

**EFEITO DA QUIMIOTERAPIA EM MODELO DE ESFEROIDES (3D)**

Gabriel Ratund¹
Érica Ballestreri²
Ivana Grivicich³

RESUMO

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. Porém, esse modelo apresenta limitações, como baixa interação celular com a matriz extracelular e entre células de diferentes linhagens e não equivalência de efeito de antineoplásicos com modelos *in vivo*. Assim, os modelos de cultura 3D foram desenvolvidos para promover melhor simulação das condições *in vivo* de interações celulares e expressões fenotípicas. Assim, os objetivos deste estudo foram desenvolver um modelo de cultura 3D (esferoides) para as linhagens celulares de carcinoma de pulmão de não-pequenas células NCI-H460 e de carcinoma colorretal HT-29 e avaliar o efeito da quimioterapia neste modelo. Primeiramente foram realizados testes para padronizar o protocolo de cultivo 3D. A seguir a linhagem NCI-H460 foi exposta ao tratamento com cisplatina e a linhagem HT-29 ao quimioterápico 5-Fluorouracil. A análise foi realizada por mensuração do diâmetro dos esferoides antes do tratamento, 48 h após o tratamento e depois a cada 3 dias, até os esferoides se desintegrarem. Observamos que: a densidade ideal a ser utilizada para este é 10×10^4 células; o tempo para a formação dos esferoides é entre 5 e 7 dias; a durabilidade dos esferoides é de 15 a 17 dias; os esferoides não tratados apresentaram um aumento significativo de diâmetro em relação aos tratados. Com isso, concluímos que o método de formação de esferoides proposto por esse trabalho permite o uso das linhagens NCI-H460 e HT-29 para estudos *in vitro* a fim de contribuir para o conhecimento em relação a biologia do tumor e eficácia de antineoplásicos.

PALAVRAS CHAVE: 5-Fluorouracil; cisplatina; linhagem celular

INTRODUÇÃO

O desenvolvimento do carcinoma colorretal (CRC) tem sido associado a sucessivas mutações nas células epiteliais de revestimento do intestino. As fases iniciais se caracterizam pela proliferação descontrolada das células da cripta, seguindo para as células da mucosa, até a invasão da membrana basal. Apesar de apresentar um complexo desenvolvimento, alguns fatores de risco podem ser identificados, como: predisposição genética; doenças inflamatórias do intestino; hábitos nutricionais ricos em gordura animal e carboidratos refinados e deficientes em fibras e cereais; e histórico familiar em relação à ocorrência deste tipo de câncer (VOLGESTEIN, 1988; FEARON, 1995). O tratamento das neoplasias de cólon e reto baseia-se em combinações com o quimioterápico 5-fluorouracil (5-FU). A quimioterapia adjuvante é amplamente realizada em pacientes que apresentam linfonodos comprometidos ao

1 Aluno do colégio Cristo Redentor – Bolsista PIBIC-EM/CNPq – gabrielratund@gmail.com

2 Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular Aplicada à Saúde – ericaballesterri@hotmail.com.br

3 Professora do Curso de Medicina e do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular Aplicada à Saúde (ULBRA) – grivicich@terra.com.br

diagnóstico com aumento de sobrevida global e de sobrevida livre de doença. Diversas combinações de agentes são hoje avaliadas com o intuito de aumentar as respostas obtidas com o 5-FU (TAY et al., 2015).

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 extracelular e entre células de diferentes linhagens, necessidade de altas concentrações não fisiológicas de soro fetal bovino (SFB) e de realimentação por meio de mudança do meio a cada 2-3 dias, além das células necessitarem de adesão a uma superfície de contato para que possam iniciar a sua proliferação. Também existem relatos que o efeito de algumas concentrações dos antineoplásicos não apresentam equivalência *in vivo* dos valores encontrados na cultura 2D (AMANN et al., 2014). Assim, os modelos de cultura 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. As células quando crescidas neste sistema, formam estruturas denominadas de esferoides multicelulares. Estes esferoides apresentam em seu interior uma heterogeneidade celular, formação de microambiente e exposição diferencial a diversos fatores como nutrientes e oxigênio. Diante desses fatores o modelo de cultivo em 3D *in vitro* é o que mais se aproxima dos modelos *in vivo* e sua similaridade com regiões avasculares de pequenos tumores e com as regiões intervaseculares de grandes tumores sólidos tornam esse modelo 3D peculiar (DO AMARAL e MACHADO-SANTELLI, 2011; LU et al., 2014).

Nesse estudo, investigamos a capacidade das linhagens de carcinoma de pulmão e colorretal formarem esferoides e o efeito de agentes antineoplásicos no crescimento dessas células em cultura.

METODOLOGIA

A padronização do cultivo em esferoide foi realizado com a linhagem de câncer de cólon HT-29 e a linhagem NCI-H460 (carcinoma de pulmão), esta última como controle da técnica. Primeiramente foram realizados testes para determinar a densidade inicial de células a serem utilizadas, condições de preparo e monitorado o tempo de crescimento dos esferoides, para a linhagem utilizada no estudo, e após foi padronizado o seguinte protocolo: em placas de 6 poços foram adicionados, 2 mL/poço de ágar a 2% em meio de cultura DMEM, em uma diluição de 1:5 e após ter solidificado essa mistura, aplicou-se a quantidade de 10×10^4 células/poço (BASSEGIO, et al., 2006). As placas foram mantidas nas condições de cultivo descritas acima por sete dias, sendo diariamente observados em microscópio invertido, até a formação completa dos esferoides. Para analisar o crescimento dos esferoides ao longo do tempo, após os sete dias de incubação, com os esferoides já formados, eles foram coletados sob microscópio invertido, com o auxílio de uma pipeta, e foram transferidos individualmente para placas de 24 poços contendo 500 mL de ágar a 2% em meio de cultura DMEM (diluição 1:5), acrescido de mais 1mL de meio DMEM (YUHAS, et al., 1997).

