

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA

MICHELE GOULART DOS SANTOS

**NOVO MODELO DE INTERAÇÃO CÉLULA EPITELIAL E CÉLULA
HEMATOPOIÉTICA UTILIZANDO A LINHAGEM HEK 293**

**São Gabriel
2018**

MICHELE GOULART DOS SANTOS

**NOVO MODELO DE INTERAÇÃO CÉLULA EPITELIAL E CÉLULA
HEMATOPOIÉTICA UTILIZANDO A LINHAGEM HEK 293**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do Título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador: Andrés Delgado Cañedo

**São Gabriel
2018**

s237i dos Santos, Michele Goulart

Novo modelo de interação célula epitelial e célula hematopoiética utilizando a linhagem HEK 293
35 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação)-- Universidade Federal do Pampa, BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS, 2018.

"Orientação: Andrés Delgado Cañedo".

1. cultura celular 2. interação célula-célula 3. HEK293 4. Jurkat

I. Título.

MICHELE GOULART DOS SANTOS

**NOVO MODELO DE INTERAÇÃO CÉLULA EPITELIAL E CÉLULA
HEMATOPOIÉTICA UTILIZANDO A LINHAGEM HEK 293**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do Título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Trabalho de Conclusão de Curso defendido e aprovado em: 6 de dezembro de 2018.

Banca examinadora:

Prof. Dr. Andrés Delgado Cañedo

Orientador

(Unipampa)

Prof. Dra. Adriana Koslovski Sassi

(Unipampa)

Prof. Dra. Marícia Fantinel D'Ávila

(Unipampa)

Dedico este trabalho ao meu avô, e a todos os pacientes que enfrentam, ou enfrentaram o câncer.

AGRADECIMENTO

Aos meus pais Sérgio e Rosalba, por me ajudarem financeiramente com as despesas da faculdade e por me carregarem aos finais de semana e feriados até o laboratório na Unipampa. À minha irmã Jéssica, por me enxergar como uma grande cientista que faz experimentos malucos, e querer se espelhar nisso.

Ao Bryan, por nunca ter se importado em me levar ou buscar na universidade quando eu ficava até mais tarde, e até mesmo por me emprestar o carro para ir até lá, e confiar em mim como motorista que recém havia tirado a habilitação.

Às minhas amigas Amanda, Caroline, Jéssica e Renata por tornarem meus problemas e angústias mais leves pra mim, mesmo quando eu não aguentava mais ter que ir para a faculdade, eu lembrava que encontraria vocês lá, e por ouvirem as minhas reclamações e mesmo assim continuarem sendo minhas amigas.

À minha gatinha Fify, que me demonstra um amor verdadeiro e que apareceu na minha vida pra ser minha companheira, principalmente nos momentos difíceis.

A todos os professores que tive, desde a minha alfabetização até minha última disciplina da faculdade, se não fosse por vocês, não existiriam bons profissionais no mundo.

À Unipampa por todas as oportunidades.

Ao meu orientador Andrés, por ter me aceitado no seu grupo de pesquisa e por todo conhecimento transmitido e dedicação nas explicações, também à minha colega de laboratório Josiély, por todas as técnicas de cultura que me ensinou. À Adriana, por ser um doce de pessoa e ter autoclavado todas as pilhas e pilhas de materiais que eu utilizava, sempre com boa disposição e carinho.

E ao meu Deus, por permitir tudo isso em minha vida, obrigada!

“Os sonhos são como um bússola, indicando os caminhos que seguiremos e as metas que queremos alcançar. São eles que nos impulsionam, nos fortalecem e nos permite crescer”.

Augusto Cury

RESUMO

A adesão celular é fundamental na união de células para a formação de diferentes tecidos, motilidade celular e resposta imunológica dos seres vivos. A composição desses tecidos, e sua organização em órgãos, é determinada por interações moleculares em nível celular, devido à expressão de um grande número de moléculas de adesão. Modelos de adesão célula-célula usando cultivo celular, são de grande importância no estudo de diversas doenças, como isquemias, doenças inflamatórias e câncer. Exemplos de adesão celular mais utilizados são com células Jurkat e células endoteliais ativadas, como as HUVEC, CACO-2 e também células mensequimais. Um modelo alternativo para interação célula endotelial-hematopoiética, pode ser obtido com células HEK 293, uma linhagem endotelial amplamente utilizada como ferramenta de expressão para proteínas recombinantes. Sabendo que a expressão aumentada das moléculas de adesão possui um papel crítico na patogenicidade de diversas doenças, o desenvolvimento de novos modelos de interação celular de fácil cultivo e manipulação genética se faz necessário. Por essa razão, este trabalho buscou estabelecer um novo modelo de estudo para interação célula epitelial e célula hematopoiética, utilizando a linhagem de células HEK 293. Foram testados diferentes concentrações de células HEK 293 cultivadas durante 24 e 48 horas com a finalidade de obter a melhor concentração celular para a manutenção das células aderentes na placa. Foi desenvolvido também testes de coloração com os corantes rodamina B e carboxifluoresceína em diferentes concentrações, no intuito de se estabelecer a melhor marcação para ambas as linhagens. O ensaio de interação célula-célula foi então realizado e analisado por meio de microscopia de fluorescência. Os resultados obtidos sugeriram que a concentração ideal de células HEK 293 foi a de 5×10^4 células/ml em 24 horas, demonstrando ser uma confluência suficiente para que as células permanecessem aderidas durante as lavagens dos poços. Quanto às marcações, foi estabelecido que para a linhagem endotelial a melhor marcação foi com 40µM de rodamina B, e para a linhagem linfocítica a marcação suficiente foi a de 500nM do corante carboxifluoresceína. A interação entre as células foi alcançada nas diferentes concentrações, e a distinção entre as linhagens foi possível devido aos corantes possuírem comprimento de emissão da luz diferentes e não sobrepostos. Portanto a escolha dos corantes e suas respectivas

concentrações, foram eficientes para esse modelo de interação; contudo, outros estudos voltados para as células HEK 293 se fazem necessários, com o propósito de aumentar essa aderência celular, além de desenvolver um método quantitativo para avaliar a interação em futuros experimentos.

Palavras-Chave: cultura celular; interação célula-célula; HEK 293; Jurkat.

