que todo o meio seja retirado nesta etapa. A pipetagem para a retirada do meio deve ser feita com cuidado para evitar danos ao biomaterial. Para aspirar com cuidado, deslize a ponta da pipeta contra a parede do poço, sugando suavemente o meio ao mesmo tempo. Tenha cuidado ao aspirar próximo ao hidrogel, tente não desloca-lo.

4. Após a retirada do meio das matrizes, deixe a placa aberta no fluxo de ar em ambiente estéril para que o meio que ainda possa estar excedente nas matrizes evapore. Cuidado com esta etapa, pois caso ultrapasse 1h pode haver ressecamento das matrizes. Caso o ressecamento ocorra descarte a matriz e reinicie o processo com uma nova amostra.

5. Na etapa 2.3 é apresentada uma tabela com faixas de volume de semeadura sugeridas para os diferentes formatos de matrizes. É importante que nesta etapa não haja extravasamento do meio de cultura contendo a suspensão de células animais para fora das matrizes. Recomenda-se a realização de experimentos piloto para estabelecer uma densidade ideal de semeadura de células para atender à necessidade desejada.

DICAS E SUGESTÕES GERAIS

Ressecamento do material

Você receberá suas matrizes em um tubo com água ultrapura. Certifique-se que todas as matrizes se encontrem embebidas na água, caso contrário agite o tubo para que todas as matrizes fiquem imersas ou em ambiente estéril com uma pinça abra o tubo e coloque as matrizes novamente na água. Durante todo o armazenamento do material este também deverá ficar imerso na água ultrapura. Caso seu material resseque coloque-o imediatamente em água ultrapura para hidrata-lo novamente ou descarte.

Esterilização

Recomendamos a reesterilização por vapor (autoclave) das matrizes 3D células animais metabolicamente remanescentes dos seus experimentos para garantir esterilidade e a validade do produto. A esterilização pode ser realizada por calor em autoclave à 121° C por 20 min, sem danos ao produto. Também é possível a esterilização do produto com luz UV, neste caso lembre-se de esterilizar as duas superfícies do material. OBS: Após a utilização das matrizes 3D CellFate® estas não podem ser reutilizadas. Se a manipulação das matrizes 3D células CellFate metabólica ocorrer em ambiente não estéril e limpo o produto deve ser descartado.

Testes de Viabilidade Celular

Para análise da atividade metabólica das células animais (viabilidade/proliferação) recomenda-se a utilização do reagente CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (MTS) da Promega. OBS: As matrizes 3D células animais metabólica não são compatíveis com MTT.

Microscopia

Devido à alta transparência óptica, as células podem ser visualizadas em ambas as superfícies da matriz. Utilize os métodos padrões de preparação de amostras. Evite a secagem do hidrogel - mantenha as matrizes sempre submersas em um tampão ou meio. Evite bolhas de ar presas entre a matriz e o vidro enquanto prepara o material para a microscopia. Use uma lamela para minimizar a quantidade de tampão (o excesso de líquido permite movimentos da matriz) e a evaporação. A desidratação das matrizes 3D CellFate metabólica deve ser realizada por ponto crítico de CO_2 com fixação prévia das células.

