



UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE- CCBS
DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA – DEFAR
CURSO DE FARMÁCIA



ANA PAULA MESQUITA SOUZA

**ESTABELECIMENTO DE PROTOCOLO DE CULTURA 3D COM LINHAGENS DE
CÉLULAS TUMORAIS HUMANAS E FIBROBLASTO**

SÃO LUÍS

2019

ANA PAULA MESQUITA SOUZA

**ESTABELECIMENTO DE PROTOCOLO DE CULTURA 3D COM LINHAGENS DE
CÉLULAS TUMORAIS HUMANAS E FIBROBLASTO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Departamento do Curso de Farmácia da Universidade Federal do Maranhão, como pré-requisito para obtenção do grau de bacharel em Farmácia.

Orientadora: Profa. Dra. Ana Paula Silva de Azevedo dos Santos Trabalho de conclusão de curso

SÃO LUÍS

2019

Ficha gerada por meio do SIGAA/Biblioteca com dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Núcleo Integrado de Bibliotecas/UFMA

Souza, Ana Paula Mesquita.

Estabelecimento de protocolo de cultura 3D com
linhagens de células tumorais humanas e fibroblasto / Ana
Paula Mesquita Souza. - 2019.

32 f.

Orientador(a): Ana Paula Silva de Azevedo dos Santos.
Monografia (Graduação) - Curso de Farmácia,
Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2019.

1. Câncer. 2. Cultura 3D. 3. Microambiente tumoral.
I. Santos, Ana Paula Silva de Azevedo dos. II. Título.

ANA PAULA MESQUITA SOUZA

**ESTABELECIMENTO DE PROTOCOLO DE CULTURA 3D COM LINHAGENS DE
CELULAS TUMORAIS HUMANAS E FIBROBLASTO**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Departamento do Curso de
Farmácia da Universidade Federal do
Maranhão, como pré-requisito para
obtenção do grau de bacharel em
Farmácia.

Aprovado em: _____ de _____ de _____ Nota: _____

Banca examinadora:

Profa. Dra. Ana Paula Silva de Azevedo dos Santos – UFMA
Doutora em Imunologia

Profa. Dra. Sally Cristina Moutinho Monteiro – UFMA
Doutora em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia

Profa. Ma. Elis Victor Benatti – UNINASSAU
Mestre em Biofotônica Aplicada às Ciências da Saúde

Profa. Dra. Patrícia de Maria Silva Figueiredo – UFMA
Doutora em Microbiologia

SÃO LUÍS

2019

Embora o prazer seja nosso bem primeiro e inato, nem por isso escolhemos qualquer prazer: há ocasiões em que evitamos muitos prazeres, se um prazer maior advir depois de suportamos essas dores por muito tempo. Portanto, todo prazer constitui um bem por sua própria natureza, não obstante isso, nem todos são escolhidos, do mesmo modo, toda a dor é um mal, mas nem todas devem ser evitadas.

Epicuro

AGRADECIMENTOS

A minha mãe Simone, por seu amor e apoio incondicional à todas as minhas decisões, pelo seu suporte e por nunca ter me deixado desistir. A sua caminhada de vida é minha inspiração e a razão de eu ter chegado até aqui.

A minha família, em especial minha irmã Anamaria, minha avó Ana Zélia e meu pai Rogério pelo apoio e pelas palavras de incentivo.

A minha orientadora Dra Ana Paula Santos, pelos ensinamentos, atenção e dedicação. Sua paixão pela ciência é um exemplo que desejo levar para minha vida.

A meus companheiros de laboratório do LIAC, em especial a Sulayne, Luzimar, Ana Luiza e Mirtes, pela paciência e amparo durante os momentos angustiantes e aflitos ao longo dos experimentos.

Aos amigos que o curso de farmácia me proporcionou conhecer, tanto os com quem iniciei essa jornada quanto os que me acolheram na metade do curso, o Corredor. Vocês tornaram essa caminhada muito mais fácil e prazerosa, com as risadas, conselhos, companhia, e o mais importante, a amizade, que eu espero levar para o resto da vida.

As minhas “Fourmigas” ou “Cocós”: Carla, Lidia e Raissa, que compartilharam todos os momentos comigo, os bons, os ruins, os dias em que os humilhados são exaltados e os dias que os humilhados continuam humilhados, seja de perto ou de longe (às vezes de muito longe), tenho muita sorte de ter encontrado essas fadas sensatas e sem defeitos e de poder contar com elas na vida.

A todas as professoras e professores que, cada um à sua maneira, dividiram um pouco do seu conhecimento comigo.

Dedico um agradecimento especial às professoras que se dispuseram a integrar minha banca, Dra Sally Monteiro, Elis Victor e Dra Patricia Figueiredo. Três exemplos de mulheres na ciência a quem eu possuo uma grande admiração.

E finalmente, agradeço à UFMA, por ter proporcionado o ambiente para eu viver ao máximo a graduação e agradeço à FAPEMA e ao CNPQ, sem os qual não teria sido possível realizar esta pesquisa.

RESUMO

O Câncer é a denominação dada a um conjunto de doenças que se caracterizam pelo crescimento desordenado de células e pela invasão e propagação dessas células para vários tecidos e é um dos problemas de saúde mais prevalentes da atualidade. Os tumores têm característica de serem tecidos altamente heterogêneos não podendo ter seu microambiente tumoral fielmente reproduzidos *in vitro* pelas técnicas tradicionais bidimensionais. Assim, o objetivo do trabalho foi desenvolver e estabelecer um protocolo de cultura 3D, utilizando linhagens de células tumorais humanas e linhagens de fibroblastos humanos, de modo a caracterizar inicialmente o modelo quanto ao crescimento e a viabilidade. Para isso, células de linhagens imortalizadas de fibroblastos (GM) e de células tumorais (MCF7 e HeLa) foram cultivadas em placas com o fundo revestido com agarose, forçando as células a se auto agregarem e formarem uma estrutura esferoide. Os esferoides foram medidos no quarto e sétimo dia de cultura para avaliar o crescimento e no sétimo dia foram submetidos a um ensaio de MTT para a análise da viabilidade. Dadas as condições adequadas é possível se obter uma cultura de células tumorais e de fibroblastos tridimensional. No geral, as linhagens utilizadas apresentaram características parecidas entre si no padrão de crescimento, apresentando, em menor ou maior grau, uma tendência a diminuir ao longo do tempo. A viabilidade das linhagens na cultura 3D mostrou uma boa adaptação das células ao modelo, representando que a técnica se dá como uma alternativa para ensaios futuros com um modelo que mimetiza melhor as condições biológicas dos tecidos.

Palavras-chave: Câncer. Cultura 3D. Microambiente tumoral.

