

Escola Superior São Francisco de Assis
Curso de Graduação em Biomedicina

Luis Fernando Gomes dos Santos
Yasmin Moraes Barbosa

**Investigação da influência da glicoproteína fibronectina na linhagem de
Fibroblastos L-929**

Santa Teresa
2024

Luis Fernando Gomes dos Santos

Yasmin Moraes Barbosa

**Investigação da influência da glicoproteína fibronectina na linhagem de
Fibroblastos L-929**

Trabalho de conclusão de curso apresentado à Coordenação do curso de Biomedicina da Escola Superior São Francisco de Assis, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Biomedicina.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Sílvia Ramira Lopes Caldara.

Santa Teresa

2024

Luis Fernando Gomes dos Santos

Yasmin Moraes Barbosa

Investigação da influência da glicoproteína fibronectina na linhagem de Fibroblastos L-929

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Coordenação do curso de Biomedicina da Escola Superior São Francisco de Assis como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Bacharel em Biomedicina.

Aprovada em ___ de _____ de 2024.

BANCA EXAMINADORA

Prof^ª. Dr^ª. Sílvia Ramira Lopes Caldara
Escola Superior São Francisco de Assis

Prof. Dr. Gabriel Henrique Taufner
Escola Superior São Francisco de Assis

Dr^ª Alessandra Ferreira Gomes
Universidade Federal do Espírito Santo

Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”.

(Marthin Luther King)

AGRADECIMENTOS

À Deus;

Foste Tu que me ensinaste que nada é impossível, que perante qualquer dificuldade quem acredita no teu amor encontrará o caminho da superação. Assim, meu Deus, a Ti dedico e agradeço por mais esta conquista, pois em todo instante senti Tua mão me amparando e Teu amor me guiando.

Às nossas famílias;

Aos nossos pais e avós, que se sacrificaram, dedicaram e abdicaram de tempo e de projetos pessoais para que tivéssemos a oportunidade de estudar e de ter não só uma boa formação profissional, mas também pessoal. Se podemos nos orgulhar do lugar onde chegamos, certamente é porque tivemos vocês nos guiando e apoiando a todo momento.

À nossa orientadora;

Prof. Dra. Silvia Ramira Lopes Caldara, os seus ensinamentos foram muito além dos conteúdos do currículo. A sua missão vai muito além da missão de uma professora. Muito obrigado por todos os momentos, amizade, carinho, conselhos, dedicação e paciência. Você soube despertar nossa admiração de modo único, tornando-se uma gigantesca fonte de inspiração como profissional, amiga e mulher que és.

Aos nossos co-orientadores;

Aos Doutores Gabriel Henrique Taufner e Alessandra Ferreira Gomes pela parceria, incentivo, carinho, paciência e amizade construída no decorrer dessa caminhada. Ambos demonstraram enorme dedicação e esforço, incentivando-nos a dar o nosso melhor a cada etapa do projeto. Agradecemos também ao Doutorando Wedson Correa dos Santos, que nos acompanhou juntamente à Dr^a. Alessandra, nos acolhendo e fazendo o melhor para esclarecer as várias dúvidas que surgiram ao longo do processo.

À turma;

Aos colegas de turma, pelas amizades construídas e alegrias compartilhadas, assim como medos e mãos trêmulas que antecedem as apresentações dos seminários. Vocês foram essenciais para conclusão dessa jornada.

Ao LUCCAR;

Ao coordenador do laboratório da UFES, Prof Dr. Breno Valentim Nogueira, e aos demais pesquisadores envolvidos por todo apoio, permitindo o uso da estrutura e tornando possível o nosso treinamento. Devemos a vocês a conclusão desse projeto.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Variações de coloração do meio de cultura DMEM.....	13
Figura 2 - Representação da matriz extracelular, com fibras de colágeno entrelaçadas a proteoglicanos carregadores de carboidratos.....	17
Figura 3 - Modelos de cultura. (A) Modelo de cultura sobre biopolímero. As células são distribuídas em frascos de cultura cuja superfície foi recoberta com moléculas de matriz extracelular, como colágeno I e matrigel. (B) Modelo de cultura em molde de biopolímero natural ou sintético. As células são encapsuladas em gel de biopolímero, o que permite sua organização tridimensional mais fisiológica (C e D). Órgãos ou fragmentos de órgãos (E) e células (F) são cultivados em inserção na interface líquido-ar.....	16
Figura 4 - Proteínas da matriz extracelular e do citoesqueleto por imunofluorescência de fibroblastos gengivais. Marcação imunológica de fibronectina de fibroblastos gengivais após 7 dias de cultura com DMEM e FBS em diferentes concentrações. Os núcleos foram corados com DAPI (azul).....	19
Figura 5 - Microscopia evidenciando as células da linhagem L929 (10x).....	21
Figura 6 - Método de descongelamento das células. (A) Primeira etapa (banho-maria). (B) Segunda etapa (calor corporal).....	29
Figura 7 - Metodologia utilizada para realização do ensaio MTT.....	31
Figura 8 - Visualização das células em microscópio invertido Zeiss VERT A1 (10x), 48 horas após cultura. (A) Meio de cultura sem adição de fibronectina; (B) Meio contendo 50 µg/ml; (C) Meio contendo 100 µg/ml; (D) Meio contendo 200 µg/ml.....	32
Figura 9 - Representação das diferenças observadas entre a viabilidade celular dos diferentes grupos de cultivo.....	33

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Componentes e Elementos básicos utilizados em meio de cultura para células animais.....	14
Tabela 2 - Suplementação utilizada na preparação do meio de cultura.....	14
Tabela 3 - Meios de cultura que podem ser utilizados para cultivo de células.....	15

LISTA DE SIGLAS

pH	Potencial Hidrogeniônico
CO₂	Dióxido de Carbono
H₂CO₃	Ácido Carbônico
FB	Fibroblasto
PBS	Solução Salina Tamponada por Fosfato
FBS	Soro Fetal Bovino
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
DMEM	Meio de Eagle modificado por Dulbecco
DMSO	Dimetilsulfóxido
FN	Fibronectina
MEC	Matriz Extracelular
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
RPMI	Meio de cultura especializado (5A de McCoy modificado)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
2 REVISÃO DE LITERATURA	11
2.1 O PERCURSO EVOLUTIVO DA TECNOLOGIA DE CULTURA DE TECIDOS	
11	
2.2 CARACTERÍSTICAS DESEJÁVEIS A UM MEIO DE CULTURA PARA	
CRESCIMENTO E MANUTENÇÃO DE CÉLULAS	11
2.2.1 Substrato	11
2.2.2 Potencial Hidrogeniônico (pH)	12
2.2.3 Solução-Tampão	12
2.2.4 Concentração de Co ₂	12
2.3 TIPOS DE CULTURAS	14
2.4 AGENTES PROMOTORES DE CRESCIMENTO	16
2.4.1 Fibronectina	16
2.4.2 Soro Fetal Bovino (FBS)	19
2.5 LINHAGEM L-929	20
3 JUSTIFICATIVA	22
4 OBJETIVOS	23
4.1 OBJETIVO GERAL	23
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23
5 ARTIGO CIENTÍFICO	24
Investigação da influência da glicoproteína fibronectina na linhagem de Fibroblastos	
L-929	24
Resumo	24
Abstract	25
Introdução	27
Material e Métodos	29
Resultados	32
Discussão	34
Conclusão	37
6 PERSPECTIVAS FUTURAS	41
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	42

1 INTRODUÇÃO

A fibronectina é uma glicoproteína adesiva abundante e um dos principais componentes das membranas basais da matriz extracelular. Ela auxilia na migração, diferenciação e adesão celular e tem atraído a atenção de pesquisadores por conta de seu papel em processos biológicos cruciais. Nesse sentido, pesquisas focadas na influência da fibronectina em células específicas, como os fibroblastos, oferecem perspectivas importantes sobre os mecanismos subjacentes à dinâmica celular e tecidual (Bergami, 2022).

Os fibroblastos, por sua vez, são essenciais para a síntese e remodelação da matriz extracelular, garantindo a manutenção da integridade estrutural dos tecidos. A influência da fibronectina sobre essas células está ligada a critérios diversos, como a modulação da resposta inflamatória (Bitencourt, 2020). No entanto, as respostas específicas dos fibroblastos a essa glicoproteína ainda não foram completamente elucidadas, de modo que explorar essa interação em um contexto experimental pode revelar como a fibronectina afeta a proliferação, viabilidade e diferenciação dessas células, além de preencher lacunas relevantes na literatura científica.

Compreender essa interação em células da linhagem L-929, amplamente utilizada em pesquisas por suas semelhanças com células humanas, pode ser especialmente relevante no contexto da cicatrização e regeneração tecidual, uma vez que a fibronectina apresenta considerável potencial para otimizar a reparação de tecidos e o processo de cultivo celular.

Sob essa ótica, o presente estudo objetivou avaliar a influência da fibronectina no desenvolvimento de fibroblastos L-929. Os dados obtidos poderão esclarecer aspectos fundamentais dessa relação e, com isso, contribuindo para a criação de estratégias terapêuticas mais eficazes e para o aprimoramento da produção de biomateriais com aplicações relevantes na medicina regenerativa.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O PERCURSO EVOLUTIVO DA TECNOLOGIA DE CULTURA DE TECIDOS

Historicamente, as primeiras observações de cultivo celular remontam ao final do século XIX, quando Wilhelm Roux tentou condicionar células saudáveis da placa neural provenientes de embriões de frangos em soluções salinas por vários dias. No entanto, o marco definitivo nesse campo ocorreu no início do século XX, graças ao trabalho do pesquisador norte-americano Ross Granville Harrison (1870-1959), um renomado biólogo e anatomista (Rodríguez-Hernández *et al.*, 2014).

Em 1907, Harrison, interessado em compreender o funcionamento do Sistema Nervoso, realizou experimentos pioneiros que demonstraram a composição das fibras nervosas por meio de células nervosas isoladas. Esse feito foi crucial para o desenvolvimento da cultura de células, já que ele conseguiu manter fragmentos de tecido vivos e em crescimento por vários dias. Tal avanço representou um marco significativo no estudo de tecidos fora do organismo animal, permitindo que Harrison avaliasse suas hipóteses e contribuísse de forma substancial para o avanço da ciência (Rodríguez-Hernández *et al.*, 2014).