ABSTRACT

Cell adhesion is fundamental in cells interaction to form different tissues, cellular motility and immune response of living beings. The assembly of these tissues, and their organization into organs, are determined by molecular interactions at cellular level, due to the expression of a large number of adhesion molecules. Cell-cell adhesion models using cell culture, are very important to studying several diseases, such as ischemia, inflammatory diseases and cancer. There are few cellular models of cell adhesion and the most used add Jurkat cells to activated endothelial cells such as HUVEC, CACO-2 or mesenchymal cells. An alternative model for endothelial-hematopoietic cell interaction may be obtained using HEK 293 cells, an endothelial cell line widely used as a tool for recombinant proteins expression. Since increased expression of adhesion cells plays a critical role in the pathogenicity of several diseases, the development of cellular interaction new models with cells easily culturable and able for genetic manipulation become necessary. Thus, this work aimed to establish a new model of study for epithelial cell and hematopoietic cell interaction using the HEK 293 cell line. We tested different HEK 293 concentrations cultured for 24 and 48 hours, in order to obtain the best cell concentration in which the adherent cells did not release from the culture dish in the washes. We also carried out staining tests with different concentrations of rhodamine B and carboxyfluorescein, to establish the best labeling for both cell lines. The cell-cell interaction assay was performed and analyzed by fluorescence microscopy. Results obtained suggested that ideal concentration of HEK 293 cells was 5×10^4 cells / ml in 24 hours, demonstrating sufficient confluence for remain cells adherence during the well washings. The best labeling for the endothelial line was 40 μ M rhodamine B consonant with our tests, and for the lymphocytic cell line 500nM of-carboxyfluorescein were sufficient. The interaction between cells was achieved at different concentrations, and the distinction between the lines was possible because the dyes had different and non-overlapping emission lengths. Therefore, the dyes choice and their respective concentrations were efficient for this interaction model; however, further studies using at HEK 293 cells will be necessary in order to increase the cell adhesion and to develop a quantitative method to evaluate the interaction in future experiments.

Key words: cell culture; cell-cell interaction; HEK 293; Jurkat

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1 – Representação da placa de 24 poços com concentrações celulares..... | 22 |
| Figura 2 – Microfotografia de células HEK 293 soltas na placa | 24 |
| Figura 3 – Microfotografia da concentração inicial de 5×10^4 células/mL de células HEK 293 em 24 horas | 25 |
| Figura 4 - Microfotografia da concentração inicial de 5×10^5 células/mL de HEK 293 em 48 horas..... | 25 |
| Figura 5 - Microfotografia da linhagem HEK 293 corada com rodamina b em diferentes exposições de luz..... | 26 |
| Figura 6 - Microfotografia da linhagem Jurkat corada com carboxifluoresceína em diferentes exposições de luz | 26 |
| Figura 7 - Microfotografia de fluorescência das células HEK 293 corada com diferentes concentrações de rodamina B..... | 27 |
| Figura 8 - Microfotografia de fluorescência de HEK 293 coradas com diferentes concentrações de carboxifluoresceína..... | 27 |
| Figura 9 - Microfotografia de fluorescência de diferentes concentrações de rodamina B utilizada na linhagem celular Jurkat..... | 28 |
| Figura 10- Microfotografia de fluorescência de diferentes concentrações de carboxifluoresceína utilizada na linhagem celular Jurkat..... | 28 |
| Figura 11 - Microfotografia de fluorescência de HEK 293 na concentração de 5×10^4 células/mL interagindo com as células Jurkat..... | 30 |
| Figura 12 - Microfotografia de fluorescência de HEK 293 na concentração de 1×10^5 células/mL, interagindo com as células Jurkat..... | 30 |
| Figura 13 - Microfotografia de fluorescência de HEK 293 na concentração de 2×10^5 células/mL, interagindo com as células Jurkat..... | 31 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AD5 – Adenovírus tipo 5

CACO-2 - Adenocarcinoma epitelial colorretal humano

DNA - Ácido desoxirribonucleico

HBS - Solução Salina Equilibrada de *Hank*

HEK 293 - *Human Embryonic Kidney 293 cells*

HUVEC - *Human Umbilical Vein Endothelial Cells*

RPMI 1640 - *Roswell Park Memorial Institute medium-1640*

SFB – Soro fetal bovino

SUMÁRIO

| | | |
|------------|---|-----------|
| 1 | INTRODUÇÃO | 14 |
| 1.1 | Modelos celulares para estudo de interação entre células endoteliais e linfocíticas..... | 15 |
| 1.2 | Cultura de células..... | 15 |
| 1.3 | HEK293: uma célula com características endoteliais | 16 |
| 2 | JUSTIFICATIVA..... | 18 |
| 3 | OBJETIVOS..... | 19 |
| 3.1 | Objetivo geral | 19 |
| 3.2 | objetivos específicos | 19 |
| 4 | MATERIAIS E MÉTODOS | 20 |
| 4.1 | Teste das condições de cultura da linhagem HEK 293..... | 20 |
| 4.2 | Teste de coloração das linhagens | 20 |
| 4.3 | Ensaio de interação célula-célula | 21 |
| 4.4 | Visualização em microscopia de fluorescência..... | 22 |
| 5 | RESULTADOS..... | 24 |
| 5.1 | Determinação da concentração e tempo ideal para a cultura das células HEK 293..... | 24 |
| 5.2 | Teste dos corantes..... | 25 |
| 5.3 | Interações entre célula endotelial e célula hematopoiética sem indução.... | 28 |
| 6 | CONSIDERAÇÕES FINAIS | 32 |
| 7 | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 33 |

1 INTRODUÇÃO

A adesão celular é fundamental na união de células para a formação de diferentes tecidos, para a motilidade celular e para a resposta imunológica dos seres vivos. As células não se unem apenas para formar os tecidos, elas também são organizadas em padrões altamente distintos, possuindo uma variedade de mecanismos de junções celulares para a manutenção e integridade desses tecidos (GUMBINER, 1996).

Possivelmente um passo importante na evolução para a multicelularidade, teria sido a capacidade das células de interagirem entre si, e essa sincronia foi adquirida durante o ciclo de vida, passando de uma geração para outra, e se adaptando ao ambiente, que está constantemente em mudança (TORDAY J. S; REHAN V. K. 2012).

A montagem de diferentes tecidos e sua organização em órgãos é determinada por interações moleculares em nível celular, e não seria possível sem a expressão de um grande número de moléculas de adesão, pois são elas que determinam a estimulação funcional, migração, ancoragem, diferenciação fenotípica e multiplicação celular (CARDOSO, 2009). Por exemplo, as células tumorais possuem uma capacidade incrível de se movimentarem, atravessarem paredes de vasos sanguíneos e de se proliferarem pelo organismo, chamamos isso de processo de metastização, que é totalmente dependente das moléculas de adesão celular (CARDOSO, 2009).

As moléculas de adesão celular são, de acordo com a definição do *Gene Ontology Consortium* (<http://www.geneontology.org/>) “moléculas expressas na superfície de uma célula que medeiam a adesão da célula a outras células ou à matriz extracelular”. Essas moléculas estão distribuídas em várias classes, são elas às integrinas, caderinas, imunoglobulinas e as selectinas. Estas proteínas de superfície, desempenham numerosas funções cruciais na interface de uma célula e seu ambiente, seja este ambiente uma outra célula, de um tipo de célula semelhante ou diferente, a matriz extracelular ou até elementos, por vezes, solúveis (BLANKENBERG *et.al*, 2002).

A adesão celular constitui um campo novo da Patologia Molecular, e existem muitas aplicações de técnicas de biologia molecular utilizando essas moléculas, revelando assim, todo o seu potencial terapêutico para várias doenças ditas

degenerativas, ou que tenham por base processos inflamatórios, ou que envolvam mecanismos de migração, diferenciação e interação celular (CARDOSO, 2009).