ABSTRACT

Cancer is the name given to a set of diseases that are characterized by the disordered growth of cells and the invasion and spread of these cells to various tissues and is one of the most prevalent health problems today. Tumors have the characteristic of being highly heterogeneous tissues and their tumor microenvironment cannot be faithfully reproduced *in vitro* by traditional two-dimensional techniques. Thus, the objective of this thesis was to develop and establish a 3D culture protocol, using human tumor cell strains and human fibroblast strains, in order to initially characterize the model for growth and viability. For this purpose, immortalized fibroblast (GM) and tumor cell strains (MCF7 and HeLa) were cultured on agarose coated plates, forcing the cells to self-aggregate to form a spheroid structure. The spheroids were measured on the fourth and seventh day of the culture to evaluate growth and on the seventh day were submitted to an MTT assay for viability analysis. Given the proper conditions it is possible to obtain a three-dimensional culture of tumor cells and fibroblasts. In general, the strains used showed similar characteristics amongst each other in their growth pattern, presenting, to a lesser or greater degree, a tendency to decrease over time. The viability of the cells in the 3D culture showed a good adaptation of the cells to the model, representing that the technique is given as an alternative for future trials with a model that better mimics the biological conditions of the tissues.

Key words: Cancer, 3D cell culture, Tumor microenvironment.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação do Cronograma experimental.....	19
Figura 2 – Fotomicrografia representativa dos esferoides formados nas diferentes condições no quarto e sétimo dia de cultura.	21
Figura 3 – Tamanho dos esferoides de fibroblasto	22
Figura 4 – Tamanho dos esferoides das linhagens tumorais.	23
Figura 5 – Tamanho dos esferoides em co-cultura	23
Figura 6 – Comparação do Tamanho do esferoide entre as Linhagens.....	24
Figura 7 – Representação morfológica das linhagens celulares no cultivo 2D	26
Figura 8 – Comparação da viabilidade entre os modelos 2D e 3D	27
Figura 9 – Viabilidade dos modelos de cultura 3D	28

LISTA DE SIGLAS

2D - Bidimensional

3D – Tridimensional

ANOVA – Análise de variância

DMEM - *Dulbecco modified eagles's medium*

MTT – brometo de 3- [4,5- dimetil-2y] -2,5 diphenyltertrazolio

nm – nanômetro

PBS – Tampão fosfato salino

SFB – Soro fetal bovino

UV – Ultravioleta

µm - micrômetro

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	11
2.	REFERENCIAL TEÓRICO	13
2.1	O Histórico da Cultura de Células	13
2.2	O Modelo de Cultura 3D	14
2.3	Câncer e o uso de cultura 3D para recriar o microambiente tumoral	15
3.	OBJETIVOS	17
3.1	OBJETIVO GERAL.....	17
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
4.	METODOLOGIA	18
4.1	Cultura Celular.....	18
4.2	Estabelecimento da cultura 3D.....	18
4.3	Caracterização do Esferoide	19
4.3.1	Tamanho e Morfologia do Esferoide.....	19
4.3.2	Viabilidade Celular.....	19
4.4	Análise dos Dados.....	20
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	21
5.1	Tamanho e Morfologia do Esferoide.....	21
5.2	Viabilidade Celular.....	26
6.	CONCLUSÃO	30
	REFERÊNCIAS	31

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

O câncer é um dos principais problemas de saúde da atualidade. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), só em 2018 o número de novos casos foi de 18.1 milhões e o número de mortes pela doença foi de 6.9 milhões de pessoas. De acordo com a organização, é estimado que um em cada 5 homens e uma em cada 6 mulheres terão a doença durante a vida, e destes, um em cada 8 homens e uma em cada 11 mulheres entrarão em óbito em decorrência dessa enfermidade (WHO, 2018).

Câncer é a denominação dada a um conjunto de doenças que se caracterizam pelo crescimento desordenado de células e pela invasão e propagação dessas células para vários tecidos. Mais de 100 doenças com essas características já foram previamente descritas e o câncer pode ser classificado de acordo com o tecido em que ocorre (PERCORINO, 2012). O câncer é resultado de uma série de mutações no DNA e na alteração da expressão gênica, que podem ser resultado de fatores ambientais como produtos carcinogênicos e inflamação crônica (PELENGARIS e KHAN, 2013).

Esse crescimento irregular de células resulta muitas vezes em tumores sólidos que são estruturas semelhantes a órgãos, complexas estruturalmente e heterogêneas, compostas de células cancerígenas, fibroblastos e células imunológicas imersas numa matriz extracelular e nutridos por uma rede de vasos sanguíneos que formam o chamado microambiente tumoral (TREDAN, 2007). Subpopulações celulares de porções diferentes de um mesmo tumor podem variar em imunogenicidade, em ritmo de crescimento, resposta a drogas e habilidade de entrar em metástase, demonstrando assim, uma heterogeneidade funcional e fenotípica. Essa heterogeneidade pode ser causada pela diferente disponibilidade de recursos dentro do mesmo tumor, como por exemplo o acesso desigual a oxigênio e nutrientes devido à disposição deste tecido (TABASSUM, 2015).

Os modelos de cultura 3D oferecem uma melhor simulação do microambiente tumoral, já que estes exibem características que se assemelham às condições complexas dos tumores *in vivo*. Dessa forma, enquanto as linhagens celulares em 2D nos providenciam com um material de estudo homogêneo, as culturas 3D induzem as células a se comportarem de uma maneira um pouco mais próxima às condições naturais (RAVI, 2015).

Assim, é importante levar em consideração os complexos contextos biológicos e a heterogeneidade fenotípica do desenvolvimento dos tumores na hora de se criar

novas drogas ou terapias imunológicas para combater o câncer, já que estes podem ter seus efeitos restringidos pelas capacidades extrínsecas e intrínsecas das células cancerígenas de sinalizarem a outros tipos celulares e componentes do microambiente tumoral (THOMA, 2014).

Dessa forma, a proposta do trabalho foi desenvolver e estabelecer um modelo de cultura 3D, utilizando linhagens de células tumorais humanas e linhagens de fibroblastos humanos, que melhor mimetize o tecido tumoral, tendo em vista futuros testes para elucidação de mecanismos tumorais, imunológicos e farmacológicos.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 O Histórico da Cultura de Células

A cultura de células se iniciou como uma técnica para estudar o comportamento de células animais num ambiente controlado, fora do organismo, com Harrison em 1907 e Carrel em 1912. Desde essa época até os dias atuais esse método é reproduzido em laboratórios do mundo inteiro, sendo ainda uma ferramenta de pesquisa de grande importância. Inicialmente os experimentos consistiam no cultivo de fragmentos de tecidos em frascos com fluidos animais de onde tais tecidos eram provenientes, sendo Harrison o primeiro a isolar células e cultivá-las em *in vitro* ao invés do tecido inteiro (ALVES; GUIMARÃES, 2010). A partir disso, várias áreas da ciência, como a Microbiologia, a Protozoologia e a Virologia, se beneficiaram da técnica, levando a diversos avanços, como o desenvolvimento de vacinas, nessas áreas (REBELLO, 2013).

O ano de 1951 representou um marco na pesquisa em cultura de células humanas e na pesquisa do câncer, em outubro deste ano, após oito meses de ser diagnosticada com uma forma agressiva adenocarcinoma cervical, a jovem americana Henrietta Lanks vai à óbito. Entretanto as células do seu tumor continuam se desenvolvendo em laboratório, graças a George Gey, um cientista brilhante no campo de cultura de células. A linhagem recebeu o nome de HeLa, em homenagem à paciente que deu origem às células, e desde então esta linhagem tumoral se tornou umas das mais utilizadas ao redor mundo (MASTERS, 2002).

