

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA**

**PADRONIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE ADESÃO DE CÉLULAS DE
HIPERPLASIA PROSTÁTICA BENIGNA (HPB) EM MATRIZES
TEMPORÁRIAS TRIDIMENSIONAIS**

CAROLINA KRETSCHMER LUFT

PORTO ALEGRE

2013

CAROLINA KRETSCHMER LUFT

**PADRONIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE ADESÃO DE CÉLULAS DE
HIPERPLASIA PROSTÁTICA BENIGNA (HPB) EM MATRIZES
TRIDIMENSIONAIS**

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado ao Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel(a) em Biomedicina.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Ilma Simoni Brum

Coorientador: Me. Joelson Tomedi

PORTO ALEGRE

2013

"Conhecer as obras poderosas de Deus; compreender Sua sabedoria e majestade e poder; apreciar, em certo grau, o maravilhoso trabalho de Suas leis, sem dúvida, tudo isso deve ser uma maneira agradável e aceitável de louvar o Altíssimo, a quem a ignorância não pode ser mais grata que o conhecimento".

Copérnico

AGRADECIMENTOS

A Deus, que pela graça me supriu em tudo nesses anos.

À minha família, por não ter deixado de acreditar que eu encontraria meu caminho profissional. À mãe, que foi paciente, encorajadora e meu maior apoio. À minha irmã Larissa, pela grande parceria e sabedoria, e por ser a pessoa que me faz relaxar. Ao pai, que se fez presente e se preocupou comigo durante esses anos. À Vó Reinilda, por se comprometer com o meu sustento e sempre orar por mim.

À minha orientadora Ilma, que durante esses três anos foi um exemplo de ética e sempre esteve disposta a me ajudar com questões acadêmicas e pessoais, me proporcionando boas oportunidades. Ao meu coorientador Joelson, que pacientemente me deu a base teórica pra que este trabalho fosse possível e dividiu comigo a bancada durante todos os experimentos.

Aos colegas de LaGOM e LaBiMET pelo convívio e conversas, em especial à Gabi, à Débora e à Ju Castilhos, que além da amizade e de sempre me acompanharem pra comer doce, contaram centenas de fotos de células.

Ao pessoal do Laboratório de Psiquiatria Molecular do HCPA, em especial à Bianca Pfaffenseller, que disponibilizou e auxiliou no uso dos microscópios.

Às minhas colegas mais presentes durante a graduação, Isabella e Natully, por dividirem os bons e os maus momentos da Biomedicina comigo, e por serem o meu grupo perfeito de trabalho.

Aos meus amigos, principalmente Raquel, Damaris e Carol (e os Seberino), que foram minha família em Porto Alegre e fizeram minha vida aqui mais fácil e feliz.

RESUMO

Hiperplasia prostática benigna (HPB) é um distúrbio proliferativo com alta prevalência na população masculina, associado a uma série de complicações urinárias e redução da qualidade de vida. Sua etiologia ainda é pouco compreendida, mas historicamente a investigação *in vitro* dos mecanismos envolvidos na sua gênese baseiam-se em modelo de cultura celular em placa 2D. Entretanto, já foi demonstrado que esse modelo não é capaz de simular a complexidade existente no tecido prostático. *In vivo*, as células e a matriz extracelular (MEC) interagem de forma complexa e bidirecional, regulando processos como diferenciação, proliferação, sobrevivência e migração das células. As células aderem-se à matriz extracelular principalmente através da ligação das integrinas a proteínas da MEC como colágeno, fibronectina, vitronectina e laminina. Tem sido demonstrado que vários tipos celulares *in vitro* dependem da adsorção inicial de fibronectina e vitronectina do soro para adesão e proliferação em diversos materiais sintéticos. Ainda, como cada tecido é circundado por um ambiente próprio, é desejável que se simulem essas características particulares para cada aplicação, com diversos biomateriais sintéticos e naturais testados para suportar o cultivo 3D. Entre as matrizes naturais, materiais como colágeno e glicosaminoglicanos são amplamente utilizados e apresentam inúmeras vantagens. Então, existe um grande interesse em encontrar um modelo tridimensional que represente de forma mais fidedigna cada ambiente tecidual encontrado *in vivo*. Assim, este trabalho teve como objetivo padronizar as condições de adesão de células de pacientes com HPB em relação às modificações de concentração meio de cultivo/soro, do número de células semeadas e da composição da matriz temporária, para a qual também foi verificada a capacidade de proliferação celular. Para isso, as amostras de células foram oriundas de tecido prostático hiperplásico de pacientes submetidos à prostatectomia no Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Para testar a influência da adição de soro fetal bovino (SFB) no meio de cultivo sobre a adesão celular, as células foram semeadas em matriz de colágeno nas seguintes condições: DMEM, DMEM com SFB 10%, DMEM

com SFB 40% ou SFB puro. Na segunda etapa, verificou-se a eficiência da adesão para diferentes densidades de células por área de matriz: 10 mil, 20 mil, 50 mil ou 100 mil células por cm^2 . Na terceira etapa, as seguintes composições de matrizes temporárias foram testadas: colágeno, colágeno com ácido hialurônico, colágeno com heparina e mistura dos três substratos. Após o período de adesão de 1 hora, as células tiveram o núcleo marcado com Hoechst 33342, e foram capturadas seis imagens de cada matriz em microscópio de fluorescência. As células foram contadas em cada imagem. Na análise estatística para um $n = 18$ (por grupo), foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis, com teste de comparações múltiplas de Dunn, para os dois primeiros ensaios de adesão e teste GEE para análise da composição da matriz. Foi considerado o nível de significância de $P < 0,05$. Como resultados, encontramos que a presença de SFB no meio de cultivo prejudicou a adesão, que para um grande número de células semeadas o número de células aderidas foi maior, mas a eficiência de adesão piorou, e que a matriz com ácido hialurônico favoreceu a adesão celular. As células também proliferaram nas diferentes matrizes temporárias.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	7
1.1 Hiperplasia Prostática Benigna	8
1.2 Interação entre as células e a matriz extracelular	9
1.3 Cultura celular tridimensional	10
1.4 Importância do soro nos processos de adesão e proliferação em cultura celular	13
1.5 Substrato de adesão	14
2. ARTIGO CIENTÍFICO	16
Resumo	16
Introdução	17
Materiais e métodos	18
Resultados e discussão	22
Conclusão	25
Referências	26
Figuras	28
Tabelas	35
3. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	38
BIBLIOGRAFIA	39
ANEXO	42

1 INTRODUÇÃO

Grande parte dos estudos sobre a etiologia de doenças e de possíveis tratamentos têm sido feitos por meio de cultura celular. O cultivo celular bidimensional, em placas ou garrafas (2D), possibilitou o entendimento de muitos processos de biologia celular. No entanto, esse modelo tem a desvantagem da difícil extrapolação dos seus resultados para o que ocorre *in vivo*, por ser um modelo extremamente reducionista. No organismo, as células estão envoltas em um complexo ambiente de interações com as outras células e com a matriz extracelular, que lhes fornecem sinais físicos e bioquímicos. Para mimetizar melhor esse ambiente, surgiram os modelos de cultura tridimensionais (3D). [1]

As aplicações da cultura 3D podem ser clínicas, na engenharia de tecidos ou medicina regenerativa, ou como um modelo *in vitro*, para descobertas de fisiologia e patologia. [1] Através de modelos 3D é possível estudar em cultura celular processos como migração e invasão de células cancerígenas, e testar com alto rendimento possíveis drogas para atuarem nesses processos. [2]

Como cada tecido é circundado por um ambiente próprio, é desejável que se simulem essas características particulares para cada aplicação. Em razão disso, diversos biomateriais sintéticos e naturais têm sido desenvolvidos e testados para suportar o cultivo 3D. [1] Entre as matrizes naturais, materiais como colágeno e glicosaminoglicanos se destacam pela ampla utilização e inúmeras vantagens. [3]

Com base nisso, faz-se necessário buscar as melhores condições para o modelo 3D desejado, que vão desde a escolha do material para a matriz temporária até as melhores condições de cultivo das células em relação à adesão, proliferação, morfologia, expressão gênica e ao perfil proteico.

1.1 Hiperplasia Prostática Benigna

Hiperplasia Prostática Benigna (HPB) é uma condição proliferativa da próstata que ocorre na zona de transição e nas glândulas periuretrais. [4] De acordo com achados em autópsias realizadas em homens nos Estados Unidos da América, a HPB está relacionada à idade, com prevalência de 50% na população masculina de 51 a 60 anos e de 80-90% em homens de 70 a 80 anos. [5]

Em função da localização da HPB, pode ocorrer obstrução da uretra, levando a sintomas obstrutivos (em relação ao esvaziamento da bexiga) como diminuição da força do jato urinário, hesitação, intermitência, esforço miccional, esvaziamento incompleto, ou alterações vesicais que originam sintomas irritativos (em relação à função de armazenamento da bexiga) tais como urgência e incontinência miccionais. Além disso, quadros avançados estão relacionados com aumento do risco para o desenvolvimento de infecções urinárias e insuficiência renal. [6, 7]

A HPB consiste em hiperplasia glandular geralmente expressa com um aumento do componente estromal em relação ao epitelial. Apesar de haver variações histológicas na hiperplasia, esse maior crescimento do estroma pode ser visto como uma característica central dessa patologia, implicando em uma relação alterada entre células estromais e epiteliais. [8]

Acredita-se que o aumento da relação estrogênio/androgênio com o envelhecimento possa ter um papel na diferenciação de músculo liso e no aumento da matriz extracelular em torno do estroma da próstata. Porém, a etiologia da HPB ainda é pouco compreendida. [9]

Assim, modelos de estudos experimentais de HPB são de grande valia para a elucidação das características dessa condição. Entre os modelos *in vivo* utilizados estão HPB espontânea ou induzida em cães ou chimpanzés, modelo xenográfico (células humanas transplantadas em ratos ou camundongos) e camundongos transgênicos. O modelo *in vitro* de cultura de células é largamente utilizado, seja cultura primária de células estromais

e epiteliais ou de linhagens celulares. [10] Embora já exista modelo de cocultura de células epiteliais e estromais de hiperplasia de próstata, que permite a manutenção de várias características do tecido prostático como expressão de receptores de androgênio, de antígeno prostático benigno (PSA) e 5 α -redutases, esse ainda é um modelo reducionista, já que mantém os dois tipos celulares sem contato direto entre si e sem o ambiente proporcionado pela matriz extracelular. [11]

1.2 Interação entre as células e a matriz extracelular

A matriz extracelular é composta basicamente por colágeno, glicoproteínas, proteoglicanos e moléculas solúveis como fatores de crescimento, citocinas e quimiocinas. A matriz provê suporte estrutural às células e atua como depósito para fatores de crescimento, quimiocinas e citocinas, que agem na sinalização para morfogênese e diferenciação celular. [12, 13]

