

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
COMISSÃO DE GRADUAÇÃO
TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

ISADORA RIBEIRO SASSO DAS DORES

NOVAS TÉCNICAS PARA O ESTUDO DE MIGRAÇÃO CELULAR

PORTO ALEGRE, DEZEMBRO DE 2013

ISADORA RIBEIRO SASSO DAS DORES

NOVAS TÉCNICAS PARA O ESTUDO DE MIGRAÇÃO CELULAR

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Comissão de Graduação do Curso de Ciências Biológicas – Bacharelado, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador:

Prof.^o Dr. Carlos Termignoni

Porto Alegre

AGRADECIMENTOS

Agradeço à família, por todo estímulo, investimento e incentivo à educação da vida toda. Ao Cauê Pacheco e à Fernanda Bresciani, pelo apoio e ajuda sempre. À Capes, pela concessão da bolsa no exterior, uma das experiências mais enriquecedoras que já tive. À equipe com quem trabalhei na UCSD, especialmente o Eugene Tkachenko e o Edgar Gutierrez. Ao Professor Carlos Terrignoni, que aceitou me orientar neste trabalho, e à banca avaliadora, Professores Guido Lenz e Marcelo Lamers. À toda equipe do Laboratório de Bioquímica Farmacológica do Centro de Biotecnologia da UFRGS, onde fiz iniciação científica durante 3 anos, em especial à Renata Terra, que me ensinou muito mais do que pipetar e fazer experimentos.

Tenho muito a agradecer a todos os citados, pois aprendi muito ao longo dos últimos anos, e todos contribuíram de alguma forma para o meu crescimento nesse período.

RESUMO

A migração celular é um importante processo envolvido em diversos eventos biológicos, tais como cicatrização, inflamação, desenvolvimento embrionário, transformação celular e metástase de tumores. Portanto, o processo depende de uma regulação precisa tanto dos sinais mecânicos, quanto dos bioquímicos percebidos pelas células. Nesse sentido, a influência do meio extracelular no comportamento das células, vem recebendo atenção especial, pelo seu destaque nos processos biológicos. A partir disso, a necessidade de melhor representar este ambiente nos experimentos *in vitro* se torna evidente, uma vez que os experimentos com culturas de células são comumente realizados sobre as superfícies de vidro ou plástico das placas de cultura. Assim, o presente trabalho traz à tona outras abordagens possíveis para o estudo de migração celular, que englobam os aspectos envolvidos no processo, inclusive a influência do meio extracelular, através da utilização de técnicas, que já vem sendo estudadas, que visam a semelhança da realidade celular. As interferências no processo migratório aqui abordadas são externas, incluindo desde o meio externo, como a rigidez do substrato e o papel das adesões, até a atividade de moléculas biologicamente ativas, presentes em venenos animais como o da lagarta *Lonomia obliqua*. Em suma, as técnicas aqui apresentadas pretendem auxiliar na obtenção de informações relevantes a respeito da influência do meio externo sobre as células, de forma a agregar conhecimento à esta importante área da biologia celular.

Palavras-chave: migração celular; substratos macios; polarização; *Lonomia obliqua*

ABSTRACT

Cell migration is a key process involved in several biological events as wound healing, inflammation, embryonic development, cell transformation and metastasis of tumors. Therefore, the process relies on the precise adjustment of both mechanical and biochemical signals. Thus, the influence of the extracellular environment on cells behavior has received particular attention, once it is emphasized on biological processes. From this, the need to better represent this environment in experiments becomes evident since the present assays with cell cultures are commonly performed on glass or plastic surfaces of culture plates. Thus, we bring here other possible approaches to cell migration studies which consider aspects of the process, including the influence of extracellular environment through the use of techniques, that are being used already, that aim the similarity of cell reality. Here we discuss external interferences in the migratory process, including from the external environment, such as the stiffness of the substrate and the role of adhesions, to the activity of biological active molecules such those found in animal venoms, as *Lonomia obliqua* venom, In short, the techniques presented here are intended to assist in obtaining relevant regarding the influence of the external environment on cells, in order to add knowledge to this important area of cell biology.

Keywords: cell migration; soft substrates; polarization; *Lonomia obliqua*

ÍNDICE

1 INTRODUÇÃO	7
1.1 COMPONENTES DO CITOESQUELETO.....	7
1.2 POLARIZAÇÃO E ADESÃO CELULAR	8
1.3 AMBIENTES EXTRA-CELULARES	9
1.4 INTERFERENTES DOS PROCESSOS BIOLÓGICOS: VENENO DE LONOMIA OBLIQUA	10
1.5 OBJETIVO.....	11
1.5.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	11
2 METODOLOGIA	12
2.1 CONSTRUÇÃO DAS PLACAS PARA CULTURA DE CÉLULAS.....	12
2.1.1 TÉCNICA PARA INDUÇÃO DE POLARIZAÇÃO	12
2.1.2 TÉCNICA PARA VISUALIZAÇÃO DA INFLUÊNCIA DO MEIO EXTRACELULAR.....	13
2.2 CULTURA DE CÉLULAS	13
2.3 ENSAIO COM VENENO DA LAGARTA LONOMIA OBLIQUA	13
2.3.1 VENENO DA LAGARTA LONOMI OBLIQUA.....	13
2.3.2 COBERTURA DE FIBRONECTINA	14
2.3.3 PAXILINA	14
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	15
3.1 TÉCNICA PARA INDUÇÃO DE POLARIZAÇÃO	15
3.2 TÉCNICA PARA VISUALIZAÇÃO DA INFLUÊNCIA DO MEIO EXTRACELULAR	16
3.3 ENSAIO COM VENENO DA LAGARTA LONOMIA OBLIQUA	17
4 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	18
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	19
ANEXO A - FIGURAS	21