Diversas são as vantagens de se utilizar a cultura de células; o controle do ambiente, o baixo custo e a homogeneidade da amostra são só algumas delas, quando comparada aos modelos animais. Além disso, devido às questões éticas que regem o uso de animais em pesquisa científica, a cultura de células, hoje, é o principal modelo alternativo para substituir os animais em experimentos (ROCHA, 2016).

Entretanto, o modelo original e mais difundido, em que as células são cultivadas em monocamada num recipiente plástico, tem como grande desafio representar, *in vitro* com fidelidade o comportamento dos tecidos, *in vivo*. Assim, nos anos 70, devido à necessidade da criação de uma técnica que melhor imitasse as condições biológicas, Robert M. Sutherland desenvolveu os primeiros modelos de cultura 3D,

que por terem assumido inicialmente uma morfologia esférica, foram batizados de esferoides (AMARAL, 2010 e WEISWALD, 2015).

2.2 O Modelo de Cultura 3D

Na natureza, tecidos e órgãos são tridimensionais, as células estão em contato direto com outros tipos de células e são cercadas por uma estrutura de suporte composta de proteínas e açúcares chamada de matriz extracelular (FENNEMA, 2013). Todavia, a maioria dos estudos em biologia celular é realizada utilizando um tipo de célula em cultivo numa superfície plana, em monocamada, e apesar deste modelo ter sido muito aperfeiçoado ao longo dos anos, vários estudos o comparando com novas tecnologias 3D destacam as divergências entre os dois e as limitações do método 2D em reproduzir as condições *in vivo*, no que diz respeito à morfologia das células, polaridade, expressão de receptores, expressão de oncogenes, interação com a matriz extracelular e a arquitetura celular em geral (BRESLIN, 2013).

Nesse contexto, os esferoides são excelentes ferramentas para o entendimento dos tecidos, das interações célula-célula e das interações entre as células e a matriz extracelular (FENNEMA, 2013). As maiores vantagens dos modelos 3D são: a morfologia celular e a sinalização que se assemelham muito mais às condições fisiológicas do que na cultura 2D comum; permitir manipulações experimentais rápidas para teste de hipóteses; e proporcionar imagens em tempo real em microscopia do que em modelos animais (YAMADA, 2007).

Este modelo pode ser obtido através de diferentes metodologias, desde métodos que utilizem estruturas, polímeros ou armações que ajudem as células a se proliferarem de forma tridimensional ou métodos independentes de ancoragem, que permitem que as próprias células se organizem numa estrutura 3D agregando-se a si mesmas. Cada modelo tem suas vantagens e limitações, por exemplo, os modelos dependentes de ancoragem conseguem mimetizar melhor as interações entre as células e a matriz extracelular, por sua vez o modelo independente de ancoragem demonstra melhor os gradientes fisiológicos (LANGHANS, 2018).

Vários estudos testificam evidências de que células crescendo em uma estrutura 3D, obtida através de diferentes metodologias, lembram melhor o aspecto fisiológico *in vivo* do que células em estruturas monocamada, como por exemplo, na pesquisa de novas drogas em que o modelo esferoide imita melhor o gradiente

químico e as barreiras físicas que num sistema biológico se mostram como o maior obstáculo na distribuição de fármacos nos tecidos (THOMA, 2014).

Um estudo de 2010 comparou a atividade antiproliferativa de drogas comumente usadas no tratamento de câncer de pulmão em linhagens de células tumorais de pulmão cultivadas em 2D e em 3D. Os resultados demonstraram que oito das dez drogas testadas tiveram diferenças significativas nas suas respostas no modelo 3D comparado ao modelo 2D, sugerindo que algumas implicações biológicas devem ser levadas em consideração na escolha de drogas candidatas a estudos pré-clínicos (NIRMALANANDHAN, 2010).

O modelo esferoide também demonstrou ser útil na pesquisa *in vitro* de imunoterapias, e um dos primeiros estudos a evidenciar isso foi uma pesquisa de 1977, em que os pesquisadores incubaram esferoides de uma linhagem tumoral de camundongos junto com células do baço normais e células aloimunes, demonstrando uma diminuição da proliferação da linhagem tumoral em contato com os linfócitos aloimunes comparada com os linfócitos normais (HOFFMAN, 2017; SUTHERLAND, 1977).

2.3 Câncer e o uso de cultura 3D para recriar o microambiente tumoral

Por muito tempo o câncer foi pensado como uma doença clonal, onde todas as células derivavam de um ancestral comum e possuíam o mesmo conjunto de alterações genéticas e epigenéticas. Hoje, porém, é inegável que a maioria dos cânceres possuem uma considerável heterogeneidade intratumoral fenotípica e espacial, que podem ser resultado de variações genéticas ou não em um mesmo tumor (TABASSUM, 2015).

Em seres humanos, os tumores são constituídos de diferentes tipos celulares, que tem suas funções e destino determinados por vários fatores químicos, físicos e biológicos presentes no microambiente tumoral, e juntos, esses fatores contribuem para a proliferação, evolução, invasão e metástase das células cancerígenas, assim como também contribuem para a evasão de tratamentos (THOMA,2014). Alguns desses fatores chave que influenciam nas propriedades das células tumorais são: a interação entre as células e a matriz extracelular, as interações entre as diferentes células do microambiente tumoral, e os gradientes de concentração no tecido (LANGHANS, 2018).

A matriz extracelular é uma estrutura de suporte composta de diversas proteínas como colágeno, elastina e laminina, que conferem aos tecidos propriedades mecânicas e auxiliam na organização da comunicação entre as células. A composição da matriz extracelular varia de tecido para tecido e pode influenciar no grau de resistência do tumor aos tratamentos (ABBOT,2003). Entretanto, as células tumorais não são rodeadas apenas por matriz extracelular, o tecido conectivo também é composto por células do estroma como fibroblastos, adipócitos e células da glia, células da vasculatura adjacente e células do sistema imune e a interação entre essas células pode contribuir para progressão e prognóstico da doença. E o resultado desse microambiente heterogêneo é a presença de gradientes de concentração diferentes dentro de um mesmo tecido para oxigênio, pH e componentes solúveis como moléculas efetoras e metabólitos celulares, podendo criar zonas proliferativas e um núcleo em hipóxia e inativo, mais resistente à quimioterapia, imunoterapia e radioterapia (LANGHANS, 2018).

Neste contexto, muitos modelos de cultura 2D falham em reconstituir *in vitro* os microambientes celulares, já que as células são homoganeamente expostas ao meio nutriente e oxigênio, e como consequência, essas culturas não conseguem manter suas funções diferenciadas (HUH, 2011). O modelo 3D de esferoide tumoral tem potencial de diminuir a lacuna entre o modelo de cultura 2D e o modelo animal para estudar a biologia tumoral e a resposta a terapias (RAVI, 2015).

Tendo em vista a necessidade de se desenvolver cada vez mais novas tecnologias que permitam o entendimento mais profundo dos sistemas e dos tecidos biológicos, e considerando que o modelo 3D traz uma alternativa que visa se aproximar das condições *in vivo*, é de extrema importância o delineamento e consolidação desses métodos, que podem possibilitar uma maior compreensão dos mecanismos do câncer e o desenvolvimento de novas formas terapêuticas.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Implantar um modelo *in vitro* de cultura de células tumorais humanas tridimensional (3D), simulando o microambiente tumoral, visando à pesquisa futura de agentes antitumorais, tanto imunológicos quanto farmacológicos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estabelecer as condições ideais e a estabilidade do modelo de cultura tridimensional para a utilização em experimentos pósteros.
- Caracterizar o modelo quanto ao crescimento.
- Observar a viabilidade das células quando cultivadas em tais condições.