>> Para informações técnicas adicionais envie e-mail para suporte@biocelltis.com



Montana Molecular
Fluorescent Biosensors for Live Cell Discovery

Fluorescent ACE2

July 15, 2020

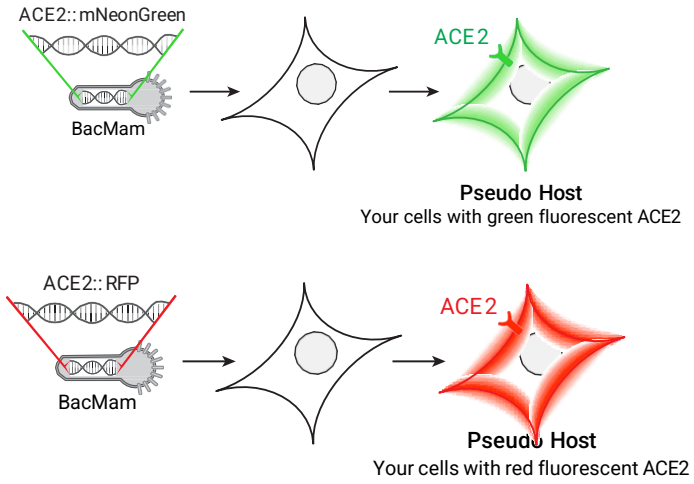
Product Info & Protocol

About Fluorescent ACE2 ..... **2**
BacMam Kit Materials and Storage 3
Additional Materials Required 3
Biosafety Considerations 3
Warranty 3
Protocol for Use **4**
First Experiment – Optimize by Titrating the Fluorescent ACE2 4
Day 1 - Detailed Procedure - Transduce and Plate Cells 5
Day 2 - Detailed Procedure - Measuring Fluorescence **6**
Fluorescence Properties 7
Optimization **7**
Optimizing Fluorescence 7
Optimizing Expression 7
Troubleshooting Guide 8
Related Products 10
Contact Us 10

About Fluorescent ACE2

Spike protein on the surface of SARS CoV-2 interacts with the ACE2 protein expressed on the surface of human airway cells to mediate viral entry into the host cell. The tight binding of spike to ACE2 is the first step in the infection process. If this interaction could be blocked, with antibodies or compounds, a therapeutic drug for COVID-19 could be developed [6], [7]. The viral entry process may also involve proteases. Theses enzymes, such as TMPRSS2 (product #C1130N) are thought to cleave the spike protein such that a membrane fusion complex springs into action, fusing the envelope membrane with the host cell membrane, ensuring that the virus enters the cell [8], [9], [10].

The fluorescent ACE2 described here, combined with our pseudoviruses (pseudo SARS-CoV-2 products #C1110G, #C1110R), provide biologists and drug discovery teams with robust, safe tools to study SARS-CoV-2 entry and potentially discover compounds or neutralizing antibodies that can stop the viral entry process. Pseudo SARS-CoV-2 and fluorescent ACE2 are based on a BSL-1 BacMam vector that does not replicate in mammalian cells. BacMam vectors make it possible to generate pseudo host cells that express a fluorescent ACE2 (products #C1100G, and #C1100R) and TMPRSS2. A significant advantage of pseudo host cells is that cell lines which are easy to culture and well suited for use in high throughput screening can be used. By combining pseudo SARS-CoV-2 and pseudo host cells, safety requirements are minimal and screening is cost effective. This means that most laboratories can be screening for blocking agents within a few days, with a minimum of changes to work flow or safety/regulatory procedures.



Overview

The following protocol is optimized for A549 cells on a 96-well plate [1].

Relevant Products

Product	Description	Promoter	Recommended Use
#C1100G	mNeonGreen Fluorescent ACE2	CMV	High-content imaging, microscopy, flow cytometry, plate reader
#C1100R	Red Fluorescent ACE2	CMV	High-content imaging, microscopy, flow cytometry, plate reader

Our goal is to make your workflow easy and reproducible.

We'd love to hear about your research.

Questions?
Call us, we can help!
+1 406-200-8321
info@montanamolecular.com

We also have a **Troubleshooting Guide** *at the end of this document*

BacMam Kit Materials and Storage

BacMam stocks should be stored at 4°C protected from light in the original package. Store **HDAC inhibitor at 4°C. Avoid repeated freeze/thaw cycles.** We recommend re-testing BacMam stock after storing for more than 12 months.