2.2 CARACTERÍSTICAS DESEJÁVEIS A UM MEIO DE CULTURA PARA CRESCIMENTO E MANUTENÇÃO DE CÉLULAS

O cultivo celular implica em inserir um ou mais tipos de células em um ambiente isolado, cujas propriedades físico-químicas sejam capazes de simular as condições fisiológicas de seu ambiente natural. Determinados atributos são fundamentais para garantir um meio de cultura sustentável e propício ao crescimento e manutenção de células animais, conforme descrito a seguir (Freshney, 2010; Brysek *et al.*, 2013):

2.2.1 Substrato

A maioria das células cultivadas *in vitro* se desenvolve formando uma monocamada sobre um substrato artificial. Esse substrato deve ser uniformemente distribuído para promover a adesão e a proliferação celular, além de permitir a secreção de fatores de adesão celular (Freshney, 2010).

Geralmente, os substratos mais comuns são o vidro e o plástico, em função de suas propriedades ópticas e regularidade. No entanto, fibras sintéticas (utilizadas na construção de suportes tridimensionais) e metais, como o aço inoxidável, são empregados para a transferência de amostras para microscopia eletrônica (Freshney, 2010).

Ross *et al.* (2012) indicaram que é possível melhorar as propriedades do substrato tratando sua superfície com produtos de colágeno da matriz extracelular, fibronectina e outras culturas celulares, bem como com matrizes extracelulares derivadas de tecidos cultivados e polímeros como poli-L-lisina ou matrizes comerciais.

2.2.2 Potencial Hidrogeniônico (pH)

A maioria das células prosperam em um pH entre 7,0 e 7,4. No entanto, é importante observar que esse intervalo pode variar consideravelmente a depender do tipo de células com que se trabalha (Chaudhry, 2009).

Buscando facilitar a análise do pH no ambiente microcelular, deve-se adicionar um indicador de pH ao meio de cultura. Um bom exemplo seria o como o vermelho de fenol, que apresenta uma coloração vermelho claro quando o pH está em 7,4; em pH 7,0, exibe cor alaranjada; em pH 6,5, possui coloração amarela e, com o aumento do pH para 7,8, reflete uma coloração vermelho escuro ou roxa (De Sousa; Gonçalves, 2020).

2.2.3 Solução-Tampão

A solução pode incluir dióxido de carbono dissolvido, que estabelece equilíbrio com os íons HCO_3^- , resultando na diminuição do pH. Embora a capacidade tampão do pH fisiológico seja limitada, o bicarbonato é frequentemente empregado devido à sua baixa toxicidade e aos benefícios nutricionais associados (Freshney, 2010).

2.2.4 Concentração de CO_2

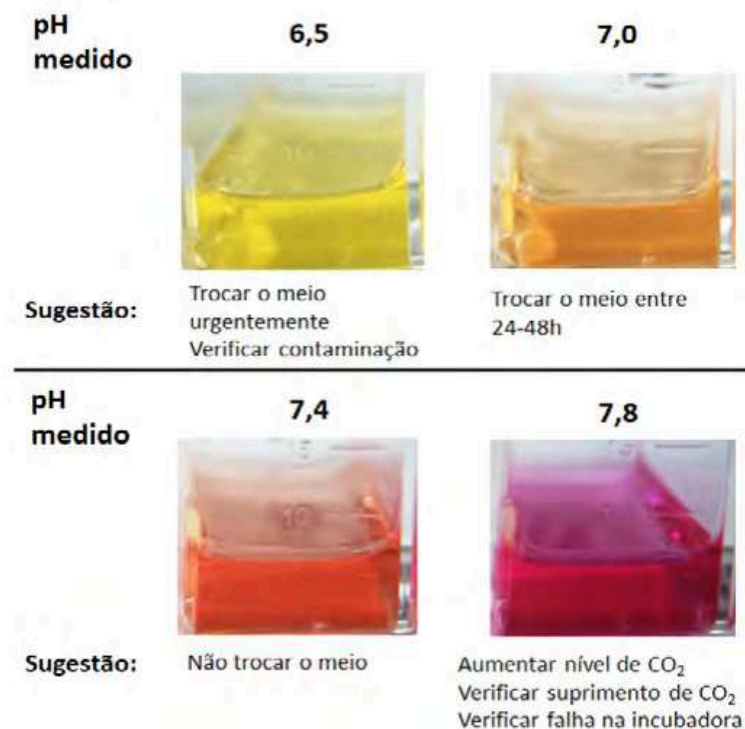
Atualmente é comum encontrar incubadoras de dióxido de carbono (CO_2) em laboratórios de microbiologia, uma vez que estas são empregadas no processo de cultivo de diferentes linhagens celulares (Freshney, 2010).

Um aspecto crucial a ser considerado no meio de cultura é a fase gasosa, já que boa parte das células necessitam de oxigênio para a respiração *in vitro*. Desse modo, entende-se que a presença de oxigênio se faz necessária, sendo que sua concentração varia de acordo com o tipo de cultura (Freshney, 2010).

É importante destacar que, para as culturas celulares, o CO_2 não está presente para servir como nutriente. Sua presença é relevante por seu papel na formação de ácido carbônico (H_2CO_3) através de reações que envolvem o sistema bicarbonato. Tais reações são essenciais para controle do pH, ponto fundamental no que diz respeito à criação de um ambiente propício ao desenvolvimento das células cultivadas. Na prática, portanto, a quantidade de CO_2 utilizada está relacionada à quantidade de bicarbonato de sódio presente no meio de cultura (De Sousa; Gonçalves, 2020).

Ademais, de acordo com de Sousa e Gonçalves (2020), podem ocorrer variações na coloração do meio DMEM em função do pH e da concentração de CO_2 . Abaixo seguem as alterações a serem observadas conforme ilustrado na figura 1.

Figura 1 - Variações de coloração do meio de cultura DMEM.



Fonte: De Sousa; Gonçalves (2020).

2.3 TIPOS DE CULTURAS

O cultivo de células demanda de meios nutritivos que possam replicar as condições ideais para o crescimento (Tabela 1). Muitas vezes, os protocolos para preparo dos mesmos contam com etapas de adição de suplementos (Tabela 2), além do fato de que tais meios devem ser substituídos constantemente visando garantir uma entrega contínua dos nutrientes essenciais. Deve-se, também, garantir um ambiente asséptico de modo a evitar contaminações (De Sousa; Gonçalves, 2020).

Tabela 1 - Componentes e Elementos básicos utilizados em meio de cultura para células animais

Componentes Básicos para manutenção celular em meio de cultura	Elementos e compostos aplicáveis em meio de cultura
H ₂ O ₂	Destilada ou desmineralizada.
Fonte de Carbono	Glicose
Elementos inorgânicos	Sais: KCl, NaCl, MgCl ₂ , CaCl ₂ , 6H ₂ O, NaH ₂ PO ₄ , NaHCO ₃
Aminoácidos	Arginina, Cistina, Fenilalanina, Glutamina, Istidina, Isoleucina, Leucina, Lisina, Metionina, Treonina, Triptofano, Tirosina e Valina.
Vitaminas	Biotina, ácido fólico, colina, nicotinamida, ácido pantotênico, piridoxal, riboflavina, tiamina.
Para controle fúngico ou de diferentes contaminações	Antibióticos (Penicilina e Estreptomicina)
Indicador de pH	Vermelho fenol (pH 7,2-7,4)
Soro	Soro animal de diferentes origens. Ex: soro fetal Bovino
Na ausência de soro	Proteínas: Insulina, Transferrinas e Fatores específicos de crescimento

Adaptado de: Heggendorn (2020).

Tabela 2 - Suplementação utilizada na preparação do meio de cultura.

Suplementos Utilizados		
Penicilina	2P-ácido ascórbico	Fungizone
Estreptomicina	Glutamina	Gentamicina
L-glutamina	Anfotericina	PDGF
Ácido L-ascórbico	AA	Glutamax
Insulina	Dexametasona	EGF

Selênio	Vitamina C	hLIF
Transferrina	IGF	Claritromicina
hPDGF BB	β -ME	CDLC
LA-BSA	Ciprofloxacino	Canamicina
Glicose	Piruvato de sódio	Suplemento de crescimento de células mesenquimais
β FGF	Hepes	BSA

Adaptado de: Ferrúa *et al.* (2017).

Em suma, os meios de cultura possuem substâncias líquidas que são fontes de nutrientes essenciais para o crescimento, divisão e multiplicação celular. Sua composição pode conter sais inorgânicos, uma quantidade equilibrada de vitaminas, aminoácidos essenciais e não essenciais, proteínas e glicose, além de vitaminas e um indicador de pH. Nesse sentido, sabe-se que a composição de meios como os da tabela 3 devem ser pensadas com base nas espécies moleculares e necessidades nutricionais das linhagens celulares que se deseja cultivar (De Sousa; Gonçalves, 2020).

Tabela 3 - Meios de cultura que podem ser utilizados para cultivo de células.

Meios de Cultura		
α -MEM (α -meio essencial mínimo)	A-DMEM (meio Eagle modificado por Dulbecco avançado)	High-glucose DMEM
DMEM (meio Eagle modificado por Dulbecco)	DMEM/Ham'sF12 (meio Eagle modificado por Dulbecco/Ham's F12)	Low glucose DMEM and MCDB-201
DMEM/F12 (meio Eagle modificado por Dulbecco/F12)	EBM2 (meio basal de células endoteliais 2)	NH stem cell expansion
DMEM-KO (Meio Eagle modificado por Dulbecco – KnockOut)	MCDB-201	Phenol red free L-DMEM
Low glucose DMEM	MEM-Earle (meio mínimo essencial - Earle)	Mega Cell
MEM (meio essencial mínimo)	BME (meio basal Eagle)	MCM (meio completo MesenCult)

MSCM (meio de células-tronco mesenquimais)	Meio RPMI (5A de McCoy modificado)	
--	------------------------------------	--

Adaptado de: Ferrúa *et al.* (2017).