Todas as células interagem com a matriz extracelular, seja durante toda a sua vida, em alguma fase do desenvolvimento, ou durante processos como invasão e migração. A matriz fornece suporte estrutural aos tecidos, aos órgãos, a camadas de células (como membrana basal) e ao processo de migração celular. Ainda, tem papel importante no desenvolvimento embrionário, na remodelagem e na homeostase de tecidos e órgãos. Também é fundamental na adesão e na sinalização para as células, através da ligação às integrinas. [14-16]

As células ligam-se a determinados sítios de proteínas da matriz extracelular através das integrinas, que são os principais receptores de adesão das células à matriz. As integrinas são heterodímeros de cadeias α e β e podem ligar a proteínas da matriz extracelular - colágenos, fibronectinas, vitronectina, lamininas - e receptores celulares. Existem 18 tipos de cadeia α e 8 de β , que se combinam de forma a existirem 24 receptores diferentes,

que ligam com diferentes afinidades aos ligantes. Algumas subunidades reconhecem a sequência RGD (arginina-glicina-ácido aspártico), em proteínas como fibronectina e vitronectina, enquanto outras mediam a adesão às lamininas da membrana basal ou ao colágeno. [14, 17] Adicionalmente, integrinas possuem papel importante na organização do citoesqueleto de actina e na modulação de vias de transdução de sinais que controlam funções essenciais da célula. [18]

As células e a matriz extracelular interagem de forma complexa e bidirecional; a sinalização do ambiente externo para o interior da célula participa da regulação de processos como determinação, diferenciação, polaridade, proliferação, sobrevivência e migração das células, além de tumorigênese e cicatrização de feridas. No sentido inverso, sinais intracelulares podem levar a uma mudança na conformação das integrinas, alterando a afinidade aos ligantes extracelulares. [15, 16]

Ainda, estudos demonstram que o ambiente tridimensional da matriz tem efeito sobre a morfologia das células, mantendo as características morfológicas de fibroblastos e células epiteliais. [16]

1.3 Cultura celular tridimensional

O modelo experimental de cultura bidimensional de células em placa de cultivo (2D) é largamente utilizado com a finalidade de investigar os mecanismos envolvidos em processos fisiológicos e patológicos. Entretanto, esse modelo não é representativo do ambiente encontrado nos tecidos, pois a arquitetura característica e as interações célula-matriz são perdidas, e as interações célula-célula são modificadas. Então, um modelo de cultura celular tridimensional (3D) que recrie essas condições pode mimetizar de forma mais realista um tecido *in vivo*. [19] Alguns processos celulares como morfogênese e crescimento tumoral só ocorrem quando as células estão organizadas em estruturas 3D. [20]

A utilização de matrizes temporárias derivadas de células ou tecidos, proteínas individuais purificadas da matriz extracelular ou matrizes de polímeros sintéticos para modelos de cultura 3D tem possibilitado produção de tecidos *ex vivo*, além da pesquisa básica sobre processos tumorais e testes de drogas de alto rendimento. [2, 19, 20]

Células epiteliais normais de próstata e mama cultivadas em 2D crescem em monocamada, diferentemente do que ocorre no cultivo 3D, em que formam agregados, polarizam, e se organizam em esferoides ocós semelhantes a ácinos (característica de células epiteliais glandulares funcionais). Em contraste, células tumorais formam uma arquitetura desorganizada de esferoides atípicos. [21] Fibroblastos, que crescem de forma achatada em placa, rapidamente assumem forma bipolar ou estrelada em ambiente 3D. [22]

Diversas linhagens epiteliais de próstata (tumorais e não tumorais) foram cultivadas em Matrigel e formaram agregados celulares de quatro tipos: esferoides, massas disformes, estrelares ou semelhantes a cachos de uva. Na maioria dos casos, a característica morfológica de cada linhagem refletiu as propriedades de célula normal, transformada ou invasiva. [23] Outro trabalho comparou a morfologia em cultivo 2D e 3D (Matrigel) de duas linhagens de metástase à distância de câncer de próstata (PC3 e DU145), uma linhagem de metástase linfonodal de câncer de próstata (LNCaP) e uma linhagem de célula epitelial de próstata (RWPE-1). Em 2D, essas células se apresentam com morfologia bipolar (PC3 e LNCaP), achatada (DU145) ou em pequenas esferas (RWPE-1). Já em Matrigel DU145 e RWPE-1 formaram agregados esferoides, LNCaP formou massas disformes e PC3 apresentou um fenótipo de aglomerados na forma estrelar, característico de células invasivas. RWPE-1, no quinto dia de cultivo, formou esferoides com lúmen, consistente com a morfologia de células epiteliais normais *in vivo*. [24]

Mudanças na biologia celular e na expressão de genes e proteínas acompanham as alterações de morfologia que ocorrem em células cultivadas em 3D. Linhagens de câncer de próstata cultivadas em 2D e 3D

tiveram cerca de 3400 mRNAs diferentemente expressos detectados através de *microarray*. Muitos dos genes encontrados foram relacionados à morfologia apresentada e ao fenótipo de linhagens de células invasivas ou não invasivas. [23] Quando comparada a expressão proteica, em 2D foi detectada pouca diferença entre linhagens metastáticas ou epitelial normal. Já em 3D, a linhagem metastática PC3 mimetizou melhor a expressão proteica de células metastáticas *in vivo*, com menor expressão de proteínas como E-caderina e integrina $\alpha 6$ e maior expressão de N-caderina, vimentina e integrina $\beta 1$. [24]

Quando se analisa proliferação de linhagens celulares, as células cultivadas em 2D apresentam taxas de proliferação aumentadas em relação à mesma linhagem cultivada em 3D. Um estudo realizado com HepG2 (linhagem de carcinoma hepatocelular humano) mostrou que as células cultivadas em matrizes de alginato (3D) tiveram menores taxas de proliferação do que as encontradas em cultura 2D. Ainda, quando se comparou a proliferação para diferentes densidades celulares inicialmente semeadas, as taxas de crescimento diminuíram com o aumento da densidade, em cultivos 2D e 3D. Essa observação pode ser resultado da inibição por contato, e possivelmente da disponibilidade reduzida de nutrientes. Também é possível que cultivo 3D esteja mais susceptível à limitação do transporte de oxigênio e, portanto a um gradiente de concentração de O_2 . [2] Em estudo realizado com linhagens tumorais e não tumorais de próstata, as taxas de proliferação em cultura 2D também foram maiores que as encontradas em 3D. Porém, em 2D a diferença de proliferação entre células metastáticas e não metastáticas foi mínima, enquanto em 3D as linhagens de metástases sistêmicas PC3 e DU145 proliferaram mais que as células epiteliais normais e que a linhagem de metástase linfonodal LNCaP. Esse resultado indica que as taxas de proliferação em cultura 3D são mais representativas das encontradas nos tumores *in vivo*. [24]

Além de todas as questões levantadas, o modelo de cultivo 3D possibilita o cocultivo de diversos tipos celulares que interagem no tecido de

origem. O cocultivo de cardiomiócitos e fibroblastos possibilita a manutenção da polaridade e da morfologia dos cardiomiócitos, e também sua função, já que ocorrem contrações sincronizadas que em 2D são incoerentes. [25] Já o cocultivo de linhagem de células epiteliais de HPB e fibroblastos (cultura primária de pacientes com HPB) aumenta a adesão lateral das células epiteliais através da colocação de E-caderina e actina, o que indica a participação do estroma na manutenção da morfologia do tecido epitelial. [26]

1.4 Importância do soro nos processos de adesão e proliferação em cultura celular

A utilização de soro animal em meio de cultura celular tem papel importante na adesão, crescimento, proliferação, diferenciação e metabolismo das células. O mais utilizado em cultura é o de origem bovina, em especial soro fetal bovino (SFB), que fornece proteínas, aminoácidos, carboidratos, lipídeos, vitaminas, enzimas, fatores de crescimento, hormônios e íons às células. Apesar dos benefícios, existem discussões sobre a utilização do soro animal, principalmente em função de questões relacionadas à proteção animal, da demanda crescente *versus* a possibilidade de suprimento e da necessidade de soro humano para a engenharia de tecidos e a terapia celular. [27]

In vitro, a adesão das células às superfícies é mediada por proteínas de adesão contidas no soro, principalmente pela vitronectina e pela fibronectina. [28] A adesão de osteoblastos e outros tipos celulares a diversos materiais sintéticos depende primariamente da adsorção de tais proteínas na sua forma ativa aos materiais. [29]

Embora a sequência de aminoácidos RGD seja utilizada a fim de aumentar a adesão de células a substratos sintéticos, por ser sítio de ligação das células a proteínas da matriz extracelular, esse peptídeo tem menor

habilidade de promover adesão do que as proteínas intactas. Um estudo que comparou adesão e espalhamento de células-tronco mesenquimais à hidroxiapatita (HA) demonstrou que essas duas características foram muito favorecidas quando a HA foi coberta por soro de diversas espécies animais (concentração de 100%) em comparação à cobertura com a sequência RGD. [30]

Outro estudo demonstrou que SFB em concentrações de até 40% no meio de cultivo estimula o crescimento celular, e em concentrações a partir de 60% inibe o crescimento de maneira dose-dependente e induz morte celular. [31] Mais recentemente, condrócitos bovinos foram cultivados em meio sem soro, com adição de fatores de crescimento e fibronectina, e as células proliferaram sem diferença em relação ao grupo controle com 10% de SFB. [32]

1.5 Substratos de adesão

Colágenos são os principais constituintes da matriz extracelular, e se distribuem na composição dos tecidos de forma específica. Possuem diversas funções, como fornecer suporte estrutural a tecidos e órgãos, promover adesão, migração e diferenciação celular, e participar da sinalização celular – de forma direta através da ligação às integrinas, ou indireta, através da ligação a outras proteínas como a fibronectinas. [33]

O ácido hialurônico é um glicosaminoglicano não sulfatado presente na matriz extracelular de todos os vertebrados, envolvido em diversos processos como organização da matriz, sinalização celular, cicatrização, morfogênese, e progressão tumoral. [34] Atua na proliferação e na diferenciação, além de regular a adesão e a motilidade das células, promovendo migração celular. [35]

A heparina é um glicosaminoglicano sulfatado que participa da matriz e se liga a diversas moléculas - principalmente fatores de crescimento -

regulando sua liberação, ligação às células e degradação. Tem reconhecido papel no estímulo à angiogênese, e ainda inibe a migração celular e respostas imunológicas. [36]

2 ARTIGO CIENTÍFICO

Artigo com formatação adequada ao periódico **Experimental Cell Research**

Padronização das condições de adesão de células de Hiperplasia Prostática Benigna (HPB) em matrizes temporárias tridimensionais

Carolina Kretschmer Luft¹, Joelson Tomedi¹, Ilma Simoni Brum^{1*}

¹Laboratório de Biologia Molecular Endócrina e Tumoral, Departamento de Fisiologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil

* Autor correspondente:

Rua Sarmiento Leite, 500

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Porto Alegre, Brasil

Fone: 51 3308 3559

Endereço de email: Ilma@ufrgs.br

RESUMO

Embora estudos com cultura celular 2D sejam amplamente utilizados, esse modelo é reducionista, em função da complexidade encontrada nos tecidos *in vivo*. Nosso objetivo foi padronizar as condições de adesão de células de HPB de pacientes em relação à concentração de soro fetal bovino (SFB) no meio de cultivo, ao número de células semeadas e à composição da matriz temporária (colágeno, ácido hialurônico e heparina). Para a composição da matriz, também foi avaliada a proliferação celular. Os resultados encontrados mostraram que o SFB prejudicou a adesão, as células aderiram em maior número quando semeadas em grandes proporções, porém com uma menor eficiência de adesão, e a matriz com ácido hialurônico em sua composição favoreceu a adesão em relação à matriz com heparina. Além

disso, foi demonstrado que as células de HPB são capazes de proliferar nas diferentes matrizes temporárias. Esses resultados poderão servir de base para o futuro estabelecimento de cultivo 3D de células de HPB.

