

EFEITO DA QUIMIOTERAPIA EM MODELO DE ESFERÓIDES (3D)

Gabriel Ratund¹, Érica Ballestreri², Ivana Grivicich³

¹Acadêmico 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; ²Doutoranda Programa de Pós-Graduação Biologia Celular e Molecular Aplicada à Saúde, ULBRA; ³Professora 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: gabrielratund@gmail.com

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 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 (esferóides) 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.

Metodologia

CULTURA CELULAR E PREPARO DOS ESFERÓIDES

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 CO₂.

Para o crescimento dos esferóides 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 10⁴ 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 esferóides.

Protocolo este padronizado após realizado testes para acerto da densidade, condições de preparo e tempo de crescimento dos esferóides.

AVALIAÇÃO DA CINÉTICA DE CRESCIMENTO DOS ESFERÓIDES

Após 7 dias, os esferóides 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.

Para mensuração dos esferóides, 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 esferóides se desintegrarem.

A mensuração dos esferóides 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 DOS ESFERÓIDES COM CISPLATINA OU 5-FLUOROURACIL

Após serem coletados, os esferóides foram submetidos ao tratamento com doses de 0, 2, 5 e 10ug/mL de solução de 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 esferóides, observou-se que nas condições de protocolo descritas acima houve a formação e crescimento de esferóides nas linhagens celulares NCI-H460 (Figura 1a) e HT-29 (Figura 1b) que a durabilidade dos esferóides desta linhagem foram de cerca de 15 dias após coletados. Também observou-se um aumento significativo do tamanho dos esferóides não tratados em relação aos tratados com cisplatina (Figuras 2 e 3), demonstrando, efeito citotóxico da cisplatina e 5-fluorouracil, respectivamente.

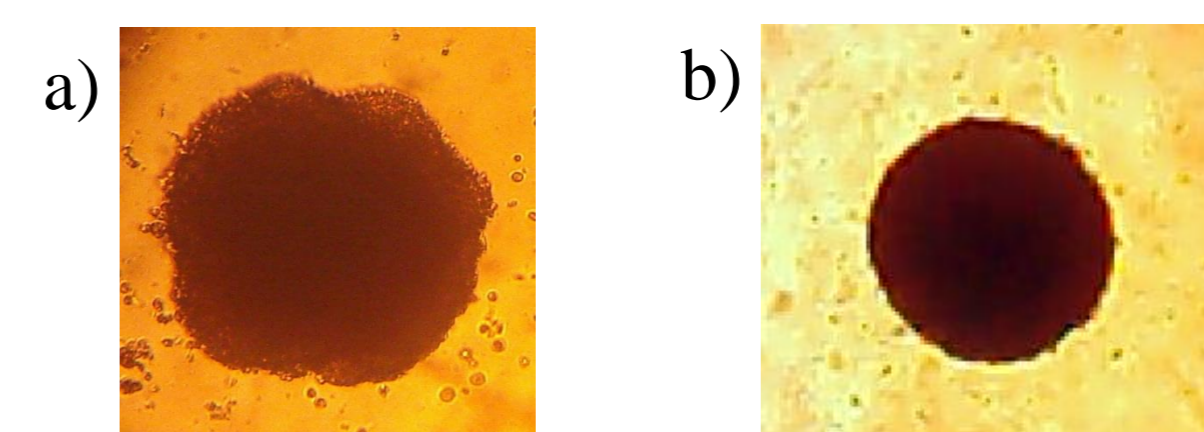


Figura 1: a) Esferoide da linhagem NCI-H460; b) Esferoide da linhagem HT-29.