1 INTRODUÇÃO

A migração celular desempenha papel central em uma série de fenômenos biológicos (LAUFFENBURGER & HORWITZ, 1996). Entre eles destacam-se eventos fisiológicos essenciais como a morfogênese e o desenvolvimento dos sistemas orgânicos animais (AMAN & PIOTROWSKI, 2010), durante a embriogênese; a cicatrização e a infiltração de leucócitos para fagocitose na resposta inflamatória, no organismo maduro (LAUFFENBURGER & HORWITZ, 1996). Não obstante, a migração é um aspecto marcante também em condições patológicas como visto na invasão de células tumorais, através do endotélio vascular, no estroma de tecidos circundantes e na difusão e propagação das mesmas em locais distantes, através da circulação (SHARMA, *et al.*, 2012). Na diabetes, no entanto, a migração celular se torna marcante por ser deficiente, o que prejudica a cicatrização. Para que o processo migratório ocorra, as células devem estar intimamente conectadas a seus meios circundantes, de forma que a percepção e a consequente conversão dos estímulos externos em uma resposta sejam possíveis e resultem no movimento celular. Este é, portanto, um processo complexo, o qual requer regulação espaço-temporal coordenada das vias mecânica e bioquímica de sinalização celular (TKACHENKO, *et al.*, 2011). A resposta resultante é diretamente dependente da reorganização dos componentes internos da célula, o que modifica a estrutura do corpo celular, permitindo o movimento. Durante todo o processo, esta estrutura formada pelo citoesqueleto é remodelada diversas vezes.

1.1 COMPONENTES DO CITOESQUELETO

O funcionamento celular depende diretamente da ambientação das células no espaço e de suas interações com o meio circundante. A organização espacial e as propriedades mecânicas das células são determinadas pelo citoesqueleto, que, na maioria das células animais, é composto por três famílias de proteínas que se agrupam para formar três tipos principais de filamentos. Tais filamentos organizam-se em arranjos helicoidais a partir de subunidades que se autoassociam. Diferenças na estrutura das subunidades e na forma de associação delas conferem propriedades mecânicas e, conseqüentemente, funcionais distintas aos filamentos: (1) os filamentos intermediários curvam-se facilmente, mas são resistentes ao rompimento, e, portanto, fornecem força mecânica às células; (2) já os microtúbulos (formados de subunidades de tubulina) são tubos ocos, rígidos e fortes, e determinam tanto as posições das organelas, quanto o transporte intracelular direto;

por fim, (3) os filamentos de actina (formados por subunidades de actina) são finos e facilmente rompíveis, determinam a morfologia da superfície celular, além de serem responsáveis pela locomoção das células. Apesar de possuírem funções biológicas e propriedades mecânicas particulares, os três tipos de filamentos atuam em conjunto para assegurar forma, resistência e capacidade de locomoção às células. Além deles, proteínas acessórias são essenciais, uma vez que controlam a associação dos filamentos em regiões específicas no corpo celular e estabelecem as conexões dos filamentos entre si e com os demais componentes celulares, possibilitando uma série de alterações morfológicas (ALBERTS *et al.*, 2007, p. 965-1052).

1.2 POLARIZAÇÃO E ADESÃO CELULAR

O primeiro passo para a migração celular é a polarização (ETIENNE-MANNEVILLE & HALL, 2001 apud LIM *et al.*, 2008). De maneira geral, a polaridade reflete as diferenças moleculares e funcionais entre a frente (região mais próxima da direção do movimento) e a parte traseira (região oposta à frente) da célula, o que, em células eucarióticas, pode ser atingido espontaneamente, ou direcionado por sinais extracelulares, como pela formação de adesões ao substrato ou de contatos entre si. Os estímulos externos induzem a polarização, pois ativam, de forma assimétrica, receptores celulares específicos, que se distribuem homogeneamente na membrana; isto gera uma sinalização interna heterogênea que resulta na morfologia polarizada. A partir desta sinalização, a frente celular é formada, principalmente, através da ativação de receptores pertencentes à superfamília dos receptores acoplados à proteína G (GPCR), os quais se agregam e amplificam o estímulo assimétrico, e, assim, este pode ser propagado ao longo de uma complexa rede de comunicação até atingir os efetores do sistema. Entre os efetores, as proteínas da família das Rho GTPases destacam-se por serem centrais na migração celular, uma vez que atuam nos processos de polimerização, organização e contração do citoesqueleto de actina e na polimerização e estabilização de microtúbulos. Assim, a frente do corpo celular é uma região extremamente ativa, caracterizada por intensa polimerização de filamentos de actina e pela presença de protrusões, que são extensões da membrana celular que apontam na direção do movimento. A formação dessas protrusões é mediada pela GTPase Rac e depende da integração entre polimerização dinâmica do citoesqueleto de actina, que força a expansão da membrana, e adesão da célula ao substrato, para sua estabilização.

Em contrapartida à frente, a parte traseira da célula é uma área sem protrusões. Por ação da GTPase RhoA, ocorre a contração dos filamentos de actina e a formação de feixes espessos de actomiosina, o que juntamente com o estabelecimento de adesões estáveis possibilita a retração do corpo celular durante a migração.

Tão importante quanto polarizar para o processo migratório é o estabelecimento de adesões. As adesões são sítios de convergência entre o citoesqueleto de actina e as fibras da matriz extracelular que auxiliam na interação física entre a célula e o seu meio externo. Tais interações variam em termos de composição e estabilidade podendo relacionar-se a momentos e tipos celulares distintos. Células com perfil migratório formam adesões fracas (facilmente desassociáveis) e transientes que geram sinalização para ativação de Rac, promovendo, assim, polimerização de actina. Estas adesões são importantes no sentido de estabilizar as protrusões, servindo como âncoras durante o movimento. Entretanto, algumas destas podem amadurecer e tornar-se mais estáveis, transformando-se em adesões focais através do engrossamento e crescimento da estrutura, somado à conexão com feixes de actomiosina. Este tipo de adesão é associado à atividade de Rho, sendo inversamente relacionado à mobilidade celular.