PALAVRAS-CHAVE: Adesão celular; Modelo 3D; HPB; Colágeno; Ácido hialurônico; Heparina

INTRODUÇÃO

Hiperplasia Prostática Benigna (HPB) é uma condição proliferativa muito prevalente na população masculina, relacionada à idade, e que gera redução da qualidade de vida em função dos sintomas urinários obstrutivos e irritativos que provoca. [4, 5] Apesar das evidências de participação hormonal na HPB, sua etiologia ainda é pouco compreendida. [9] Por isso, diversos modelos experimentais são utilizados na tentativa de elucidar melhor essa condição. [10]

O modelo de cultura bidimensional de células em placa de cultivo (2D) é amplamente utilizado, porém não é representativo do ambiente encontrado nos tecidos. Nos modelos de cultura tradicionais, a arquitetura tecidual característica e as interações célula-matriz extracelular são perdidas, e as interações célula-célula são modificadas. Em modelos de cultura tridimensionais (3D), a morfologia, as expressões gênica e proteica, e os processos de adesão e proliferação são mais semelhantes aos encontrados nos tecidos *in vivo*. [19, 23, 24] Ainda, o cultivo 3D possibilita o cocultivo de tipos celulares que interagem no tecido de origem. [25, 26]

As interações entre as células e a matriz extracelular (MEC) são complexas e bidirecionais, e geralmente envolvem a ligação de proteínas da MEC - colágenos, fibronectinas, vitronectina e lamininas - às integrinas, que são os principais receptores de adesão celular. A sinalização do ambiente externo para o interior da célula participa da regulação de processos como determinação, diferenciação, polaridade, proliferação, sobrevivência e migração das células, além de tumorigênese e cicatrização de feridas. No sentido inverso, sinais intracelulares podem levar a uma mudança na

conformação das integrinas, alterando a afinidade aos ligantes extracelulares. [15, 16]

A adição de soro fetal bovino (SFB) ao meio de cultivo celular tem sido amplamente utilizada para melhorar a adesão, a proliferação e as condições metabólicas das células. As proteínas vitronectina e fibronectina presentes no soro são responsáveis pela adesão das células a diversos materiais sintéticos. Em relação ao crescimento celular, o soro induz crescimento quando na concentração de até 40%, e acima de 60% inibe o crescimento e induz a morte das células. [28, 31]

Outro fator que pode influenciar processos como adesão e proliferação das células em cultura é a composição da matriz temporária. Colágeno é a principal proteína constituinte da matriz extracelular e fornece suporte estrutural a tecidos e órgãos, promove adesão, migração e diferenciação celular, e participa da sinalização celular. Já o ácido hialurônico e a heparina são glicosaminoglicanos envolvidos em diversos processos como sinalização celular, adesão e migração (o primeiro promove e o segundo inibe a migração celular). [33-36]

Neste estudo, buscamos estabelecer as melhores condições de adesão de células originárias de HPB em relação à concentração de SFB no meio de cultivo, ao número de células inicialmente semeadas e à composição da matriz temporária. Em relação à composição da matriz, também avaliamos a proliferação celular.

MATERIAIS E MÉTODOS

Coleta e dissociação do tecido prostático

O tecido prostático foi oriundo de pacientes com diagnóstico de HPB, confirmado posteriormente com o anatomopatológico, submetidos à prostatectomia no Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). O projeto ao qual esse estudo está vinculado foi aprovado pelo Comitê de Ética do HCPA, e cada paciente participante assinou o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Os fragmentos foram coletados no período transoperatório, em condições estéreis, e transportados em solução tampão de Hank suplementado com 2% de kanamicina até o laboratório, onde foram acondicionados a 4°C até o dia seguinte. O tecido foi então lavado em tampão de Hank, pesado e reduzido a fragmentos menores para a dissociação. O tecido foi agitado durante 3 horas a 37°C em solução tampão de Hank e colagenase tipo I, calculados respectivamente a 2,5 mL e 7,5 mg por grama de tecido.

Após a dissociação, foi adicionado igual volume de solução tampão, a fim de inibir a ação da colagenase. O dissociado foi filtrado em uma membrana de nylon com poros de 250 µm e centrifugado a 1500 rpm por 10 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi retirado e as células foram centrifugadas novamente em solução tampão de Hank e contadas em câmara de Neubauer.

Ensaio de adesão com concentrações variadas de soro fetal bovino (SFB) e meio de cultivo DMEM

O ensaio de adesão consistiu em semear 50 mil células em uma matriz de colágeno sobre uma lamínula de área igual a 2,54 cm² (aproximadamente 20 mil células por cm²), com um dos quatro grupos randomizados em bloco: meio de cultivo DMEM, meio DMEM com soro fetal bovino 10%, meio DMEM com soro fetal bovino 40% e soro fetal bovino puro.

As células previamente contadas foram ressuspendidas em 20 µL de solução tampão de Hank para 50 mil células. Cada matriz temporária foi coberta com 230 µL de um dos quatro tratamentos e 20 µL da suspensão de células.

Em seguida, a placa contendo as matrizes sobre as lamínulas foi mantida em estufa a 37 °C e 5% de CO₂ durante 1 hora para adesão das células.

Ensaio de adesão com diferentes densidades de células

As células dissociadas foram ressuspensas em 3 mL de solução tampão de Hank e separadas em quatro frações de volume relativo para a obtenção dos seguintes números de células: 25 mil, 50 mil, 125 mil e 250 mil (10 mil, 20 mil, 50 mil e 100 mil células por cm^2 , respectivamente). As quatro frações foram centrifugadas, ressuspensas em 100 μL de DMEM e semeadas sobre a matriz de colágeno já tratada com 150 μL de DMEM puro.

A placa contendo as matrizes sobre as lamínulas foi mantida em estufa a 37 °C e 5% de CO_2 durante 1 hora para adesão das células.

Ensaio de adesão em diferentes substratos

Células em densidade de 20 mil por cm^2 foram semeadas com DMEM puro em lamínulas cobertas com um dos quatro tipos de substrato: colágeno, colágeno com 2% de ácido hialurônico, colágeno com 2% de heparina e colágeno com 1% de ácido hialurônico + 1% de heparina.

As células na placa contendo as lamínulas foram mantidas durante 1 hora em estufa a 37 °C e 5% de CO_2 .

Imunocitoquímica

Após 1 hora na estufa, as matrizes foram lavadas três vezes com PBS 1X para a retirada das células não aderidas, e fixadas com 500 μL de paraformaldeído a 4% durante 1 hora. Em seguida, foi realizada a permeabilização com 500 μL de solução de PBS 1X contendo albumina a 1%, Triton-X a 0,1% e Tween-20 a 0,05% por 45 minutos.

Antes da visualização no microscópio, foi utilizado o marcador fluorescente de núcleo Hoechst 33342 (1:50), durante 2 minutos.

Aquisição de fotos e contagem de células aderidas

Foram adquiridas seis fotos de cada matriz em um microscópio de fluorescência (Leica, modelo DMI 3000B), com aumento de 200 vezes. O

número de células em cada foto foi contado por dois observadores, e a média das duas contagens foi utilizada para a análise estatística. A área de cada foto, de $602261 \mu\text{m}^2$ foi calculada pela medida da altura vezes a do comprimento, após transformação de pixel em μm . A eficiência de adesão foi calculada pela razão do número de células aderidas pelo número de células semeadas, por foto (sabendo o número de células semeadas por área de matriz e considerando uma distribuição homogênea das células na superfície).

Para os ensaios de diferentes concentrações de SFB e de diferentes composições de matriz, 118 células teriam sido semeadas por área de foto caso a distribuição das células fosse homogênea. Para o ensaio variando as densidades celulares em 10 mil, 20 mil, 50 mil e 100 mil células por cm^2 , os números de células semeadas por área de foto seriam 59, 118, 296 e 593, respectivamente.

Ensaio de proliferação

As células dissociadas conforme descrito anteriormente foram semeadas na proporção de 20 mil células por cm^2 de cada uma das quatro diferentes composições de matriz. Após 1 hora de adesão foram lavadas para a retirada de células não aderidas e submetidas ao ensaio de proliferação EdU (Invitrogen) conforme orientações do fabricante, durante 14 horas. Foi capturada uma imagem de cada matriz em microscópio confocal (Leica, TCS SP5) com aumento de 400 vezes.

Análise estatística

O método de randomização em bloco foi utilizado no delineamento de todos os experimentos. Para a avaliação do efeito da composição da matriz sobre a adesão celular, as amostras de células também foram estratificadas pelo paciente de origem. Nos experimentos de influência do soro e do número de células, os indivíduos que contaram as células não tinham conhecimento do experimento (*blinded*). No estudo que avaliou o efeito do

tipo de matriz, além dos indivíduos que contaram as células, o pesquisador que realizou a semeadura também desconhecia o grupo experimental (*double blinded*).

Para cada experimento de adesão, as células foram semeadas em 3 matrizes por tratamento, com 6 fotos capturadas por matriz, totalizando assim 18 amostras por grupo. Foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis para a análise intergrupos seguido pelo seu teste de comparações múltiplas (teste de Dunn) nos dois primeiros ensaios de adesão. Para o terceiro experimento de adesão (diferentes substratos), foi realizado o teste GEE (Equações de Estimação Generalizadas) e o teste de comparações múltiplas de Bonferroni. Utilizou-se o software SPSS 20.0 e considerou-se o nível de significância de $P < 0,05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Células aderidas nas variadas concentrações de DMEM e SFB

Após 1 hora de adesão à matriz de colágeno, houve diferença entre os grupos ($P < 0,001$). As células semeadas apenas com DMEM aderiram em maior número em comparação às semeadas com os outros tratamentos que incluíam soro, independente da concentração (Figuras 1 e 2; Tabela 1) Ainda, apresentaram boa eficiência de adesão, representada pela razão das células aderidas por células semeadas por área de foto (Tabela 2).