4. METODOLOGIA

4.1 Cultura Celular

Para a cultura celular foram utilizadas linhagens celulares imortalizadas, para o modelo de fibroblasto foi utilizada a linhagem GM07492 e as linhagens tumorais trabalhadas foram a MCF7 e HeLa, linhagens de câncer de mama e de câncer cervical, respectivamente. Essas linhagens foram mantidas em garrafas de cultura de 75cm² com meio DMEM suplementado a 10% de soro fetal bovino, em atmosfera de 5% de CO₂ e à 37 °C. O meio foi trocado a cada 24 ou 48 horas. Quando as células atingiram 80% de confluência foram repicadas para o sub-cultivo na cultura 3D, utilizando PBS-1x para lavagem das células da garrafa e em seguida tripsina para dissociação celular enzimática por 2 minutos à 37 °C. Depois, a ação da tripsina foi inibida com meio DMEM + 10% SFB e foi realizada a contagem das células em Câmara de Neubauer com Azul de Tripán.

4.2 Estabelecimento da cultura 3D

Para a execução da cultura 3D seguiu-se o método descrito por Saleh, (2017) e por Friedrich et al., (2009) com modificações. Primeiramente, o pó de agarose foi dissolvido na concentração de 2% em água para injetáveis e solubilizado em micro-ondas por 30 segundos. Ainda em estado líquido, o gel foi manipulado em fluxo laminar e transferido para uma placa de 96 poços, no volume de 50 microlitros por poço. A placa foi esterilizada em radiação UV por 30 minutos e em seguida incubada à 37 °C por mais 30 minutos para a completa gelificação da agarose.

Depois, as células foram plaqueadas no volume total de 200 microlitros por poço na forma de monocultura ou co-cultura, na densidade de $1,2 \times 10^4$, sendo no caso de co-cultura, na proporção de 1:1. As células foram cultivadas por 4 dias em atmosfera de 5% de CO₂ à 37 °C, sendo este o tempo necessário para formação do esferoide. Ainda no quarto dia o meio foi trocado, retirando-se metade do volume total do poço e, adicionando metade do volume de meio fresco. As análises foram realizadas no quarto e no sétimo dia.

Figura 1 – Representação do Cronograma experimental



Fonte: Autora.

4.3 Caracterização do Esferoide

4.3.1 Tamanho e Morfologia do Esferoide

Para avaliar o crescimento e a morfologia dos esferoides, foram capturadas imagens com intuito de analisar a área e o diâmetro das estruturas no quarto e sétimo dia de cultivo, em microscópio de fluorescência invertido na objetiva de 2x. A área foi calculada através do software ImageJ, contornando a imagem do esferoide e determinando o valor em μm^2 , do quarto dia e do sétimo dia e comparando os dois para determinar o crescimento.

4.3.2 Viabilidade Celular

A viabilidade foi avaliada usando o ensaio do MTT (brometo de 3- [4,5- dimetil-2y] -2,5 diphenyltertrazolio) como descrita por Rocha (2016). Após o sétimo dia de cultura os esferoides foram transferidos das placas de cultura com agarose para placas novas sem agarose e em meio DMEM suplementado com 1% SFB. Em seguida os esferoides foram incubados em solução de MTT (1 microlitro por poço) por 2 horas à 37 °C ao abrigo da luz. Após a incubação, foi adicionado 200 microlitros de álcool etílico para a solubilização dos cristais de formazan. Para a comparação com a cultura 2D, as células nesta condição foram avaliadas com 72 horas de cultura, para não extrapolar a confluência do poço e causar um viés de morte celular por falta de espaço na placa. A formação dos cristais foi medida em absorbância de 570 nm usando o espectrofotômetro.

4.4 Análise dos Dados

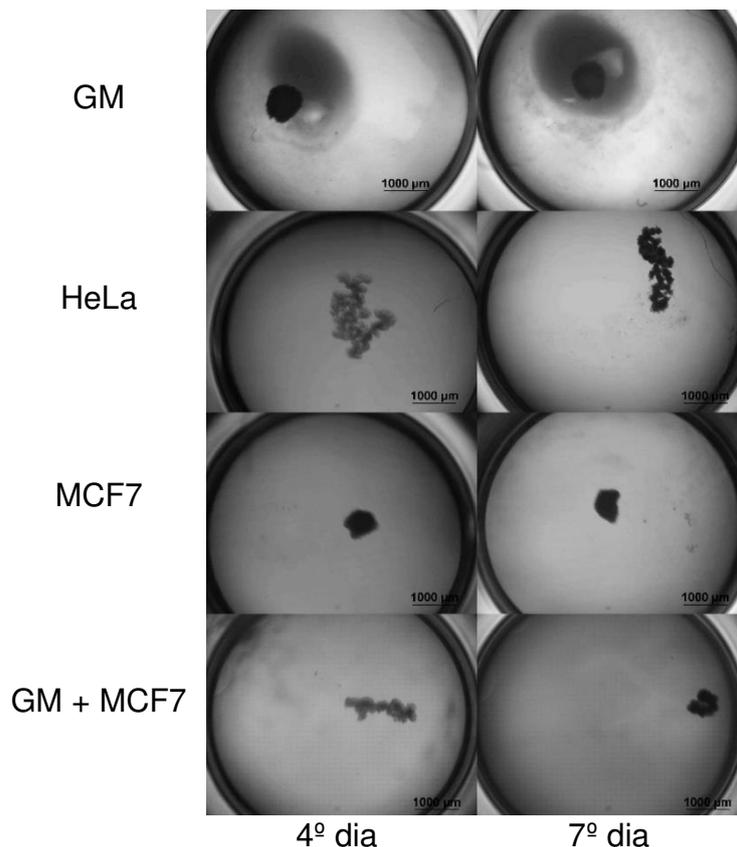
Após processados, os dados foram expressos como média ou média + desvio padrão. A análise estatística foi realizada utilizando-se o GraphPad Prism (versão 8.0.2) para realizar os testes estatísticos empregando análise de variância, teste t quando analisadas duas variáveis e ANOVA para mais de duas variáveis.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Tamanho e Morfologia do Esferoide

No presente trabalho foi proposto um modelo de esferoide independente de ancoragem, utilizando uma camada de agarose a 2% no fundo de uma placa de 96 poços, como descrito anteriormente, impedindo que as células aderissem ao fundo da placa e estimulando auto agregação (Saleh, 2017). Em todas as condições as células tenderam a se agregar umas às outras, havendo assim formação de esferoide como pode ser observado na Figura 2.

Figura 2 – Fotomicrografia representativa dos esferoides formados nas diferentes condições no quarto e sétimo dia de cultura.



As imagens ilustram os esferoides formados pelo método 3D, nas diferentes condições escolhidas, no quarto e sétimo dia de cultivo no aumento de 20x em microscópio de fluorescência invertido. Escala: 1000µm.

Fonte: dados da pesquisa.