1.1 Modelos celulares para estudo de interação entre células endoteliais e linfocíticas:

Modelos de adesão célula-célula usando cultivo celular, são de grande importância no estudo de diversas doenças, como o processo que desencadeia isquemia e doenças inflamatórias, que é predominantemente mediado por moléculas de adesão celular, que são expressas no endotélio vascular e nos leucócitos circulantes em resposta a vários estímulos inflamatórios (SPRINGER, 1990), e os cânceres, que em sua maioria se originam a partir de um tecido epitelial (CHANDAR & VISELLI, 2011).

Modelos de adesão mais utilizados são com células Jurkat, e células endoteliais ativadas. A linhagem celular Jurkat, trata-se de células T linfoblásticas, oriundas de amostras de sangue de um menino de 14 anos portador de leucemia, conforme foi descrito por Schneider, Schwenk e Bornkamn (1977), e vêm sendo muito utilizada em vários procedimentos de biologia celular.

As células endoteliais utilizadas, são as HUVEC's (*Human Umbilical Vein Endothelial Cells*), células mesenquimais e enterócitos CACO-2 (Adenocarcinoma epitelial colorretal humano) (SEETHARAM *et.al*, 2011), que apresentam diferentes padrões moleculares de interação, permitindo-se trabalhar o processo de estímulo à adesão celular, quanto a inibição das mesmas, dependendo do sistema celular utilizado (LIU. *et.al*, 2012). Isto é evidenciado no trabalho de Seetharama, Sharon e Jining (2011), que tratam células Jurkat com o composto químico PMA (13-acetato de 12-miristato de forbol), para estimular sua adesão antes do ensaio de interação.

1.2 Cultura de células:

O cultivo celular começou no princípio do século XX com Harrison, em 1907, e Carrel, em 1912. Essa técnica foi desenvolvida como um método para estudar o comportamento de células animais fora do organismo, em um meio ambiente controlado. Trata-se ainda hoje de uma importante ferramenta de pesquisa nos laboratórios do mundo inteiro (FRESHNEY, 1994).

Convém ressaltar que o cultivo de células de mamíferos requer cuidados mais rigorosos do que outros tipos de células, pois necessita de um meio de cultura mais especializado, com suprimento correto dos gases oxigênio e gás carbônico, confluências de células não muito altas, cuidados com o estresse mecânico e principalmente cuidados com a contaminação por fungos e/ou bactérias. Tradicionalmente, essas células são cultivadas em meios de culturas suplementados com derivados humanos ou animais, de forma a aumentar a viabilidade e produtividade (BIAGGIO, 2014), sendo o meio mais utilizado o RPMI 1640 (Calbiochem, USA), que consiste em uma mistura de sais enriquecidos com aminoácidos, vitaminas e outros componentes essenciais para o crescimento celular, agindo, dessa forma, como uma solução nutritiva para as células.

As células cultivadas podem apresentar dois aspectos distintos, isto é, podem ser aderentes ou não aderentes, o que significa dizer que algumas células poderão se ligar ao fundo da garrafa de cultura enquanto outras ficarão em suspensão no meio (MOLINARO *et.al*, 2010).

As células em cultura possuem, inicialmente, características semelhantes aos seus tecidos de origem; assim, células provenientes de tecidos epiteliais terão uma maior dependência de interação célula – célula, enquanto células hematopoiéticas, como a linhagem Jurkat, não necessitam de nenhuma interação (MOLINARO *et.al*, 2010).

1.3 HEK293: uma célula com características endoteliais:

A linhagem celular HEK 293 (*Human Embryonic Kidney 293 cells*), foi desenvolvida em 1973 a partir da exposição da cultura de células primárias de rim embrionário humano ao DNA de adenovírus tipo 5 (AD5) e a partir disto foram selecionadas as células mais resistentes (Graham *et al.*, 1977). Esta linhagem celular possui fácil cultivo e tem sido amplamente utilizada como ferramenta de expressão para proteínas recombinantes (THOMAS & SMART, 2005; SUN *et al.*, 2006; ADAM *et al.*, 2008; BACKLIWAL *et al.*, 2008; LOIGNON *et al.*, 2008; WAJIH *et al.*, 2008; SONG *et al.* 2011; SWIECH *et al.*, 2011; DUMONT *et al.*, 2012; FISCHER *et al.*, 2012). Um importante fator para sua grande aplicação em

pesquisas, é a facilidade de serem manipuladas geneticamente e a capacidade desta linhagem de crescer facilmente em meios de cultivo disponíveis no mercado.

Quanto a sua real identidade celular, existem controvérsias, pois a partir de marcadores moleculares alguns autores as citam como células endoteliais e outros como células precursoras neuronais, conforme é representado no estudo de Schmidt e colaboradores (2001).

2 JUSTIFICATIVA

Tendo em vista que a expressão aumentada das moléculas de adesão possui um papel crítico na patogenicidade de diversas doenças, o desenvolvimento de novos modelos de interação celular de fáceis cultivos e manipulação genética se faz necessário. E o que a linhagem endotelial HEK 293 oferece, são justamente essas características. Porém também é importante encontrar concentrações ideais dessas células, que embora sejam aderentes, se soltam facilmente da placa que estão fixadas, e é preciso manter essa aderência, para ensaios de interação célula-célula. Embora existam modelos de interação entre célula epitelial e célula hematopoiética, esses processos geralmente são induzidos a interagirem entre si, portanto se faz necessário o desenvolvimento de um modelo em que essa dinâmica ocorra naturalmente, simplificando assim, muitos experimentos voltados a estes estudos.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral:

Estabelecer um novo modelo de estudo para interação célula epitelial e célula hematopoiética, utilizando a linhagem de células HEK 293.

3.2 Objetivos específicos:

- Definir a melhor concentração das células HEK 293, para manutenção da aderência;
- Identificar a melhor marcação celular, testando diferentes concentrações de rodamina B e carboxifluoresceína nas linhagens celulares;
- Avaliar a interação celular entre Jurkat e HEK 293.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Teste das condições de cultura da linhagem HEK 293:

As células de rim embrionário humano (HEK 293) foram cultivadas em meio RPMI 1640 (Calbiochem, USA), suplementado com 10% de soro fetal bovino (Invitrogen, Brasil), 100 µg /mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina (Invitrogen) e mantidas em estufa a 37°C em atmosfera umidificada contendo 5 % de CO₂. O meio de cultura foi trocado a cada 2-3 dias.

Quando as células atingiram aproximadamente 80% de confluência na garrafa de cultivo, elas foram transferidas para duas placas de cultura de 24 poços, utilizando 1mL por poço, nas concentrações de 5×10^3 , 5×10^4 e 5×10^5 células/mL. Uma placa foi usada para análise no período de 24 horas (placa 1) e outra para o período de 48 horas (placa 2).

Após as 24 horas, a placa 1 foi retirada da estufa e agitada levemente em orientação orbital e cada poço da placa foi lavado 2x com 1mL de HBSS (solução salina equilibrada de Hanks), com o auxílio de uma micropipeta P1000, para a remoção das células não aderentes na placa, e acrescentado 1mL de meio RPMI completo após as lavagens. O mesmo procedimento foi realizado na placa 2 após o período de 48 horas de cultura.