Esse resultado foi inesperado, em função de estudos terem mostrado anteriormente que a adesão das células a diversos materiais utilizados para cultivo tridimensional é possível em função da adsorção de proteínas do soro. Porém, nesses trabalhos foram utilizados materiais como hidroxiapatita e polímeros sintéticos, que naturalmente não possibilitam adesão celular, por não terem sítios de ligação às integrinas e a outros receptores de adesão celular. [30, 37, 38] As matrizes utilizadas nessa etapa do nosso estudo eram compostas de colágeno, que é uma proteína abundante na MEC com afinidade por algumas integrinas. Assim, é possível que a adesão tenha diminuído na presença de soro porque proteínas como fibronectina e vitronectina não tenham sido adsorvidas na sua forma ativa

pela matriz e ainda tenham competido pelos sítios de ligação do colágeno às integrinas celulares.

Outra possível explicação para esse resultado vem de um estudo que testou o efeito do SFB sobre a linhagem de fibroblastos TIG-1. Ele mostrou que SFB 60% induziu morte celular após 2-3 dias de cultivo, e SFB 80% induziu a morte das células em 24 horas de cultivo, provavelmente em função da citotoxicidade provocada pela fração de baixo peso molecular do soro. Embora o tempo de adesão do nosso estudo tenha sido de apenas 1 hora, é válido que se investigue se as concentrações de soro utilizadas estão provocando morte celular. [31]

Eficiência de adesão celular em relação ao número de células semeadas

A fim de avaliar se o número de células semeadas altera a eficiência de adesão, as células foram semeadas em diferentes densidades na matriz de colágeno. Em função do resultado encontrado na etapa anterior do estudo, a semeadura foi feita com DMEM puro. Foi utilizada a razão do número de células aderidas pelo número de células semeadas em cada área de foto para avaliar a adesão relativa ou eficiência de adesão de cada grupo.

A adesão relacionada às densidades de células semeadas apresentou diferença estatisticamente significativa ($P < 0,002$) para o número bruto de células. O grupo de 100 mil células por cm^2 apresentou mais células aderidas em relação aos grupos de 10 e 50 mil células por cm^2 (Figura 3; Tabela 3). Já em relação à eficiência, o resultado encontrado foi que para as densidades de 10 e 20 mil células por cm^2 de matriz a eficiência de adesão foi maior do que para a densidade de 50 mil células por cm^2 de matriz. Já em relação ao grupo de 100 mil células semeadas por cm^2 , não houve diferença estatisticamente significativa para eficiência (Figura 4; Tabelas 4 e 5).

A princípio, esse resultado indica que um maior número de células adere quando é semeada uma grande quantidade de células como 100 mil por cm^2 . Já a eficiência de adesão é melhor quando semeado um menor número de células. É possível que isso ocorra pela saturação dos sítios de

ligação ao colágeno quando grandes proporções de células são semeadas. Porém, não foi possível detectar diferença estatística na eficiência em relação ao grupo de 100 mil células por cm^2 , possivelmente em função da maior variabilidade nesse grupo quando comparado ao grupo de 50 mil células por cm^2 , onde a razão de células aderidas por células semeadas foi mais constante entre as amostras do grupo. Ainda assim, parece haver uma maior homogeneidade entre as amostras dos dois grupos com maiores densidades de células do que entre as amostras dos dois grupos de menores densidades. Como para um menor número de células existem mais espaços livres na matriz, a distribuição das mesmas é menos uniforme do que quando as células em grande quantidade tem uma superfície limitada de adesão.

Então, se por um lado uma grande densidade de células favorece a adesão (como valor bruto de células aderidas), a eficiência de adesão é pior, e perdem-se muitas células. Nós optamos por utilizar a semeadura de 20 mil células por cm^2 nas etapas posteriores do trabalho pela boa eficiência e pela maior homogeneidade de adesão em relação à semeadura com 10 mil células; ainda, a contagem das células nas fotos se tornou mais simples. Porém, para modelo de cultivo 3D deve-se avaliar melhor a escolha da densidade de semeadura, pois tecido prostático de paciente é um material de difícil obtenção para ser perdido com baixa eficiência de um grande número de células, mas o maior número de células aderidas reduz o tempo de experimento por existirem mais células para proliferarem.

Adesão celular nos diferentes substratos

Quando avaliada a influência da composição da matriz na adesão celular, houve diferença estatisticamente significativa ($P < 0,001$) entre os grupos. As matrizes que continham ácido hialurônico apresentaram mais células aderidas que as matrizes contendo heparina; porém nenhuma diferença na adesão em relação às matrizes de colágeno ou da mistura dos três componentes foi observada (Figuras 5 e 6; Tabela 6). A eficiência de adesão à matriz de colágeno com ácido hialurônico também foi satisfatória (Tabela 7).

A heparina favorece a adesão celular em materiais como o ácido polilático, que isoladamente não tem capacidade de promover adesão celular [39]. No entanto, ela inibe a adesão em superfícies cobertas com laminina ou fibronectina, possivelmente por se ligar a domínios de ligação à heparina. [40] Da mesma forma, a heparina também inibe a adesão celular ao colágeno tipo I, que apresenta domínio de ligação à heparina. [41]

É estabelecido que matrizes temporárias produzidas com ácido hialurônico puro favorecem a migração e inibem a adesão celular. [35, 42, 43] Porém, quando o ácido hialurônico foi tratado com poli-D-lisina favoreceu a adesão de fibroblastos. [44] A adição da sequência RGD à matriz de ácido hialurônico também favoreceu a adesão, o espalhamento e a proliferação de fibroblastos. [43]

Nosso resultado também condiz com o relatado em estudo que encontrou igual adesão de fibroblastos fetais humanos em matrizes de colágeno puro ou com variadas concentrações de ácido hialurônico. [45]

Proliferação celular nas matrizes com diferentes composições

Através do ensaio do EdU foi possível observar que as células proliferaram nas diferentes matrizes (dados parcialmente mostrados; Figura 7).

Conclusão

Neste estudo, conseguimos padronizar a semeadura de células de HPB em matrizes temporárias. Diferentemente do que acreditávamos no início do estudo, SFB diminuiu a adesão celular, o que ainda precisa ser investigado para que se estabeleça a causa deste fenômeno. As células aderiram com uma boa eficiência quando semeadas em baixas densidades, porém a adesão ocorreu de forma menos homogênea. Em relação às diferentes composições da matriz temporária, a combinação entre colágeno e ácido hialurônico favoreceu a adesão. Os resultados encontrados e podem ser utilizados como base para o estabelecimento de um modelo de cultura 3D de HPB.

Referências

- [1] J. MCNEAL, ORIGIN AND EVOLUTION OF BENIGN PROSTATIC ENLARGEMENT, *Investigative Urology* 15 (1978) 340-345.
- [2] S.J. Berry, D.S. Coffey, P.C. Walsh, L.L. Ewing, The development of human benign prostatic hyperplasia with age, *J Urol* 132 (1984) 474-479.
- [3] J.E. Oesterling, Benign prostatic hyperplasia: a review of its histogenesis and natural history, *Prostate Suppl* 6 (1996) 67-73.
- [4] W. Mahapokai, F. van Sluijs, J. Schalken, Models for studying benign prostatic hyperplasia, *Prostate Cancer and Prostatic Diseases* 3 (2000) 28-33.
- [5] F. Pampaloni, E.G. Reynaud, E.H. Stelzer, The third dimension bridges the gap between cell culture and live tissue, *Nat Rev Mol Cell Biol* 8 (2007) 839-845.
- [6] L.C. Windus, D.L. Kiss, T. Glover, V.M. Avery, In vivo biomarker expression patterns are preserved in 3D cultures of Prostate Cancer, *Exp Cell Res* 318 (2012) 2507-2519.
- [7] V. Härmä, J. Virtanen, R. Mäkelä, A. Happonen, J.P. Mpindi, M. Knuutila, P. Kohonen, J. Lötjönen, O. Kallioniemi, M. Nees, A comprehensive panel of three-dimensional models for studies of prostate cancer growth, invasion and drug responses, *PLoS One* 5 (2010) e10431.
- [8] A. Hussain, G. Collins, D. Yip, C.H. Cho, Functional 3-D cardiac co-culture model using bioactive chitosan nanofiber scaffolds, *Biotechnol Bioeng* 110 (2013) 637-647.
- [9] K.F. Chambers, J.F. Pearson, N. Aziz, P. O'Toole, D. Garrod, S.H. Lang, Stroma regulates increased epithelial lateral cell adhesion in 3D culture: a role for actin/cadherin dynamics, *PLoS One* 6 (2011) e18796.
- [10] R.O. Hynes, The extracellular matrix: not just pretty fibrils, *Science* 326 (2009) 1216-1219.
- [11] A.L. Berrier, K.M. Yamada, Cell-matrix adhesion, *J Cell Physiol* 213 (2007) 565-573.
- [12] E.G. Hayman, M.D. Pierschbacher, S. Suzuki, E. Ruoslahti, Vitronectin--a major cell attachment-promoting protein in fetal bovine serum, *Exp Cell Res* 160 (1985) 245-258.
- [13] T. Kurita, H. Namiki, Serum induced cell death, *Zoological Science*, 1993, Vol. 10, pp. 431-438.
- [14] S.Q. Liu, *Bioregenerative engineering: principles and applications*, John Wiley & Sons, Hoboken, New Jersey, 2007.
- [15] N. Volpi, J. Schiller, R. Stern, L. Soltés, Role, metabolism, chemical modifications and applications of hyaluronan, *Curr Med Chem* 16 (2009) 1718-1745.
- [16] A. Fakhari, C. Berklund, Applications and emerging trends of hyaluronic acid in tissue engineering, as a dermal filler and in osteoarthritis treatment, *Acta Biomater* 9 (2013) 7081-7092.
- [17] B. Casu, Structure and active domains of heparin, in: H. Garg, R. Linhardt, C. Hales (Eds.), *Chemistry and Biology of Heparin and Heparan Sulfate*, Elsevier, 2005.
- [18] S. Dånmark, A. Finne-Wistrand, A.C. Albertsson, M. Patarroyo, K. Mustafa, Integrin-mediated adhesion of human mesenchymal stem cells to extracellular matrix proteins adsorbed to polymer surfaces, *Biomed Mater* 7 (2012) 035011.
- [19] A.A. Sawyer, K.M. Hennessy, S.L. Bellis, The effect of adsorbed serum proteins, RGD and proteoglycan-binding peptides on the adhesion of mesenchymal stem cells to hydroxyapatite, *Biomaterials* 28 (2007) 383-392.
- [20] D. Yang, X. Lü, Y. Hong, T. Xi, D. Zhang, The molecular mechanism of mediation of adsorbed serum proteins to endothelial cells adhesion and growth on biomaterials, *Biomaterials* 34 (2013) 5747-5758.