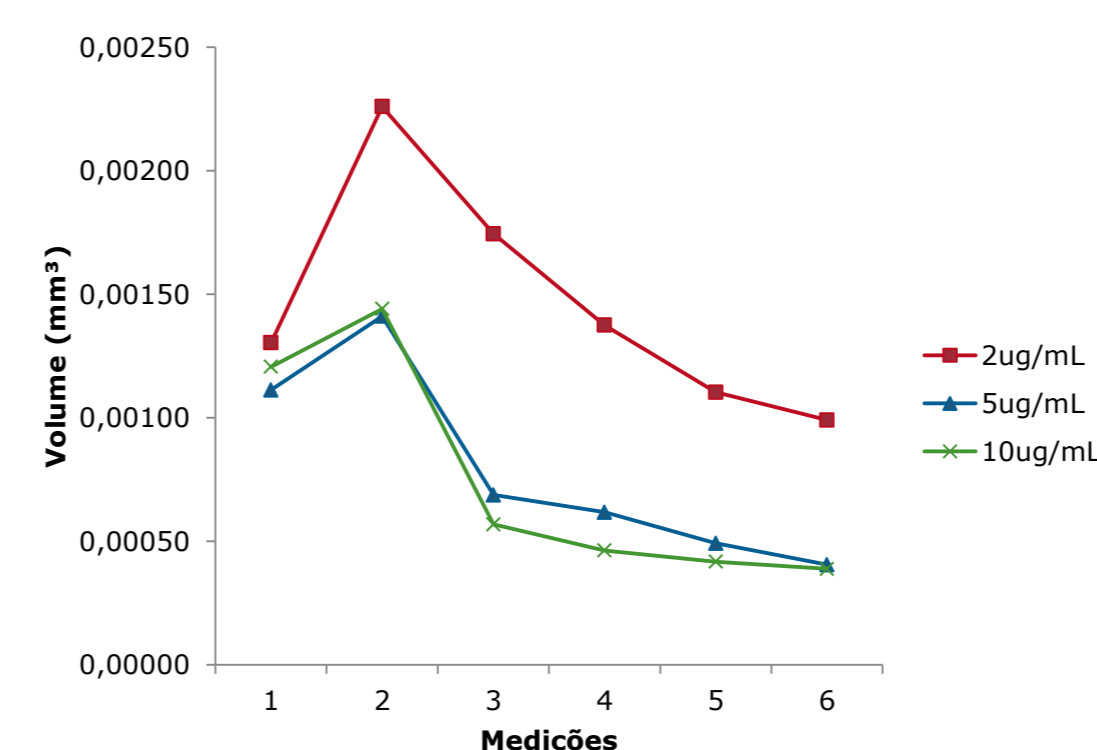


Figura 2: Efeito da cisplatina nos esferóides tratados

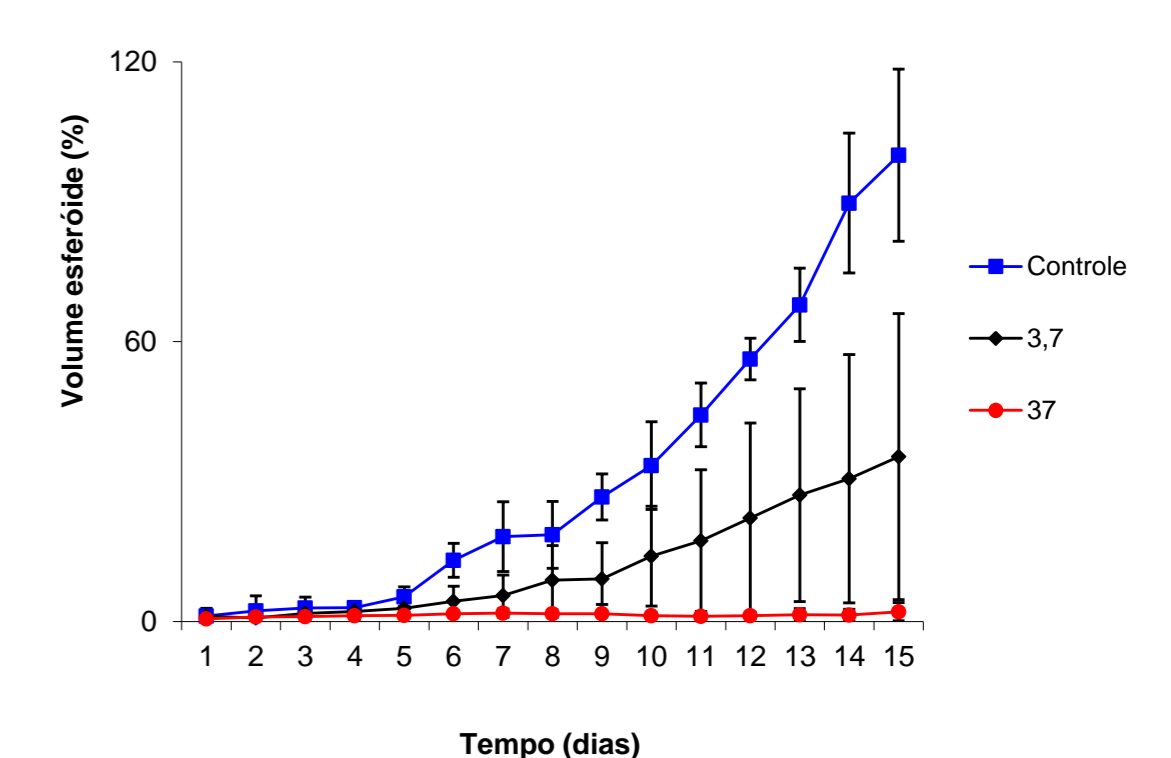


Figura 3: Efeito do 5-fluorouracil nos esferóides tratados

Conclusão

Foi possível padronizar uma metodologia eficaz para a formação e manutenção dos esferóides 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 esferóides 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 esferóides 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 esferóides na linhagem estudada.