Uma vez atingida a polaridade, o movimento celular transcorre através de ciclos de protrusão na frente da célula, seguida da translocação do corpo celular e, finalmente, de retração da parte traseira. Enquanto a translocação do corpo celular é independente de polimerização de actina, a retração requer a contração do citoesqueleto de actina coordenada com a desassociação de adesões estabelecidas na borda. Assim, ao longo de todo processo, diversas estruturas do citoesqueleto são formadas e desassociadas (CELL MIGRATION GATEWAY).

1.3 AMBIENTES EXTRACELULARES

O ambiente extracelular é um importante regulador do comportamento das células. Além da regulação bioquímica clássica, fatores mecânicos apresentados pelo meio externo – como aplicação de força ou rigidez da matriz, também exercem influência na forma e, conseqüentemente, na função celular. A mecanotransdução, que é a conversão da força mecânica em informação bioquímica relevante, contribui tanto para processos fisiológicos, como para patológicos também (ORR, *et al.*, 2006). Estudos em embriões de *Caenorhabditis elegans* demonstraram que, através da mecanotransdução, junções de oclusão foram formadas em resposta ao estresse ocasionado pela tensão exercida sobre os hemidesmossomos, afim de reforçar as

adesões célula-célula (ZHANG *et al.*, apud FREUND *et al.*, 2012). Tendo em vista que a rigidez dos tecidos afeta diversos processos biológicos, tem sido demonstrado que a progressão de tumores, frequentemente identificados por palpação devido à rigidez aumentada do tecido, é causada justamente por esta alteração mecânica do ambiente (LEVENTAL, *et al.*, 2009).

Tendo em vista a importância do meio extracelular para as células, esforços para melhor representar este ambiente nos ensaios com culturas de células são válidos. O ambiente da maioria dos organismos multicelulares é muito mais macio do que as superfícies das placas de vidro ou plástico usadas nos estudos *in vitro* (YEUNG, *et al.*, 2005); a rigidez dos tecidos animais, por exemplo, varia de < 1kPa no cérebro a ~10Gpa nos ossos (GUTIERREZ, *et al.*, 2011). Assim, a força gerada pelo citoesqueleto, que deveria ser capaz de deformar outra membrana próxima à célula, não é igualmente suficiente quando exercida sobre a superfície rígida das placas de cultura convencionais e, dessa forma, em condições de sinalização química constante, morfologia e função celulares podem ser condicionadas à rigidez do substrato (YEUNG, *et al.*, 2005). Nesse sentido, sabe-se que células exercem menos força em substratos macios do que o fazem em materiais mais rígidos (HOFFMAN, *et al.*, 2011) e que, além disso, guiam seu movimento sondando a rigidez do substrato (LO, *et al.*, 2000). Assim, a resposta celular à matriz pode variar de acordo com o tipo celular e depende da estrutura de adesão envolvida na ligação entre célula e substrato (YEUNG, *et al.*, 2005).

Nesse contexto, a interferência do ambiente externo no comportamento das células, assim como os mecanismos de resposta celular envolvidos, compõem uma importante área de estudo dentro da biologia celular, o que vem sendo trabalhado, principalmente, através da utilização de substratos macios para cultura de células (YEUNG, *et al.*, 2005).

1.4 INTERFERENTES DOS PROCESSOS BIOLÓGICOS: VENENO DE LONOMIA OBLIQUA

Dentre os diversos interferentes dos processos biológicos existentes na natureza, os venenos animais compõem uma fonte rica de substâncias ativas. Venenos animais são complexas misturas de proteínas, peptídeos e outras moléculas orgânicas capazes de interferir nos processos fisiológicos das vítimas (coagulação, agregação plaquetária, cicatrização, entre outros) resultando em prejuízo das funções vitais das mesmas. Assim, a influência de determinadas

moléculas, oriundas dos venenos animais, em eventos como migração celular e invasão metastática de tumores, vem sendo estudada (NASCIMENTO-SILVA, *et al.*, 2012). Neste sentido, o veneno da lagarta *Lonomia obliqua* (Figura 1), endêmica do sul do Brasil, é de especial interesse devido a síndrome hemorrágica que causa, a qual pode levar à morte. Nos acidentes com as lagartas, os sintomas iniciais incluem dor e ardência no local de contato com os animais, e geralmente são seguidos por manifestações clínicas mais graves, com forte hemorragia, sangramento em ferimentos cicatrizados, hematúria, hemorragia cerebral, insuficiência renal aguda e melena (PINTO, *et al.*, 2010). Sendo assim, o veneno da lagarta *L.obliqua* contém princípios ativos com inúmeras propriedades, os quais podem ocasionar disfunções nas células endoteliais (NASCIMENTO-SILVA, *et al.*, 2012) das vítimas envenenadas. Por outro lado, se estudados, estes princípios ativos compõem uma potencial fonte para novos fármacos. Portanto, ainda que muito já se saiba, novos estudos sobre as propriedades do veneno são necessários. Nesse sentido, visando novas abordagens, os métodos propostos neste trabalho tem aplicabilidade para agregar conhecimento a respeito dessas propriedades.

1.5 OBJETIVO

Diante do exposto acima, o objetivo do presente trabalho foi desenvolver novas técnicas e, assim, novas abordagens para o estudo da migração celular relacionada a estímulos mecânicos e outros interferentes externos.