- [21] A. Zhu, M. Zhang, J. Wu, J. Shen, Covalent immobilization of chitosan/heparin complex with a photosensitive hetero-bifunctional crosslinking reagent on PLA surface, *Biomaterials* 23 (2002) 4657-4665.
- [22] S.M. Smorenburg, C.J. Van Noorden, The complex effects of heparins on cancer progression and metastasis in experimental studies, *Pharmacol Rev* 53 (2001) 93-105.
- [23] J.D. San Antonio, A.D. Lander, M.J. Karnovsky, H.S. Slayter, Mapping the heparin-binding sites on type I collagen monomers and fibrils, *J Cell Biol* 125 (1994) 1179-1188.
- [24] A. Pavesio, D. Renier, C. Cassinelli, M. Morra, Anti-adhesive surfaces through hyaluronan coatings, *Med Device Technol* 8 (1997) 20-21, 24-27.
- [25] Y.D. Park, N. Tirelli, J.A. Hubbell, Photopolymerized hyaluronic acid-based hydrogels and interpenetrating networks, *Biomaterials* 24 (2003) 893-900.
- [26] M. Hu, E.E. Sabelman, S. Lai, E.K. Timek, F. Zhang, V.R. Hentz, W.C. Lineaweaver, Polypeptide resurfacing method improves fibroblast's adhesion to hyaluronan strands, *J Biomed Mater Res* 47 (1999) 79-84.
- [27] S.N. Park, H.J. Lee, K.H. Lee, H. Suh, Biological characterization of EDC-crosslinked collagen-hyaluronic acid matrix in dermal tissue restoration, *Biomaterials* 24 (2003) 1631-1641.

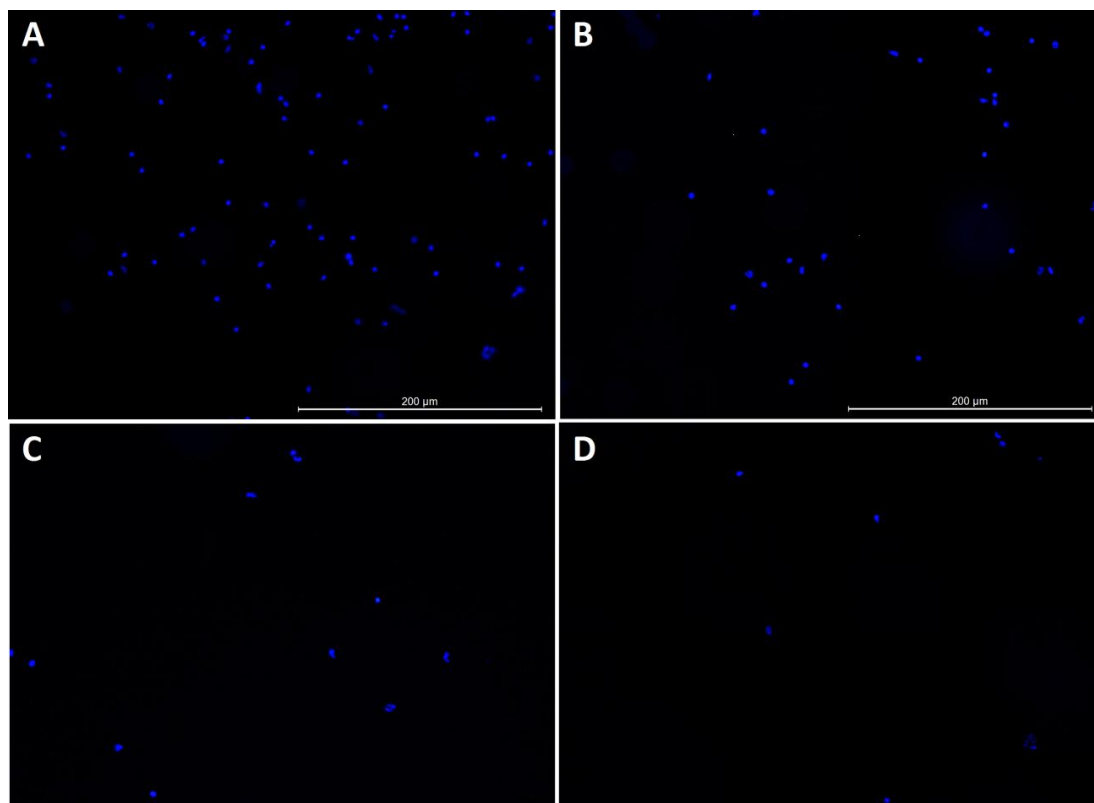
Figuras do artigo

Figura 1. Células com núcleo marcado com Hoechst (emissão de 450 nm) aderidas em matriz temporária de colágeno nas variadas concentrações de DMEM e SFB; fotos indicam a mediana de cada grupo. (A) DMEM puro; (B) DMEM com SFB 10%; (C) DMEM com SFB 40%; (D) SFB puro. Aumento de 200 vezes no microscópio de fluorescência.

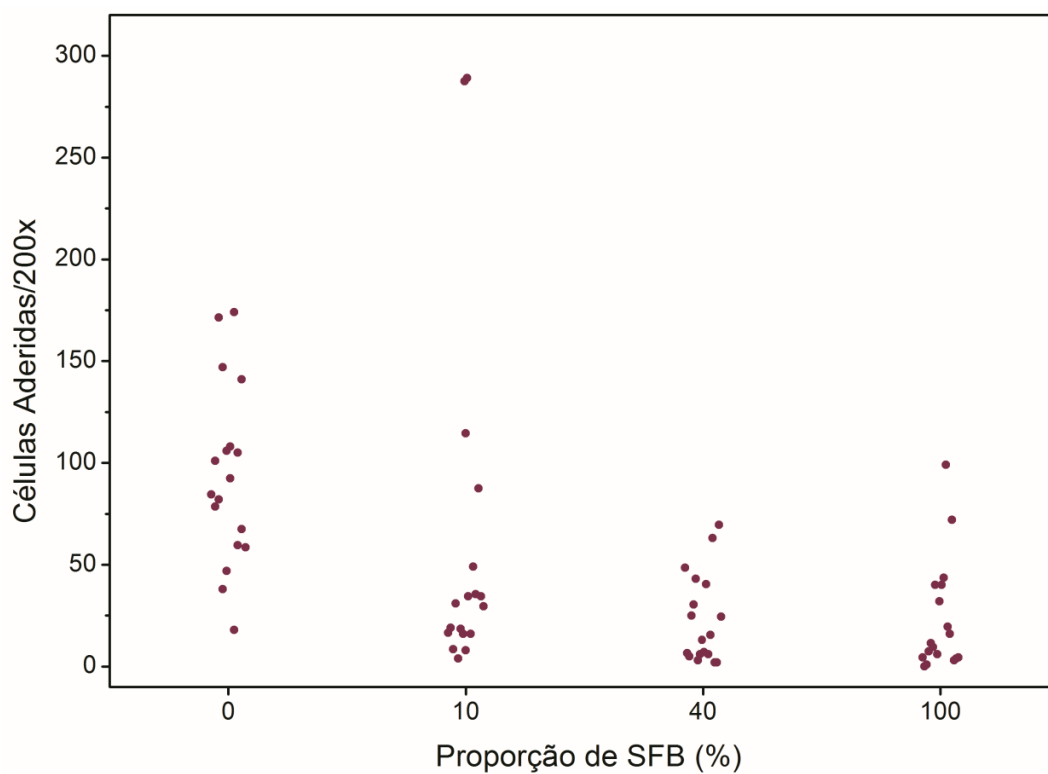


Figura 2. Gráfico do número de células aderidas por área de foto nas diferentes concentrações de soro fetal bovino no meio de cultivo DMEM: DMEM puro (0% SFB), DMEM com 10% de SFB, DMEM com 40% de SFB e soro puro (100% SFB). As células aderiram mais quando semeadas apenas em DMEM, em comparação a todos os grupos que continham soro ($P < 0,001$). Aumento de 200 vezes no microscópio de fluorescência.

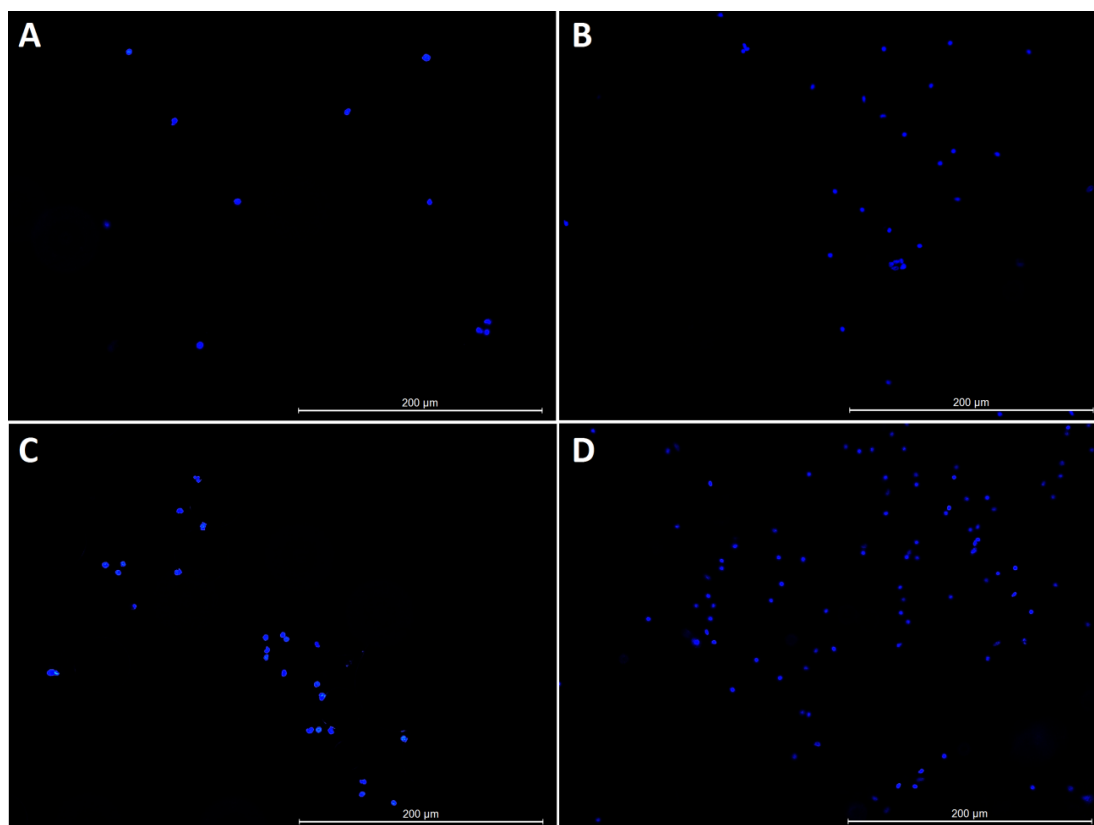


Figura 3. Células com núcleo marcado com Hoechst (emissão de 450 nm) aderidas em matriz temporária de colágeno nas variadas densidades de células por área de matriz; fotos indicam a mediana de cada grupo. (A) 10 mil células por cm^2 ; (B) 20 mil células por cm^2 ; (C) 50 mil células por cm^2 ; (D) 100 mil células por cm^2 . Aumento de 200 vezes no microscópio de fluorescência.