Quanto ao tamanho dos esferoides, a linhagem de fibroblastos (GM) apresentou uma área média de 643.886 µm² no quarto dia de cultivo e uma média de 619.839

μm^2 no sétimo dia, demonstrando não apresentar uma diferença significativa entre o quarto e o último dia de cultura.

Figura 3 – Tamanho dos esferoides de fibroblasto

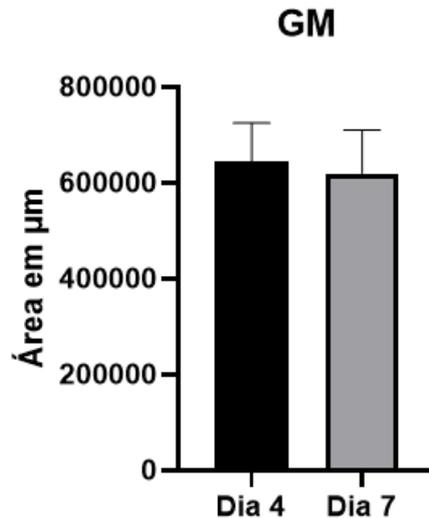


Gráfico representando a área dos esferoides de GM. Os dados estão representados como média + desvio padrão.

Fonte: Criada pela autora a partir de dados da pesquisa utilizando o software GraphPad Prism

As linhagens tumorais apresentaram área média de $1.611.977 \mu\text{m}^2$ para HeLa e $424.642 \mu\text{m}^2$ para MCF7 no quarto dia, e $1.068.452 \mu\text{m}^2$ e $389.651 \mu\text{m}^2$ para HeLa e MCF7, respectivamente, no sétimo dia. Observou-se que o esferoide da monocultura de HeLa diminui significativamente de tamanho do quarto para o sétimo dia. Por outro lado, o esferoide de MCF7, assim como o de GM, não demonstra uma diferença expressiva entre os dias observados, demonstrando que a forma final do esferoide basicamente já se estabelece por volta do quarto dia de cultura e não muda muito até o último dia.

Figura 4 – Tamanho dos esferoides das linhagens tumorais.

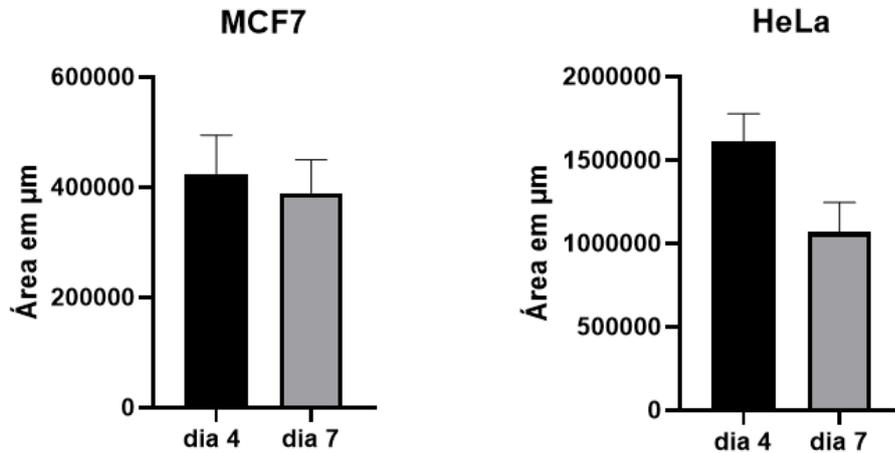


Gráfico representando a área dos esferoides de GM. Os dados estão representados como média + desvio padrão.

Fonte: Criada pela autora a partir de dados da pesquisa utilizando o software GraphPad Prism

Na co-cultura de GM+MCF7, entretanto, uma diferença de área entre o quarto e o último dia foi observada, tendo uma média de $517.142 \mu\text{m}^2$ no quarto e de $318.354 \mu\text{m}^2$ no sétimo dia de cultura, verificando-se que em co-cultura as células de GM e MCF7 não reproduzem o padrão observado nas mesmas linhagens utilizadas quando estas foram cultivadas em monocultura.

Figura 5 – Tamanho dos esferoides em co-cultura

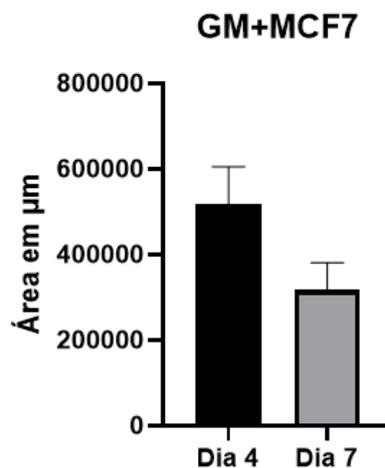


Gráfico representando a área dos esferoides de GM+MCF-7. Os dados estão representados como média + desvio padrão.

Fonte: Criada pela autora a partir de dados da pesquisa utilizando o software GraphPad Prism

O aparente encolhimento das áreas dos esferoides parece estar relacionado a uma propensão do esferoide a se tornar mais compacto, e não literalmente “diminuir”, já que o esperado é que em sete dias tenha havido proliferação das células. Esse comportamento já foi observado em trabalhos anteriores, como descrito por Dal Mora (2018), que observou que o diâmetro de seus esferoides quando cultivados em meio normal, ou seja, sem estímulo ou sem tratamento, apresentaram uma tendência a diminuir ao longo do tempo.

Durante a formação do esferoide condições metabólicas, como a oxigenação das células, podem influenciar em seu crescimento e tamanho (FISCHBACH, 2007). Um estudo de 1986 já havia observado que a taxa de consumo de oxigênio e glicose em esferoides está diretamente ligada com o volume de células, que diminuía conforme as células se acumulavam num estado inativo, de não-proliferação, assim como aumentava a área da região necrótica (MUELLER-KLIESER, 1986).

Já a relação de tamanho entres os esferoides de diferentes condições evidenciou uma grande diferença de tamanho entre a HeLa e as demais linhagens. Tendo esta praticamente o dobro do tamanho em comparação com o restante.