1.5.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Fabricar placas com substrato macio para cultura de células, projetadas especialmente para realização de ensaios de polaridade celular, pela utilização de linhas de fibronectina;
2. Fabricar placas, com substrato macio para cultura de células, com diferentes densidades de pontos para adesão celular, visando avaliar a influência do meio na atividade celular;
3. Realizar experimento, utilizando placas de substrato macio para cultura de células, com células endoteliais expostas à ação do veneno da lagarta *Lonomia obliqua*, para avaliação de atividade sobre as estruturas de adesão celular.

2 METODOLOGIA

A metodologia apresentada neste trabalho foi realizada nos laboratórios *Microfluidics Biophysics Lab* e *Ginsberg Lab - Division of Rheumatology, Allergy & Immunology*, na University of California San Diego (UCSD), em San Diego, CA, Estados Unidos.

2.1 CONSTRUÇÃO DAS PLACAS PARA CULTURA DE CÉLULAS

Para a construção das placas, uma camada de silicone foi depositada sobre a lâmina de vidro do fundo da placa. Esta camada pode variar de acordo com dois parâmetros: rigidez e espessura, o que é atingido pela proporção diferencial dos componentes do gel e pela rotação diferencial durante o revestimento da superfície, respectivamente. Para preparar a camada de silicone, componentes do pré-polímero de gel com alto índice de refração – HRI (High Refractive Index), ou seja, partes A e B do gel Qgel 920 (Quantum Silicones LLC, Richmond VA) são misturados (para rigidez de 18 kPa a proporção utilizada é de 1 parte de A para 2 partes de B) e vertidos sobre lâminas de vidro, para que, através de rotação (1920 rpm), a camada de silicone seja depositada. Depois deste processo, as lâminas são deixadas em repouso por 2 h, a 100 °C, para posteriormente serem utilizadas nos ensaios. A Figura 2 esquematiza o processo de produção das placas.

2.1.1 TÉCNICA PARA INDUÇÃO DE POLARIZAÇÃO

A polarização celular é induzida através da cobertura, em listras, de fibronectina na placa. Este padrão de listras é marcado na placa com o auxílio de uma espécie de carimbo feito de agarose (Figura 3), confeccionado artesanalmente para esta finalidade. A partir disto, a “estampa” é obtida como segue: o carimbo de agarose é embebido em solução de Sil-PEG-NH₂ (1 %, 2 K) em tampão HEPES pH 7.0, durante 5 minutos e aplicado na superfície de silicone, durante 1 min. Depois de marcado, o gel (ou seja, as áreas não marcadas) é bloqueado com Sil-PEG (Silane-Poly Ethylene Glycol) (1 %, 20 K) em tampão HEPES pH 7.0, por pelo menos 1 h. Somente após esta etapa, a solução de fibronectina (10 ug/mL & 0,01 ug/mL EDC (1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide)) é adicionada à placa (para ligar-se na região carimbada, que não foi bloqueada), por 15 min, para depois ser lavada por tampão HEPES. Por fim, esferas (de 40 nm) carboxiladas fluorescentes, suspensas em tampão HEPES, são incubadas na superfície do gel e lavadas após 10 min.

2.1.2 TÉCNICA PARA VISUALIZAÇÃO DA INFLUÊNCIA DO MEIO EXTRACELULAR

Para esta técnica, as placas são incubadas com Sil-PEG-NH₂ (0,01 %, pH 7.0) durante 10 min, e esferas carboxiladas (na presença de EDC), por 15 min. Feito isto, as placas, em solução de 20 % Irga, são expostas à luz ultravioleta (U.V.) durante 10 min, para bloqueio da superfície. Além deste, os grupamentos amina, presentes em Sil-PEG-NH₂, são também bloqueados por solução de NHS-PEG-Acryl (5 K, pH7.0). Por fim, as placas são tratadas com NHS (N-hydroxysuccinimide) e EDC (2 mg/mL), antes da adição de fibronectina (10 mg/mL), que deve ligar-se à superfície das esferas (Figura 4).

2.2 CULTURA DE CÉLULAS

Células endoteliais (Human Umbilical Vein Endothelial Cells – HUVECs) foram cultivadas em meio básico (EBM-2) com suplementação de fatores de crescimento (EGM-2 bullet kit, Lonza). Fibroblastos (NIH 3T3) foram cultivados em meio DMEM (Invitrogen) com 10% de soro fetal bovino e antibióticos. Para os experimentos, fibroblastos e células endoteliais foram plaqueados nas placas com substrato de silicone, e incubados por tempo suficiente para adesão das células no substrato (de 24 a 48 h). Depois de aderidas, o comportamento celular foi observado por microscopia Time Lapse em microscópio invertido (Nikon Diaphot). As imagens obtidas foram processadas no programa Image J (NIH, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>).

2.3 ENSAIO COM VENENO DA LAGARTA LONOMIA OBLIQUA

Células endoteliais (HUVECs) confluentes e expressando Paxilina fluorescente foram plaqueadas em placa com substrato de silicone revestida por fibronectina. Para o experimento, 44 ug de veneno foram adicionadas sobre as células (concentração final de 44 ug/uL), para observação do comportamento celular ao microscópio, durante 30 min.

2.3.1 VENENO DA LAGARTA LONOMI OBLIQUA

O veneno da lagarta *Lonomia obliqua* é obtido a partir da maceração de espículas de lagartas (fornecidas pelo Centro de Informação Toxicológica do Estado do Rio Grande do Sul – CIT-RS) em solução aquosa, como previamente descrito (BERGER, *et al.*, 2010). O extrato obtido é centrifugado a 14000 rpm, por 10 mi, para utilização do sobrenadante, que tem conteúdo protéico determinado por BCA (Pierce, Rockford, USA).

2.3.2 COBERTURA DE FIBRONECTINA

A placa com substrato de silicone utilizada foi previamente revestida por fibronectina, através de incubação com solução de fibronectina 10 ug/mL (com EDC), durante 30 min, e bloqueio da superfície com BSA 1 %, por 15 min.