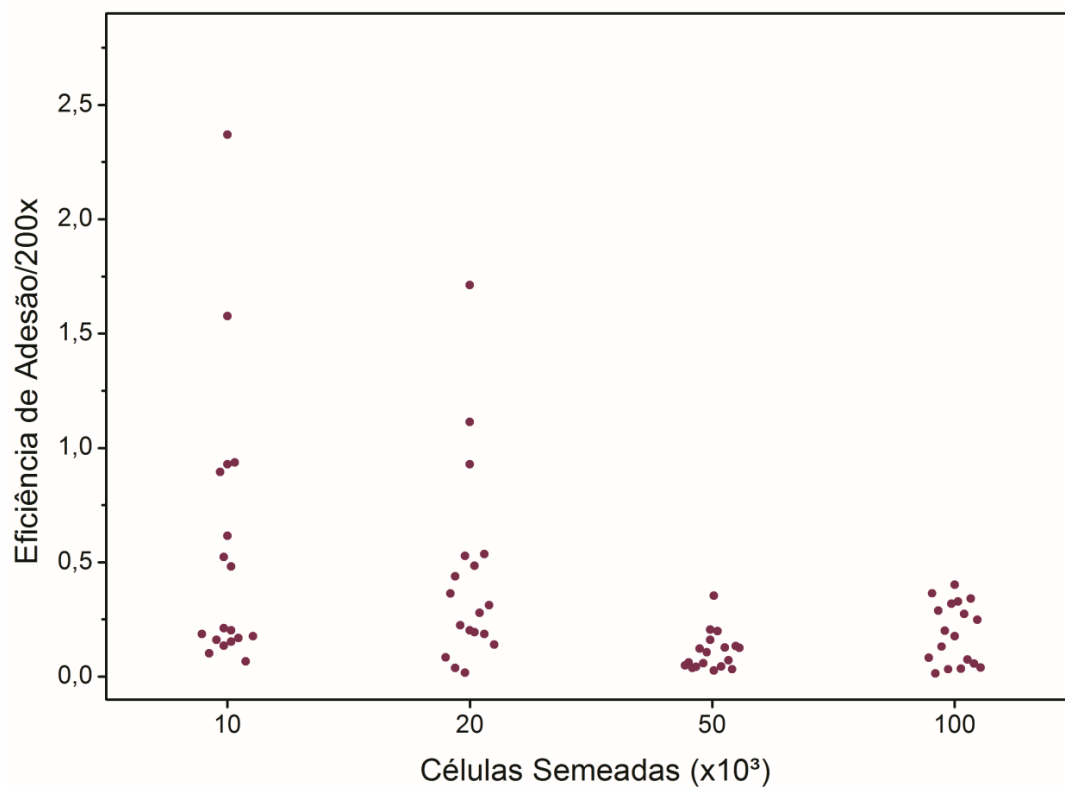


Figura 4. Gráfico da eficiência de adesão (razão do número de células aderidas pelo número de células semeadas, por área de foto) nas diferentes densidades de células em matriz de colágeno: 10, 20, 50 e 100 mil células por cm^2 . As células tiveram maior eficiência de adesão quando semeadas nas densidades de 10 e 20 mil por cm^2 , em relação à densidade de 50 mil células por cm^2 ($P < 0,05$). Aumento de 200 vezes no microscópio de fluorescência.

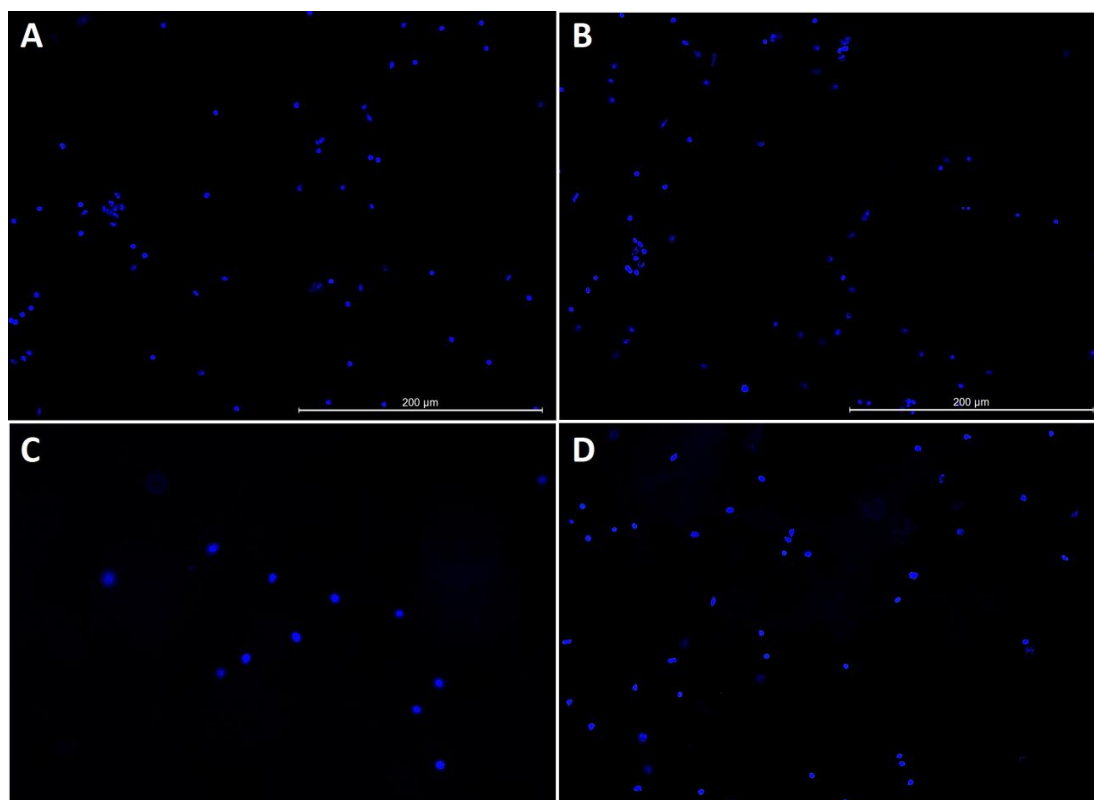


Figura 5. Células com núcleo marcado com Hoechst (emissão de 450 nm) aderidas nas diferentes composições de matriz. (A) Colágeno; (B) Colágeno e ácido hialurônico; (C) Colágeno e heparina; (D) Colágeno, ácido hialurônico e heparina. Fotos indicam a média estimada no teste GEE para cada grupo. Aumento de 200 vezes no microscópio de fluorescência.

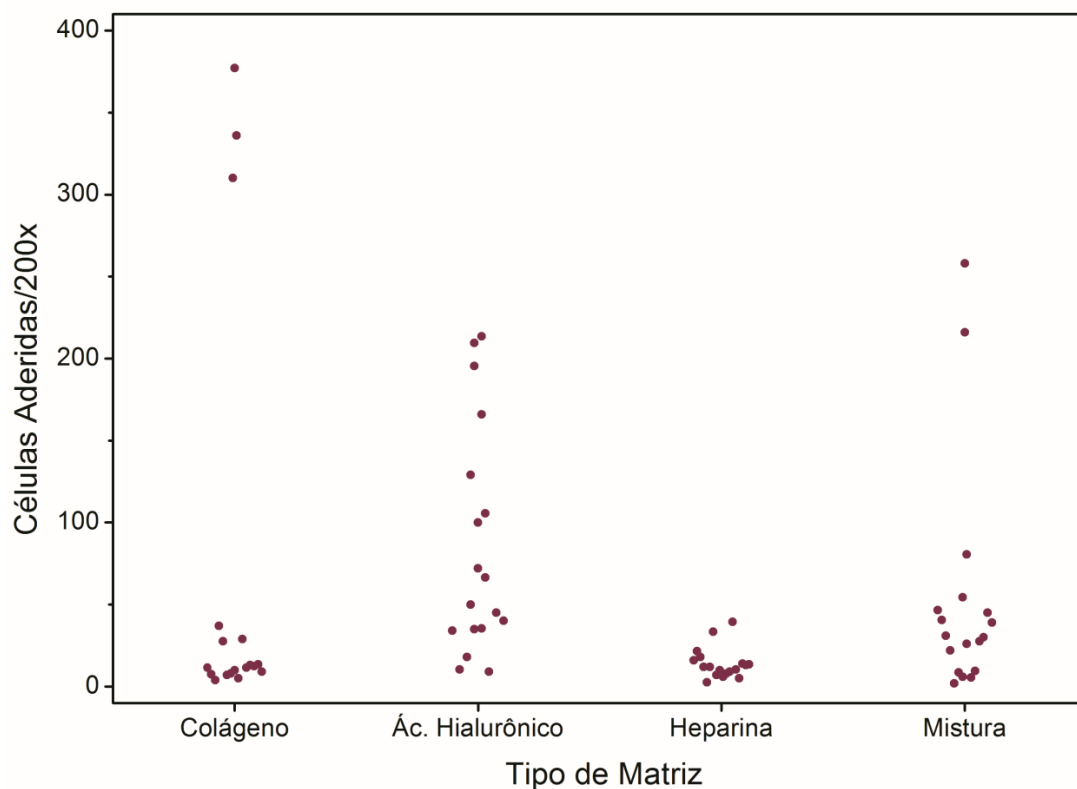


Figura 6. Gráfico do número de células aderidas por área de foto nas diferentes composições de matriz: colágeno, colágeno e ácido hialurônico (ác. hialurônico), colágeno e heparina (heparina) e colágeno, ácido hialurônico e heparina (mistura). As células aderiram mais à matriz contendo ácido hialurônico, quando comparada à matriz com heparina ($P < 0,05$). Aumento de 200 vezes no microscópio de fluorescência.