2.4 AGENTES PROMOTORES DE CRESCIMENTO

As citocinas, moléculas complexas e fascinantes, desempenham um papel crucial na orquestração da resposta imune e na homeostase do organismo. Sua atuação vai além da simples comunicação entre células, moldando a defesa contra patógenos, a reparação de tecidos e a regulação de diversos processos fisiológicos (De Oliveira, 2011).

Tais estruturas são polipeptídeos ou glicoproteínas extracelulares, com um tamanho variando entre 8 e 30 kDa. Diversas células, incluindo células do sistema imune (leucócitos), células endoteliais, fibroblastos e células epiteliais, são capazes de produzir citocinas. Essa produção é desencadeada por diversos estímulos, tais como patógenos, produtos microbianos, moléculas de estresse e danos teciduais (De Oliveira, 2011).

Devido ao seu papel como reguladores essenciais da função celular, afetando praticamente todos os aspectos da fisiologia do tecido, bem como sua implicação em processos patológicos, a sinalização mediada por essas moléculas é regulada por uma variedade de mecanismos. A maioria dessas moléculas é produzida na forma de precursores inativos, que requerem clivagem para liberar a forma madura e ativa, capaz de interagir com o receptor (Da Silva, 2019).

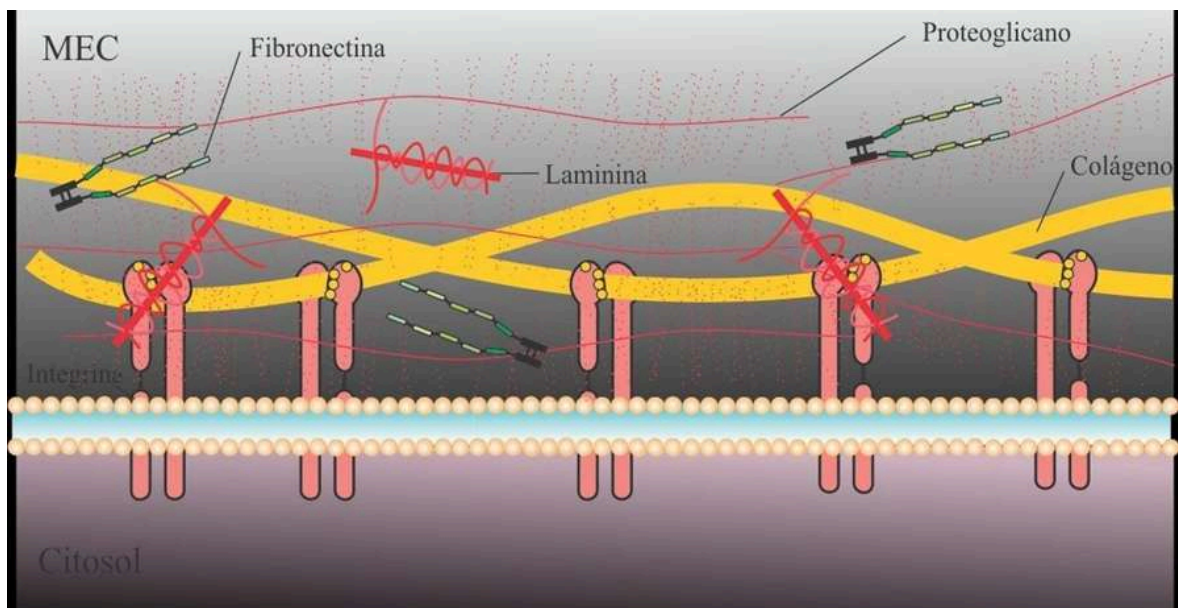
2.4.1 Fibronectina

A fibronectina consiste em uma grande molécula sintetizada pelos fibroblastos que residem no estroma tecidual, sendo uma das glicoproteínas multi-domínio presentes em maior quantidade na Matriz Extracelular (MEC), podendo ser encontradas também nos fluidos corporais e membranas basais (Londono; Badylak, 2015; Taufner, 2023). Essa glicoproteína pode se ligar às integrinas ou estabelecer ligações com outras moléculas da matriz, como o colágeno (Parreira *et al.*, 2015).

Como glicoproteína adesiva, a fibronectina interage com diversas moléculas proteicas e não proteicas, como gelatina, colágenos, heparina e fibrina, podendo adquirir conformações variadas, as quais resultam na divisão destas em celulares e plasmáticas (Bergami, 2022). Ademais, ligações estabelecidas com proteínas integrais de membrana (integrinas) permitem um contato íntimo e necessário aos processos de sinalização, proliferação e adesão celular (Taufner, 2023).

No que diz respeito à MEC (Figura 2), sabe-se que se trata da porção acelular dos tecidos, composta por diversos componentes, incluídos fatores solúveis, como os fatores de crescimento, moléculas insolúveis, como as proteínas especializadas (fibrilina, laminina e fibronectina), as proteínas estruturais (como colágeno e elastina) e os complexos de glicoproteínas, como os proteoglicanos (Parreira *et al.*, 2015).

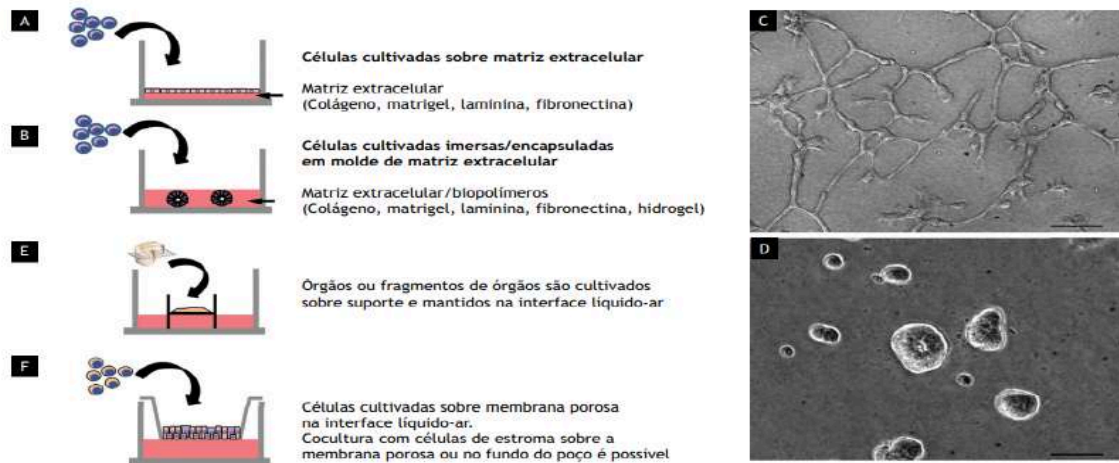
Figura 2 - Representação da Matriz Extracelular, com fibras de colágeno entrelaçadas a proteoglicanos carregadores de carboidratos



Fonte: Parreira *et al.* (2015).

No que se refere ao papel da fibronectina na formação da matriz extracelular (Figura 3), sabe-se que desempenha diversas funções, incluindo migração, adesão, proliferação e morfologia celular, bem como a cicatrização de feridas. Durante o período embrionário, é crucial para o desenvolvimento de muitos tecidos e órgãos, além de desempenhar papéis na coagulação sanguínea, defesa e metástase (Klimek; Ginalska, 2020).

Figura 3 - Modelos de cultura. (A) Modelo de cultura sobre biopolímero. As células são distribuídas em frascos de cultura cuja superfície foi recoberta com moléculas de matriz extracelular, como colágeno I e matrigel. (B) Modelo de cultura em molde de biopolímero natural ou sintético. As células são encapsuladas em gel de biopolímero, o que permite sua organização tridimensional mais fisiológica (C, D). Órgãos ou fragmentos de órgãos (E) e células (F) são cultivados em inserção na interface líquido-ar.).



Fonte: Da Costa (2018).

O gene da fibronectina possui três regiões onde ocorre splicing alternativo, o que resulta na formação de 20 variantes diferentes (NCBI, 2022). Estudos realizados por Wang et al. (2013) no coração de peixe-zebra, organismo que apresenta capacidade regenerativa mesmo na fase adulta, demonstraram a importância da fibronectina nesse processo.

No que diz respeito aos hepatócitos, células do fígado, estudos realizados por Deschênes, Valet e Marceau (1980) mostram que essas células têm alta afinidade por placas revestidas com fibronectina, o que favorece a síntese de Ácido Desoxirribonucleico (DNA) e sua migração. Além disso, segundo Bergami (2022), os hepatócitos são capazes de sintetizar fibronectina e os níveis plasmáticos dessa proteína se correlacionam com o grau de regeneração hepática, sendo úteis na detecção desse processo.

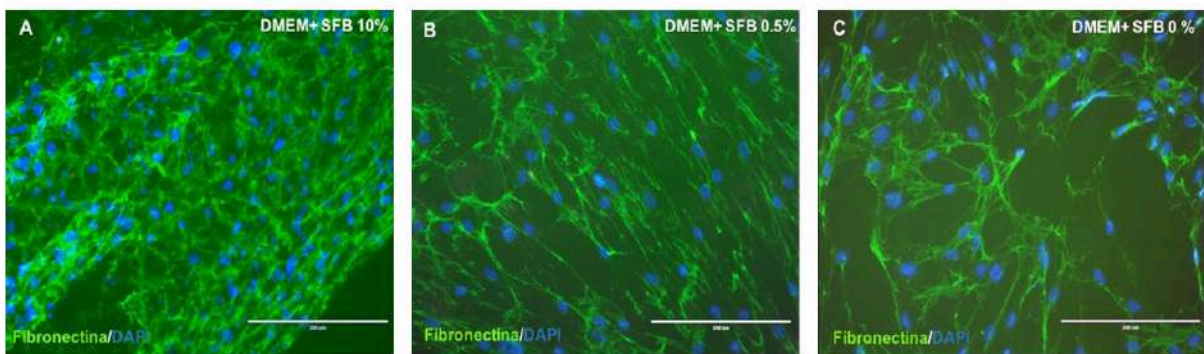
Esses achados na literatura destacam a influência benéfica da fibronectina sobre os hepatócitos, sugerindo que essas células possam servir como utilização no enriquecimento de culturas em estudos de proliferação celular, fazendo desta uma

molécula de interesse em função de sua importância na regeneração e proliferação celular (Bergami, 2022).