2.3.3 PAXILINA

A paxilina fluorescente observada no teste foi obtida através da amplificação da sequência de ácidos nucléicos codificante para ela, por reação em cadeia da polimerase (PCR), e fusão desta com Halo-Tag usando o kit InFusion (Clontech), de acordo com o protocolo do fabricante. O mesmo kit foi utilizado para subclonar a fusão Paxilina-Halo-Tag no vetor lentiviral.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados apresentados neste trabalho foram obtidos durante realização de estágio sanduíche nos laboratórios *Microfluidics Biophysics Lab* e *Ginsberg Lab - Division of Rheumatology, Allergy & Immunology*, na University of California San Diego (UCSD), como bolsista da CAPES – Processo nº 12008-12-5.

A busca por técnicas que tornem os estudos com células mais fidedignos é necessária uma vez que o conhecimento atual a respeito da estrutura e das funções celulares *in vitro* é basicamente fundamentado em estudos com células plaqueadas em substratos rígidos, como plástico e vidro, que não são macios como os materiais nos quais a maioria dos organismos multicelulares é aderido naturalmente (YEUNG, *et al.*, 2005). Nesse sentido, a utilização de substratos macios, como poliacrilamida (PELHAM & WANG, 1997), vem sendo estudada. Aqui, visando melhor representar o ambiente extracelular, as placas para cultura de células foram produzidas utilizando-se silicone como substrato. O uso do silicone (e não de poliacrilamida, por exemplo) é justificado por propiciar a geração de imagens de alta resolução e possibilitar a utilização de microscopia TIRF, devido ao seu índice de refração (GUTIERREZ, *et al.*, 2011). Como resultado, as células aderem bem ao silicone, comportando-se, aparentemente, dentro da normalidade e sobrevivendo da mesma forma (dados não demonstrados).

Uma vez que a utilização do silicone como substrato macio para a cultura de células parece ser uma boa alternativa como representação do ambiente celular, outras técnicas foram testadas, utilizando-se as placas construídas:

3.1 TÉCNICA PARA INDUÇÃO DE POLARIZAÇÃO

Com o intuito de avaliar aspectos da migração celular, as superfícies dos géis das placas de cultura foram marcadas com faixas lineares e paralelas de fibronectina. O que se pretende nessa técnica é mimetizar ainda mais o meio extracelular, inserindo seus componentes no contexto do experimento. Com isso, espera-se que as células polarizem tão logo estabeleçam adesões com o substrato, no caso preferencialmente com a fibronectina (Figura 5). A técnica foi desenvolvida utilizando-se dois tipos celulares distintos (células endoteliais e fibroblastos), o que trouxe à tona um aspecto interessante de ser discutido. As células endoteliais não responderam da forma esperada, ou seja, ainda que tenham aderido ao substrato, não migraram, apesar do estímulo ocasionado pela fibronectina. Além disso, não foram capazes de sobreviver por muito tempo. Por outro lado, fibroblastos

responderam bem ao propósito do experimento, polarizando e migrando. Nesse caso, logo depois de alinhar-se sobre as faixas de fibronectina, as células prontamente começaram a migrar, e de forma rápida, ao longo das mesmas. A observação destes fatos remete à biologia das células endoteliais. Estas formam fortes adesões umas com as outras, estabelecendo contato íntimo entre si, de forma que dependem da manutenção destas para o próprio funcionamento (ALBERTS *et al.*, 2007, p. 1445-1450). A monocamada formada pelo endotélio vascular, exemplifica o comportamento desse tipo celular, e, durante a técnica, as células não podem estabelecer contato entre si, em consequência da densidade plaqueada, o que possivelmente explique a diminuição na sobrevivência delas.

Assim, embora não válida para células HUVECs, a marcação e consequente delimitação da superfície da placa com fibronectina, demonstrou ser eficiente no que se propõe, para fibroblastos da linhagem NIH 3T3. Portanto, sendo a polarização o primeiro passo requerido para a migração celular direcionada (ETIENNE-MANNEVILLE & HALL, 2001 apud LIM *et al.*, 2008), esta técnica compõe uma ferramenta útil para o estudo deste processo. Sabe-se, inclusive usando-se ferramentas semelhantes as apresentadas neste estudo, que para macrófagos, por exemplo, as fibras da matriz extracelular exercem papel importante na facilitação do movimento celular (SHARMA, *et al.*, 2012). No entanto, por tratar-se de um processo complexo coordenado espaço-temporalmente (LAUFFENBURGER & HORWITZ, 1996), a identificação e a forma de participação dos diversos componentes moleculares envolvidos na migração celular, assim como a forma de integração destes ainda precisa ser melhor elucidada,.

3.2 TÉCNICA PARA VISUALIZAÇÃO DA INFLUÊNCIA DO MEIO EXTRACELULAR

O princípio desta técnica baseia-se na ideia de restringir os pontos para adesão das células no substrato à superfície de esferas fluorescentes e, assim, relacionar a movimentação destas ao movimento celular. Para tanto, a superfície da placa deve ser bloqueada e estas esferas fluorescentes carboxiladas ligadas à fibronectina; com isso, as células podem ligar-se apenas na superfície das esferas, onde está ligada a fibronectina disponível. Assim, a movimentação das esferas permite a detecção das zonas de adesão, o que reflete o movimento do citoesqueleto através da ligação com a fibronectina. A partir disso, outras abordagens podem ser testadas, como a utilização de diferentes densidades de esferas, o que se reflete no número de adesões possíveis para as células, ou ainda,

a utilização de diferentes tamanhos de esferas, o que permite a formação variada de áreas e tipos de adesão. Portanto, combinações entre densidades e tamanhos de esferas podem ser úteis para um melhor entendimento das dinâmicas do citoesqueleto, bem como de processos de polarização ou ainda da resposta celular à rigidez do meio. A Figura 6 mostra a co-localização de esferas e fibronectina como esperado, demonstrando a possibilidade de utilização da técnica.