Label	Materials in Kit	Details	Storage
	mNeonGreen or Santaka Red fluorescent ACE2 in BacMam ≅ 2 ×10^{10} VG/mL in ESF 921 Insect Culture Medium (Expression Systems, product #96-001-01)	CMV driven expression, green or red fluorescent tagged Angiotensin Converting Enzyme 2 (ACE2) protein in BacMam.	4°C
	Fluorescent protein – control	mNeonGreen BacMam is included for the red ACE2 and Santaka Red BacMam is included for the green ACE2	4°C
SB	**sodium butyrate** (Sigma Aldrich product #B5887) 500 mM in H_2O	Sodium butyrate is added to the culture to maintain BacMam expression. Other HDAC inhibitors may work as well.	4°C

Additional Materials Required (not included in kit)

1. Black, clear bottom microplate coated with a cell attachment factor. **Greiner Cell Coat (#655946)** is our preferred 96-well plate available from VWR.
2. Dulbecco's Phosphate Buffered Saline with Ca^{2+} and Mg^{2+} (DPBS) available from VWR **[2]**.
3. DMEM Fluorobrite (**Thermo Fisher #A1896701**) (optional, **see Measuring Fluorescence on page 6**)
4. Complete growth medium – for A459 cells, we recommend F-12K media (**ATCC catalog #30-2004**) +10% fetal bovine serum (10% FBS)

Biosafety Considerations

The BacMam vector carrying the fluorescent protein in this construct is a modified baculovirus, used for delivery to, and expression in, a wide variety of mammalian cell types including primary cultures.

BacMam is a modified baculovirus, *Autographa californica*, AcMNPV. The natural host of baculovirus is larvae of the order *Lepidoptera*. The BacMam vector in the kit is produced in the lab using Sf9 insect cells and is pseudotyped to infect mammalian cells. In mammalian cells, the baculovirus genome is silent, and it cannot replicate to produce new virus in mammalian cells. While it should be handled carefully, in a sterile environment, it is classified as a Biosafety Level 1 (BSL-1) reagent.

Other types of viruses are quantified in terms of plaque forming units (PFU) in cells from the natural host. Since BacMam is modified to produce expression in mammalian cells, we quantify the virus by measuring viral genes (VG) per milliliter (mL). Viral samples are prepared to release viral genomic DNA, then multiple dilutions of the preparation are run in qPCR using primers that are specific to the VSVG gene in the BacMam genome. Results are compared against a standard curve to generate an average titer for each viral stock. Check the label on the tube to find VG/mL for your stock.

This product is for research use only and is not recommended for use or sale in human or animal diagnostic or therapeutic products.

Warranty

Materials are provided without warranty, express or implied. End user is responsible for making sure product use complies with applicable regulations. No right to resell products or any components of these products is conveyed. Under no circumstances should these products be administered to, nor consumed by humans.

Protocol for Use

This protocol is optimized for detection on a fluorescence plate reader in **A549 cells.**, It may be adjusted for use with other cell types and for detection on imaging systems.

Take the time to optimize ACE2 expression for your cell type and your particular conditions.

First Experiment -Optimize Fluorescent ACE2 Expression Relative to Pseudovirus and Bald Control

OPTIMIZE ACE2 EXPRESSION

For cell types other than A549, we recommend using a titration series to optimize signal above background.

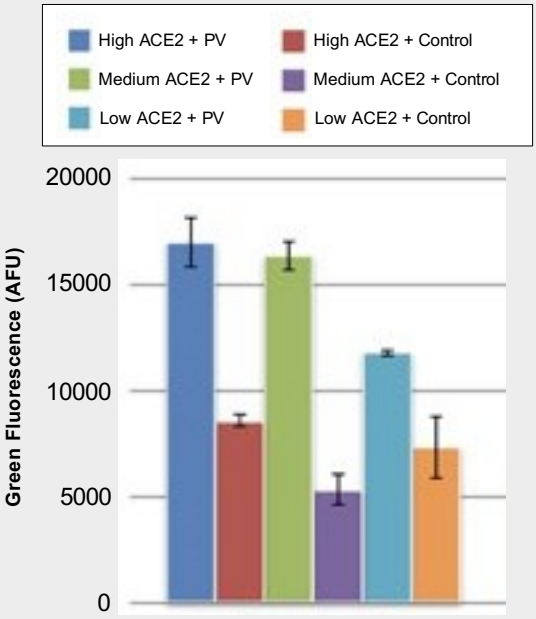


Figure 1. Optimize ACE2 expression to reduce non-specific infection by pseudovirus