2.4.2 Soro Fetal Bovino (FBS)

Segundo Nowatzki (2023), ao final dos anos 50 o Soro Fetal Bovino (SFB ou FBS do inglês "*Fetal Bovine Serum*") começou a ser utilizado com a finalidade de estimular o crescimento celular. Com o passar do tempo, no entanto, percebeu-se que o mesmo também apresentava componentes essenciais para a adesão, proliferação e manutenção das células (Figura 4).

Figura 4 - Proteínas da matriz extracelular e do citoesqueleto por imunofluorescência de fibroblastos gengivais. Marcação imunológica de fibronectina de fibroblastos gengivais após 7 dias de cultura com DMEM e FBS em diferentes concentrações. Os núcleos foram corados com DAPI (azul).



Adaptado de: Simancas-Escorcía; Vergara-Hernández; Díaz-Caballero (2018).

De maneira simplificada, pode-se dizer que o FBS consiste na porção líquida do sangue coagulado, sendo desprovido de células, fibrina e fatores de coagulação durante o processo de coleta. Além disso, estima-se que mais de 4000 metabólitos estejam presentes em sua composição, tornando-o uma fonte abundante de todos os elementos adicionais necessários para o cultivo celular (Nowatzki, 2023).

É importante ressaltar que, apesar da existência de outros soros animais, o Soro Fetal Bovino é mais utilizado em função de seu baixo teor de imunoglobulinas e proteínas do sistema complementar. Nesse sentido, seu uso proporciona um sistema de cultivo ideal para uma ampla gama de tipos celulares, cujo crescimento geralmente ocorre de forma rápida e uniforme, protegendo as células contra grandes

variações de pH e ação de proteases ou outros agentes que poderiam afetar a camada única de células aderentes (Nowatzki, 2023).

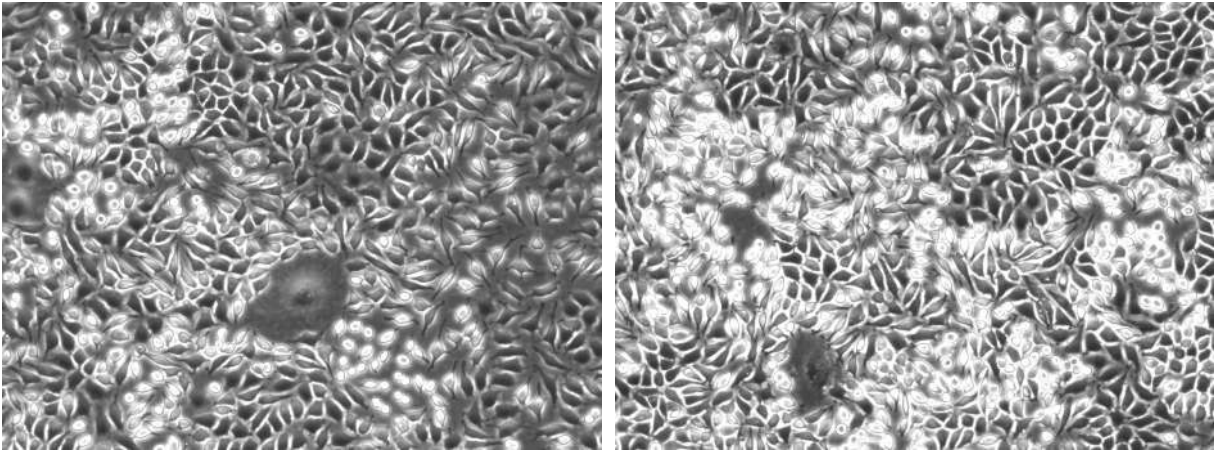
2.5 LINHAGEM L-929

A linhagem de fibroblastos L-929 é amplamente utilizada como referência em testes de citotoxicidade para biopolímeros (Serrano *et al.*, 2004). A linhagem L-929 é um subclone da linhagem parental L, estabelecida por W. R. Earle em 1940, sendo uma das primeiras a alcançar cultivo contínuo (Cytion, 2024).

Os fibroblastos são células fundamentais nos tecidos conjuntivos, responsáveis por produzir e manter a matriz extracelular, que oferece suporte estrutural e bioquímico. Em situações de lesão ou dano tecidual, eles são ativados para migrar até o local afetado, onde produzem colágeno e outras proteínas da matriz extracelular, promovendo a cicatrização e recuperação estrutural do tecido. (Pan; Jiang; Chen, 2006). Durante o processo de reparação, os fibroblastos participam da fase de remodelamento, na qual reorganizam a matriz para restaurar a integridade funcional e estrutural do tecido, além de regular a resposta inflamatória e promover a substituição de células danificadas (Baxter *et al.*, 2002; Rae, 1981).

As células L-929 possuem morfologia fusiforme e fibroblástica, além de crescerem de forma aderente à cultura. Elas são amplamente empregadas em ensaios de citotoxicidade e são um modelo padrão para avaliar a biocompatibilidade de materiais e os efeitos tóxicos de diversas substâncias. Essa característica as torna particularmente úteis nas áreas de biomateriais e engenharia de tecidos, onde é essencial garantir que os materiais utilizados sejam seguros e compatíveis com o organismo (Cytion, 2024).

Figura 5 - Microscopia evidenciando as células da linhagem L-929 (10x).



Fonte: Cytion 2024.

3 JUSTIFICATIVA

A fibronectina, uma glicoproteína presente na matriz extracelular (MEC), tem se destacado como um potencial promotor de proliferação celular, especialmente no contexto do desenvolvimento de células destinadas à fabricação de biomateriais.

Os fibroblastos L-929, por sua vez, constituem uma linhagem amplamente utilizada em estudos de culturas celulares devido à sua capacidade de representar com precisão o comportamento de fibroblastos em diferentes contextos biológicos. A especificidade dessas células torna a investigação particularmente relevante para o avanço de protocolos que integram a fibronectina em aplicações na medicina regenerativa e na engenharia de tecidos.

Sob essa ótica, o presente estudo busca responder a uma questão central: até que ponto a fibronectina pode influenciar o crescimento celular e como ela afeta o desenvolvimento e funções dos fibroblastos L-929? Ao abordar essa problemática, a pesquisa contribui para o entendimento de mecanismos celulares subjacentes e abre caminho para inovações no contexto da produção de biomateriais e implementação de terapias avançadas.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a influência da glicoproteína fibronectina no cultivo de células da linhagem de Fibroblastos L-929.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Testar diferentes protocolos de suplementação em grupos de culturas para determinar o mais eficaz na promoção da adesão e proliferação celular;
- Otimizar as condições de incubação da fibronectina para maximizar sua capacidade de promover propriedades regenerativas em células cultivadas;
- Investigar diferentes concentrações de fibronectina e as suas respectivas influências sobre a linhagem celular L-929.

5 ARTIGO CIENTÍFICO

Artigo Original

Investigação da influência da glicoproteína fibronectina na linhagem de Fibroblastos L-929

MORAES Y. B¹; SANTOS L. F. G¹; GOMES A. F²; NOGUEIRA B. V²; TAUFNER G. H³; LOPES S. R. C³

¹*Graduandos em Biomedicina, Escola Superior São Francisco de Assis, Santa Teresa, Brazil*

²*Pesquisadores da Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, Brazil*

³*Docentes do Curso de Biomedicina, Escola Superior São Francisco de Assis, Santa Teresa, Brazil*

Resumo

A área da engenharia de tecidos está em constante evolução, visando o desenvolvimento de estratégias inovadoras para regenerar tecidos danificados. Nesse sentido, sabe-se que a produção de biomateriais é essencial no que tange à promoção do crescimento e diferenciação celular. Dentre as glicoproteínas que compõem a MEC, a fibronectina possui destaque por sua capacidade de influenciar adesão, migração e proliferação celular, sendo amplamente utilizada em pesquisas relacionadas ao comportamento celular e à fabricação de biomateriais. O presente estudo investigou a influência da fibronectina na proliferação de fibroblastos L-929, visando padronizar um protocolo de cultivo celular. Para isso, fibroblastos da linhagem L-929 foram cultivados em meio de cultura enriquecida com concentrações distintas de fibronectina (50, 100 e 200 µg/ml) e comparados a um grupo controle sem suplementação da glicoproteína. A pesquisa foi conduzida a partir de células disponibilizadas pelo Laboratório de Ultraestrutura Celular Carlos Alberto Redins (LUCCAR), vinculado à Universidade Federal do Espírito Santo. Para a avaliação dos dados, foi utilizado o software *GraphPad Prism* e os testes ANOVA e Tukey, para comparar as médias dos grupos e identificar diferenças estatisticamente significativas entre os pares. As culturas foram monitoradas por microscopia invertida para avaliar o crescimento celular durante 48 horas. Todos os grupos apresentaram crescimento celular satisfatório, com boa viabilidade, e o grupo suplementado com 100 µg/ml de fibronectina demonstrou aumento significativo na proliferação celular em comparação ao grupo controle, conforme evidenciado pelos

testes estatísticos. As concentrações de 50 e 200 $\mu\text{g/ml}$ não apresentaram diferenças estatísticas significativas. Tais achados destacam o potencial da fibronectina como um promotor de crescimento celular, em especial a concentração de 100 $\mu\text{g/ml}$, que se mostrou promissora para a otimização de protocolos de cultivo aplicados à fabricação de biomateriais. Por outro lado, a ausência de significância estatística nas concentrações de 50 e 200 $\mu\text{g/ml}$ sugere que o efeito da fibronectina segue uma relação dose-dependente que pode variar conforme o contexto experimental. Constatamos que a suplementação do meio de cultivo com 100 $\mu\text{g/ml}$ de fibronectina é eficaz para potencializar a proliferação de fibroblastos L-929, contribuindo para o aprimoramento de estratégias baseadas em biomateriais na engenharia de tecidos. O estudo abre caminho para futuras investigações sobre a interação entre glicoproteínas e células em diferentes contextos de cultivo, promovendo avanços significativos no desenvolvimento de biomateriais funcionalizados.

