

## **ANÁLISE POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DE ESFEROIDES DE CÉLULAS TUMORAIS DE MAMA TRATADOS COM ARTEPILLIN C**

Isabelly Vitoria Da Silva Gonçalves (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Lyvia Eloiza de Freitas Meirelles, Djaceli Sampaio de Oliveira Dembogurski, Denise Brentan da Silva, Marcia Edilaine Lopes Consolaro, Raquel Pantarotto Souza Padovan, Vânia Ramos Sela da Silva (Orientador). E-mail: vrssilva@uem.br

Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências da Saúde, Maringá, PR.

**Área e subárea do conhecimento:** Ciências da saúde - Farmácia

**Palavras-chave:** Câncer de mama; Artepillin C; Cultura celular 3D

### **RESUMO**

O câncer de mama é a principal causa de morte por câncer na população feminina. Além de ser uma doença multifatorial, esta neoplasia possui diversos fatores de risco, podendo ter relação com estilo de vida, histórico familiar e predisposição genética. A busca por novas opções terapêuticas visa ampliar as possibilidades e melhorar os resultados dos tratamentos convencionais, além de ter como objetivo reduzir os efeitos colaterais causados por estas. Nesse sentido, vários compostos naturais vêm sendo explorados, dentre eles está o artepillin C, um constituinte de alguns tipos de própolis brasileira que tem se mostrado promissor, uma vez que possui atividades antioxidantes, antiangiogênicas e antitumorais. Dessa forma, este estudo teve como objetivo avaliar a ação do artepillin C em esferoides formados por células tumorais de mama, por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV). Os esferóides da linhagem celular tumoral de mama, MCF-7, foram obtidos e expostos à concentração de IC<sub>50</sub> do artepillin C, previamente determinado, e após 72 horas de incubação, foram submetidos à avaliação por MEV. Nossos resultados demonstraram que o tratamento com artepillin C alterou a morfologia e o tamanho dos esferoides das células tumorais de mama MCF-7, com efeito na compactação, delimitação e arranjo destes. Assim, o artepillin C apresentou importantes efeitos nessas células, sendo necessários mais estudos para investigar suas potenciais atividades no tratamento do câncer de mama.

### **INTRODUÇÃO**

O câncer de mama é um importante problema de saúde pública mundial, uma vez que representa a principal causa de morte por câncer na população feminina. Essa neoplasia é uma doença multifatorial com diversos fatores de risco, que incluem o histórico familiar, fatores hormonais, mutações genéticas de genes como BRCA1 ou BRCA2, e estilo de vida (Akram, 2017).

Diferentes estratégias de tratamento são utilizadas para esse câncer, como a quimioterapia, radioterapia e terapias hormonais, no entanto, visando reduzir os efeitos colaterais e aumentar a taxa de sobrevivência, outras alternativas têm sido investigadas. Dentre elas, as avaliações com compostos naturais se mostram promissoras. O artemisinina, um dos principais constituintes da própolis brasileira, já demonstrou atividades anti-inflamatórias, antioxidantes, antiangiogênicas e anticâncer em alguns tipos de câncer (Machado, 2016; Bhargava, 2021).

Além disso, os modelos tridimensionais têm ganhado destaque frente à biologia tumoral, visto ser o modelo *in vitro* que mais se aproxima do modelo *in vivo*. Sendo assim, eles são capazes de refletir o comportamento das células tumorais no tecido e permitir a investigação de múltiplas características funcionais e morfológicas, sendo uma importante ferramenta nos ensaios de citotoxicidade (Kim, 2005).

Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar a ação do artemisinina em esferoides formados por células tumorais de mama, por meio da microscopia eletrônica de varredura (MEV), observando alterações relacionadas à morfologia e ao tamanho dos esferoides.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### *Obtenção do artemisinina*

O artemisinina (ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico) foi extraído e purificado no laboratório da professora Dra. Denise Brentan da Silva, da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, sendo gentilmente doado para a realização dos experimentos.

### *Linhagem celular e manutenção das células*

MCF-7: Linhagem celular tumoral de mama derivada de um carcinoma ductal invasivo, positiva para receptores de estrogênio e progesterona. As células foram mantidas em frascos com meio de cultura DMEM suplementados com 10% de soro fetal bovino, 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina e 2,5 µg/mL de anfotericina B, sob atmosfera umidificada com 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C.

### *Preparo das placas e formação dos esferoides*

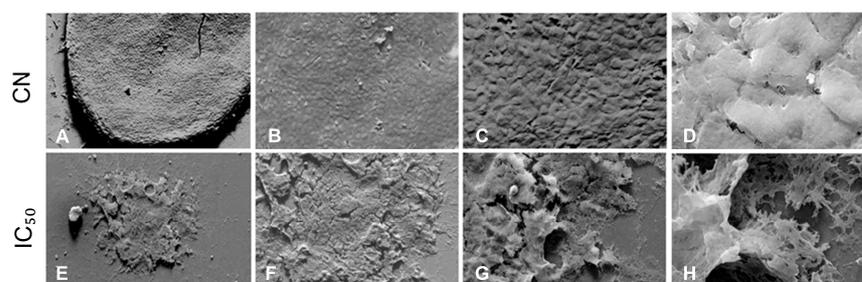
Para a formação dos esferoides foi preparado agarose a 1,5% e adicionada uma fina camada em uma placa de 96 poços com fundo em U. Para o plaqueamento das células foi realizada a contagem dessas em câmara de Neubauer para uma concentração de  $7,5 \times 10^4$  células/mL. Em seguida, 200 µL das células foram adicionadas em cada poço da placa previamente preparada com agarose e então inserida em centrífuga de placa por 3 minutos. Posteriormente, as placas foram incubadas por 6 dias.

