

PADRONIZAÇÃO DE MODELO DE CULTURA CELULAR 3D EM CÉLULAS CERVICAIS

Ana Beatriz Camillo Santos (PIC/UEM); Thaise Andreia Ferreira (PIC/UEM),
Cristiane Suemi Shinobu Mesquita (Orientador), e-mail:
abeatrizsantos99@gmail.com / thaiseand@gmail.com.

Universidade Estadual de Maringá / Centro de Ciências Biológicas e da
Saúde/Maringá, PR.

**Área: 20600003 - Ciências Biológicas II, Subárea: 20601000 -
Morfologia: Citologia e Biologia Molecular**

Palavras-chave: Cultura celular 3D, esferóides, câncer cervical.

Resumo:

O câncer cervical representa a quarta causa de morte entre as mulheres no Brasil e no mundo, sendo que as opções de tratamento são cirurgia, quimioterapia, radioterapia ou uma combinação entre elas. As células cultivadas como modelos 3D são consideradas um excelente modelo para estudos biológicos, pois exibem características que estão mais próximas das condições *in vivo*. O objetivo do presente projeto foi padronizar metodologia de modelo de cultura celular 3D, visando otimizar estudos *in vitro* de ação de drogas com atividade antitumoral. A metodologia de cultura celular 3D a partir de utilização de placas revestidas com agarose foi padronizada, proporcionando obtenção dos esferóides das linhagens celulares HaCat, CaSki e HeLa, porém, C33A e SiHa apresentaram apenas aglomeração celular, não sendo capazes de formar o esferóide, portanto, são necessários estudos para melhorar a metodologia, possibilitando a obtenção dos esferóides em diversas linhagens celulares.

Introdução

O câncer cervical está entre os principais cânceres que atingem a população feminina. Após apenas do câncer de pele não melanoma, mama e colorretal, representa a quarta causa de morte entre as mulheres no Brasil e no mundo¹. A infecção persistente pelo Papilomavírus humano (HPV) é causa necessária mas não suficiente para o câncer cervical, e está associado também ao câncer anogenital e oral².

O câncer cervical possui uma taxa de mortalidade muito alta devido ao acesso limitado a tratamento adequado, por isso, vários estudos visam desenvolver novas terapias para o câncer cervical já estabelecido, utilizando inclusive, técnicas de imunoterapia³. As células cultivadas como modelos 3D são consideradas um excelente modelo para estudos biológicos, pois os esferóides obtidos a partir da técnica exibem características que estão mais próximas das complexas condições *in vivo*. As vantagens do modelo 3D ainda incluem a possibilidade de estudos com biomarcadores, desenvolvimento de novas drogas, aplicações farmacológicas e estudo de

cânceres⁴.

Levando em consideração às informações apresentadas, o objetivo do presente projeto foi o de realizar uma padronização de modelo de cultura celular 3D para implantação no Laboratório de Citologia Clínica da Universidade Estadual de Maringá, com a finalidade de otimizar estudos *in vitro* de ação de drogas com atividade antitumoral.

Materiais e métodos

Um levantamento bibliográfico foi realizado para pesquisar as metodologias possíveis para o modelo de cultura celular 3D em células cervicais. Durante a escolha considerou-se a disponibilidade de reagentes, equipamentos e outros recursos necessários para obtenção dos esferóides no laboratório. Quatro metodologias para obtenção dos esferóides foram selecionadas: utilização de placas específicas para cultura de esferóides, utilização de placas de cultura de células de 96 poços revestidas com agarose, utilização de frascos spinner a partir de cultura de células em placas de Petri e cultura da gota em suspensão.

Linhagens celulares

Foram utilizadas as seguintes linhagens de células epiteliais cancerosas cervicais para os testes: HeLa (HPV-18 positiva), SiHa (HPV-16 positiva), CaSki (HPV-16 e 18 positiva) e C33A (HPV negativa), além da HaCaT, que é uma linhagem de queratinócitos humanos imortalizados (controle negativo).

Condições de cultura e manutenção das linhagens celulares

As células foram cultivadas em estufa de cultura celular a 37°C, em frascos plásticos descartáveis com tampa de rosca e dispositivo para a entrada de CO₂, contendo meio de crescimento normal específico para cada linhagem, em atmosfera de 5% de CO₂ / 97,5% de ar, para a manutenção de pH próximo ao fisiológico. As células foram sub-cultivadas sempre que atingiram, aproximadamente, 80% da densidade de saturação, utilizando, para tanto, tripsina 0,1% em tampão fostato salino (PBS) contendo 1mM de EDTA e tendo sido a cultura previamente lavada, uma vez, com solução de PBS. Os estoques celulares foram mantidos em meio de cultivo contendo 10% dimetilsulfóxido (DMSO) a -190°C, em reservatório contendo nitrogênio líquido.

Utilização de placas de cultura de células de 96 poços revestidas com agarose

Para obtenção dos esferóides foram utilizadas placas de 96 poços revestidas com 100 µL de agarose, que ficou na luz UV por 15 min. Foi adicionado 200 µL de suspensão de células na concentração de 0,5 x 10⁴ células/ml de cada linhagem, sendo que cada linhagem celular foi testada em quintuplicata. Na sequência, as placas foram centrifugadas por 1min à 2500 rpm. Após a centrifugação, a placa foi incubada (à 37°C, 5% CO₂ e 95% de umidade) em repouso, sendo observadas em 48 e 72h. As placas de 96 poços podem servir como suporte para a geração de esferóides, já que podem ser revestidas com filme de agarose ou polímeros hidrofóbico para garantir que as células não façam a adesão na parede do poço.