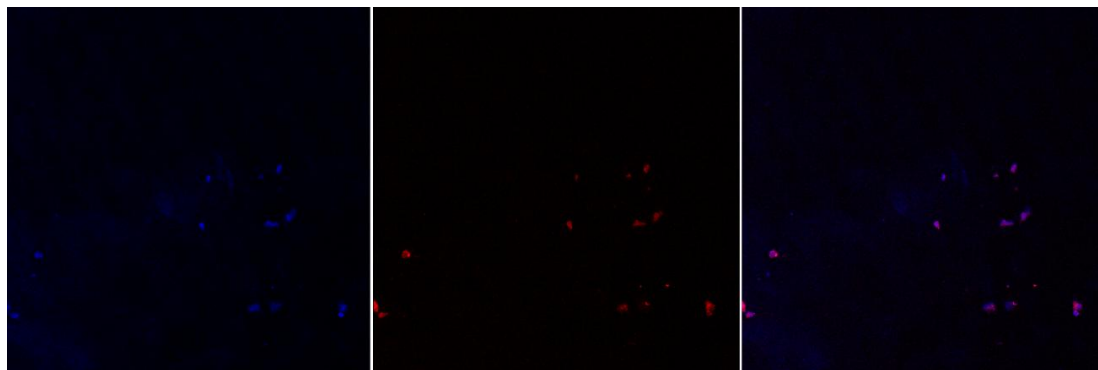


Figura 7. Células com núcleo marcado com Hoechst (azul) e EdU (vermelho; emissão de 647 nm) . Na imagem sobreposta, é possível observar a proliferação celular na matriz contendo ácido hialurônico através da incorporação do EdU (análogo da timidina) no DNA durante a fase S do ciclo celular. Aumento de 400 vezes no microscópio confocal.

Tabelas do artigo

Tabela 1. Comparações pareadas das medianas de células aderidas por grupo de concentração de SFB no meio de cultivo DMEM (0, 10, 40 e 100%)

	Medianas	Nível de significância
0 e 10%	88,50 – 30,25	$P = 0,036$
0 e 40%	88,50 – 14,25	$P < 0,001$
0 e 100%	88,50 – 10,50	$P < 0,001$
10 e 40%	30,25 – 14,25	NS*
40 e 100%	14,25 – 10,50	NS*

*NS: não significativo

Tabela 2. Eficiência de adesão para as diferentes concentrações de soro fetal bovino e DMEM

	Células aderidas/células semeadas (Mediana, mínimo e máximo)
DMEM puro	0,937 (0,474 – 0,950)
DMEM + SFB 10%	0,233 (0,122 – 1,189)
DMEM + SFB 40%	0,220 (0,100 – 0,257)
SFB 100%	0,132 (0,024 – 0,425)

Tabela 3. Comparações pareadas das medianas de células aderidas por grupo de densidade de células

	Medianas	Nível de significância
10 e 20 mil	12,25 – 35,00	NS*
10 e 50 mil	12,25 – 26,25	NS*
10 e 100 mil	12,25 – 112,00	$P < 0,002$
20 e 50 mil	35,00 – 26,25	NS*
50 e 100 mil	26,25 – 112,00	$P < 0,02$

*NS: não significativo

Tabela 4. Comparações pareadas das medianas da razão do número de células aderidas pelo número de células semeadas, por grupo de densidade de células

	Medianas	Nível de significância
10 e 20 mil	0,20 – 0,30	NS*
10 e 50 mil	0,20 – 0,09	$P = 0,006$
10 e 100 mil	0,20 – 0,19	NS*
20 e 50 mil	0,30 – 0,09	$P = 0,002$
50 e 100 mil	0,09 – 0,19	NS*

*NS: não significativo

Tabela 5. Eficiência de adesão para as diferentes densidades de células semeadas

	Células aderidas/células semeadas (Mediana, mínimo e máximo)
10 mil	0,202 (0,067 – 2,294)
20 mil	0,304 (0,017 – 1,847)
50 mil	0,091 (0,027 – 0,358)
100 mil	0,191 (0,015 – 0,442)

Tabela 6. Comparações pareadas das médias estimadas por grupo de composição de matriz temporária: colágeno puro (Colágeno), colágeno e ácido hialurônico (Ác. hialurônico), colágeno e heparina (Heparina) e colágeno, ácido hialurônico e heparina (Mistura)

	Médias	Nível de significância
Colágeno e Ác. hialurônico	68,28 – 85,25	NS*
Colágeno e Heparina	68,28 – 13,94	NS*
Colágeno e Mistura	68,28 – 52,67	NS*
Ác. hialurônico e Heparina	85,25 – 13,94	$P = 0,019$
Heparina e Mistura	13,94 – 52, 67	NS*

*NS: não significativo

Tabela 7. Eficiência de adesão nas diferentes composições de matriz

	Células aderidas/células semeadas (Média \pm desvio padrão)
Colágeno	0,576 \pm 0,366
Ácido hialurônico	0,719 \pm 0,210
Heparina	0,118 \pm 0,007
Mistura	0,444 \pm 0,203

3 CONCLUSÕES E PERSPECTIVA

Nesse trabalho, foi possível padronizar as condições de adesão de células de pacientes com HPB, e verificar que as células conseguem proliferar nas diferentes matrizes temporárias propostas. Essas descobertas irão possibilitar o estabelecimento de um modelo de cultivo de células primárias de HPB, e o cocultivo de células primárias epiteliais e estromais. Porém, o trabalho levantou questões que precisam ser mais bem investigadas, como o motivo de o SFB estar prejudicando a adesão celular.

Como perspectivas futuras, será realizado o cultivo 3D primário de HPB, para avaliar a interação de células epiteliais e estromais e a possível formação de um tecido semelhante à HPB *in vivo*.

BIBLIOGRAFIA

- [1] J. Lee, M.J. Cuddihy, N.A. Kotov, Three-dimensional cell culture matrices: state of the art, *Tissue Eng Part B Rev* 14 (2008) 61-86.
- [2] L. Meli, E.T. Jordan, D.S. Clark, R.J. Linhardt, J.S. Dordick, Influence of a three-dimensional, microarray environment on human cell culture in drug screening systems, *Biomaterials* 33 (2012) 9087-9096.
- [3] L.S. Liu, A.Y. Thompson, M.A. Heidarani, J.W. Poser, R.C. Spiro, An osteoconductive collagen/hyaluronate matrix for bone regeneration, *Biomaterials* 20 (1999) 1097-1108.
- [4] J. MCNEAL, ORIGIN AND EVOLUTION OF BENIGN PROSTATIC ENLARGEMENT, *Investigative Urology* 15 (1978) 340-345.
- [5] S.J. Berry, D.S. Coffey, P.C. Walsh, L.L. Ewing, The development of human benign prostatic hyperplasia with age, *J Urol* 132 (1984) 474-479.
- [6] M. BARRY, F. FOWLER, M. OLEARY, R. BRUSKEWITZ, H. HOLTGREWE, W. MEBUST, A. COCKETT, J. BLAIVAS, A. WEIN, THE AMERICAN-UROLOGICAL-ASSOCIATION SYMPTOM INDEX FOR BENIGN PROSTATIC HYPERPLASIA, *Journal of Urology* 148 (1992) 1549-1557.
- [7] A.D. Rule, M.M. Lieber, S.J. Jacobsen, Is benign prostatic hyperplasia a risk factor for chronic renal failure?, *J Urol* 173 (2005) 691-696.
- [8] H.P. Rohr, G. Bartsch, Human benign prostatic hyperplasia: a stromal disease? New perspectives by quantitative morphology, *Urology* 16 (1980) 625-633.
- [9] J.E. Oesterling, Benign prostatic hyperplasia: a review of its histogenesis and natural history, *Prostate Suppl* 6 (1996) 67-73.
- [10] W. Mahapokai, F. van Sluijs, J. Schalken, Models for studying benign prostatic hyperplasia, *Prostate Cancer and Prostatic Diseases* 3 (2000) 28-33.
- [11] C. Bayne, F. Donnelly, K. Chapman, P. Bollina, C. Buck, F. Habib, A novel coculture model for benign prostatic hyperplasia expressing both isoforms of 5 alpha-reductase, *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 83 (1998) 206-213.
- [12] H.K. Kleinman, D. Philp, M.P. Hoffman, Role of the extracellular matrix in morphogenesis, *Curr Opin Biotechnol* 14 (2003) 526-532.
- [13] M. Aumailley, B. Gayraud, Structure and biological activity of the extracellular matrix, *J Mol Med (Berl)* 76 (1998) 253-265.
- [14] R.O. Hynes, Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines, *Cell* 110 (2002) 673-687.
- [15] R.O. Hynes, The extracellular matrix: not just pretty fibrils, *Science* 326 (2009) 1216-1219.
- [16] A.L. Berrier, K.M. Yamada, Cell-matrix adhesion, *J Cell Physiol* 213 (2007) 565-573.
- [17] R.D. Burke, Invertebrate integrins: structure, function, and evolution, *Int Rev Cytol* 191 (1999) 257-284.
- [18] M.A. Schwartz, M.D. Schaller, M.H. Ginsberg, Integrins: emerging paradigms of signal transduction, *Annu Rev Cell Dev Biol* 11 (1995) 549-599.
- [19] F. Pampaloni, E.G. Reynaud, E.H. Stelzer, The third dimension bridges the gap between cell culture and live tissue, *Nat Rev Mol Cell Biol* 8 (2007) 839-845.
- [20] M.P. Lutolf, J.A. Hubbell, Synthetic biomaterials as instructive extracellular microenvironments for morphogenesis in tissue engineering, *Nat Biotechnol* 23 (2005) 47-55.
- [21] J. Debnath, J.S. Brugge, Modelling glandular epithelial cancers in three-dimensional cultures, *Nat Rev Cancer* 5 (2005) 675-688.