3.3 ENSAIO COM VENENO DA LAGARTA LONOMIA OBLIQUA

O experimento realizado com o veneno da lagarta *Lonomia obliqua* revelou uma ação de efeito agudo do veneno sobre as células. Foi observado que o veneno ocasionou a perda do contato das células entre si e destas com o substrato, o que fez com que as mesmas perdessem a aparência saudável, logo nos primeiros 30 minutos da aplicação. Esse quadro, provavelmente, foi ocasionado por uma alteração na estrutura do citoesqueleto resultante da ação do veneno, que sabidamente contém diversas moléculas ativas (VEIGA, *et al.*, 2005). Entretanto, pouco tempo após a observação do efeito do veneno (aproximadamente 1 h após aplicação do mesmo), as células foram capazes de refazer suas adesões e, portanto, recuperaram sua aparência natural (saudável). O veneno da lagarta *L.obliqua* vem sendo estudado ao longo dos anos, por possuir uma série de princípios ativos com propriedades que podem ocasionar disfunções das células endoteliais (NASCIMENTO-SILVA, *et al.*, 2012). O que foi observado neste experimento pode indicar a presença de uma atividade do tipo proteolítica, uma vez as adesões celulares, que possivelmente foram alvo do efeito do veneno, são formadas por proteínas celulares e de matriz e foram desfeitas durante o tratamento. No entanto, a atividade do veneno não pareceu ser significativa ao longo do tempo, uma vez que as células foram capazes de sobreviver frente a sua ação. Entretanto, uma vez que o veneno foi aplicado de forma diluída no meio de cultura presente na placa, sua atividade pode ter sido inibida em consequência disto. Embora muito se tem descoberto no que diz respeito aos componentes e atividades do veneno da lagarta *Lonomia obliqua* (VEIGA, *et al.*, 2005), estudos que visem compreender suas ações *in vitro* são importantes para elucidar seus efeitos nos envenenamentos.

4 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

A biologia celular é uma área de extrema relevância, principalmente quando se considera o impacto que novas descobertas podem ter tanto para a comunidade científica, quanto, em um segundo momento, para o público geral. Nesse sentido, alternativas que se somem aos métodos tradicionais de estudo, aumentando as possibilidades disponíveis para a construção do conhecimento são de grande valia. As técnicas desenvolvidas, e aqui apresentadas, são simples e de relativo baixo custo, podendo ser aplicadas mesmo em laboratórios de pesquisa de pequeno porte e compondo uma potencial fonte para novas descobertas. O uso do silicone possibilita a representação de diversos ambientes celulares, o que permite a elaboração de uma gama de desenhos experimentais para teste de inúmeras condições ambientais.

Como perspectivas, estão o aprimoramento das técnicas testadas, bem como o uso destas, inclusive para avaliação de diversos aspectos do envenenamento pela lagarta *Lonomia obliqua*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBERTS, B., JOHNSON, A., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K., & WALTER, P. (2007). *Molecular Biology of The Cell*. Garland Science.
- AMAN, A. & PIOTROWSKI, T. Cell migration during morphogenesis. **Developmental Biology**, 2010, p. 20-33.
- BERGER, M.; RECK, J.; TERRA, R. M.; PINTO, A. F.; TERMIGNONI, C.; & GUIMARÃES, J. A. Lonomia obliqua caterpillar envenomation causes platelet hypoaggregation and blood incoagulability in rats. **Toxicon**, 2010 , p. 33-44.
- CELL MIGRATION GATEWAY. Disponível em: www.cellmigration.org
- FREUND, J. B.; GOETZ, J. G.; HILL, K. L. & VERMOT, J. Fluid flows and forces in development: functions, features and biophysical principles. **Development**, 2012, p. 1229-1245.
- GUTIERREZ, E.; TKACHENKO, E.; BESSER , A.; SUNDD, P.; LEY , K.; DANUSER, G.; GINSBERG, M. H.; GROISMAN, A. High Refractive Index Silicone Gel for Simultaneous Total Internal Reflection Fluorescence and Traction Force Microscopy of Adherent Cells. **Plos One**, 2011, p. 1-5.
- HOFFMAN, B. D.; GRASHOFF, C.; SCHWARTZ, M. A. Dynamic molecular processes mediate cellular mechanotransduction. **Nature**, 2011, p. 316-323.
- LAUFFENBURGER, D. A. & HORWITZ, A. F. Cell Migration: A Physically Integrated Molecular Process. **Cell**, 1996 , p. 359-369.
- LIM, C. J.; KAIN, K. H.; TKACHENKO, E.; GOLDFINGER, L. E.; GUTIERREZ, E.; ALLEN, M. D., GROISMAN, A.; ZHANG, J.; GINSBERG, M. H. Integrin-mediated Protein Kinase A Activation at the Leading Edge of Migrating Cells. **Molecular Biology of the Cell**, 2008, p. 4930-4941.
- LO, C.-M.; WANG, H. B.; DEMBO, M.; WANG, Y. L. Cell Movement Is Guided by the Rigidity of the Substrate. **Biophysical Journal**, 2000, p. 144-152.
- NASCIMENTO-SILVA, V.; RODRIGUES DA SILVA, G.; MORAES, J.; CYRINO, F. SEABRA, S.; BOUSKELA, E.; GUIMARÃES, J. A.; BARJA-FIDALGO, C. A pro-inflammatory profile of endothelial cell in Lonomia obliqua envenomation. **Toxicon**, 2012, p. 50-60.
- PELHAM, R. J. & WANG, Y. L. Cell locomotion and focal adhesions are regulated by substrate flexibility. **Cell Biology**, 1997, p. 13661-13665.

