



## EFEITO DA QUIMIOTERAPIA EM MODELO DE CULTIVO EM ESFEROIDES

Gabriel Ratund<sup>1</sup>, Érica Ballestreri<sup>2</sup>, Felipe U. Conter<sup>3</sup>, Ivana Grivicich<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Acadêmico do Ensino Médio, Iniciação Científica Júnior CNPq no Laboratório de Biologia do Câncer, Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular Aplicada à Saúde, ULBRA; <sup>2</sup>Doutoranda do Programa de Pós-Graduação Biologia Celular e Molecular Aplicada à Saúde, ULBRA; <sup>3</sup>Doutorando do Programa de Pós-Graduação Biologia Celular e Molecular Aplicada à Saúde, ULBRA; <sup>4</sup>Professora do Curso de Biomedicina e do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular Aplicada à Saúde, Coordenadora do Laboratório de Biologia do Câncer, ULBRA  
E-mail de contato: grivicich@terra.com.br

### Introdução

A investigação pré-clínica do fenótipo do câncer, agressividade e resistência aos antineoplásicos é geralmente realizada em modelos *in vitro* de cultura de células tumorais em duas dimensões (2D ou monocamada). Porém, esse modelo apresenta limitações, como baixa interação celular com a matriz e entre células de diferentes linhagens. Também existem relatos que o efeito de algumas concentrações dos antineoplásicos não apresentam equivalência *in vivo* dos valores encontrados na cultura 2D.

Assim, os modelos de cultivo em esferoides (3D) foram desenvolvidos para promover melhor simulação das condições *in vivo* de interações celulares e expressões fenotípicas, possibilitando que as células migrem para todas as direções, permitindo um aumento da superfície celular. Diante desses fatores o modelo de cultivo em 3D *in vitro* é o que mais se aproxima com modelos *in vivo*.

### Objetivos

Assim, os objetivos deste estudo foram desenvolver um modelo de cultura 3D (esferoides) para as linhagens celulares de carcinoma colorretal HT-29 e de carcinoma de pulmão de não-pequenas células NCI-H460 e avaliar o efeito da quimioterapia neste modelo.

### Metodologia

#### Cultura Celular e Preparo dos Esferoides

As linhagens celulares de câncer de cólon HT-29 e a linhagem NCI-H460 (carcinoma de pulmão) foram cultivadas em meio de cultura Dulbecco's suplementado com 10% de soro fetal bovino e incubados a uma temperatura de 37°C em estufa umidificada contendo 5% de CO<sub>2</sub>.

Para o crescimento dos esferoides foram adicionados em placas de 6 poços, ágar a 2% em meio de cultura Dulbecco's em uma diluição de 1:5 e após ter solidificado essa mistura, aplicou-se a quantidade de 10 x 10<sup>4</sup> células por poço.

Após as placas foram mantidas nas condições de cultivo descritas acima por 7 dias, sendo diariamente observados em microscópio invertido, até formação completa dos esferoides.

#### Avaliação da Cinética de Crescimento dos Esferoides

Após 7 dias, os esferoides já formados foram coletados e colocados em placas de 24 poços, contendo 500 mL do ágar 2% em meio Dulbecco's acrescido de mais 1 mL de meio Dulbecco's.

A mensuração dos esferoides, foram realizadas fotos antes do tratamento com a cisplatina ou 5-fluorouracil, após 48 h do tratamento e em seguida, a cada três dias até os esferoides se desintegrarem.

A mensuração dos esferoides através das fotos foi realizada pelo programa *ImageJ* e após foi aplicada a fórmula ( $= (4/3) * \pi * r1 * r2 * r3$ ) para se obter o volume de cada esferoide.

#### Tratamento com Antineoplásicos

Após serem coletados, os esferoides foram submetidos ao tratamento com doses de 0, 2, 5 e 10 ug/mL de cisplatina e doses de 0, 8,5 e 85 uM de 5-fluorouracil.

### Resultados

Visto que nem todas linhagens celulares crescem em forma de esferoides, observou-se que nas condições de protocolo descritas acima houve a formação e crescimento de esferoides a partir do 7º e 5º nas linhagens celulares NCI-H460 (Figura 1a) e HT-29 (Figura 1b), respectivamente. A durabilidade dos esferoides desta linhagem foi cerca de 17 dias na linhagem H460 e 15 dias na linhagem HT-29 após coletados. Também observou-se um aumento significativo do tamanho dos esferoides não tratados em relação aos tratados com cisplatina (Figuras 2 e 3), demonstrando, efeito citotóxico da cisplatina e 5-fluorouracil, respectivamente.

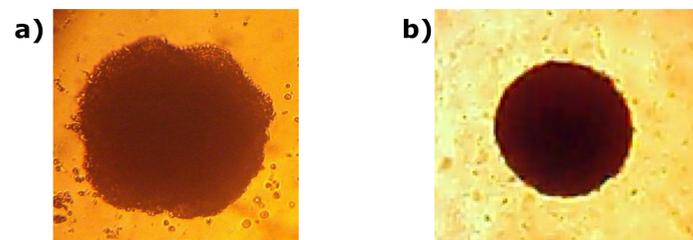


Figura 1: a) Esferoide da linhagem NCI-H460; b) Esferoide da linhagem HT-29.

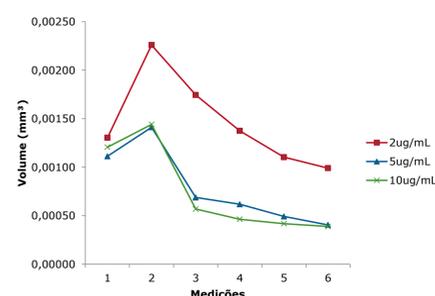


Figura 2: Efeito da cisplatina nos esferoides tratados

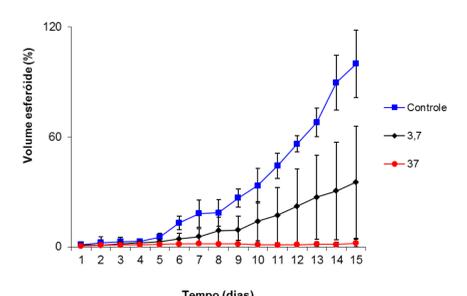


Figura 3: Efeito do 5-fluorouracil nos esferoides tratados

### Conclusão

Foi possível padronizar uma metodologia eficaz para a formação e manutenção dos esferoides a partir das linhagens celulares humanas de câncer de pulmão NCI- H460 e de câncer colorretal HT-29, visto que cada linhagem se comporta de maneira diferente e nem todas se agregam tridimensionalmente.

A cisplatina inibiu, de forma dose-dependente, o crescimento dos esferoides derivados da linhagem NCI-H460, evidenciando que esse agente antineoplásico possui efeito citotóxico significativo também nesses agregados celulares tridimensionais.

O 5-FU inibiu, de forma dose-dependente, o crescimento dos esferoides derivados da linhagem HT-29. Além disso, verificamos que não houve diferença significativa entre as doses necessárias para inibir o crescimento no modelo de monocamada e esferoides na linhagem estudada.