4.2 Teste de coloração das linhagens:

As células das linhagens celulares Jurkat e HEK 293, foram cultivadas como descrito anteriormente e depois de atingirem aproximadamente 80% de confluência, 1mL foi transferido para placas de cultura de 24 poços, na concentração inicial de 1×10^5 células/mL de ambas linhagens, e submetidas a incubação a 37°C na estufa por 24 horas antes dos tratamentos. Todas as análises foram feitas em triplicatas.

Foram utilizados dois tipos de corantes, nos dois tipos celulares, a rodamina B (Synth, Brasil), que emite cor vermelha quando excitada com verde, nas concentrações finais de 10µM a 40µM e a carboxifluoresceína (Sigma, USA), que emite cor verde quando excitada com azul, nas concentrações finais de 500nM a 2µM.

A rodamina B é um composto químico fluorescente que possui cor vermelha e é usada extensivamente em aplicações de biotecnologia, como microscopia de fluorescência, citometria de fluxo, espectroscopia de correlação de fluorescência e ELISA (BAKER, 1996).

A carboxifluoresceína ou diacetato de 5-carboxifluoresceína, é uma molécula não fluorescente que é clivada por esterases intracelulares, dando assim um produto fluorescente verde. É extensamente utilizado para a coloração de células auxiliando na diferenciação de células vivas e mortas. Ajuda também no monitoramento da integridade da membrana (GERBER et.al, 2013).

Após a aplicação dos corantes em cada um dos poços, as células foram incubadas durante 20 minutos com a placa protegida da luz. Logo após esse período, as células passaram por duas lavagens com HBSS.

A lavagem da linhagem endotelial ocorreu na própria placa, uma vez que as células são aderentes, apenas retira-se o meio anterior e acrescenta o HBSS cuidadosamente pelas bordas dos poços, para não desprender as células que estão fixadas no fundo da placa. Após as lavagens, é acrescentado em cada poço 1mL de meio RPMI 1640 completo.

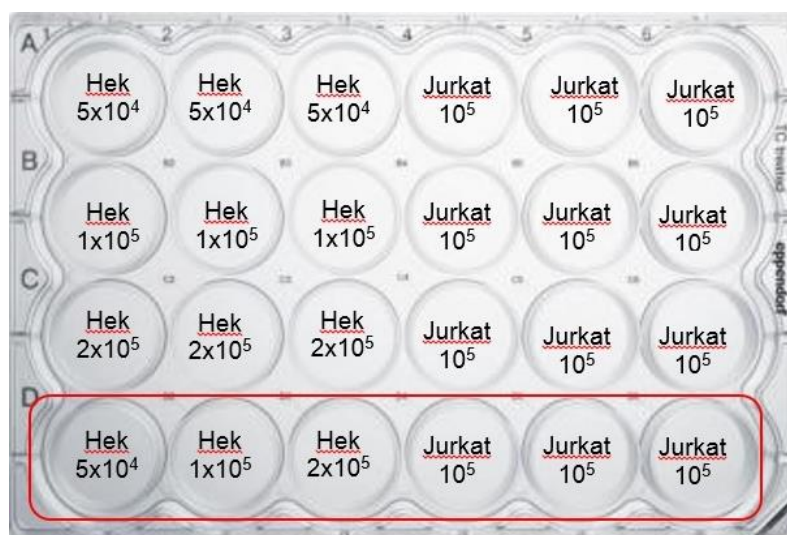
Na linhagem linfocítica, a lavagem se dá por centrifugação, na qual as células são transferidas para microtubos de 1,5mL e centrifugados a 4000 rpm por 5 minutos. Descarta-se o sobrenadante e acrescenta 1 mL de HBSS em cada um dos microtubos, dissociando o *pellet*, e estes são novamente centrifugados nas mesmas condições. Em seguida, o sobrenadante é descartado, e o *pellet* dissociado com 1 mL meio RPMI 1640 completo. Cada suspensão celular é transferida para os poços em que estavam anteriormente na placa, para as análises de microscopia de fluorescência.

4.3 Ensaio de interação célula-célula:

As linhagens celulares HEK 293 e Jurkat, que se desenvolviam na estufa em meio completo, foram transferidas para placas de 24 poços 1 dia antes do ensaio de interação. A linhagem endotelial foi plaqueada em diferentes concentrações de 5×10^4 , 1×10^5 e 2×10^5 células/mL, enquanto que para linhagem linfocítica a concentração utilizada foi única, de 1×10^5 células/mL. A placa foi mantida 24 horas na estufa a 37 °C, desenvolvendo-se em meio completo durante este período.

O experimento foi realizado todo em triplicata na placa. O exemplo da organização é demonstrado na figura 1, onde nos seis últimos poços (destacados na figura), não foram realizados ensaios de interação entre ambas, sendo estes nossos controles negativo.

Figura 1: Placa de 24 poços com as respectivas concentrações celulares por poço.



Após 24 horas, a placa foi retirada da estufa e agitada levemente em sentido orbital. Nos poços com células HEK 293, o meio foi removido e adicionado cuidadosamente meio novo.

Posteriormente, as células Jurkat's foram marcadas com carboxifluoresceína (na concentração de 500nM) e as células HEK 293 com rodamina B (na concentração de 40 μ M).

Depois das células serem lavadas, foi adicionado 1mL meio RPMI 1640 completo ao *pellet* das células Jurkat's, e essa suspensão celular, foi adicionada em cada um dos poços contendo células HEK 293 para interação, exceto nos poços do controle negativo.

Para as linhagens interagirem, foram incubadas durante 30 minutos com a placa na estufa a 37 °C, após esse tempo, foram realizadas 3 lavagens com HBSS em todos os poços, com ou sem interação, para a padronização do protocolo.

4.4 Visualização em microscopia de fluorescência:

As análises de fluorescência, foram realizadas em microscópio invertido de fluorescência Olympus® IX71. A carboxifluoresceína foi detectada usando um filtro *band-pass* que excita em azul para observar fluorescência verde, e a rodamina B foi observada usando filtro *band-pass* que excita com luz verde para observar fluorescência vermelha. Para a obtenção e processamento das fotografias, foi utilizado o software Q-capture-Pro (QImaging FireWire™). As imagens com luz brancas foram capturadas em aproximadamente 25 ms e as fluorescentes em aproximadamente 500-600 ms.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Determinação da concentração e tempo ideal para a cultura das células HEK:

Para o estabelecimento das concentrações ideais de células HEK 293, no ensaio de interação, foram testadas diferentes concentrações celulares iniciais e tempos de cultura.

A primeira lavagem realizada após retirar a placa da estufa é indispensável, pois com essa técnica, remove-se as células que não se aderiram à placa, selecionando assim, apenas as células HEK 293 aderidas, não interferindo dessa forma no procedimento de adesão célula-célula.

Na placa de 24 horas (placa 1), a maior concentração utilizada 5×10^5 células/mL, resultou em uma confluência celular muito alta, pois inúmeros tapetes celulares se soltaram do fundo dos poços (Figura 2), se tornando dessa forma uma concentração inadequada para os testes de interação, uma vez que quando houvesse a adesão célula-célula se perderia a interação durante o processo das lavagens dos poços.