Resultados e Discussão

A partir de pesquisa bibliográfica, 4 diferentes metodologias foram selecionadas para possível obtenção dos esferóides: utilização de placas específicas para cultura de esferóides, utilização de placas de cultura de células de 96 poços revestidas com agarose, utilização de frascos Spinner a partir de cultura de células em placas de Petri e cultura da gota em suspensão.

As metodologias obtidas após levantamento bibliográfico foram avaliadas quanto a viabilidade para sua realização em laboratório, respeitando as condições e limitações disponíveis para o trabalho. A metodologia que utiliza placas de 96 poços revestidas com agarose foi a escolhida para a criação do modelo de cultura 3D. Dentre suas vantagens estão: o baixo custo e fácil manuseio, grande número de esferóides obtidos em um espaço limitado (96 ou 384 poços), recuperação pós cultura fácil e pode ser facilmente utilizado para obtenção de imagens bem como outras avaliações ou metodologias⁵.

A utilização de frascos Spinner a partir de cultura de células em placas de Petri garante uma troca descomplicada de nutrientes e resíduos celulares. No entanto, uma distribuição homogênea de células não é alcançada, pois a maioria é encontrada predominantemente na periferia, assim ela não foi considerada para a criação de um modelo de cultura 3D⁵.

O método de cultura da gota em suspensão é considerado um dos mais trabalhosos, uma desvantagem sendo que a viabilidade celular pode ser afetada pela elevação da osmolaridade causada pela evaporação do conteúdo das gotas durante os testes⁵.

Com relação à utilização de placas específicas para obtenção de esferóides, a metodologia é relativamente simples, inclusive, mais simples do que a utilização de placas de 96 poços revestidas com agarose, no entanto, o valor das placas torna a metodologia inviável, uma vez que, atualmente no Brasil a pesquisa científica passa por um momento difícil devido à falta de investimentos.

O protocolo desenvolvido com base na metodologia das placas de 96 poços revestidas com agarose foi: 1) Pesar agarose e diluir em TBE (1,5% gel) para quantidade necessária. 100 µl de agarose por poço (placa de 96 poços). Colocar a agarose dentro do fluxo, assim como o PBS. 2) Aquecer a agarose no microondas até sua dissolução. 3) Pipetar 100 µl de agarose em cada poço. 4) Deixar a placa 1 hora em temperatura ambiente e depois mais 1 hora dentro da estufa. 5) Ressuspender as células. 6) Colocar as células na placa com agarose $0,5 \times 10^4$ células/ml. 200 µl por poço. 7) Incubar estufa de 48 a 72 dias 8) Coleta do esferóide: Com a pipeta de 1000 colocar no volume 200 e coletar o poço. Colocar em um tubo falcon e deixar decantar por 1h. Com pipeta de 1000 colocar no volume de 200 e puxar – soltar – puxar e transferir o esferóide para o local.

Os resultados obtidos para as linhagens celulares após incubação por 72 h são apresentados na Figura 1. As linhagens C33A e SiHa formaram pequenos aglomerados celulares, porém, não foram capazes de formar um

esferóide. Por outro lado, CaSki, HaCat e HeLa formaram os esféróides como é possível observar na Figura 1, indicando que o protocolo escolhido foi capaz de permitir a obtenção dos esféróides.

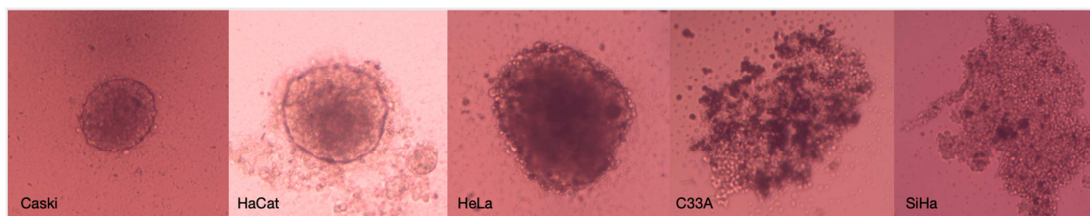


Figura 1 – Esféróides obtidos a partir da utilização de placas de 96 poços revestidas com agarose após 72 h de incubação

Conclusões

A metodologia de cultura celular 3D a partir da utilização de placas revestidas com agarose para células cervicais foi padronizada. A partir dos resultados obtidos é possível observar que a metodologia escolhida foi capaz de proporcionar a obtenção dos esféróides. No entanto, isso não ocorreu para todas as linhagens celulares selecionadas, uma vez que as linhagens C33A e SiHa apresentaram uma pequena aglomeração celular, porém, não foram capazes de formar o esféróide. Dessa forma, o presente trabalho atingiu seu objetivo, uma vez que a obtenção dos esféróides foi alcançada, no entanto, são necessários mais estudos para melhorar a metodologia, possibilitando a obtenção dos esféróides para diversas linhagens celulares.

Referências

1. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Estimativa 2020 : incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Rio de Janeiro: INCA, 2019.
2. SANJOSÉ S., BROTONS M., PAVÓN M.A. The natural history of human papillomavirus infection. Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.47:p.2–13, 2018.
3. SMALL, W.; BACON, M. A.; BAJAJ, A.i; CHUANG, L. T.; FISHER, B. J.; HARKENRIDER, Matthew M.; JHINGRAN, A.; KITCHENER, H. C.; MILESHKIN, L. R.; VISWANATHAN, A. N. Cervical cancer: a global health crisis. **Cancer**, [S.L.], v. 123, n. 13, p. 2404-2412, 2017.
4. RAVI M., Paramesh V., Kaviya S. R., et al. 3D cell culture systems:Advantages and applications. J Cell Physiol.230(1):16–26, 2015.
5. NATH S., DEVI G.R. Three-dimensional culture systems in cancer research: Focus on tumor spheroid model. Pharmacol Ther.163: p.94-108, 2016.