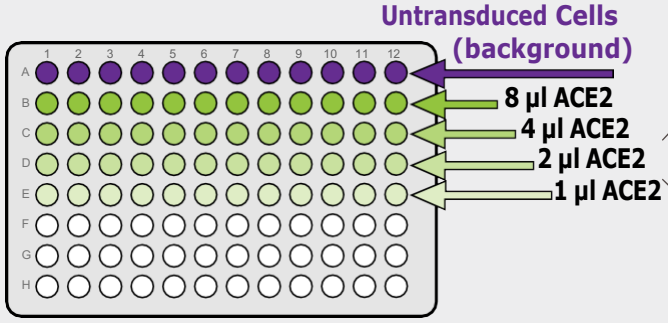
A549 cells were transduced with ACE2 BacMam at
1) 9×10^7 VG/ well (HIGH)
2) 4.5×10^7 VG/well (MEDIUM)
3) 9×10^6 VG/well (LOW)
~20 hours later, pseudovirus (PV) or "bald" control virus (Control) was added to cells at 5×10^8 VG/well, and infection was allowed to proceed overnight at 37C°.
~16 hours later, cells were washed with PBS and green fluorescence was quantified with a BioTek® plate reader.

Conclusions: Optimal ACE2 transduction for A549 cells (15,000 cells/well in a 96-well plate) is 4.5×10^7 VG/well. Note that the improvement comes from a reduction in non-specific infection (control virus in HIGH ACE2 vs. control virus in MEDIUM ACE2, p = 0.002) rather than an increase in pseudovirus infection. The effect is lost if the ACE2 transduction is too low.

Day 1

a. Set up your plate. One row of wells are reserved for cells that are not transduced with ACE2.

b. Titrate ACE2 in a series of wells to optimize assay. Refer to detailed protocol **Day 1 procedure on page 5.**



Transduction Reaction Per Well	
2 µL	Fluorescent ACE2 BacMam
0.6 µL	500 mM **SB** (sodium butyrate)
47.4 µL	complete media
50 µL	**total volume per well**

Day 2

c. On Day 2, refer to **Pseudo SARS-CoV-2 Protocol** (if using).

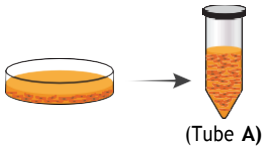
d. **Refer to detailed protocol Day 2 procedure on page 6.**

Tip: *For use in A549 cells, we've already determined the optimal amount of Fluorescent ACE2 (see* **Fig 1** *above).*

Day 1 – Detailed Procedure

Transduce and Plate Cells

Step 1)
Prepare Cells (Tube A)



a. Detach cells using standard trypsinization protocol. Re-suspend cells in complete culture media and determine cell count.

b. Prepare a dilution of cells at your desired concentration.

100 µL of this cell re-suspension will be required for a single well in a 96-well plate, so prepare enough of the dilution to seed the desired number of wells in the plate. Let cells sit in hood and move on to preparation of the viral transduction reaction.

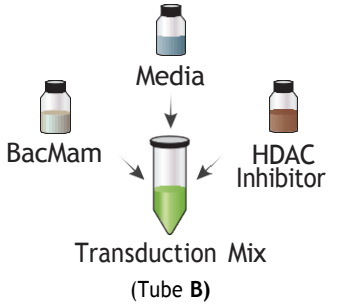
Cells (Tube A)

Per Well (96-well plate)
100 µL cells

Tip: *150,000 cells/mL works well for A549 cells. This will result in 15,000 cells/well in a 96 well plate. But remember, your optimal cell density is cell type dependent*

Step 2)
Prepare Viral Transduction Reaction (Tube B)

c. For each transduction reaction (i.e. one well in a 96-well plate), prepare the transduction solution by mixing 4.5×10^7 VG/mL of the fluorescent ACE2 BacMam stock (The stock concentration of Fluorescent ACE2 is 2×10^{10} VG/mL which equates to 2.2 µL per well.) with 0.6 µL of the 500 mM **SB** (stock solution of sodium butyrate), and 47.2 µL of the complete culture media for your cells, for a total volume of 50 µL. Mix gently. Following Step 3, the final concentration of sodium butyrate will be 2 mM.