Figura 6 – Comparação do Tamanho do esferoide entre as Linhagens

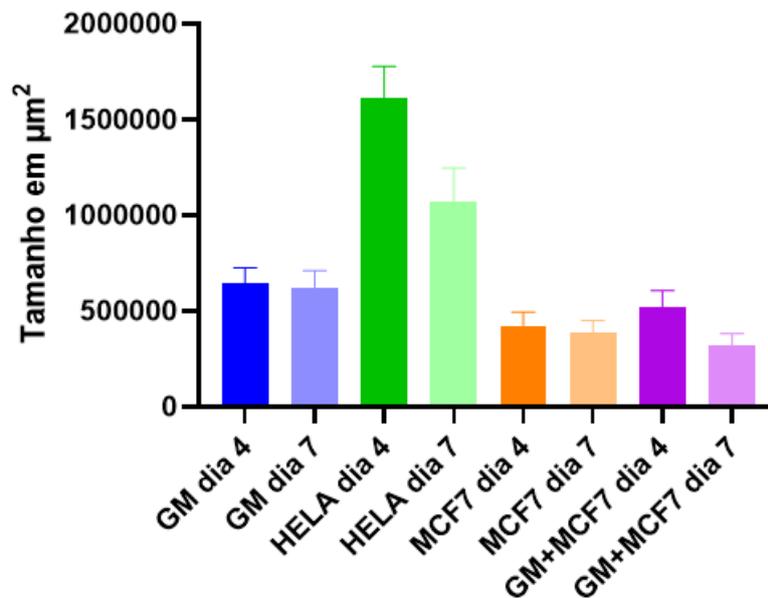


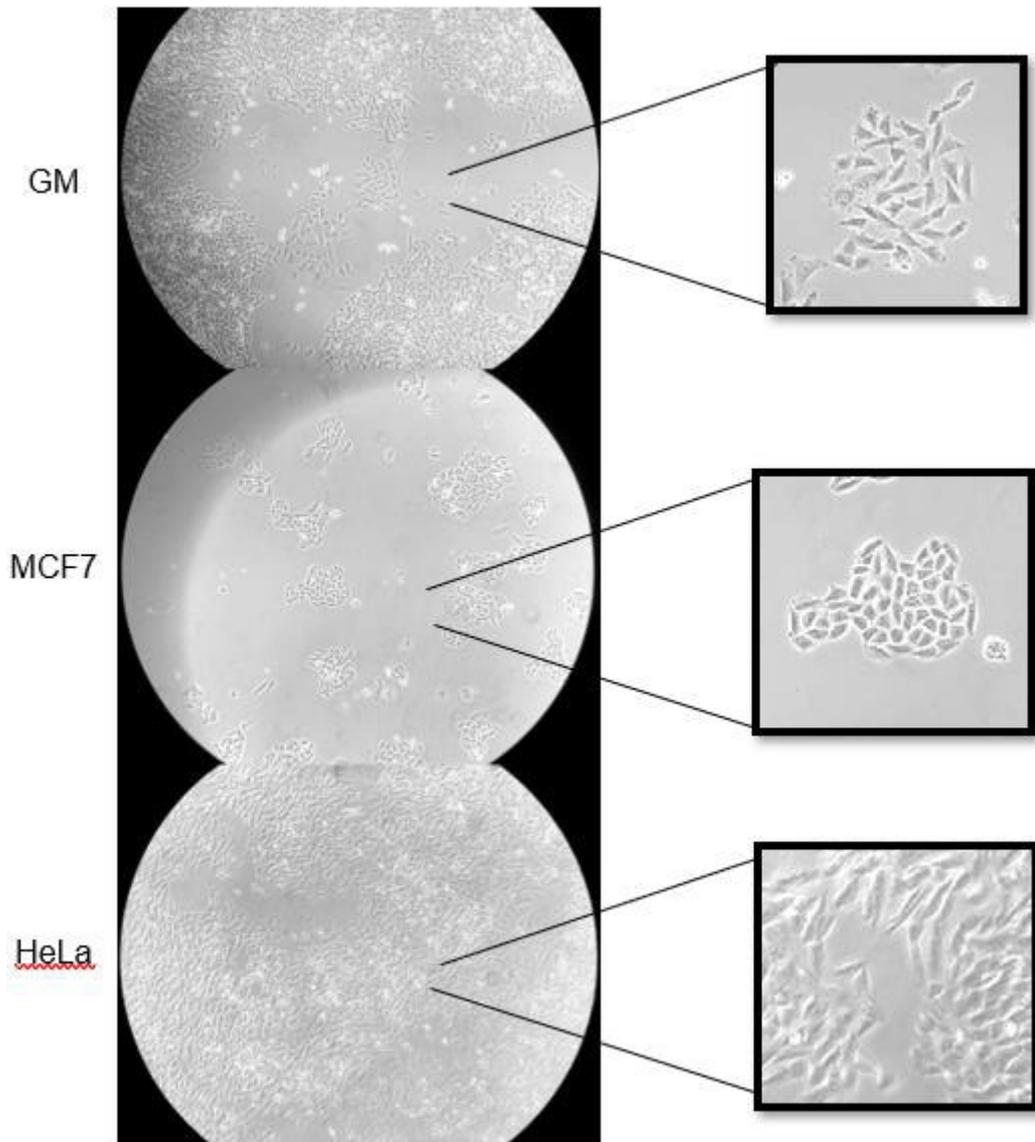
Gráfico representando a comparação das áreas dos esferoides no quarto e sétimo de dia de cultura de cada condição testada. Os dados estão representados como média + desvio padrão. Fonte: Criada pela autora a partir de dados da pesquisa utilizando o software GraphPad Prism.

Essa diferença pode estar relacionada às individualidades morfológicas entre as linhagens. A HeLa é uma linhagem tumoral de adenocarcinoma cervical, e tem a característica de crescer de forma achatada e alongada quando cultivada de forma 2D (ZHAO, 2014), além disso, uma particularidade marcante desta linhagem é a rapidez em sua proliferação e estabilidade, o que faz com esta seja uma das mais antigas linhagens tumorais humanas que se tem conhecimento e mantém sua importância até os dias atuais (MASTERS, 2002). Já linhagens derivadas de tumores mamários crescem em colônias poliédricas de células com aspecto glandular. Apesar de tanto a HeLa, quanto a MCF-7 apresentarem origem epitelial, há muito tempo tem se registro de descrições de HeLa apresentando similaridades morfológicas com células de tecido conjuntivo, como os fibroblastos (LEIGHTON, 1957).

Uma das diferenças mais marcantes entre a cultura 3D e a cultura 2D são as desigualdades na morfologia. Quando células crescem em monocamada elas são chatas, podem se aderir e expandir horizontalmente, mas não têm nenhum suporte para expandir verticalmente. Uma das consequências disso é a mudança de polaridade nas células, o que pode influenciar diretamente no formato destas, que por sua vez tem impacto na proliferação, diferenciação e na sensibilidade à apoptose. Essas diferenças na forma geométrica (por exemplo: forma de circular x forma estrelada, alongada x cuboide) afetam tanto a função celular como a área total de crescimento na 2D, e apesar de ainda não se saber ao certo o grau de influência dessas características no modelo 3D, é provável que elas ditem o padrão de crescimento das células, bem como o formato que as colônias assumem e a aderência entre as células (BAKER, 2012).

Na figura 7 pode-se perceber que as três linhagens apresentam geometrias bem distintas entre si, a GM, por exemplo, parece apresentar um formato mais estrelado enquanto a MCF7 mostra-se num aspecto mais cuboide e a HeLa por sua vez exibe uma característica mais alongada, um formato que lembra um fuso. Essas distinções entre elas podem explicar as particularidades no perfil morfológico de cada esferoide.

Figura 7 – Representação morfológica das linhagens celulares no cultivo 2D



As imagens ilustram as linhagens utilizadas no trabalho e suas morfologias quando cultivadas em monocamada, de cima para baixo: GM, MCF7 e HeLa, em microscópio de luz invertido no aumento de 100x.

Fonte: dados da pesquisa.