Palavras-chave: Engenharia de tecidos, Adesão celular e Fibronectina.

Abstract

The field of tissue engineering is constantly evolving, aiming to develop innovative strategies for regenerating damaged tissues. In this context, the production of biomaterials is essential for promoting cell growth and differentiation. Among the glycoproteins that make up the extracellular matrix (ECM), fibronectin stands out for its ability to influence cell adhesion, migration, and proliferation, and is widely used in research related to cellular behavior and biomaterial development. This study aims to investigate fibronectin's influence on the proliferation of L-929 fibroblasts, aiming to standardize a cell culture protocol. L-929 fibroblasts were cultured in a medium enriched with different concentrations of fibronectin (50, 100, and 200 $\mu\text{g/ml}$) and compared to a control group without glycoprotein supplementation. The research utilized cells provided by the Carlos Alberto Redins Laboratory of Cellular Ultrastructure (LUCCAR), affiliated with the Federal University of Espírito Santo. Data were evaluated using GraphPad Prism software, employing ANOVA and Tukey's test to compare group means and identify statistically significant differences. Cultures were monitored through inverted microscopy to assess cell growth over 48 hours. All groups demonstrated satisfactory cell growth and viability. The group supplemented

with 100 µg/ml of fibronectin showed a significant increase in cell proliferation compared to the control group, as confirmed by statistical analysis. In contrast, the 50 and 200 µg/ml concentrations did not show statistically significant differences. These findings emphasize the potential of fibronectin as a cell growth promoter, particularly at the concentration of 100 µg/ml, which shows promise for optimizing cell culture protocols in biomaterial production. The absence of significant effects at 50 and 200 µg/ml suggests a dose-dependent relationship that varies with experimental conditions. We found that supplementing culture medium with 100 µg/ml of fibronectin effectively enhances L-929 fibroblast proliferation, contributing to improved biomaterial strategies in tissue engineering. This study paves the way for future investigations into glycoprotein-cell interactions across various culture contexts, fostering significant advancements in biomaterial development.

Keywords: Tissue Engineering, Cell Adhesion, and Fibronectin.

Introdução

A engenharia de tecidos têm se destacado como uma área inovadora e promissora na pesquisa científica, possibilitando o desenvolvimento de novas abordagens para a reparação e regeneração de tecidos danificados. Uma das estratégias emergentes consiste na utilização de biomateriais, desenvolvidos com o intuito de promover o crescimento e diferenciação celular.

Tais processos geram uma demanda crescente por técnicas de cultivo celular mais eficazes e otimizadas, já que o desenvolvimento de protocolos que potencializam a proliferação celular impactam significativamente a qualidade, tanto dos processos quanto do produto final (Alves, 2024). Nesse contexto, nota-se que as glicoproteínas matriciais exercem um papel crucial no comportamento celular e, dentre elas, a fibronectina (FN) tem sido amplamente estudada por sua influência na adesão, migração e proliferação celular (Taufner, 2023).

A FN pode ser descrita como uma glicoproteína multifuncional distribuída por todo o organismo. No sangue, encontra-se em sua forma solúvel, enquanto nos tecidos aparece na forma insolúvel, integrando a matriz extracelular (MEC) e estruturas como a membrana basal (To; Midwood, 2011).

Sua importância está ligada a uma ampla gama de processos celulares e teciduais. Na adesão celular, por exemplo, ela media interações entre as células e a MEC através de receptores específicos, como as integrinas (Campbell; Humphries, 2011; Wickström; Radovanac; Fässler, 2011).

Além disso, ela contribui para a diferenciação celular, auxiliando na modulação de fenótipos celulares em diferentes contextos biológicos. No processo de reposição tecidual, a FN é crucial para a organização da matriz provisória, promovendo a migração e a promoção celular em resposta a lesões. Também exerce funções importantes na fagocitose, facilitando a remoção de bactérias, detritos celulares e complexos antígeno-anticorpo pelo sistema imunológico (Williams *et al.*, 2014).

No contexto hemostático, a glicoproteína serve como substrato para enzimas do sistema fibrinolítico e da coagulação, destacando seu papel em processos de cicatrização e remodelação tecidual. Essas características fazem da FN uma

molécula central em diversas áreas de pesquisa, possuindo considerável potencial para desenvolvimento de novas aplicações biomédicas, sobretudo no que diz respeito às terapias regenerativas e fabricação de biomateriais (Parise, 2004).

Destaca-se, ainda, que a mesma desempenha um papel crítico na fase inicial da cicatrização de feridas, sendo fundamental para a formação do microambiente ideal. Durante o referido processo, ela facilita a agregação plaquetária e contribui para a formação do coágulo sanguíneo, que não apenas interrompe o sangramento, mas também serve como matriz temporária para as células envoltórias (Gurtner, 2008).

Em suma, a mesma age como um "molde" estrutural, guiando a migração e adesão de fibroblastos, queratinócitos e outras células essenciais. Além disso, ela regula a organização inicial da matriz extracelular, favorecendo o depósito de colágeno e outros componentes necessários à formação de novos tecidos (Gurtner, 2008).

Pode-se dizer, portanto, que a fibronectina é um componente fundamental da MEC e atua como uma ponte entre as células e o ambiente circundante. Desse modo, ao variar a concentração da glicoproteína em um contexto experimental, é possível determinar a quantidade mínima necessária para promover a adesão celular, bem como identificar um possível efeito de saturação dos receptores. Tais informações, por sua vez, são cruciais para entender como as células são ancoradas e organizadas em tecidos, processos que configuram-se essenciais para o desenvolvimento embrionário, reparo de tecidos e resposta a ferimentos.

Sob essa ótica, o presente estudo teve como objetivo contribuir para a elaboração de um protocolo otimizado de cultivo de fibroblastos da linhagem L-929, amplamente utilizados em pesquisas por seu comportamento similar ao de células humanas. Com isso, espera-se estabelecer um ponto de partida para futuras pesquisas na área e gerar um impacto positivo no que tange ao aprimoramento das técnicas de cultura e produção de biomateriais.

Material e Métodos

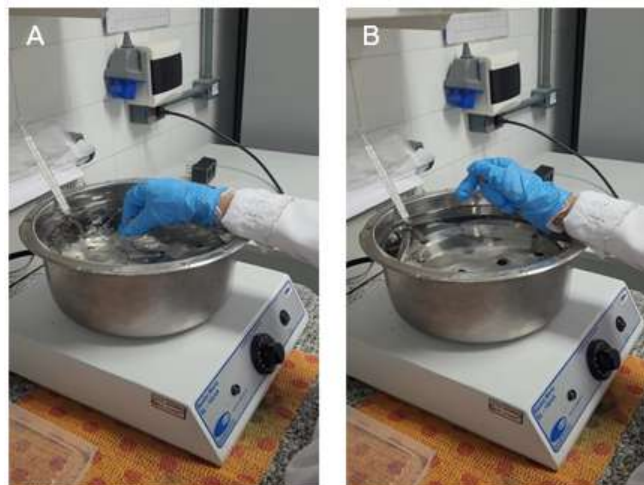
O presente estudo consistiu em uma pesquisa experimental cujo objetivo foi desenvolver um protocolo de cultivo celular, padronizando a aplicação da glicoproteína fibronectina como um agente promotor de crescimento. A abordagem visa avaliar a melhoria do desenvolvimento de fibroblastos destinados à fabricação de biomateriais, valendo-se de uma metodologia que busca potencializar a adesão e proliferação das células, permitindo sua adaptação para ambientes específicos e aprimorando sua funcionalidade.

As culturas foram realizadas com fibroblastos da linhagem L-929 (provenientes de camundongos), selecionados em função de sua relevância para estudos voltados à adesão e eficácia dos processos.

Obtenção e Preparo das Células

Para realizar o descongelamento das células L-929 as mesmas foram retiradas do freezer a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ e posteriormente levadas a um banho-maria com temperatura aproximada de $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Nesta etapa foi utilizada uma técnica em que o criotubo é levado ao banho-maria e logo retirado e segurado com a mão fechada por alguns segundos. Esse processo se repete várias vezes até o descongelamento completo (Figura 6).

Figura 6 - Método de descongelamento das células. (A) Primeira etapa (banho-maria); (B) Segunda etapa (calor corporal).



Fonte: Acervo pessoal do autor.

A seguir, o conteúdo do criotubo foi transferido para um tubo de centrifugação contendo 10 ml de meio DMEM, visando a inativação do DMSO (dimetilsulfóxido), utilizado no congelamento das células como crioprotetor. Logo, prosseguiu-se com a centrifugação a 1.500 g por 5 min, descartando o sobrenadante ao final.

Cultura de Células

As células da linhagem L-929 foram ressuspensas em meio de cultura DMEM, sendo posteriormente transferidas para placas de 96 poços contendo aproximadamente 5 mil células por poço. Em seguida, foram incubadas por 48 horas em condições controladas com temperatura de 37°C e ambiente de 5% CO₂.

Para essa etapa, foram adicionadas diferentes concentrações de fibronectina, buscando avaliar a influência da glicoproteína no que tange ao crescimento dos fibroblastos utilizados. Nesse sentido, parte dos poços continham concentrações de 50, 100 e 200 µg/ml de fibronectina, enquanto outros permaneceram sem a adição da mesma, correspondendo ao grupo controle.