Transduction Reaction (Tube B)

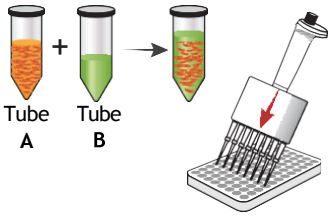
Per Well (96-well plate)
4.5×10^7 VG/mL Fluorescent ACE2 BacMam
0.6 µL 500 mM **SB** sodium butyrate
47.2 µL complete media

50 µL total volume

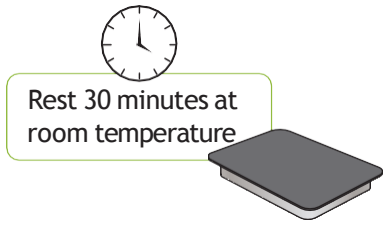
Tip: *The stock concentration of Fluorescent ACE2 is 2×10^{10} VG/mL which equates to 2.2 µL per well.*

Step 3)
Mix Cells and Transduction Mix

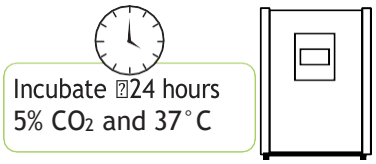
d. Mix Tube A and Tube B (100 µL tube A + 50 µL tube B). Mix gently and seed 150 µL of mix per well on the 96-well plate.



e. Cover plate to protect from light and let rest at room temperature for 30 minutes.



f. Incubate ≈ 20-24 hours under normal cell growth conditions (5% CO_2 and 37°C), protected from light.



Tip: *When preparing a master mix, scale up by 10-15% of the number of wells needed to avoid coming up short.*

Cells (Tube A) + Transduction Reaction (Tube B)

Per Well (96-well plate)
100 µL cell suspension
50 µL transduction reaction

150 µL total volume per well

Day 2 – Detailed Procedure

Measuring Fluorescence

g. **For measuring assays on a plate reader:** Replace cell culture media with DPBS (1X, containing calcium and magnesium). Wash very gently, to avoid dislodging the cells. Experiments are performed at room temperature.

h. If possible, visually inspect cells on microscope to confirm cell health, fluorescent ACE2 expression, and transduction efficiency.

i. Measure signal-to-background. Transduced cells should be at least 5× brighter compared to untransduced cells.

Tip: For measuring kinetic assays on an imaging system: *Prior to imaging fluorescence, replace cell culture media with DMEM Fluorobrite (***Thermo Fisher #A1896701***), fresh media for A549 cells (***ATCC catalog #30-2004***) and 1X Gibco GlutaMAX (***catalog #35050-061***). Wash very gently, to avoid dislodging the cells. Experiments are performed at room temperature.*

Fluorescence Detection

Our BacMam products are compatible with automated fluorescent plate readers and imaging systems.

Our customers have reported good results on:

- Hamamatsu FDSS®
- Molecular Devices FLIPR®
- Molecular Devices Flexstation®
- Perkin Elmer Enspire®

We have validated on:

- Biotek Lionheart™ FX
- Biotek Synergy MX™
- Biotek Cytation™
- BMG CLARIOstar®
- Epifluorescence microscopes

Fluorescence Properties

mNeonGreen BacMam expresses the very bright, mNeonGreen fluorescent protein **[5]**. While the peak excitation and emission wavelengths are 506 nm and 517 nm, respectively, a range of 485-505 nm (excitation) and 515-535 nm (emission) may be used if your instrument does not allow measurement at the peak ex/em. For example, on the BioTek Synergy MX™, the preferred ex/em is 488/525. If using filters, we recommend Chroma's Catalog set #49003 for optimal results.