Figura 2: Microfotografia de células HEK 293, mostrando o conjunto de células que se soltaram (destacado no círculo) durante a lavagem do poço, devido à alta confluência celular. Objetiva de 4X



Na menor concentração utilizada de 5×10^3 células/mL, havia uma confluência muito baixa, mostrando ser uma concentração insuficiente para o experimento de adesão celular.

A concentração inicial escolhida nesse experimento, foi a de 5×10^4 células/mL, em 24 horas, tendo em vista que possuía uma confluência suficiente, para os testes posteriores de interação pois manteve uma boa aderência das células na placa (Figura 3).

Figura 3: Microfotografia da concentração inicial de 5×10^4 células/mL de células HEK 293 em 24 horas. Objetiva de 10x.



O período de 48 horas foi inviável nessas concentrações utilizadas, tendo em vista que, na maioria dos poços, as células se desprenderam da placa durante as lavagens (Figura 4), exceto na menor concentração, que ainda assim possuía uma confluência insuficiente.

Figura 4: Microfotografia da concentração inicial de 5×10^5 células/mL de HEK 293 em 48 horas
Objetiva de 4x.



De acordo com os resultados, foi estabelecido que a concentração ideal foi a de 5×10^4 células/mL em 24 horas, pois nesta confluência as células não se soltam da placa, formando um tapete de adesão necessário para os testes de interação célula-célula.

5.2 Teste dos corantes:

A coloração das células foi fundamental para a diferenciação das linhagens na avaliação da interação entre as células. Os corantes escolhidos neste experimento foram a rodamina B e a carboxifluoresceína, uma vez que são corantes de baixo custo e frequentemente utilizados em marcações celulares.

Esses dois tipos de corantes possuem comprimento de emissão da luz diferentes e não sobrepostos, como podemos observar nas figuras 5 e 6. A rodamina B possui uma fluorescência de 542-554 nm e a carboxifluoresceína de 492-517 nm.

Figura 5: Microfotografia da linhagem HEK 293 corada com rodamina b em diferentes exposições de luz (A = luz branca; B= excitação com luz verde para emissão da fluorescência vermelha; C= excitação com luz azul para emissão da fluorescência verde) Objativa de 10X.

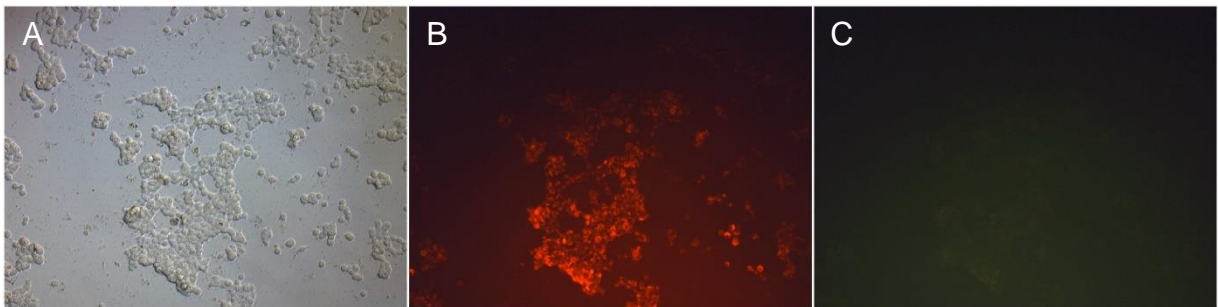
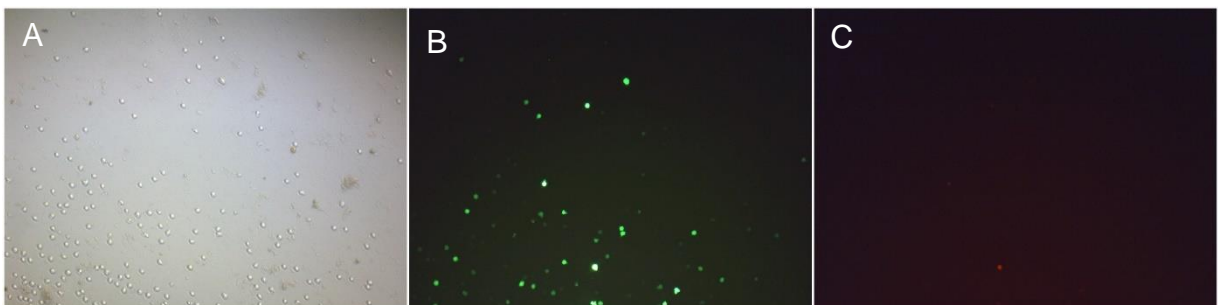


Figura 6: Microfotografia da linhagem Jurkat corada com carboxifluoresceína em diferentes exposições de luz (A = luz branca; B= excitação com luz azul para emissão da fluorescência verde; C= excitação com luz verde para emissão da fluorescência vermelha) Objativa de 10X

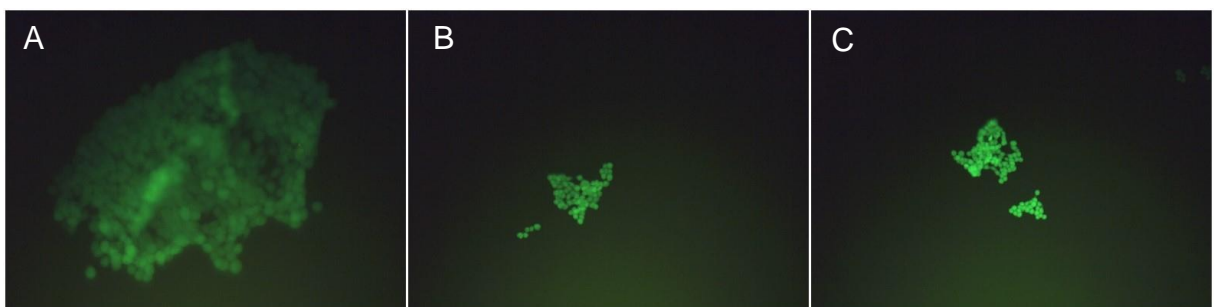


Para determinar as melhores concentrações e com qual corante marcar cada células, inicialmente marcamos as células HEK 293 com rodamina B nas concentrações finais de 10 μ M, 20 μ M e 40 μ M. Como observado na Figura 7 a marcação foi fraca e optou-se pela maior concentração. No caso da marcação com carboxifluoresceína a menor concentração (500nM) já demonstrou ser suficiente para sua observação (Figura 8).

Figura 7: Microfotografia de fluorescência das células HEK 293 corada com diferentes concentrações de rodamina B (A= 10 μ M, B= 20 μ M e C=40 μ M)
Objetiva de 10X



Figura 8: Microfotografia de fluorescência de HEK 293 coradas com diferentes concentrações de carboxifluoresceína (A= 500nM, B= 1 μ M e C=2 μ M)
Objetiva de 10X



Para as células Jurkat, foram usadas as mesmas concentrações que as utilizadas na marcação das células HEK 293. Como observado na Figura 9, as células Jurkat obtiveram uma marcação muito fraca com a rodamina B. Contudo, apresentam alto contraste quando coradas com carboxifluoresceína (Figura 10) desde a menor concentração empregada (500nM). Portanto, as marcações escolhidas para os experimentos foi a carboxifluoresceína (500nM) para as Jurkat, e a rodamina B (40 μ M) para as células HEK 293.