- PINTO, A. F.; BERGER, M.; RECK, J.; TERRA, R. M.; GUIMARÃES, J. A. *Lonomia obliqua* venom: In vivo effects and molecular aspects associated with the hemorrhagic syndrome. **Toxicon**, 2010, p. 1103-1112.
- SHARMA, V. P.; BEATY, B. T.; PATSIALOU, A.; LIU, H.; CLARKE, M.; COX, D.; CONDEELIS, J. S.; EDDY, R. J. Reconstitution of in vivo macrophage-tumor cell pairing and streaming motility on one-dimensional micro-patterned substrates. **IntraVital**, 2012, p. 77-85.
- TKACHENKO, E.; SABOURI-GHOMI, M.; PERTZ, O.; KIM, C.; GUTIERREZ, E.; MACHACEK, M.; GROISMAN, A.; DANUSER, G.; GINSBERG, M. H. Protein kinase A governs a RhoA-RhoGDI protrusion-retraction pacemaker in migrating cells. **Nature Cell Biology**, 2011, p. 660-668.
- VEIGA, A. B.; RIBEIRO, J. M.; GUIMARÃES, J. A.; FRANCISCHETTI, I. M. A catalog for the transcripts from the venomous structures of the caterpillar *Lonomia obliqua*: identification of the proteins potentially involved in the coagulation disorder and hemorrhagic syndrome. **Gene**, 2005, p. 11-27.
- YEUNG, T.; GEORGES, P. C.; FLANAGAN, L. A.; BEATRICE, M.; ORTIZ, M.; FUNAKI, M.; ZAHIR, N.; MING, W.; WEAVER, V.; JANMEY, P. A. Effects of Substrate Stiffness on Cell Morphology, Cytoskeletal Structure, and Adhesion. **Cell Motility and the Cytoskeleton**, 2005, p. 24-34.

ANEXO A – FIGURAS



Figura 1: A lagarta *Lonomia obliqua*. Foto: CIT/SC

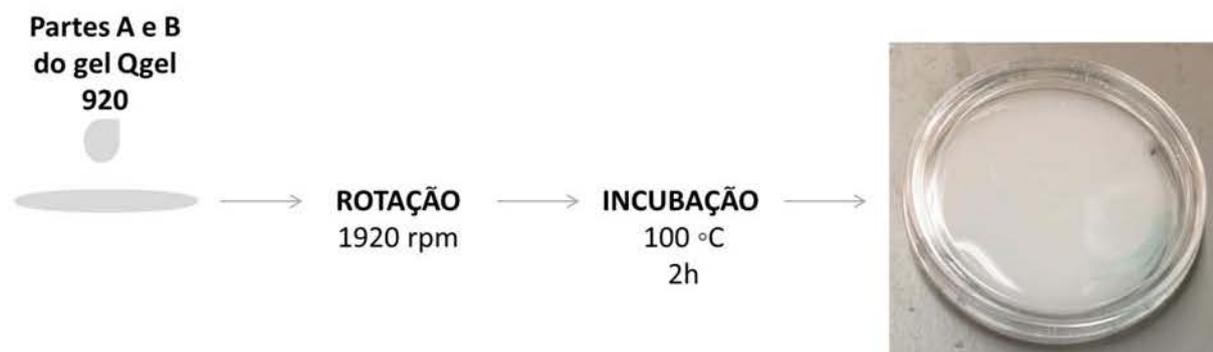


Figura 2: Esquema representativo das etapas de produção das placas de cultura. A mistura dos pré-polímeros é depositada na lâmina de vidro, e, através de rotação, a deposição se dá de forma homogênea. Posteriormente, as placas são incubadas em estufa a 100 °C, durante 2 h.

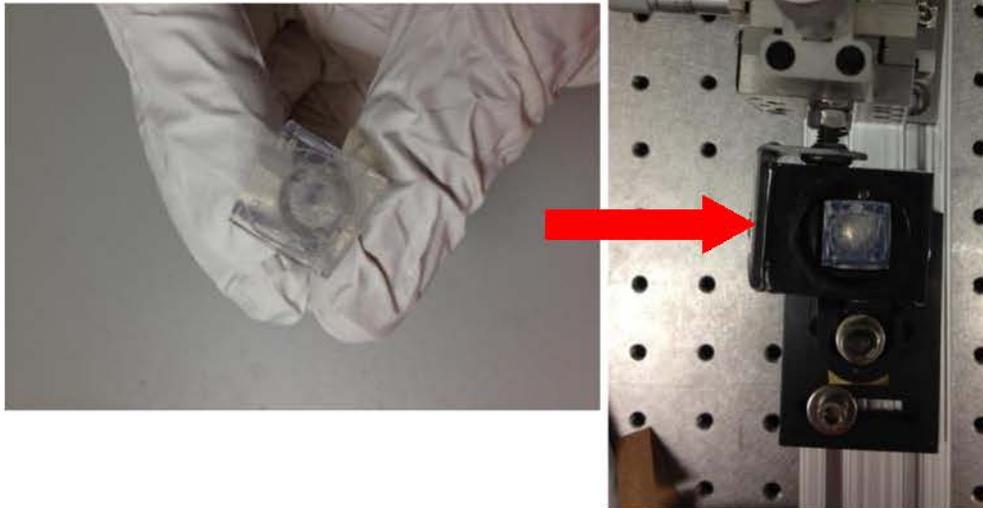


Figura 3: Carimbo para marcação de substrato. À esquerda, a imagem do carimbo, feito de agarose, usado para marcar os substratos macios de silicone. Na imagem à direita, o carimbo colocado na posição correta para uso (indicado pela seta vermelha), na qual é mantido por ímãs sobre o aparato, onde também é apoiada a placa a ser marcada.