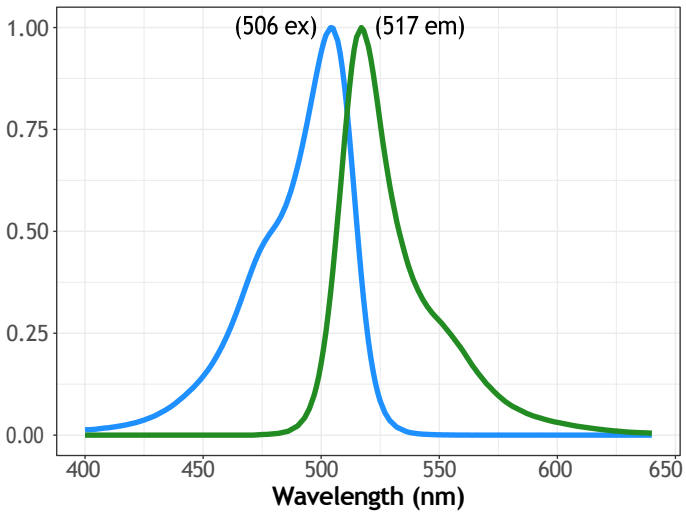


Figure 2A. Absorption and emission properties of the mNeonGreen fluorescent protein plotted as a function of wavelength.

For the RFP, the optimal excitation wavelength is 558 nm, but the absorption band of this protein is quite broad. Broad bandpass filters that pass 540 to 580 nm light can be used quite effectively. On the emission side, the red light spans 600 to 700 nm (peak excitation at 603 nm), so broad bandpass emission filters can also help to collect much of the emission.

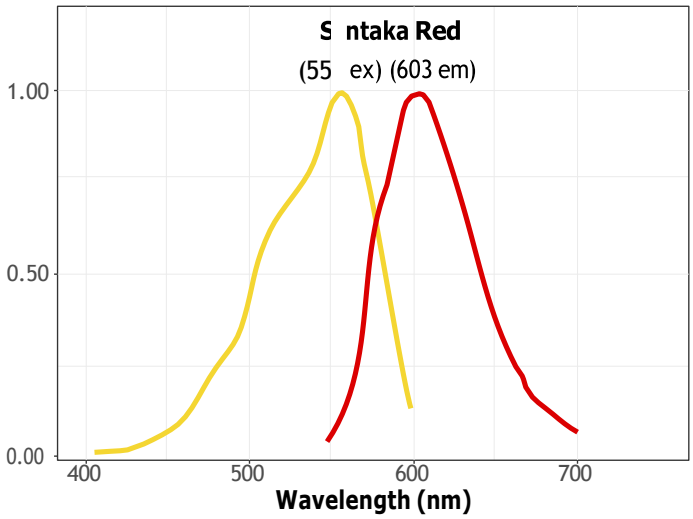


Figure 2B. Santaka Red fluorescent protein spectra

Optimization

Optimizing Fluorescence

Twenty-four hours after transduction, check your cells for fluorescence. Wells that were transduced with the fluorescent ACE2 should be 5-10 times brighter than control wells that were not treated with ACE2 BacMam.

HDAC inhibitors may be used to maintain expression. While BacMam transduction alone will result in protein expression, sodium butyrate or another HDAC inhibitor, such as valproic acid (VPA) or trichostatin A (TSA), will generate higher levels of expression and will maintain this level of expression. If cells look unhealthy, use lower concentrations or no HDAC inhibitor.

The type of cell culture media used in your experiment can affect the transduction efficiency of BacMam. For A459 cells, we recommend F-12K media (**ATCC catalog #30-2004**) +10% fetal bovine serum (10% FBS)

Optimizing Expression for Your Cell Type

To determine optimal conditions for your cell type, prepare a dilution series of transduction reactions by varying the amount of BacMam. For example, a range of 1 µL to 8 µL is a good starting range in a 96-well plate. We also suggest optimizing Fluorescent ACE2 expression relative to Pseudovirus and Bald Control **(see page 4).**

Varying the cell density, concentration of sodium butyrate, or trying a new HDAC inhibitor (VPA or TSA) may boost expression as well.