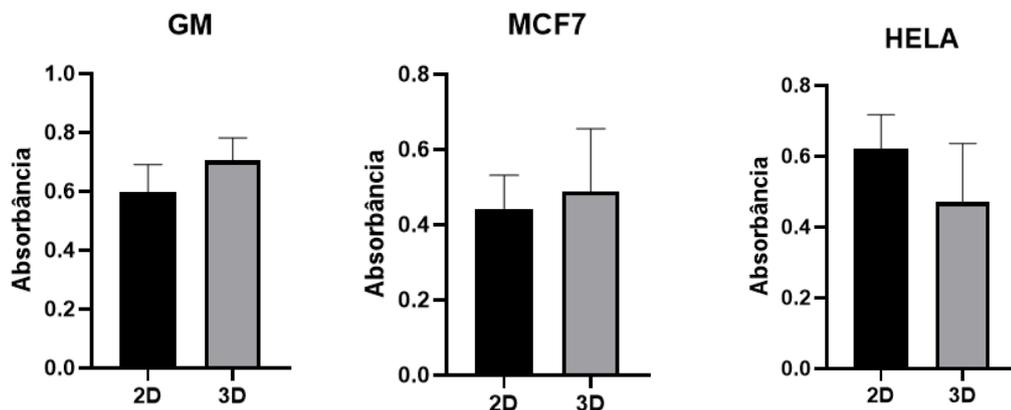
5.2 Viabilidade Celular

O ensaio de viabilidade se baseia no princípio de que células com metabolismo ativo tem capacidade de reduzir o composto MTT a cristais de formazan, de cor arroxeada, na mitocôndria. Esse produto de formazan se acumula dentro das células assim como na sua superfície, e deve ser solubilizado para a leitura da absorbância. O mecanismo pelo qual as células reduzem o MTT em formazan ainda não é completamente conhecido, mas sabe-se que acontece pela ação de enzimas

mitocondriais, tornando este ensaio um medidor de atividade mitocondrial e conseqüentemente, quanto maior a absorbância, maior a viabilidade celular (RISS, 2016).

A viabilidade das culturas 3D, quando contrapostas com as mesmas linhagens cultivadas em monocamada, não apresentou uma diferença estatística, entretanto, vale lembrar que a comparação com a 2D não cabe como um “controle” pois as circunstâncias das culturas são distintas por natureza. Assim, as linhagens de GM e MCF7 tiveram uma tendência ter sua viabilidade levemente aumentada em relação à 2D, aumentando 1,2x e 1,1x em relação à monocultura, respectivamente, enquanto a viabilidade da HeLa tendeu a diminuir, observando-se uma diminuição de 1,3x quando comparada à 2D.

Figura 8 – Comparação da viabilidade entre os modelos 2D e 3D



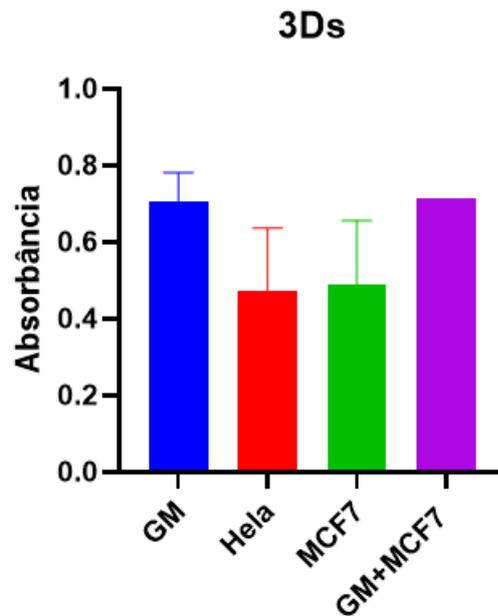
Gráficos representando a absorbância obtida no ensaio de MTT para avaliar a viabilidade das células em cultura 2D e 3D. Os dados estão representados como média + desvio padrão. Fonte: Criada pela autora a partir de dados da pesquisa utilizando o software GraphPad Prism.

Essa tendência das células de HeLa a diminuírem sua viabilidade pode ser relacionada com a diferença de tamanho observado entre o quarto e sétimo dia, já que a menor viabilidade pode indicar uma menor proliferação e assim um menor número de células no sétimo dia. Isso pode se dar por uma distribuição desigual dos nutrientes e de oxigênio (DAL MORA, 2018), assim como acontece em condições biológicas devido aos diferentes gradientes de concentração presentes em um mesmo tecido (LANGHANS, 2018).

Analisando a viabilidade das culturas 3Ds entre si, pode-se inferir que as monoculturas de GM, MCF7 e a co-cultura das duas demonstraram ter uma boa adaptação no modelo esferoide, não sendo observada uma grande variação entre as

três, a HeLa em contraste, mostrou novamente uma diminuição da viabilidade quando associada às outras linhagens, remetendo novamente às divergências morfológicas entre as linhagens e suas condições de cultivo.

Figura 9 – Viabilidade dos modelos de cultura 3D



Gráficos representando a absorbância obtida no ensaio de MTT para avaliar a viabilidade das células em cultura 3D entre si. Os dados estão representados como média + desvio padrão. Fonte: Criada pela autora a partir de dados da pesquisa utilizando o software GraphPad Prism.

O desenvolvimento de modelos 3D de cultura de células surgiu de uma necessidade do aperfeiçoamento de técnicas nas pesquisas biomédicas e farmacêuticas que se assemelhem melhor aos tecidos biológicos e sejam alternativas mais éticas do que pesquisas em modelos animais e para a diminuição de erros nas fases clínicas em pesquisas de novas drogas (DERDA, 2009; HUH, 2015; EDMONDSON, 2014).

Diversos estudos nos últimos anos descreveram a importância e as vantagens das culturas tridimensionais para o melhor entendimento do funcionamento dos tecidos e a fisiopatologia das doenças, como o câncer, já que tumores sólidos crescem numa conformação espacial 3D, resultando numa exposição heterogênea a nutrientes e oxigênio e tornando proliferação e hipóxia inversamente proporcionais (WEISWALD, 2015). Os resultados do trabalho reproduzem esta tese, tendo em vista que as linhagens que apresentaram pouca mudança no tamanho da área do esferoide do

quarto para o sétimo dia foram também as mesmas que apresentaram uma maior viabilidade.

Dessa forma, pode-se deduzir que neste modelo, assim como nutrientes não são distribuídos uniformemente através das células tumorais, os fármacos, os anticorpos e a radiação, utilizados no tratamento contra o câncer também enfrentariam essas barreiras espaciais para atuar no tecido. Diferente da cultura em monocamada, onde todas as células são expostas homogeneamente ao meio e aos tratamentos, evidenciando as limitações da cultura 2D em mimetizar o tecido (ZANONI, 2016; ACHILLI, 2012).

Por fim, o presente trabalho representou o primeiro passo em estabelecer e caracterizar a técnica do modelo esferoide, um protocolo nunca antes descrito nas pesquisas realizadas na Universidade Federal do Maranhão, carecendo ainda de ajustes e diferentes ensaios para definir melhor suas características e aperfeiçoar o modelo, mas abrindo possibilidades futuras para pesquisas mais aprofundadas de eficácia e citotoxicidade de agentes anticâncer desenvolvidos e estudados na instituição.

6. CONCLUSÃO

Dadas as condições adequadas é possível se obter uma cultura de células tumorais e de fibroblastos 3D baseada no modelo de esferoide celular. No geral, as linhagens utilizadas apresentaram características parecidas entre si no padrão de crescimento, apresentando, em menor ou maior grau, uma tendência a diminuir ao longo do tempo. A viabilidade das linhagens na cultura 3D mostrou uma boa adaptação das células ao modelo, representando que a técnica se dá como uma alternativa para ensaios futuros com um modelo que mimetiza melhor as condições biológicas dos tecidos.