- [22] M. Larsen, V.V. Artym, J.A. Green, K.M. Yamada, The matrix reorganized: extracellular matrix remodeling and integrin signaling, *Curr Opin Cell Biol* 18 (2006) 463-471.
- [23] V. Härmä, J. Virtanen, R. Mäkelä, A. Happonen, J.P. Mpindi, M. Knuutila, P. Kohonen, J. Lötjönen, O. Kallioniemi, M. Nees, A comprehensive panel of three-dimensional models for studies of prostate cancer growth, invasion and drug responses, *PLoS One* 5 (2010) e10431.
- [24] L.C. Windus, D.L. Kiss, T. Glover, V.M. Avery, In vivo biomarker expression patterns are preserved in 3D cultures of Prostate Cancer, *Exp Cell Res* 318 (2012) 2507-2519.
- [25] A. Hussain, G. Collins, D. Yip, C.H. Cho, Functional 3-D cardiac co-culture model using bioactive chitosan nanofiber scaffolds, *Biotechnol Bioeng* 110 (2013) 637-647.
- [26] K.F. Chambers, J.F. Pearson, N. Aziz, P. O'Toole, D. Garrod, S.H. Lang, Stroma regulates increased epithelial lateral cell adhesion in 3D culture: a role for actin/cadherin dynamics, *PLoS One* 6 (2011) e18796.
- [27] D. Brunner, J. Frank, H. Appl, H. Schöffl, W. Pfaller, G. Gstraunthaler, Serum-free cell culture: the serum-free media interactive online database, *ALTEX* 27 (2010) 53-62.
- [28] E.G. Hayman, M.D. Pierschbacher, S. Suzuki, E. Ruoslahti, Vitronectin--a major cell attachment-promoting protein in fetal bovine serum, *Exp Cell Res* 160 (1985) 245-258.
- [29] C.J. Wilson, R.E. Clegg, D.I. Leavesley, M.J. Percy, Mediation of biomaterial-cell interactions by adsorbed proteins: a review, *Tissue Eng* 11 (2005) 1-18.
- [30] A.A. Sawyer, K.M. Hennessy, S.L. Bellis, The effect of adsorbed serum proteins, RGD and proteoglycan-binding peptides on the adhesion of mesenchymal stem cells to hydroxyapatite, *Biomaterials* 28 (2007) 383-392.
- [31] T. Kurita, H. Namiki, Serum induced cell death, *Zoological Science*, 1993, Vol. 10, pp. 431-438.
- [32] X.X. Shao, N.A. Duncan, L. Lin, X. Fu, J.Y. Zhang, C.L. Yu, Serum-free media for articular chondrocytes in vitro expansion, *Chin Med J (Engl)* 126 (2013) 2523-2529.
- [33] S.Q. Liu, *Bioregenerative engineering: principles and applications*, John Wiley & Sons, Hoboken, New Jersey, 2007.
- [34] N. Volpi, J. Schiller, R. Stern, L. Soltés, Role, metabolism, chemical modifications and applications of hyaluronan, *Curr Med Chem* 16 (2009) 1718-1745.
- [35] A. Fakhari, C. Berklund, Applications and emerging trends of hyaluronic acid in tissue engineering, as a dermal filler and in osteoarthritis treatment, *Acta Biomater* 9 (2013) 7081-7092.
- [36] B. Casu, Structure and active domains of heparin, in: H. Garg, R. Linhardt, C. Hales (Eds.), *Chemistry and Biology of Heparin and Heparan Sulfate*, Elsevier, 2005.
- [37] S. Dånmark, A. Finne-Wistrand, A.C. Albertsson, M. Patarroyo, K. Mustafa, Integrin-mediated adhesion of human mesenchymal stem cells to extracellular matrix proteins adsorbed to polymer surfaces, *Biomed Mater* 7 (2012) 035011.
- [38] D. Yang, X. Lü, Y. Hong, T. Xi, D. Zhang, The molecular mechanism of mediation of adsorbed serum proteins to endothelial cells adhesion and growth on biomaterials, *Biomaterials* 34 (2013) 5747-5758.
- [39] A. Zhu, M. Zhang, J. Wu, J. Shen, Covalent immobilization of chitosan/heparin complex with a photosensitive hetero-bifunctional crosslinking reagent on PLA surface, *Biomaterials* 23 (2002) 4657-4665.
- [40] S.M. Smorenburg, C.J. Van Noorden, The complex effects of heparins on cancer progression and metastasis in experimental studies, *Pharmacol Rev* 53 (2001) 93-105.
- [41] J.D. San Antonio, A.D. Lander, M.J. Karnovsky, H.S. Slayter, Mapping the heparin-binding sites on type I collagen monomers and fibrils, *J Cell Biol* 125 (1994) 1179-1188.

- [42] A. Pavesio, D. Renier, C. Cassinelli, M. Morra, Anti-adhesive surfaces through hyaluronan coatings, *Med Device Technol* 8 (1997) 20-21, 24-27.
- [43] Y.D. Park, N. Tirelli, J.A. Hubbell, Photopolymerized hyaluronic acid-based hydrogels and interpenetrating networks, *Biomaterials* 24 (2003) 893-900.
- [44] M. Hu, E.E. Sabelman, S. Lai, E.K. Timek, F. Zhang, V.R. Hentz, W.C. Lineaweaver, Polypeptide resurfacing method improves fibroblast's adhesion to hyaluronan strands, *J Biomed Mater Res* 47 (1999) 79-84.
- [45] S.N. Park, H.J. Lee, K.H. Lee, H. Suh, Biological characterization of EDC-crosslinked collagen-hyaluronic acid matrix in dermal tissue restoration, *Biomaterials* 24 (2003) 1631-1641.

ANEXO – Orientações do periódico *Experimental Cell Research* aos autores

Types of paper

Manuscripts can be published in the format of **regular articles**. There is no strict size limitation on regular articles, although they usually do not exceed 15,000 words, preceded by an abstract not to exceed 200 words. *ECR* also publishes review articles, which should be between 3000 and 5000 words in length. *ECR* does not accept unsolicited **review articles** unless they are preapproved by the Editor-in-Chief. All review articles will be subject to review before publication.

PREPARATION

NEW SUBMISSIONS

Submission to this journal proceeds totally online and you will be guided stepwise through the creation and uploading of your files. The system automatically converts your files to a single PDF file, which is used in the peer-review process.

As part of the Simplified Submission service, you may choose to submit your manuscript as a single file to be used in the refereeing process. This can be a PDF file or a Word document, in any format or lay-out that can be used by referees to evaluate your manuscript. It should contain high enough quality figures for refereeing. If you prefer to do so, you may still provide all or some of the source files at the initial submission. Please note that individual figure files larger than 10 MB must be uploaded separately.

References

There are no strict requirements on reference formatting. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Author(s) name(s), journal title / book title, article title, year of publication, volume number / book chapter number and the pagination must be present. The reference style required by the journal will be applied to the published version by Elsevier.

Formatting requirements

There are no strict formatting requirements but all manuscripts must contain the essential elements needed to convey your manuscript, for example Abstract, Keywords, Introduction, Materials and Methods, Results, Conclusions, Artwork and Tables with Captions.

If your article includes any Videos and/or other Supplementary material, this should be included in your initial submission for peer review purposes.

Divide the article into clearly defined sections. It is not necessary to format your manuscript in double column layout, even if the journal has a double column layout.

Please note that the instructions related to Abbreviations, Abstract, Graphical abstract & Keywords still apply to all new submissions.

REVISED SUBMISSIONS

Use of wordprocessing software

Regardless of the file format of the original submission, at revision you must provide us with an editable file of the entire article. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed

and replaced on processing the article. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier:

<http://www.elsevier.com/guidepublication>). See also the section on Electronic artwork.

To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your wordprocessor.

Article structure

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Material and methods

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

Essential title page information

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.

- **Author names and affiliations.** Where the family name may be ambiguous (e.g., a double name), please indicate this clearly. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.

- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. **Ensure that phone numbers (with country and area code) are provided in addition to the e-mail address and the complete postal address.**

Contact details must be kept up to date by the corresponding author.

- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so

it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

Graphical abstract

A Graphical abstract is optional and should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership online. Authors must provide images that clearly represent the work described in the article. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Image size: Please provide an image with a minimum of 531 × 1328 pixels (h × w) or proportionally more. The image should be readable at a size of 5 × 13 cm using a regular screen resolution of 96 dpi. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. See <http://www.elsevier.com/graphicalabstracts> for examples.

Authors can make use of Elsevier's Illustration and Enhancement service to ensure the best presentation of their images also in accordance with all technical requirements: [Illustration Service](#).

Highlights

Highlights are mandatory for this journal. They consist of a short collection of bullet points that convey the core findings of the article and should be submitted in a separate file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point). See <http://www.elsevier.com/highlights> for examples.

Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Abbreviations

Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

Database linking

Elsevier encourages authors to connect articles with external databases, giving their readers oneclick access to relevant databases that help to build a better understanding of the described research.

Please refer to relevant database identifiers using the following format in your article: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN). See <http://www.elsevier.com/databaselinking> for more information and a full list of supported databases.

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article. Many wordprocessors build footnotes into the text, and this feature may be used. Should this not be the case, indicate the position of footnotes in the text and present the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

Table footnotes

Indicate each footnote in a table with a superscript lowercase letter.

Artwork

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Preferred fonts: Arial (or Helvetica), Times New Roman (or Times), Symbol, Courier.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Indicate per figure if it is a single, 1.5 or 2-column fitting image.
- For Word submissions only, you may still provide figures and their captions, and tables within a single file at the revision stage.
- Please note that individual figure files larger than 10 MB must be provided in separate source files.

A detailed guide on electronic artwork is available on our website:

<http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

Regardless of the application used, when your electronic artwork is finalized, please 'save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS (or PDF): Vector drawings. Embed the font or save the text as 'graphics'.

TIFF (or JPG): Color or grayscale photographs (halftones): always use a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPG): Bitmapped line drawings: use a minimum of 1000 dpi.

TIFF (or JPG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale): a minimum of 500 dpi is required.

Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); the resolution is too low.
- Supply files that are too low in resolution.
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF) or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color on the Web (e.g., ScienceDirect and other sites) in addition to color reproduction in print. For further information on the preparation of electronic artwork, please see <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

References*Citation in text*

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

Web references

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

References in a special issue

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

Reference management software

This journal has standard templates available in key reference management

packages EndNote (<http://www.endnote.com/support/enstyles.asp>) and Reference Manager (<http://refman.com/support/rmstyles.asp>). Using plug-ins to wordprocessing packages, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article and the list of references and citations to these will be formatted according to the journal style which is described below.

Journal abbreviations source

Journal names should be abbreviated according to:

List of title word abbreviations: <http://www.issn.org/2-22661-LTWA-online.php>; NLM Catalog

(Journals referenced in the NCBI Databases): <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nlmcatalog/journals>;

CAS (Chemical Abstracts Service): via <http://www.cas.org/content/references/corejournals>.

Video data

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include links to these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly

relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the files in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 50 MB. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>.

Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our video instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>. Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

AudioSlides

The journal encourages authors to create an AudioSlides presentation with their published article.

AudioSlides are brief, webinar-style presentations that are shown next to the online article on ScienceDirect. This gives authors the opportunity to summarize their research in their own words and to help readers understand what the paper is about. More information and examples are available at <http://www.elsevier.com/audioslides>. Authors of this journal will automatically receive an invitation e-mail to create an AudioSlides presentation after acceptance of their paper.

Supplementary data

Elsevier accepts electronic supplementary material to support and enhance your scientific research.

Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, highresolution images, background datasets, sound clips and more. Supplementary files supplied will be published online alongside the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. In order to ensure that your submitted material is directly usable, please provide the data in one of our recommended file formats. Authors should submit the material in electronic format together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. For more detailed instructions please visit our artwork instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Submission checklist

The following list will be useful during the final checking of an article prior to sending it to the journal for review. Please consult this Guide for Authors for further details of any item.

Ensure that the following items are present:

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address
- Telephone

All necessary files have been uploaded, and contain:

- Keywords
- All figure captions
- All tables (including title, description, footnotes)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell-checked' and 'grammar-checked'
- All references mentioned in the Reference list are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Web)
- Color figures are clearly marked as being intended for color reproduction on the Web (free of charge) and in print, or to be reproduced in color on the Web (free of charge) and in black-and-white in print
- If only color on the Web is required, black-and-white versions of the figures are also supplied for printing purposes

For any further information please visit our customer support site at

<http://support.elsevier.c>