

ANÁLISE POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DE ESFERÓIDES DA LINHAGEM CELULAR CASKI TRATADOS COM CRISINA

Larissa de Souza Brianezi (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Natália Lourenço Mari, Vânia Ramos Sela da Silva, Cristiane Suemi Shinobu Mesquita (Co-orientadora), Marcia Edlaine Lopes Consolaro (Orientadora), e-mail: melconsolaro@gmail.com

Universidade Estadual de Maringá / Centro de Ciências Biológicas e da Saúde/Maringá

Área: Ciências Biológicas e Subárea: Morfologia – Citologia e Biologia Celular

Palavras-chave: cultura celular 3D, esferoides, crisina

Resumo

O câncer cervical (CC) é o quarto tipo mais comum de câncer em mulheres no mundo, e o terceiro mais frequente no Brasil. A infecção persistente por *Papillomavirus humano* (HPV) é o fator essencial para o seu desenvolvimento. As opções de tratamento com efeitos citotóxicos para evitar o avanço do CC são limitadas. Assim, um grande número de compostos naturais tem recebido atenção por apresentarem efeitos terapêuticos específicos de interesse para o câncer. O desenvolvimento de novas ferramentas que auxiliem a busca por novos compostos com efeitos terapêuticos mostra-se relevante, especialmente ferramentas que substituam os testes *in vivo* convencionais, uma vez que o sacrifício de animais é algo que deve ser cada vez mais evitado nas pesquisas. Dessa forma, a utilização de metodologia de cultura celular 3D mostra-se como algo promissor, por se tratar de um ensaio *in vitro* que se aproxima muito do modelo *in vivo*, permitindo ao pesquisador inúmeras possibilidades. Dessa forma, o objetivo do presente projeto foi avaliar a ação da crisina, que é um flavonóide derivado da própolis, em esferóides formados por células tumorais cervicais humanas da linhagem CasKi (HPV-16 e -18 positivas), por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV). Nossos resultados indicam uma possível atividade antineoplásica da crisina em esferóides de CasKi. Porém, são necessários mais estudos para avaliar novas concentrações da crisina, bem como melhorar a preparação das lâminas para microscopia, com a intenção de preservar a estrutura tridimensional dos esferóides.

Introdução

O câncer de colo do útero ou câncer cervical (CC) é um importante problema de saúde pública, pois está entre os mais incidentes no mundo, ocupando a quarta posição. No Brasil, é o terceiro mais frequente, exceto o câncer de pele não melanoma, ficando apenas atrás de câncer de mama e colorretal. A estimativa para cada ano do triênio 2020-2022 é de 16.590 novos casos (INCA, 2021). Aproximadamente 85% dos casos mundiais de CC ocorrem em países subdesenvolvidos ou em desenvolvimento, sendo responsável por 311 mil óbitos por ano (GLOBOCAN, 2021).

A infecção persistente pelo *Papillomavirus* humano (HPV) de alto risco carcinogênico (AR) é o principal fator envolvido no desenvolvimento do CC. O HPV-AR 16 é o tipo mais frequente na população em geral e é considerado o principal causador de CC, seguido do HPV 18, relacionado a aproximadamente 15% (BRIANTI *et al*,2017). Sabe-se que a maioria das infecções por HPV são transitórias, e que outros cofatores são importantes para o desenvolvimento das neoplasias em mulheres infectadas por HPV-AR (BRIANTI *et al*,2017).

O tratamento do CC depende do estágio de evolução da doença, tamanho do tumor e fatores pessoais. Entre os tratamentos para o CC estão a cirurgia, a quimioterapia, a radioterapia ou a combinação de radioterapia e quimioterapia (INCA,2021). As opções de tratamento com efeitos citotóxicos para evitar o avanço do CC ainda são limitadas, de modo que a busca de novos compostos terapêuticos é de extrema importância.