Troubleshooting Guide

Problem	Possible Cause	Solution
1. Low expression and/ or poor transduction efficiency	Suboptimal BacMam volume is being used.	**Perform titration of the BacMam stock**, testing a large range (i.e. 3-15 µL in 96-well plate format) to identify optimal volume. Too little can result in low expression, too much can cause cells to become sick.
	Transducing adherent cells.	Transduce cells while in suspension. If this isn't possible, try doing a media exchange on adherent cells after 4-6 hours, in addition to leaving the virus on overnight.
	Suboptimal cell density; too few or too many cells added.	Transduce cells so that the cells will be around 75-80% confluent at the time of transduction. Also, when transducing cells in suspension, make sure that cells in the source flask are < 100% confluent (approximately 80% confluent is ideal).
	HDAC inhibitor was not added to the transduction mix, or the concentration was wrong.	Add HDAC inhibitor at the proper concentration: sodium butyrate - 2mM valproic acid - 5mM trichostatin A - 0.25µM * Perform a titration to determine optimal concentration for the cell type being used.
	HDAC inhibitor being used is not optimal for cell type.	Test other HDAC inhibitors (e.g. sodium butyrate, valproic acid, trichostatin A.)
	Cell culture media is inhibiting transduction.	Remove media during transduction, preparing the transduction mix in DPBS and adding to cells. Replace transduction mix with media after 2-4 hours.
	BacMam stock was not stored properly (i.e. not stored at 4°C, exposed to light for long periods, subjected to multiple freeze-thaw cycles), or the shelf life has been exceeded.	Follow **guidelines for product storage**. BacMam stocks are stable for at least 12 months when stored properly. After this time period, the stock should be re-evaluated and compared to previous experiments.
	BacMam stock was not mixed adequately before transducing cells.	Mix BacMam stock thoroughly before transduction, especially after being stored for long periods.
	Cells are contaminated	Monitor cells for bacteria, fungi, etc

Problem	Possible Cause	Solution
2. Low fluorescence signal on microscope/plate reader.	Low expression, low transduction efficiency.	See solutions for **Problem 1**.
	Excitation/emission settings are not optimal for mNeonGreen or Santaka Red FP.	Refer to protocol for the **fluorescence spectra**. Make sure that filter sets or monochromators are aligned with the peak excitation and emission wavelengths.
	Cells are in cell culture media, and the media is producing a large fluorescent signal (autofluorescence).	Exchange media so that cells are in DPBS at the time of experiment. If cell culture media must be used, try using FluoroBrite media.
	Wrong microplate type is being used.	Use black, clear-bottom microplates with low autofluorescence.
	Exposure time or gain setting on instrument is suboptimal.	Test different exposure and gain settings, monitoring how the signal-to-background and noise in the measurement changes. Too high can result in saturation and/or photobleaching; too low can result in noisy data.
	Cells were dislodged during media exchange/plate washing.	Make sure that media exchange or plate washing is done gently and does not dislodge cells. **Confirm with visual inspection on a microscope**.
3. Signal-to-background is low (i.e. cells/wells with fluorescence are not much brighter than control cells/wells without the fluorescent protein.	Low expression, low transduction efficiency.	See solutions for **Problem 1**.
	Excitation/emission settings are not optimal.	Refer to protocol for the **fluorescence spectra**. Make sure that filter sets or monochromators are aligned with the peak excitation and emission wavelength.
	Exposure time or gain setting on instrument is suboptimal.	Test different exposure and gain settings, monitoring how the signal-to-background and noise in the measurement changes. Too high can result in saturation and/or photobleaching; too low can result in noisy data.
	Media exchange was not performed before running the assay; cells are in media rather than DPBS. Cell culture media being used has high autofluorescence.	Perform media exchange so that cells are in DPBS at the time of experiment. If cell culture media must be used, try using FluoroBrite media.
	Cells were dislodged during media exchange/plate washing.	Make sure that media exchange or plate washing is done gently and does not dislodge cells. **Confirm with visual inspection on a microscope**.