A avaliação da citotoxicidade no modelo de esferoides foi realizado na linhagem HT-29 com o 5-FU (0 a 50 μ M) e na linhagem NCI-H460 com a cisplatina. (0 a 2,0 μ g/mL). Para a mensuração, os esferoides foram fotografados antes do tratamento com os antineoplásicos e após 48 h de tratamento e em seguida, a cada três dias até os esferoides se desintegrarem. O volume de cada esferoide foi calculado utilizando o programa ImageJ seguido da fórmula $(=4/3) * \pi * r1 * r2 * r3$ (YUHAS, et al., 1997).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após diversos testes para padronização do protocolo adequado para formação dos esferoides utilizando as linhagens NCI-H460 e HT-29, observamos que a densidade ideal a ser utilizada para este experimento nas duas linhagens celulares foi 10×10^4 células. O tempo para a formação dos esferoides nessas linhagens foi de 7 e 5 dias, respectivamente. As condições para o cultivo envolvem uma diluição de 1:5 de ágar em meio de cultura completo para ambas linhagens celulares; 4) o tempo de duração do cultivo em esferoides destas linhagens foi cerca de 17 e 15 dias, respectivamente, após coletados, tempo adequado para avaliarmos o efeito de agentes antineoplásicos. Achados semelhantes foram verificados por Godugu et al. (2013), demonstrando ser este um modelo adequado para estudos de biologia tumoral.

A exposição a cisplatina promoveu uma diminuição do crescimento dos esferoides dependente da dose utilizada, de forma significativa ($p < 0,05$), em relação ao controle não tratado. Esse efeito, na linhagem de pulmão NCI-H460, foi observado a partir do oitavo dia de cultura, sendo que com a dose de $0,1 \mu\text{g/mL}$ o volume dos esferoides reduziu em aproximadamente 50%. Mesmo ocorrendo uma inibição do volume, os esferoides tratados continuaram a aumentar o volume até o 14º o qual foi observada uma acentuada inibição do volume devido ao fato de já estarem começando a se desintegrarem. Quando expostos a dose de $2,0 \mu\text{g/mL}$, já após 48 h de exposição à cisplatina, não foi observado crescimento dos esferoides. Nossos achados corroboram o estudo de Inoue et al. (1987), no qual avaliaram em modelo 2D e 3D a sensibilidade da cisplatina em duas linhagens de câncer de pulmão (PC-6 e PC-10) mostrando que nas células PC-6 a letalidade celular induzida por cisplina foi essencialmente inalterada, independentemente de as células estarem em uma monocamada ou esferoides e também foi capaz manter sua eficácia no cultivo em esferoides das células PC-10, apresentando-se apenas três vezes mais resistente em comparação a monocamada.

O efeito citotóxico do 5-FU foi avaliado no modelo de esferoide e no modelo de monocamada. No modelo de monocamada, o tratamento com 5-FU mostrou inibição de crescimento de 50% em 24 h que persistiu até 72 h com dose de $8 \mu\text{M}$. No modelo de cultivo em esferoide, esse efeito foi observado a partir do 6º dia de cultivo com uma dose de $8,5 \mu\text{M}$ de 5-FU. Com dose de $85 \mu\text{M}$ a inibição do crescimento dos esferoides iniciou já após 48 h.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

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.

REFERÊNCIAS

Amann, A. et al. Development of an Innovative 3D Cell Culture System to Study Tumour - Stroma Interactions in Non-Small Cell. Lung Cancer Cells. **Plos One**, v.9, p.1-13, 2014.

Baseggio, A.P. et al. Inibição do crescimento celular induzido pela oxaliplatina em esferoides derivados da linhagem celular HT-29. **Rev Inic Cient Ulbra**.v.1, p31-37, 2006.

- Do Amaral, J.B., Machado-Santelli, G.M. A cultura de células em 3 dimensões e a sua aplicação em estudos relacionados a formação do lúmen. **Naturalia**, v.34, p1-20. 2011.
- Fearon, E.R. **Molecular abnormalities in colon and rectal cancer**. The molecular basis of cancer. Philadelphia: WB Saunders Company. p.340-357, 1995.
- Godugu, C. et al. Algimatrix[™] based 3D cell culture system as an in-vitro tumor model for anticancer studies. **Plos One**, v.8. 2013.
- Inoue, S. et al. Effects of doxorubicin and cisplatin on multicellular tumor spheroids from human lung cancer. **Cancer Drug Deliv.**, v.4, p.213-224, 1987.
- Lu, W.D. et al. Development of an Acellular Tumor Extracellular Matrix as a Three-Dimensional Scaffold for Tumor Engineering. **Plos One**, v.9, p.1-13. 2014.
- Tay, R.Y. et al. Treatment of metastatic colorectal cancer: focus on panitumumab. **Cancer Manag Res.**, v.7, p.189-198, 2015.
- Volgestein, B. Genetic alterations during colorectal-tumor development. **New England of Journal Medicine**, v.319, p.525-532, 1988.
- Yuhas, J.M. et al. A simplified method for production and growth of multicellular tumor spheroids. **Cancer Res.**, v.35, p.3639-3643. 1977.