Atualmente, também vem sendo mais estudado e explorado o modelo de cultura de células em 3D, visto ser o modelo *in vitro* que mais se aproxima do modelo *in vivo* (KIM,2005). A utilização destes esferóides apresenta desde curvas de resistência a drogas semelhantes ao encontrado em tumores sólidos como também restabelece características morfológicas e funcionais do seu tecido *in vivo*, sendo uma importante ferramenta em ensaios de citotoxicidade (KIM,2005).

A terapia a partir de produtos naturais ainda é pouco explorada para o CC, e têm sido um recurso extremamente eficaz tanto para a descoberta quanto no desenvolvimento de medicamentos, por proporcionar uma enorme variedade de estruturas químicas (KASALA *et al*,2015). A crisina é um composto flavonóide derivado da própolis, e tem sido investigado em uma ampla variedade de linhagens celulares de câncer tais como cólon, pulmão, mama, fígado, próstata e leucemia, bem como em modelos tumorais em animais, e esta tem demonstrando propriedades anticâncer promissoras, agindo principalmente na inibição da proliferação celular e da apoptose (KASALA *et al*,2015). Dessa forma, o objetivo do presente projeto é avaliar a ação da crisina em esferóides formados por células cervicais tumorais humanas da linhagem CasKi (HPV-16 e 18), por meio de microscopia eletrônica de varredura, observando alterações relacionadas à morfologia e ao tamanho dos esferóides.

Materiais e métodos

A crisina (5,7-diidroxiflavona) utilizada nos experimentos foi adquirida comercialmente da Sigma-Aldrich, diluída em DMSO, em uma concentração de 40 mM e estocada a uma temperatura de -20º C. Utilizou-se a linhagem celular CasKi, de origem de neoplasia de cérvix uterina humana metastática, com propriedade aderente, com morfologia semelhante a célula epitelial. Contém aproximadamente 500 cópias do genoma do HPV-16 e ainda genoma do HPV-18, assim como genes p53 e pRB sem mutações. O cultivo foi feito em uma garrafa de cultivo celular com meio de cultura suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS) em atmosfera controlada com 5% de CO₂ a 37ºC.

Para geração dos esferóides foram utilizadas microplacas de 96 poços com fundo em U, sendo que cada poço foi revestido com uma fina camada de agarose (1,5%). Após polimerização da agarose, foram adicionados 200 µL em cada poço de uma suspensão de células com uma concentração de 5x10⁴ células/mL e as placas foram

incubadas durante quatro dias em estufa de CO₂. Assim, os esferóides foram expostos às concentrações de 50, 100 e 200 µM de crisina por 72 horas. Células mantidas apenas com DMEM foram utilizadas como controles negativos (CN). Após o tratamento, os esferóides foram fixados em solução de glutaraldeído a 2,5% em tampão cacodilato 0,1 M e desidratados em uma série ascendente de álcool. A seguir, foi determinado o ponto crítico e a metalização em ouro. As amostras foram então observadas com um dispositivo de varredura Shimadzu SS-550 Super (Shimadzu, Tóquio, Japão) no COMCAP/UEM, sendo avaliados parâmetros como diâmetro e morfologia das células que compõe os esferóides.

Resultados e Discussão

Através da microscopia eletrônica de varredura (Figura 1 A-D), foi possível observar que por conta da preparação das lâminas, os esferóides acabaram perdendo seu formato tridimensional, adquirindo um formato plano, semelhante à um disco, o que impossibilitou a avaliação do diâmetro dos mesmos.