REFERÊNCIAS

- ABBOTT, Alison. **Cell culture: biology's new dimension**. 2003.
- ACHILLI, Toni-Marie; MEYER, Julia; MORGAN, Jeffrey R. Advances in the formation, use and understanding of multi-cellular spheroids. **Expert opinion on biological therapy**, v. 12, n. 10, p. 1347-1360, 2012.
- ALVES, Emanuele Amorim et al. Cultivo celular.
- AMARAL, Jonatas Bussador do. **Células MCF-7 como modelo 3D no estudo de câncer de mama humano**. 2010. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.
- BAKER, Brendon M.; CHEN, Christopher S. Deconstructing the third dimension—how 3D culture microenvironments alter cellular cues. **J Cell Sci**, v. 125, n. 13, p. 3015-3024, 2012.
- BRESLIN, Susan; O'DRISCOLL, Lorraine. Three-dimensional cell culture: the missing link in drug discovery. **Drug discovery today**, v. 18, n. 5-6, p. 240-249, 2013.
- DAL MORA, Tamara et al. Estabelecimento de esferoides multicelulares tipo tecido adiposo: aspectos morfo-funcionais da adipogênese. 2018.
- DERDA, Ratmir et al. supported 3D cell culture for tissue-based bioassays. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 44, p. 18457-18462, 2009.
- EDMONDSON, Rasheena et al. Three-dimensional cell culture systems and their applications in drug discovery and cell-based biosensors. **Assay and drug development technologies**, v. 12, n. 4, p. 207-218, 2014.
- FENNEMA, Eelco et al. Spheroid culture as a tool for creating 3D complex tissues. **Trends in biotechnology**, v. 31, n. 2, p. 108-115, 2013.
- FISCHBACH, Claudia et al. Engineering tumors with 3D scaffolds. **Nature methods**, v. 4, n. 10, p. 855, 2007.
- LANGHANS, Sigrid A. Three-dimensional in vitro cell culture models in drug discovery and drug repositioning. **Frontiers in pharmacology**, v. 9, p. 6, 2018.
- FRIEDRICH, J. et al. Spheroid-based drug screen: considerations and practical approach. **Nature Protocols**, v. 4, n. 3, p. 309–324, 2009.
- HOFFMAN, Robert M. Patient-derived mouse models of cancer. **Molecular and Translational Medicine**, p. 251-273, 2017.
- HUH, Dongeun; HAMILTON, Geraldine A.; INGBER, Donald E. From 3D cell culture to organs-on-chips. **Trends in cell biology**, v. 21, n. 12, p. 745-754, 2011.

JUSTICE, Bradley A.; BADR, Nadia A.; FELDER, Robin A. 3D cell culture opens new dimensions in cell-based assays. **Drug discovery today**, v. 14, n. 1-2, p. 102-107, 2009.

LEIGHTON, Joseph et al. The similarity in histologic appearance of some human "cancer" and "normal" cell strains in sponge-matrix tissue culture. **Cancer research**, v. 17, n. 5, p. 359-363, 1957.

MASTERS, John R. HeLa cells 50 years on: the good, the bad and the ugly. **Nature Reviews Cancer**, v. 2, n. 4, p. 315, 2002.

MUELLER-KLIESER, W.; FREYER, J. P.; SUTHERLAND, R. M. Influence of glucose and oxygen supply conditions on the oxygenation of multicellular spheroids. **British journal of cancer**, v. 53, n. 3, p. 345, 1986.

NIRMALANANDHAN, Victor Sanjit et al. Activity of anticancer agents in a three-dimensional cell culture model. **Assay and drug development technologies**, v. 8, n. 5, p. 581-590, 2010.

PECORINO, Lauren. **Molecular biology of cancer: mechanisms, targets, and therapeutics**. Oxford university press, 2012.

PELENGARIS, Stella; KHAN, Michael (Ed.). **The molecular biology of cancer: a bridge from bench to bedside**. John Wiley & Sons, 2013.

RAVI, M. et al. 3D Cell Culture Systems: Advantages and Applications. **Journal of Cellular Physiology**, v. 230, n. 1, p. 16–26, 2015.

REBELLO, Moacyr Alcoforado. **Fundamentos da Cultura de Cultura de Tecido e das células Animais**. Editora Rubio, 2013.

RISS, Terry L. et al. Cell viability assays. 2016.

ROCHA, Karolynne de Araujo Marins José. **ANÁLISE DA DISTRIBUIÇÃO DE ZINCO EM CÉLULAS TUMORAIS PROSTÁTICAS DU145 UTILIZANDO MICROFLUORÊSCÊNCIA DE RAIOS X**. 2016. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Rio de Janeiro.

SALEH, Najla Adel et al. Cultura celular tridimensional: desenvolvimento de um modelo para avaliação da relação entre o microambiente tumoral e a ação de novos agentes antitumorais. 2017.

SUTHERLAND, Robert M.; MACDONALD, H. Robson; HOWELL, Robert L. Multicellular spheroids: a new model target for in vitro studies of immunity to solid tumor allografts: brief communication. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 58, n. 6, p. 1849-1853, 1977.

TABASSUM, Doris P.; POLYAK, Kornelia. Tumorigenesis: it takes a village. **Nature Reviews Cancer**, v. 15, n. 8, p. 473, 2015.

TALUKDAR, Sarmistha et al. Engineered silk fibroin protein 3D matrices for in vitro tumor model. **Biomaterials**, v. 32, n. 8, p. 2149-2159, 2011.

TANG, Haidong; QIAO, Jian; FU, Yang-Xin. Immunotherapy and tumor microenvironment. **Cancer letters**, v. 370, n. 1, p. 85-90, 2016.

THOMA, Claudio R. et al. 3D cell culture systems modeling tumor growth determinants in cancer target discovery. **Advanced drug delivery reviews**, v. 69, p. 29-41, 2014.

TRÉDAN, Olivier et al. Drug resistance and the solid tumor microenvironment. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 99, n. 19, p. 1441-1454, 2007.

WANG, Maonan et al. Role of tumor microenvironment in tumorigenesis. **Journal of Cancer**, v. 8, n. 5, p. 761, 2017.

WEISWALD, Louis-Bastien; BELLET, Dominique; DANGLES-MARIE, Virginie. Spherical cancer models in tumor biology. **Neoplasia**, v. 17, n. 1, p. 1-15, 2015.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Cancer. 2018. Disponível em: <<https://www.who.int/cancer/en/>> Acesso em: 15 mar. 2019.

YAMADA, Kenneth M.; CUKIERMAN, Edna. Modeling tissue morphogenesis and cancer in 3D. **Cell**, v. 130, n. 4, p. 601-610, 2007.

ZANONI, Michele et al. 3D tumor spheroid models for in vitro therapeutic screening: a systematic approach to enhance the biological relevance of data obtained. **Scientific reports**, v. 6, p. 19103, 2016.

ZHAO, Yu et al. Three-dimensional printing of Hela cells for cervical tumor model in vitro. **Biofabrication**, v. 6, n. 3, p. 035001, 2014.