Figura 9: Microfotografia de fluorescência de diferentes concentrações de rodamina B utilizada na linhagem celular Jurkat (A= 10 μ M, B= 20 μ M e C=40 μ M) Objativa de 10X

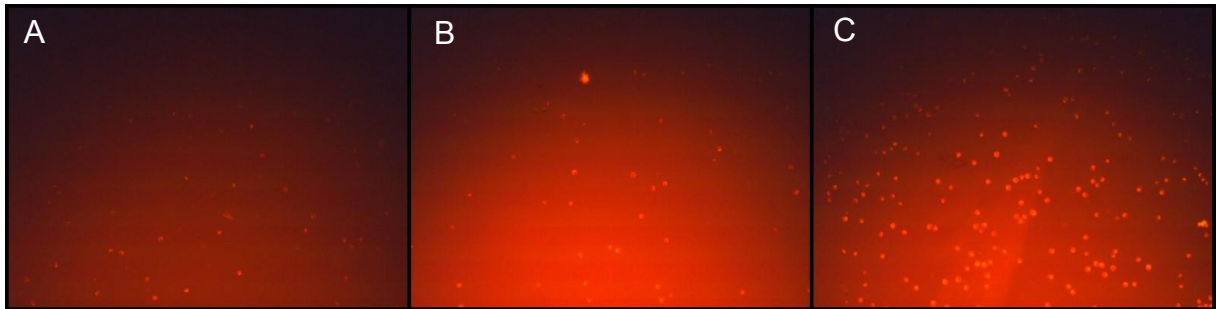
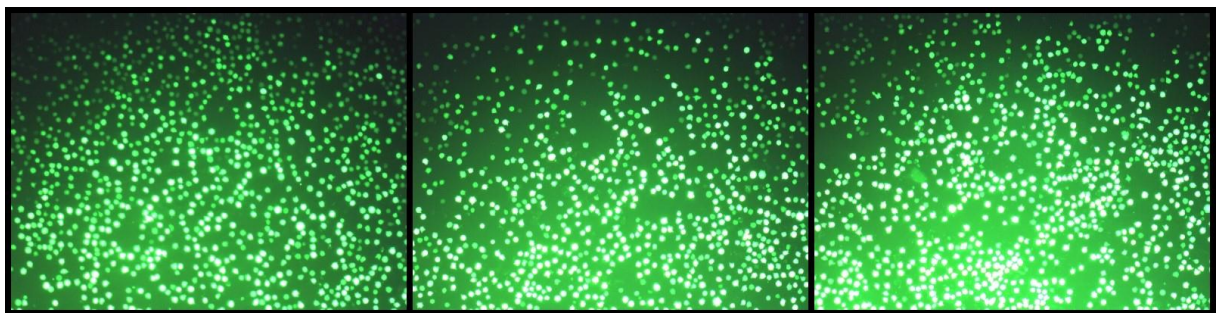


Figura 10: Microfotografia de fluorescência de diferentes concentrações de carboxifluoresceína utilizada na linhagem celular Jurkat (A= 500nM, B= 1 μ M e C=2 μ M). Objativa de 10X



5.3 Interações entre célula endotelial e célula hematopoiética sem indução.

As análises das interações, se deram por meio de microscopia de fluorescência, um método que possui uma alta sensibilidade e alta especificidade, permitindo determinar a distribuição celular, a quantidade de células e a diferenciação das linhagens nos poços, uma vez que os corantes utilizados possuem emissões de fluorescência distintas e não se misturam numa mesma célula.

A quantidade dos corantes utilizados, rodamina B e carboxifluoresceína nas concentrações já descritas anteriormente, se mostrou eficaz nas marcações, permitindo uma boa visualização dessa interação, como pode ser observado nas figuras 11, 12 e 13: nos locais onde encontram-se as células HEK 293 marcadas em vermelho, existem células Jurkat aderidas (em verde). Por outro lado, nos espaços vazios, onde não há célula HEK 293, dificilmente se encontram células da linhagem linfocítica, demonstrando que realmente existe uma interação célula-célula e que a

maioria das células Jurkat são lavadas, pois não interagindo com as células aderentes, não permanecem nos poços.

Quanto às concentrações da linhagem endotelial, estas se mostraram suficientes, pois houve formação de tapetes celulares, sem que as células se soltassem da placa, possibilitando assim uma interação célula-célula mais eficiente.

Figura 11: Microfotografia de fluorescência de HEK 293 na concentração de 5×10^4 células/mL interagindo com as células Jurkat - A-Imagem com luz branca, B-imagem das células HEK293 marcadas com rodamina b, C- células Jurkat marcadas com carboxifluoresceína e D, sobreposição das imagens B e C. Objetiva de 10X.

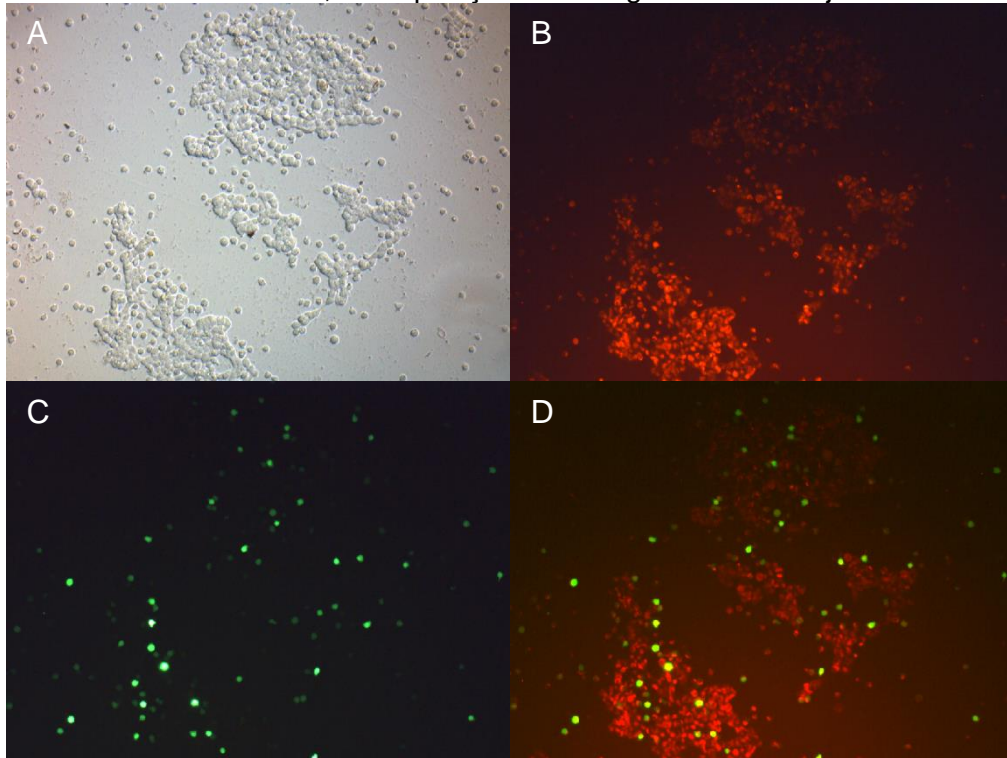


Figura 12: Microfotografia de fluorescência de HEK 293 na concentração de 1×10^5 células/mL, interagindo com as células Jurkat - A-Imagem com luz branca, B-imagem das células HEK293 marcadas com rodamina b, C- células Jurkat marcadas com carboxifluoresceína e D, sobreposição das imagens B e C. Objetiva de 10X