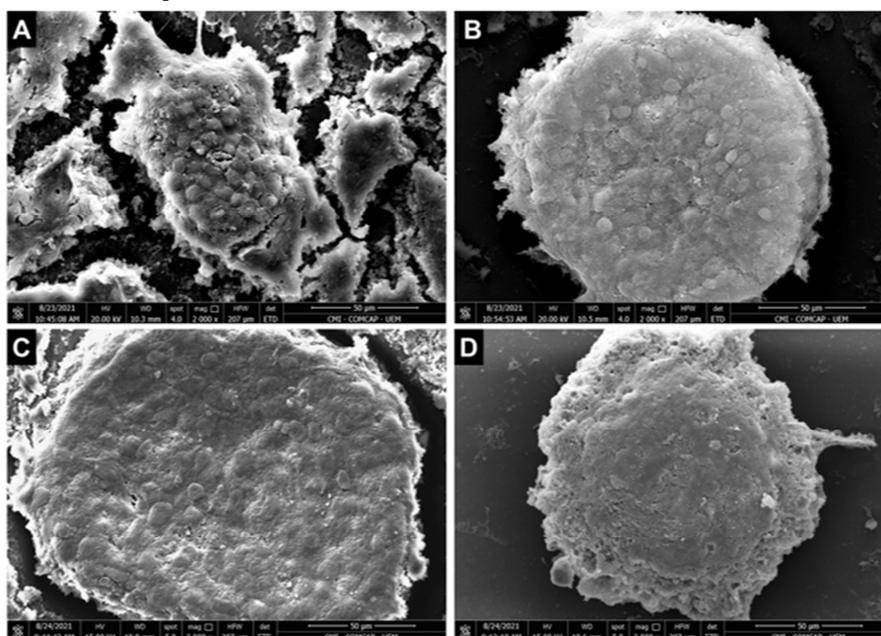


Figura 1: Imagens dos esferóides da linhagem células CaSki tratados com crisina em microscopia eletrônica de varredura (MEV). **A)** Esferóides não tratados (CN); **(B), (C)** e **(D)** Esferóides tratados com crisina nas concentrações de 50, 100 e 200 µM, respectivamente.

Com relação a sua morfologia, foi possível observar que os esferóides CN apresentam estrutura composta por células e matriz extracelular (Figura 1A). Os esferóides tratados com as concentrações de 50µM e 100µM de crisina mantém as células na sua superfície, porém nota-se um aumento na quantidade de matriz extracelular (Figura 1B e 1C). Já nos esferóides tratados com a concentração de 200µM de crisina, não foi mais observado células na superfície do mesmo, mas apenas matriz extracelular. Estes dados indicam que na concentração de 200µM de crisina, as células que compõe a superfície dos esferóides foram mortas em decorrência do tratamento. Porém, a matriz extracelular permaneceu nos esferóides, o que pode atuar como uma barreira contra a ação da crisina às células do interior dos esferóides.

Conclusões

A partir da avaliação morfológica dos esferóides por meio da MEV, podemos sugerir uma possível atividade antineoplásica da crisina *in vitro*, mas em estruturas que se aproximam mais das condições *in vivo*, que são os esferóides (modelo de cultura 3D). Porém, são necessários mais estudos para avaliar novas concentrações da crisina, bem como melhorar a preparação das lâminas para microscopia, com a intenção de preservar a estrutura tridimensional dos esferóides.

Agradecimentos

A Fundação Araucária pela bolsa concedida de iniciação científica.

Referencias

BRIANTI, P.; FLAMMINEIS, E. ; MERCURI, S.R. Review of HPV-related diseases and cancers. **New Microbiol**, v. 40, n. 2, p. 80-5, 2017.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (Brasil). **Atlas da Mortalidade**. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/assuntos/cancer-do-colo-do-utero>> .Acesso em: 26 julho. 2021.

KASALA, E. R. *et al.* Chemopreventive and therapeutic potential of chrysin in cancer: mechanistic perspectives. **Toxicol Lett**, v. 233, n. 2, p. 214-225, 2015.

KIM, JB. Three-dimensional tissue culture models in cancer biology. **Semin Cancer Biol**, v.15, n. 5, p.365-377, 2005.

WORLD

HEALTHORGANIZATION. **International Agency for Research on Cancer, Globocan**. Disponível em: < <https://gco.iarc.fr/today/home> >. Acesso em: 26 julho. 2021.