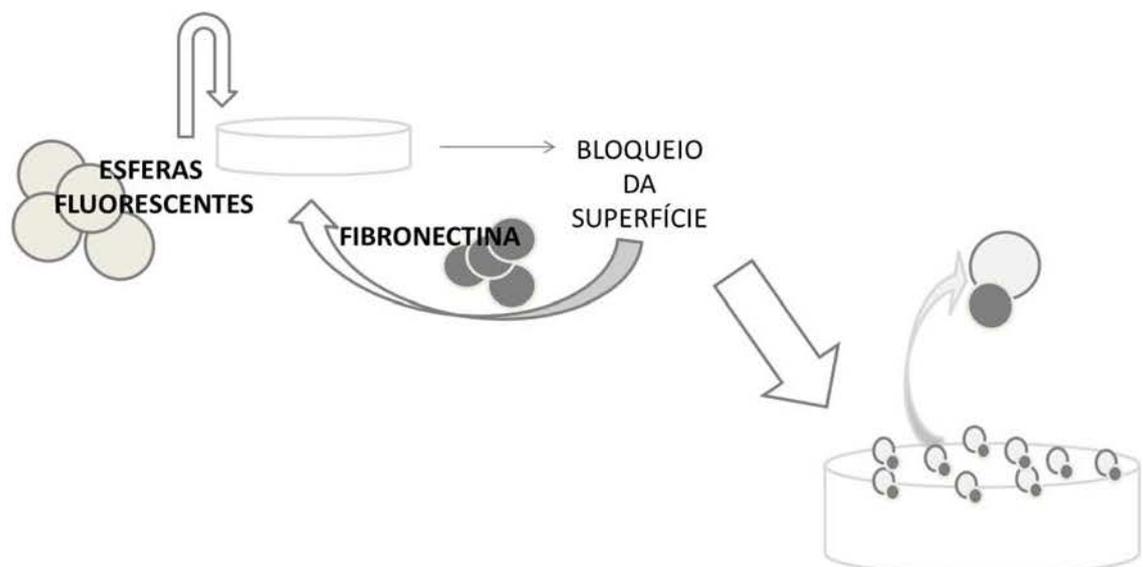


Figura 4: Esquema representativo da técnica. Através do bloqueio da superfície da placa, a fibronectina adicionada ao final do processo encontra pontos para adesão apenas sobre as esferas fluorescentes previamente adicionadas.

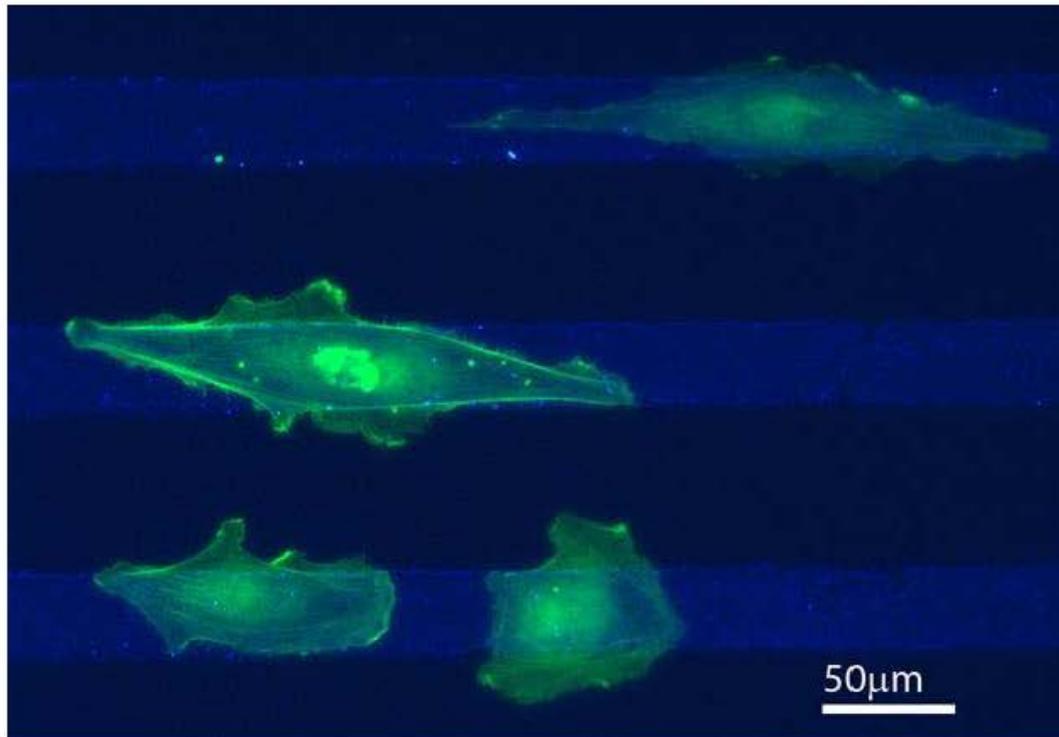


Figura 5: Indução de polarização – listras de fibronectina. Células endoteliais (HUVECs) expressando actina com marcação fluorescente (em verde) aderidas ao substrato de silicone (com rigidez de 17 kPa), sobre as listras de fibronectina com marcação fluorescente (em azul)



Figura 6: Co-localização das esferas carboxiladas com fibronectina. Esferas e proteína (fibronectina) foram marcadas, por marcadores com emissões de fluorescência distintas, para detecção de localização na placa. Em A, as imagens individuais obtidas (Esferas Carboxiladas e Fibronectina), processadas no programa Image J, para obtenção da sobreposição de ambas (Sobreposição) . Em B, frações de cada imagem em maior aumento.