Análise de viabilidade celular

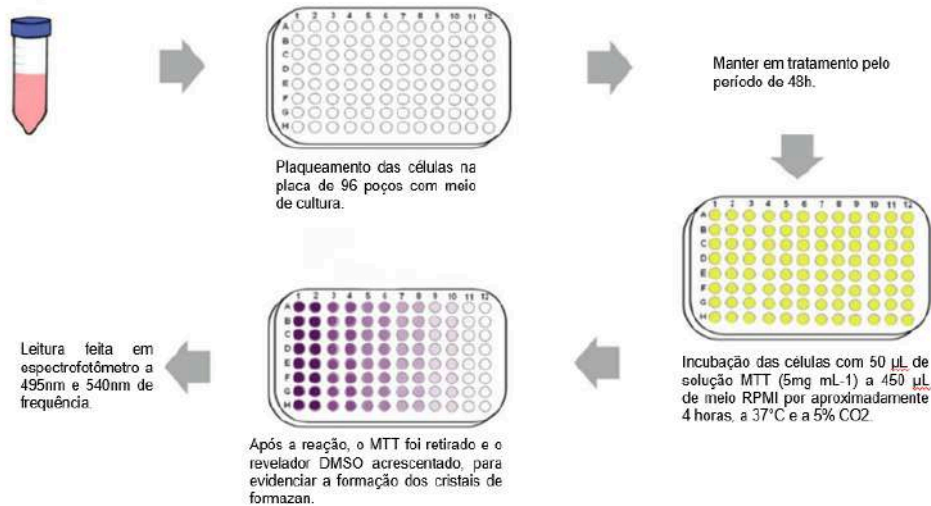
Apesar da variedade de testes colorimétricos existentes para determinação da citotoxicidade de agentes químicos, o teste de MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina) é um dos mais utilizados em função de sua sensibilidade para detecção de citotóxicos (Magalhães; Thá; Leme, 2018).

O teste de MTT avalia a viabilidade celular por meio da metabolização de glicídeos, que reflete a atividade de enzimas desidrogenases mitocondriais. Nesse sentido, a viabilidade mitocondrial e, conseqüentemente, a viabilidade das células é quantificada pela metabolização/redução do sal de tetrazólio (MTT) a formazan pelas já mencionadas enzimas. Dessa forma, pode-se dizer que a redução do MTT à formazan é diretamente proporcional à atividade mitocondrial e à viabilidade celular (Magalhães; Thá; Leme, 2018).

O protocolo para realização do teste de citotoxicidade (MTT) foi iniciado 48 horas após o tratamento (Figura 7). Para isso, foram adicionados 50 µL de solução de MTT a 5 µg/ml em cada um dos poços, juntamente com 450 µL de meio de cultura RPMI

1640. Feito isso, as placas foram novamente incubadas em condições controladas, com temperatura de 37°C e atmosfera de 5% de CO₂, por um período de aproximadamente 4 horas.

Figura 7 - Metodologia utilizada para realização do ensaio MTT.



Adaptado de: Magalhães; Thá; Leme (2018).

Em seguida, o meio contendo MTT foi cuidadosamente removido, de modo a evitar a perturbação dos cristais de formazan presentes no fundo dos poços. Logo, foi adicionado dimetilsulfóxido (DMSO) para solubilizar os cristais de formazan (reagente revelador), transformando-os em uma solução corada que pode ser quantificada. Por fim, foi realizada a leitura das absorbâncias em um espectrofotômetro com comprimentos de onda de 490 nm e 590 nm. Vale lembrar que a escolha dessas frequências se deve à coloração produzida após a reação, que varia entre um azul bem claro e um roxo intenso.

Análise estatística

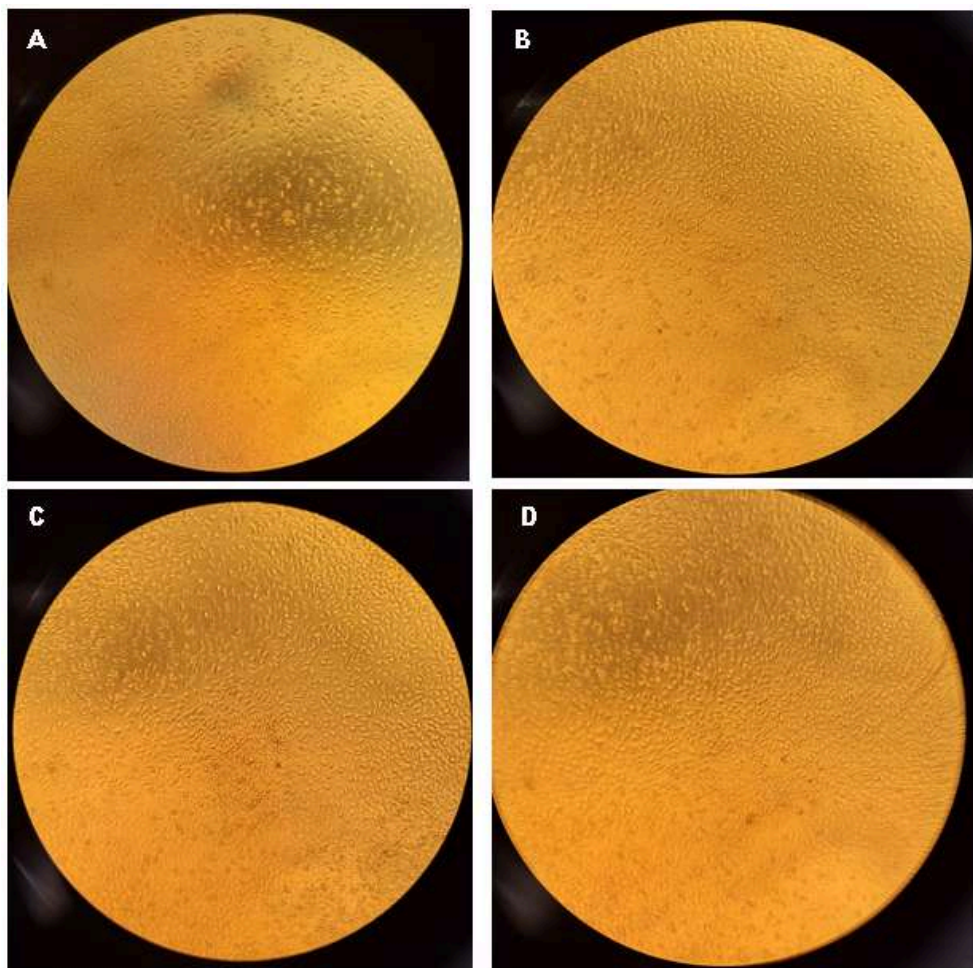
Os dados obtidos foram analisados e plotados em gráficos por meio do software *GraphPad Prism 8.4.3* (©San Diego, Califórnia). Ademais foi realizado o teste estatístico ANOVA (comparação de médias entre 3 ou mais grupos), visando comprovar se as diferenças entre as médias encontradas são reais ou ao acaso, e o teste de Tukey (comparações múltiplas), que identifica quais pares de grupos apresentam diferenças estatísticas significativas entre suas médias, ajustando o valor de *p* para evitar falsos positivos.

Resultados

Cultura de Células

As células cultivadas cresceram no decorrer das 48 horas, sendo posteriormente analisadas em microscópio invertido (Zeiss VERT A1). Com isso, foi possível comparar visualmente os resultados dos diferentes grupos experimentais, conforme mostrado na figura 8. A análise das imagens demonstrou que as células se aderiram e proliferaram de forma eficiente em todos os grupos testados, apresentando completa confluência. Em seguida, a viabilidade celular foi confirmada pelo ensaio de MTT, indicando que as mesmas estavam metabolicamente ativas.

Figura 8 - Visualização das células em microscópio invertido Zeiss VERT A1 (10x), 48 horas após cultura. (A) Meio de cultura sem adição de fibronectina; (B) Meio contendo 50 $\mu\text{g/ml}$; (C) Meio contendo 100 $\mu\text{g/ml}$; (D) Meio contendo 200 $\mu\text{g/ml}$.

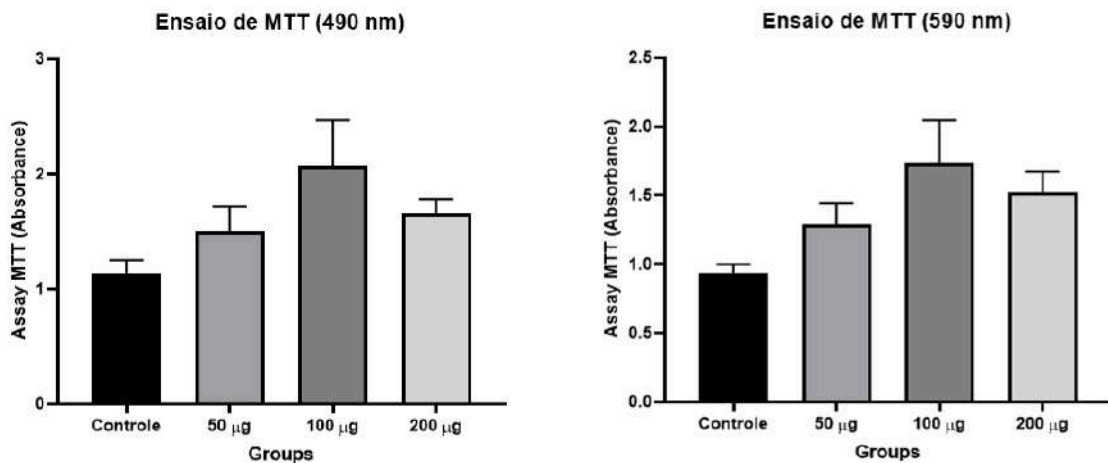


Fonte: Acervo pessoal do autor.

Viabilidade Celular e Análises Estatísticas

Constatou-se que todos os grupos - suplementados com fibronectina ou não - apresentaram desenvolvimento satisfatório, com boa quantidade de células viáveis. Ademais, as análises ANOVA e Tukey evidenciaram a existência de diferenças estatísticas significativas ao comparar o grupo controle com o grupo de células que recebeu suplementação com 100 µg/ml de fibronectina (Figura 9).

Figura 9 - Representação das diferenças observadas entre a viabilidade celular dos diferentes grupos de cultivo.



Fonte: Acervo pessoal do autor.