References

1. Graham FL, Smiley J, Russell WC, Nairn R: Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. J Gen Virol 1977, 36(1):59-74.
2. Dulbecco R and Vogt M: Plaque formation and isolation of pure lines with poliomyelitis viruses. The Journal of experimental medicine 1954.
3. Chalfie M, Tu Y, Euskirchen G, Ward WW, Prasher DC: Green fluorescent protein as a marker for gene expression. Science 1994.
4. Kost T, Condreay J, Ames R, Rees S, Romanos M: Implementation of BacMam virus gene delivery technology in a drug discovery setting. Drug Discovery Today 2007, 12(9-10):396-403.
5. Shaner, N.C., Lambert, G.G., Chammas, A., Ni, Y., Cranfill, P.J., Baird, M.A., Sell, B.R., Allen, J.R., Day, R.N., Israelsson, M., Davidson, M.W., & Wang, J. (2013) "A bright monomeric green fluorescent protein derived from Branchiostoma lanceolatum." Nature Methods, May;10(5):407-9. doi: 10.1038/nmeth.2413.
6. Wang, X. et al. (2020) 'The anti-influenza virus drug, arbidol is an efficient inhibitor of SARS-CoV-2 in vitro', Cell discovery, 6, p. 28.
7. Xiong, Hualong, Yangtao Wu, Jiali Cao, Ren Yang, Jian Ma, Xiaoyang Qiao, Xiangyang Yao, et al. 2020. "Robust Neutralization Assay Based on SARS-CoV-2 S-Bearing Vesicular Stomatitis Virus (VSV) Pseudovirus and ACE2-Overexpressed BHK21 Cells." bioRxiv. https://doi.org/10.1101/2020.04.08.026948.
8. Shirato, K., Kawase, M. and Matsuyama, S. (2018) 'Wild-type human coronaviruses prefer cell-surface TMPRSS2 to endosomal cathepsins for cell entry', Virology, 517, pp. 9–15.
9. Hoffmann, M., Kleine-Weber, H. and Pöhlmann, S. (2020) "A Multibasic Cleavage Site in the Spike Protein of SARS-CoV-2 Is Essential for Infection of Human Lung Cells", Molecular cell. doi: 10.1016/j.molcel.2020.04.022.
10. Matsuyama, S. et al. (2020) 'Enhanced isolation of SARS-CoV-2 by TMPRSS2-expressing cells', Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 117(13), pp. 7001–7003.

Related Products

Product	Description	Promoter	Recommended Use
#C1110G	SARS-CoV-2 Pseudovirus - Green Reporter (nuclear targeted green fluorescence)	CMV	High- content imaging, microscopy, flow cytrometry, plate reader
#C1120G	SARS-CoV-2-D614G Mutant Pseudovirus Green Reporter (nuclear targeted green fluorescence)	CMV	High- content imaging, microscopy, flow cytrometry, plate reader
#C1110R	SARS-CoV-2 Pseudovirus - Red Reporter (nuclear targeted red fluorescence)	CMV	High- content imaging, microscopy, flow cytrometry, plate reader
#C1120R	SARS-CoV-2-D614G Mutant Pseudovirus Red Reporter (nuclear targeted red fluorescence)	CMV	High- content imaging, microscopy, flow cytrometry, plate reader
#C1130N	Protease BacMam TMPRSS2	CMV	High- content imaging, microscopy, flow cytrometry, plate reader

Contact Us

If you have any questions about the protocols described here, or if you have ideas about how we can improve these tools, then we want to hear from you. Your feedback is extremely valuable. Please send an email to: **info@montanamolecular.com** or call us at **+1 406-200-8321** and we'll respond as quickly as we can.

certified WBENC WOMEN'S BUSINESS ENTERPRISE

WOMEN OWNED