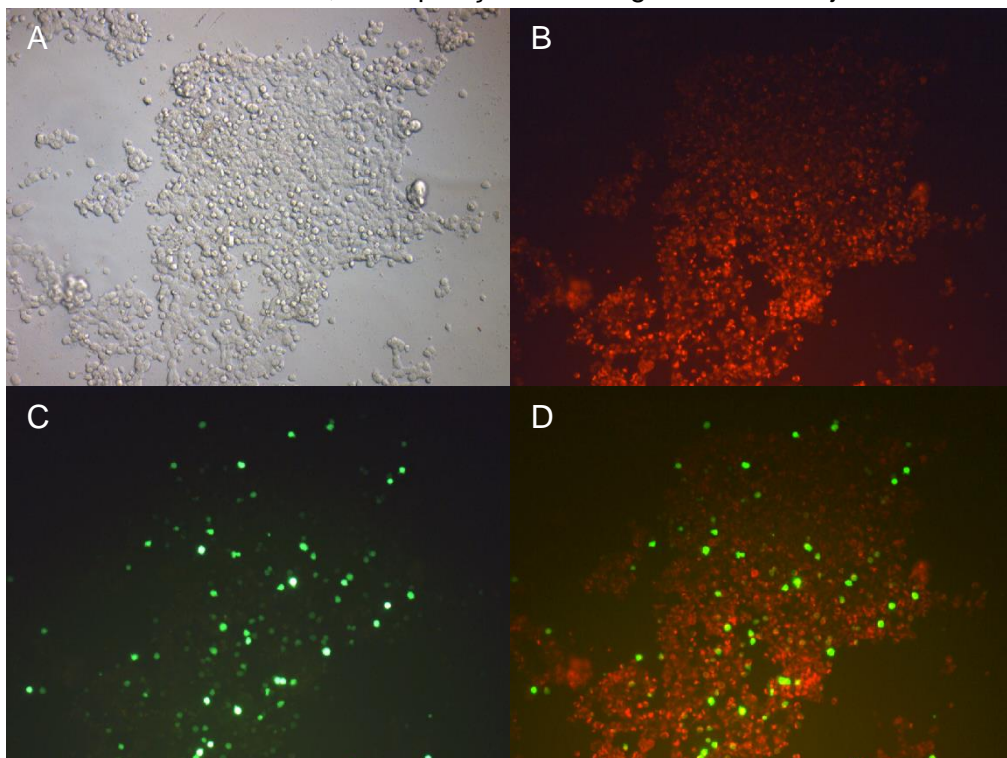
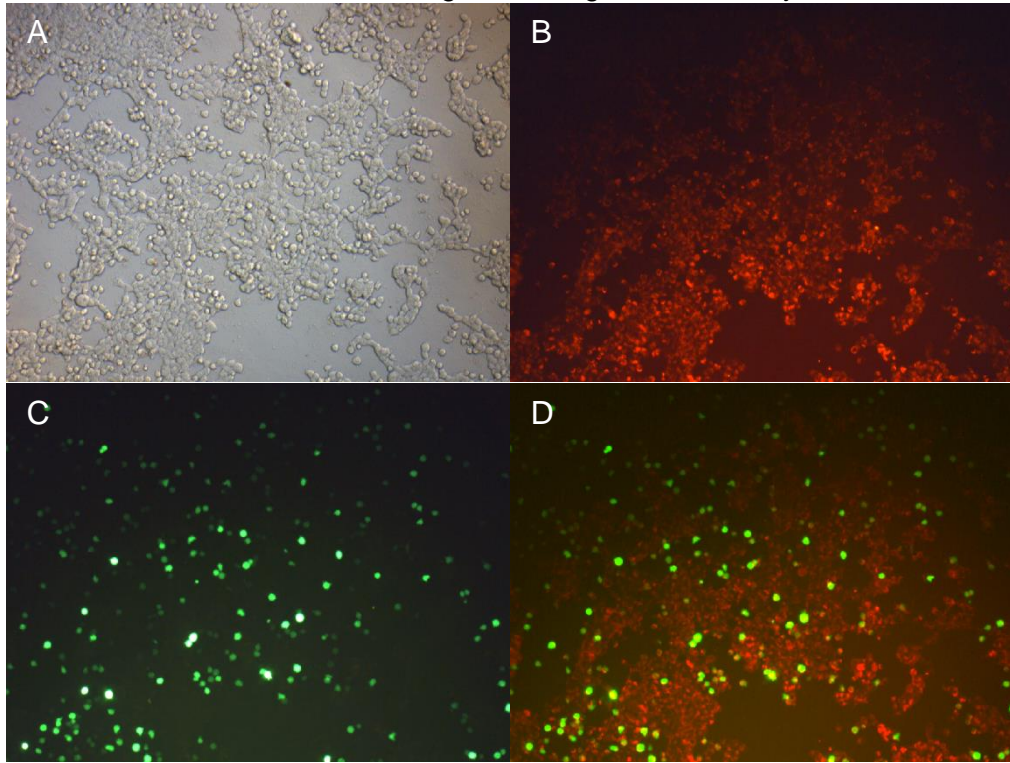


Figura 13: Microfotografia de fluorescência de HEK 293 na concentração de 2×10^5 células/mL, interagindo com as células Jurkat - A-Imagem com luz branca, B-imagem das células HEK293 marcadas com rodamina b, C- células Jurkat marcadas com carboxifluoresceína e D, merge das imagens B e C. Objetiva de 10X



6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A linhagem endotelial HEK 293, apesar de ser aderente e de extensivo uso em aplicações biotecnológicas, possui o inconveniente de se soltar da placa facilmente e, por esse motivo, mais experimentos deverão ser desenvolvidos para se estabelecer um protocolo que seja capaz de otimizar sua fixação na placa.

Uma das formas pode ser feita por meio de tratamentos da própria placa, ou por adição de compostos químicos no meio de cultivo, pois estudos demonstraram que, em quantidades crescentes de soro fetal bovino (SFB) por exemplo, a aderência das células HEK 293 na placa aumentava (BIAGGIO, 2014). Porém, deve ser estudado também como estes componentes extras se comportam no processo da interação célula-célula.