Nessa comparação, percebeu-se que o grupo com 100 µg/ml apresentou maiores valores de absorbância em função da formação de mais cristais de formazan, associada à alta concentração de células viáveis. Foi considerada relevância estatística significativa quando $p < 0,05$, sendo que nos grupos com concentrações de 50 e 200 µg/ml os valores encontrados não foram significativos, apresentando os seguintes resultados: controle x 50 µg/ml ($p > 0,05$) e controle x 200 µg/ml ($p > 0,05$). Somente na comparação entre controle x 100 µg/ml ($p < 0,05$) o resultado foi significativo.

Discussão

Os resultados obtidos a partir das análises microscópicas mostraram um padrão visual consistente com a hipótese de que o enriquecimento do meio de cultivo com diferentes concentrações de fibronectina favorece a proliferação celular. Contudo, a avaliação subjetiva das imagens apresenta limitações, levando à necessidade de realizar testes de viabilidade celular e análises estatísticas que permitam identificar diferenças significativas entre os grupos experimentais e garantir a precisão dos resultados.

Nesse sentido, o ensaio de MTT confirmou que a suplementação com fibronectina resultou em um aumento significativo na quantidade de células viáveis em pelo menos um dos grupos tratados, o que corrobora com os estudos realizados por Taufner (2023) e Bergami (2022), que destacam o papel da referida glicoproteína na adesão celular e no suporte à proliferação. Cabe ressaltar que os referidos autores optaram por prosseguir com a suplementação nas concentrações de 1 µg/ml e 20 µg/ml, respectivamente, mas não obtiveram diferenças estatísticas significativas. Por meio desses resultados, foram estabelecidos parâmetros que influenciaram na escolha das concentrações utilizadas no presente estudo.

No que se refere aos experimentos concluídos, observou-se que o aumento da concentração de FN apresentou um comportamento que pode, até certo ponto, ser interpretado como dose-dependente, com os melhores resultados sendo registrados nas concentrações intermediárias. Tal padrão tem sido observado em diversos estudos, reforçando a ideia de que doses baixas de suplementos podem promover a proliferação celular e reduzir o declínio e apoptose das células cultivadas, enquanto doses mais altas podem ter efeitos citotóxicos (Zanichelli *et al.*, 2012).

A importância de selecionar cuidadosamente o suplemento e determinar a dosagem mais adequada para o crescimento celular também é demonstrada na pesquisa de Góes *et al.* (2020), na qual foi realizada a suplementação com coenzimas do complexo B, resultando na otimização da divisão celular e redução do tempo de subcultura em células Crandell-Rees Feline Kidney.

Voltando à pesquisa conduzida, evidenciou-se que, embora existam diferenças estatísticas entre os grupos controle e suplementado com 100 µg/ml, os resultados

do grupo com 200 $\mu\text{g/ml}$ não foram significativos. Esses dados, condizentes com os argumentos apresentados por Rozario e Desimone (2010) e por Daley, Peters e Larsen (2008), sugerem a existência de um efeito platô, no qual o aumento da concentração de fibronectina acima de determinado limiar não resulta em um aumento proporcional da resposta celular. Com base nas descrições dos autores, o motivo da concentração de 200 $\mu\text{g/ml}$ não ter resultado significativo pode estar associado à ocupação dos receptores de fibronectina. Caso a concentração utilizada tenha sido suficiente para ocupar todos os receptores disponíveis, a adição de mais FN não resultaria em aumento da adesão celular, já que não haveria mais espaço para que as ligações fossem efetuadas. Outra explicação está na possibilidade de que a ligação da glicoproteína tenha desencadeado uma cascata de eventos que inibiu a adesão em lugar de estimulá-la, sendo essa uma forma relativamente comum de *feedback* negativo em processos celulares.

Já no que se refere ao experimento com 50 $\mu\text{g/ml}$, sabe-se que também não apresentou diferenças significativas. No entanto, a pesquisa de Foolen *et al.* (2016), conduzida a partir de uma concentração de 40 $\mu\text{g/ml}$ da glicoproteína, evidenciou que a mesma desempenha um papel crucial no direcionamento de células acumuladas na superfície do tecido. Vale lembrar que o autor não realizou variações na quantidade de FN, de modo que não houve comparação entre grupos, mas enfatizou a importância da mesma para o experimento.

Em vista do abordado, pode-se dizer que os resultados obtidos são condizentes com a ideia de que é preciso haver equilíbrio entre a concentração de componentes da MEC e a resposta celular esperada. Cabe ressaltar, porém, que apesar de os dados sugerirem uma relação direta entre a quantidade de FN disponível e um possível aumento na viabilidade celular, seria interessante investigar mais sobre a suplementação com concentrações mais elevadas, visando estabelecer com maior precisão os limites para utilização da glicoproteína e confirmar as interpretações já mencionadas por meio da replicação dos experimentos e aumento do número amostral.

Sendo assim, fica claro que a realização de pesquisas com diferentes doses de fibronectina no contexto das culturas celulares abre portas para diversas aplicações e avanços nos campos da biologia e medicina regenerativa. Nesse sentido,

compreender como a fibronectina influencia na adesão, migração e proliferação celular pode resultar na implementação de novas terapias focadas na cicatrização de feridas. De igual modo, entender sua dosagem ideal pode levar ao desenvolvimento de novos tratamentos e avanços na engenharia tecidual, visto que, ao otimizar a concentração de FN, é possível criar biomateriais mais eficientes para regenerar órgãos e tecidos danificados.

É importante destacar que este trabalho apresenta resultados inovadores para pesquisas envolvendo cultura de células, tendo sua relevância científica associada à escassez de estudos que explorem os efeitos de diferentes concentrações de fibronectina no cultivo de determinadas linhagens celulares, sobretudo no que diz respeito à comparação entre diferentes grupos experimentais. Nesse contexto, a lacuna evidenciada reforça a originalidade e importância do experimento conduzido. Além disso, os resultados obtidos demonstraram impactos significativos no comportamento das células L929, evidenciando o potencial da pesquisa para impulsionar inovações. O estudo, portanto, amplia as perspectivas existentes sobre o tema e oferece uma base para futuras investigações em biologia celular e bioengenharia.

Conclusão

O presente estudo demonstrou que a suplementação do meio de cultivo DMEM com fibronectina em concentrações específicas promove um aumento significativo na quantidade de células viáveis, destacando a importância da glicoproteína em questão na proliferação celular, sobretudo no que diz respeito às células da linhagem L-929. Os melhores resultados foram aqueles obtidos por meio da suplementação com 100 µg/ml, sendo que as culturas realizadas com concentrações 50 e 200 µg/ml não apresentaram diferenças estatísticas significativas.

Ressalta-se, portanto, que apesar da necessidade de investigações complementares que confirmem as concentrações ótimas da glicoproteína e abordem as vias moleculares envolvidas na interação entre ela e as células cultivadas, é certo que o estudo contribuiu para a elaboração de um protocolo otimizado de cultivo, estabelecendo um ponto de partida para futuras pesquisas na área e gerando, com isso, um impacto considerável no que tange ao aprimoramento das técnicas de cultura e produção de biomateriais.

Agradecimentos

Manifestamos nossa profunda gratidão ao Laboratório de Ultraestrutura Celular Carlos Alberto Redinz (LUCCAR), cujo suporte técnico e infraestrutura foram fundamentais para o desenvolvimento deste trabalho. Também à Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Espírito Santo pelo financiamento da mesma.

Agradecemos ainda à Dr^a. Sílvia Ramira Lopes Caldara e ao Dr. Gabriel Henrique Taufner, da Escola Superior São Francisco de Assis, e aos parceiros do LUCCAR, Dr^a. Alessandra Ferreira Gomes e doutorando Wedson Correa dos Santos por nos auxiliarem durante o desenvolvimento da pesquisa.

Referências

- ALVES, B. C. **Impressão 3D de scaffolds de alginato/hidroxiapatita para aplicação em regeneração óssea**. 2024. 81 f. Tese (Doutorado em Engenharia Mecânica) – Faculdade de Engenharia, Universidade Estadual Paulista - Unesp, Ilha Solteira, 2024.
- BERGAMI, A. A. L. **INFLUÊNCIA DA FIBRONECTINA SOBRE A PROLIFERAÇÃO DE CARDIOMIÓCITOS**. 2022. 70f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória.
- CAMPBELL, I. D.; HUMPHRIES, M. J. Integrin structure, activation, and interactions. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, v. 3, n. 3, 1 mar. 2011.
- DALEY, W. P.; PETERS, S. B.; LARSEN, M. Extracellular matrix dynamics in development and regenerative medicine. **Journal of cell science**, v. 121, n. 3, p. 255-264, 2008.
- FOOLEN, J. *et al.* Full-length fibronectin drives fibroblast accumulation at the surface of collagen microtissues during cell-induced tissue morphogenesis. **PLoS One**, v. 11, n. 8, p. e0160369, 2016.
- GURTNER, G. C. *et al.* Wound repair and regeneration. **Nature**, v. 453, n. 7193, p. 314-321, 2008.
- GÓES, F. S. R.; SILVA, H. M.; DE OLIVEIRA, A. C. S. Análise proliferativa da célula Crandell-Rees Feline Kidney (CRFK) cultivada com meio de cultura Dulbecco (DMEM) suplementado com coenzimas do complexo B. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 8, p. e250985573-e250985573, 2020.
- MAGALHÃES, W. L. E.; THÁ, E. L.; LEME, D. M. Método de determinação de concentrações não citotóxicas para avaliação da capacidade protetora da lignina contra danos ao DNA. **Concórdia: Embrapa Florestas**, 2018.
- PARISE, E. R. *et al.* Valor prognóstico da fibronectina plasmática e da classificação de Child-Pugh na cirrose hepática alcoólica: estudo comparativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 50, p. 37-40, 2004.

ROZARIO, T.; DESIMONE, D. W. The extracellular matrix in development and morphogenesis: a dynamic view. **Developmental biology**, v. 341, n. 1, p. 126-140, 2010.