### *Tratamento dos esferoides e preparação para leitura em microscópio eletrônico de varredura (MEV)*

Para análise da morfologia dos esferoides por MEV, estes foram divididos em dois grupos: tratados com a concentração de IC<sub>50</sub> do artemisinina (1,1 mM), previamente determinado em nosso laboratório; e não tratados (CN), onde foi adicionado apenas

o meio DMEM. Após o tratamento, os esferoides foram incubados por 72 horas e submetidos ao processo de análise pela MEV. Para isso, as lamínulas foram dispostas em placas de 24 poços e uma gota de poli-L-lisina foi adicionada a cada uma. Após a secagem, os esferoides foram adicionados em cada lamínula e após 1 hora para adesão, uma solução de fixação (tampão cacodilato 0,1 M + glutaraldeído 2,5%) foi adicionada durante a noite na geladeira. Posteriormente, a solução foi removida e lavada 3x com tampão cacodilato 0,1 M por 10 minutos. Para o processo de desidratação, o tampão foi retirado e adicionado uma série ascendente de álcool por 15 minutos cada. O ponto crítico e a metalização foram realizados seguindo o protocolo estipulado no COMCAP, Universidade Estadual de Maringá. As imagens foram analisadas e comparadas com o CN, com um dispositivo de varredura (Microscópio SHIMADZU 55-550).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO



**Figura1-** Imagens de microscopia eletrônica de varredura de esferoides MCF-7 tratados com IC<sub>50</sub> do artemillin C (E, F, G e H) comparados com os controles negativos - CN (A, B, C e D) após 72 horas de incubação. Aumento das imagens: 500, 1000, 2000 e 10.000X, respectivamente.

Nossos resultados demonstraram uma diferença relevante quanto ao tamanho e a morfologia dos esferoides tratados com artemillin C e sem tratamento (CN), após 72 horas de exposição, por meio da MEV. No menor aumento (Figura 1A, E), já foi possível observar que o artemillin C foi capaz de reduzir o tamanho e alterar a morfologia dos esferoides, apresentando perda da delimitação quando comparado ao CN. Por outro lado, os esferoides não tratados (CN) permaneceram uniformes e intactos, e sua superfície não perdeu a sua delimitação e compactação (Figura 1A-D). Nos maiores aumentos (Figura 1F-H), foi possível observar as alterações ainda mais evidentes nos esferoides tratados, com a perda da compactação e delimitação devido a desagregação/dissociação das células dos esferoides, fenômeno já visualizado em outros estudos (Bonafê, 2019). Além disso, observou-se que mesmo nas camadas mais internas dos esferoides tratados, foram observadas similares e importantes alterações na disposição/arranjo e características das células. Esses resultados indicam que o tratamento atingiu tanto a periferia dos esferoides como as camadas mais centrais, demonstrando o efeito do artemillin C no volume total dos esferoides das células MCF-7.

## CONCLUSÕES

Nosso trabalho demonstrou, por meio da MEV, que o artepillin C foi capaz de alterar a morfologia e o tamanho dos esferoides de células tumorais de mama MCF-7, com efeito na compactação, delimitação e arranjo destes. Assim, o artepillin C apresentou importantes efeitos nessas células, demonstrando ser um composto promissor para investigações futuras, de suas potenciais atividades no tratamento do câncer de mama.

## AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual de Maringá pelo apoio financeiro da bolsa, ao Laboratório de Citologia Clínica e ISTs por permitir a realização deste projeto e aos pesquisadores do laboratório por todo auxílio.

## REFERÊNCIAS

AKRAM, M. *et al.* Awareness and current knowledge of breast cancer. **Biological research**, 2017. v. 50, n. 1, p. 1-23. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28969709/>. Acesso em: 18 Agosto 2023.

BHARGAVA, P. *et al.* Experimental evidence for therapeutic potentials of propolis. **Nutrients**, v. 13, n. 8, 1 ago. 2021. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34444688/>. Acesso em: 28 Agosto 2023.

BONAFÈ, F. *et al.* Complete disaggregation of MCF-7-derived breast tumour spheroids with very low concentrations of  $\alpha$ -mangostin loaded in CD44 thioaptamer-tagged nanoparticles. **International Journal of Medical Sciences**, v. 16, n. 1, p. 33–42, 1 jan. 2019. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30662326/>. Acesso em: 18 Agosto 2023.

KIM, J. Three-dimensional tissue culture models in cancer biology. In: **Seminars in cancer biology**. Academic Press, 2005. p. 365-377. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15975824/>. Acesso em: 22 Agosto 2023.

MACHADO, B. *et al.* Chemical composition and biological activity of extracts obtained by supercritical extraction and ethanolic extraction of brown, green and red propolis derived from different geographic regions in Brazil. **PLoS one**, 2016;11:1–26. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26745799/>. Acesso em: 28 Agosto 2023.