A escolha dos corantes e as quantidades das concentrações dos mesmos, propostas neste trabalho, se mostraram eficazes para uma boa marcação celular. Contudo, para uma melhor análise dos resultados, poderia se utilizar a espectrofluorimetria para auxiliar na quantificação da interação célula-célula e poder realizar análises estatísticas que nos permitam testar agentes que interfiram neste tipo de interação célula-célula.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAM, E.; SARRAZIN, S.; LANDOLFI, C.; MOTTE, V.; LORTAT-JACOB, H.; LASSALLE, P.; DELEHEDDE, M. Efficient long-term and high-yielded production of a recombinant proteoglycan in eukaryotic HEK293 cells using a membrane-based bioreactor. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 369, p. 297-302, 2008.

BAKER, J. T. Rhodamine B MSDS. Disponível em: <<http://hazard.com/msds/mf/baker/baker/files/r5400.htm>>. Acesso em 20 de novembro de 2018.

BACKLIWAL, G.; HILDINGER, M.; HASIJA, V.; WURM, F. M. High-Density Transfection With HEK-293 Cells Allows Doubling of Transient Titers and Removes Need for A Priori DNA Complex Formation With PEI. **Biotechnology and Bioengineering.**, v. 99, n. 3, p. 721-727, 2008.

BLANKENBERG S. A. B.; BARBAUX S. A.; TIRET L., Adhesion molecules and atherosclerosis. Faculté de Médecine, 91 Bd de l'Hôpital, 75634 Paris Cedex 13, France. **Department of Medicine II**, Johannes Gutenberg-University, Mainz, Germany

BIAGGIO, R. T. Adaptação de linhagens celulares humanas para crescimento em suspensão e meios de cultura livres de soro fetal bovino. **Dissertação de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas**. Ribeirão Preto-, 2014

CARDOSO, E. A. D. Moléculas de adesão celular: papel do microambiente tumoral na carcinogênese. **FMUC Medicina - Teses de Mestrado**. Universidade de Coimbra, 2009

CONSÓRCIO DE ONTOLOGIA GENÉTICA. Disponível em <<http://www.geneontology.org/>> Acesso em 20 de novembro de 2018

CHANDAR, N.; VISELLI, S. **Biologia Celular e Molecular Ilustrada**. Porto Alegre: Artmed, 2011 p. 9-21.

DUMONT, J. A.; LIU, T.; LOW, S. C; *et al.* Prolonged activity of a recombinant factor VIII-Fc fusion protein in hemophilia A mice and dogs. **Blood**, v. 119, n. 13, p. 3024-3030, 2012.

FISCHER, S.; CHARARA, N.; GERBER, A.; WÖLFEL, J.; SCHIEDNER, G.; VOEDISCH, B.; GEISSE, S. Transient Recombinant Protein Expression in a Human Amniocyte Cell Line: The CAP-T® Cell System. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 109, p. 2250-2261, 2012.

FRESHNEY, R. I. Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique. 4. ed. Nova York: **Wiley-Liss**, p.397, 1994.

GERBER, S.; LIZAK C.; MICHAUD G.; BUCHER M.; DARBRE T.; AEBI M.; REYMOND J. L.; PLOCHER K. Mechanism of bacterial oligosaccharyltransferase: in vitro quantification of sequon binding and catalysis. **The Journal of biological chemistry**. p.2-6, 2013.

GRAHAM, F. L.; SMILEY J.; RUSSELL, W.; NAIRN, C. R. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. **J. Gen. Virol**, v. 36, p. 59-67, 1977.

GUMBINER, B. M. Cell adhesion: the molecular basis of tissue architecture and morphogenesis. **US National Library of Medicine National Institutes of Health**. Feb 9;84(3):345-57, 1996.

LIU D.; CHEN X.Y.; XIONG R.P.; NING Y.L.; LI P.; PENG Y. Dexamethasone inhibits U937 cell adhesion via the down regulation of ROCK1 activity. **Biochimica Polonica**. 4:557-560, 2012.

LOIGNON, M.; PERRET, S.; KELLY, J.; BOULAIS, D.; CASS, B.; BISSON, L.; AFKHAMIZARREH, F.; DUROCHER, Y. Stable high volumetric production of glycosylated human recombinant IFN α 2b in HEK293 cells. **BMC Biotechnology**, v. 8, p. 1-16, 2008.

MOLINARO, E. M.; CAPUTO G. F. L.; REIS R. M. Conceitos e métodos para a formação de profissionais em laboratórios de saúde: volume 2- Rio de Janeiro: **EPSJV; IOC**, 2010.

PAULY J.L.; OVAK G.M.; RUSSELL C.W. Isolation of interleukin 2 (IL-2) from human and mouse lymphocyte culture supernatants by batch adsorption onto silicic acid. **J Immunol Methods**.;75(1):73-84, 1984.

SEETHARAMA, D. S.; SHARON, R.; JINING, L. Heterotypic Cell Adhesion Assay for the Study of Cell Adhesion Inhibition, **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)** v.716, p 225-243, 2011.

SCHMIDT, K.; ANDREW, P.; SCHRAMMEL, A.; GROSCHNER, K.; SCHMITZ, V.; KOJDA, G.; MAYER, B. Comparison of neuronal and endothelial isoforms of nitric. **Heart and Circulatory Physiology**, v.281, p.2053-2061, 2001.

SCHNEIDER, U.; SCHWENK, H.U.; BORNKAMM, G. Characterization of EBV genome negative "null" and "T" cell lines derived from children with acute lymphoblastic leukemia and leukemic transformed non-Hodgkin lymphoma. **International Journal of Cancer**, v.19, p.621-626, 1977.

SONG, M.; RAPHAELLI, K.; JONES, M. L.; *et al.* Clonal selection of high producing, stably transfected HEK293 cell lines utilizing modified, high-throughput FACS screening. **J Chem Technol Biotechnol.**, v. 1, n. 86, p. 935–994, 2011.

SPRINGER TA. Adhesion receptors of the immune system. **Nature**; 346:425–34, 1990.

SUN, X.; GOH, P. E.; WONG, K. T. K.; MORI, T.; YAP, M. G. S. Enhancement of transient gene expression by fed-batch culture of HEK 293 EBNA1 cells in suspension. **Biotechnol. Lett.**, v. 28, p. 843–848, 2006.

SWIECH, K.; KAMEN, A.; ANSORGE, S.; DUROCHER, Y.; PIKANÇO-CASTRO, V.; RUSSO-CARBOLANTE, E. M. S.; ABREU NETO, M. S.; COVAS, D. T. Transient transfection of serum-free suspension HEK 293 cell culture for efficient production of human rFVIII. **BMC Biotechnology**, v. 11, n.114, p. 1-10, 2011.

THOMAS, P.; SMART, T. G. HEK293 cell line: A vehicle for the expression of recombinant proteins. **J Pharmacol Toxicol Methods**, v. 51, p.187-200, 2005.

TORDAY, J.S.; REHAN, V.K. Evolutionary biology, cell-cell communication, and complex disease. Published by **John Wiley & Sons**, Inc., Hoboken, New Jersey
Published simultaneously in Canada, 2012. p.37.

WAJIH, N.; OWEN, J.; WALLIN, R. Enhanced Functional Recombinant Factor VII Production by HEK 293 Cells Stably Transfected with VKORC1 where the Gamma-Carboxylase Inhibitor Calumenin is Stably Suppressed by shRNA Transfection. **Thromb Res.**, v. 122, p. 405-410, 2008.