TAUFNER, G. H. **DESENVOLVIMENTO DE CORAÇÃO BIOARTIFICIAL A PARTIR DE ARCABOUÇO DE MATRIZ EXTRACELULAR DESCELULARIZADA ENRIQUECIDA COM FIBRONECTINA PLASMÁTICA HUMANA**. 2023. 90f.

TO, W. S.; MIDWOOD, K. S. Plasma and cellular fibronectin: distinct and independent functions during tissue repair. **Fibrogenesis & tissue repair**, v. 4, p. 1-17, 2011.

WICKSTRÖM, S. A.; RADOVANAC, K.; FÄSSLER, R. Genetic analyses of integrin signaling. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, v. 3, n. 2, p. a005116, 1 fev. 2011.

WILLIAMS, C. *et al.* Young developmental age cardiac extracellular matrix promotes the expansion of neonatal cardiomyocytes in vitro. **Acta Biomaterialia**, v. 10, n. 1, p. 194–204, 2014.

ZANICHELLI, F. *et al.* Dose-dependent effects of R-sulforaphane isothiocyanate on the biology of human mesenchymal stem cells, at dietary amounts, it promotes cell proliferation and reduces senescence and apoptosis, while at anti-cancer drug doses, it has a cytotoxic effect. *Age*, v. 34, p. 281-293, 2012.

6 PERSPECTIVAS FUTURAS

Os experimentos realizados representam um avanço significativo para as pesquisas em engenharia de tecidos e biomateriais, uma vez que estabelecem parâmetros para a padronização do uso da glicoproteína fibronectina como promotora de crescimento celular. Nesse sentido, a identificação de uma concentração ideal (100 µg/ml) para estimular a proliferação de fibroblastos L-929 constitui um marco promissor na otimização de protocolos de cultivo, aplicáveis não só a fibroblastos, mas também a outras linhagens celulares. Para a implementação de tais metodologias em outros contextos, no entanto, faz-se necessário investigar a resposta de tipos celulares distintos a essa mesma concentração, visto que outras linhagens podem responder de formas diferentes.

Essa padronização é particularmente relevante para futuras pesquisas, permitindo que a influência da fibronectina nos processos de adesão, migração e proliferação celular sejam exploradas em contextos mais amplos, como o desenvolvimento de *scaffolds*, tratamentos personalizados e fabricação de tecidos artificiais. Com isso em mente, realizar experimentos em microambientes tridimensionais e desenvolver estudos mais aprofundados sobre as vias moleculares ativadas pela fibronectina são abordagens essenciais para elucidar seus mecanismos de ação.

Além disso, a aplicação de ferramentas estatísticas, como o ANOVA, e o uso de metodologias visuais e quantitativas fortalecem a reprodutibilidade e confiabilidade dos resultados, instigando novos avanços na área. Nesse contexto, cabe também o aprimoramento das metodologias por meio do uso de ferramentas automatizadas para dosagem e monitoramento, o que pode reduzir variações humanas e aumentar a precisão desses resultados.

Desse modo, os dados obtidos oferecem uma base sólida para o desenvolvimento de protocolos mais eficientes no âmbito da engenharia de tecidos, instigando a exploração de novas combinações de fatores de crescimento e a criação de microambientes mais complexos, visando mimetizar da melhor forma o microambiente *in vivo* e acelerar o processo de regeneração tecidual, tendo implicações clínicas que se estendem desde o impacto nas culturas até a criação de terapias personalizadas para diferentes tipos de lesões.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BAXTER, L. C. *et al.* Fibroblast and osteoblast adhesion and morphology on calcium phosphate surfaces. **Eur Cell Mater**, v.4, p.1-17. 2002.

BERGAMI, A. A. L. **INFLUÊNCIA DA FIBRONECTINA SOBRE A PROLIFERAÇÃO DE CARDIOMIÓCITOS**. 2022. 70f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória.

BITENCOURT, T. A. **Cicatrização de feridas e o uso de nutracêuticos como meio terapêutico**. 2020.

BRYSEK A. *et al.* **Expression and co-expression on surface markers of pluripotency on human amniotic cells cultured in different growth media**. **Ginekol Pol.**, 84: 1012-1024, 2013.

CHAUDHRY, M. A.; BOWEN, B. D.; PIRET, J. M. Culture pH and osmolality influence proliferation and embryoid body yields of murine embryonic stem cells. **Biochemical Engineering Journal**, v. 45, n. 2, p. 126-135, 2009.

CYTION. Células L929. Disponível em: <<https://www.cytion.com/pt/Celulas-L929/400260#:~:text=As%20c%C3%A9lulas%20L%2D929%20s%C3%A3o,com%20100%20dias%20de%20idade>>. Acesso em: 04 nov. 2024.

DA COSTA, M. C. *et al.* Modelos tridimensionais de cultura de células: aproximando o in vitro do in vivo. **Vigil Sanit Debate, Rio de Janeiro**, v. 6, n. 1, p. 72-83, 2018.

DA SILVA, M. S. *et al.* Citocinas. **ACTA MSM-Periódico da EMSM**, v. 6, n. 4, p. 205-217, 2019.

DE OLIVEIRA, C. M. B. *et al.* Citocinas e dor. **Rev. Bras. Anesthesiol**, v. 61, p. 255-265, 2011.

DE SOUSA, V. M.; GONÇALVES, J. C. R. MEIOS DE CULTIVO CELULAR. *In: Cultivo de células da teoria à bancada*. 1. ed. Paraíba: João Pessoa, 2020. p. 65–73. Disponível em:

<<http://www.editora.ufpb.br/sistema/press5/index.php/UFPB/catalog/download/669/839/7054-1?inline=1>>. Acesso em: 25 de Março de 2024.

DESCHÊNES, J.; VALET, J.-P.; MARCEAU, N. Hepatocytes from newborn and weanling rats in monolayer culture: Isolation by perfusion, fibronectin-mediated adhesion, spreading, and functional activities. **In Vitro**, v. 16, n. 8, p. 722–729, ago. 1980.

FERRÚA, C. P. *et al.* How has dental pulp stem cells isolation been conducted? A scoping review. **Brazilian oral research**, v. 31, 2017. Disponível em <<https://www.scielo.br/j/bor/a/MR5jCYkkJ4h9gpP38yCn7xz/abstract/?lang=en>>. Acesso em: 25 março. 2024.

FRESHNEY, R. I. **Cultura de células animais: manual de técnica básica e aplicações especializadas**. John Wiley & Filhos, 2015.

HEGGENDORN, F. L. *et al.* Testes de biocompatibilidade: cultivo de células animais e suas aplicações em estudo de toxicidade na odontologia. **Revista Conexão Ciência**, v. 15, n. 1, p. 67-77, 2020.

KLIMEK, K.; GINALSKA, G. Proteins and Peptides as Important Modifiers of the Polymer Scaffolds for Tissue Engineering Applications - A Review. **Polymers**, v. 12, n. 4, p. 844, 6 abr. 2020.

LONDONO, R.; BADYLAK, S. F. Biologic scaffolds for regenerative medicine: mechanisms of in vivo remodeling. **Annals of biomedical engineering**, v. 43, n. 3, p. 577–92, mar. 2015

NCBI. FN1 fibronectina 1 [Homo sapiens (humano)]. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/2335>>. Acesso em: 20 mar. 2024.

NOWATZKI, J. Avanços nas aplicações do cultivo celular: o uso de soro fetal bovino está com os dias contados? **Revista Blog do Profissão Biotec**, v.10, 2023. Disponível em: <<https://profissaobiotec.com.br/avancos-nas-aplicacoes-do-cultivo-celular-uso-soro-fetal-bovino-dias-contados/>>. Acesso em: 22 abr. 2024.

PAN, H.; JIANG, H. L.; CHEN, W. L. Interaction of dermal fibroblasts with electrospun composite polymer scaffolds prepared from dextran and poly lactide-coglycolide. *Biomaterials*, v.27, n.17, p.3209-3220. 2006.

PARREIRA, R. C. et al. Análise de biomarcadores da matriz extracelular do coração de camundongos tratados com isoproterenol. 2015.

RAE, T. Cell biochemistry in relation to the inflammatory response to foreign materials. In: **Fundamental Aspects of Biocompatibility**. Williams DF, ed. p.159-181. 1981.

RODRÍGUEZ-HERNÁNDEZ, C. O. *et al.* Cell culture: history, development and prospects. *International Journal of Current Research and Academic Review*, v. 2, n. 12, p. 188-200, 2014.

ROSS, A. M. *et al.* Synthetic substrates for long-term stem cell culture. *Polymer*, v. 53, n. 13, p. 2533-2539, 2012.

SERRANO, M. C. *et al.* In vitro biocompatibility assessment of poly(epsilon-caprolactone) films using L929 mouse fibroblasts. *Biomaterials*, v.25, n.25, p.5603-5611. 2004.

SIMANCAS-ESCORCIA, V; VERGARA HERNÁNDEZ, C; DÍAZ-CABALLERO, A. Influencia del suero fetal bovino en el cultivo de fibroblastos gingivales. *Avances en Odontostomatología*, v. 34, n. 6, p. 299-309, 2018. Disponível em: <https://scielo.isciii.es/scielo.php?pid=S0213-12852018000600004&script=sci_arttext>. Acesso em: 25 mar. 2024.

TAUFNER, G. H. **DESENVOLVIMENTO DE CORAÇÃO BIOARTIFICIAL A PARTIR DE ARCABOUÇO DE MATRIZ EXTRACELULAR DESCELULARIZADA ENRIQUECIDA COM FIBRONECTINA PLASMÁTICA HUMANA**. 2023. 90f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória.

THEOCHARIS, A. D. *et al.* Proteoglycans in health and disease: novel roles for proteoglycans in malignancy and their pharmacological targeting. *FEBS Journal*, v. 277, n. 19, p. 3904–3923, out. 2010.

WANG, J. *et al.* Fibronectin is deposited by injury-activated epicardial cells and is necessary for zebrafish heart regeneration. **Developmental Biology**, v. 382, n. 2, p. 427–435, out. 2013.