

DESENVOLVIMENTO DE PROTOCOLO PARA FORMAÇÃO DE ESFEROIDES EM LINHAGEM CELULAR DE CÂNCER DO COLO DO ÚTERO HUMANO HELA

Maria Eduarda Medeiros Dall Evedove (PIBIC/CNPq), Ruan Rompato Vieira, Lucimara Rodrigues Carobeli, Marcia Edilaine Lopes Consolaro, Lyvia Eloiza de Freitas Meirelles, Vânia Ramos Sela da Silva (Orientador). E-mail: vrssilva@gmail.com

Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências da Saúde

Ciências da Saúde / Farmácia

Palavras-chave: Cultura Celular Tridimensional; Neoplasias do Colo do Útero; Padronização.

RESUMO

O câncer permanece como a segunda principal causa de morte no mundo, e o câncer do colo do útero é o quarto tipo mais prevalente e letal entre as mulheres. Modelos pré-clínicos que envolvam estudos relacionados ao desenvolvimento de novos fármacos antitumorais são limitados. Nesse cenário, culturas tridimensionais (3D), como esferoides, representam alternativas promissoras por reproduzirem de forma mais realista a organização celular e os gradientes do microambiente tumoral. Este trabalho teve como objetivo desenvolver e padronizar um protocolo para a formação de esferoides a partir da linhagem de câncer cervical humano HeLa. Após levantamento bibliográfico no PubMed, três protocolos foram selecionados para serem testados no laboratório. No primeiro, utilizando a técnica da gota suspensa, foram obtidos esferoides estáveis após 96 horas de incubação, em ambas as concentrações testadas, no entanto, maior quantidade foi formado a partir de 30 µL comparado a 20 µL, o que sugere que volumes maiores favorecem a agregação celular. No segundo protocolo, não houve sucesso na formação de esferoides em nenhuma das concentrações testadas. Já no terceiro, que incluiu a adição de colágeno tipo I, houve formação consistente de esferoides em ambas as concentrações celulares testadas, com formação ao longo de 96 horas. Assim, os resultados indicam que o primeiro e o terceiro protocolos foram eficazes na padronização da formação dos esferoides no laboratório, sendo que o primeiro se destacou por apresentar menor custo em relação ao uso de reagentes adicionais.

INTRODUÇÃO

O câncer é a segunda principal causa de mortalidade no mundo, sendo responsável por uma em cada seis mortes, segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS). Entre os diversos tipos, o câncer de colo de útero se destaca como um dos mais prevalentes em mulheres, representando a quarta principal causa de

morte por câncer feminino em escala global, com maior impacto em países de baixa e média renda (IARC, 2022). Apesar dos avanços no diagnóstico e nas estratégias terapêuticas, muitos fármacos candidatos falham ao longo do desenvolvimento, especialmente devido a problemas de segurança ou falta de eficácia nos ensaios clínicos. Um dos fatores que contribuem para essa elevada taxa de insucesso é a utilização de modelos pré-clínicos inadequados, que não reproduzem de forma fidedigna a complexidade do ambiente tumoral (Guntis et al., 2021).

Nesse contexto, técnicas de cultura celular tridimensional (3D) têm se destacado como abordagens promissoras para reduzir a lacuna existente entre as culturas bidimensionais (2D) e os modelos animais. Entre essas técnicas, os esferoides representam uma alternativa versátil e eficiente. Essas estruturas, formadas por agregados celulares esféricos cultivados como unidades flutuantes livres, apresentam organização celular e gradientes de nutrientes mais próximos da realidade tumoral, embora com menor complexidade em relação aos tumores *in vivo* (Merck, 2024).

As culturas 3D podem ser obtidas tanto com o suporte de matrizes extracelulares (andaimes) quanto sem elas, e a seleção do método depende de variáveis como a origem das células, o protocolo de cultivo e o tempo necessário para o estabelecimento das estruturas (Pinto et al., 2020). Ao superar as limitações dos modelos 2D tradicionais, os esferoides oferecem uma plataforma mais realista para o estudo da carcinogênese, para a triagem de novos fármacos e para o desenvolvimento de terapias personalizadas (Moraes et al., 2020).

Diante disso, este trabalho teve como objetivo desenvolver e padronizar um protocolo para a formação de esferoides a partir da linhagem celular de câncer cervical humano HeLa, no Laboratório de Citologia Clínica e Infecções Sexualmente Transmissíveis da Universidade Estadual de Maringá (LabCito/UEM).

MATERIAIS E MÉTODOS

Foi realizado um levantamento bibliográfico na base PubMed, utilizando as palavras-chave *cervical cancer*, *HeLa*, *spheroids*, *cell culture* e *3D culture*, a fim de identificar protocolos para a formação de esferoides com a linhagem de câncer cervical humano HeLa. Dos 54 artigos encontrados, 10 foram selecionados a partir da triagem por título e resumo, e, destes, três protocolos foram escolhidos para padronização no laboratório, considerando a taxa de sucesso relatada pelos autores e a disponibilidade dos reagentes no laboratório.

A linhagem celular HeLa foi reativada e cultivada em frascos plásticos descartáveis contendo meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino, 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina e 2,5 µg/mL de anfotericina B e mantida sob atmosfera umidificada com 5% de CO₂ a 37°C. O subcultivo foi realizado quando as células atingiram 80% de confluência.

Protocolo 1 – Gota suspensa

Uma placa de 96 poços fundo em formato de U foi revestida com 170 µL de agarose 1,5% autoclavada, mantida sob UV por 30 minutos. As células foram

ajustadas para concentrações de $2,5 \times 10^4$ e $7,5 \times 10^4$ células/mL. Foram semeados 20 e 30 μL da suspensão celular na tampa da placa, sobre poços revestidos com agarose contendo 50 μL de DMEM 10%, e incubadas a 37°C e 5% de CO_2 por 96 horas para formação dos esferoides.

Protocolo 2 – Formação de esferoides em placas com agarose sem adição de colágeno tipo I

Placas de 96 poços fundo em U foram revestidas com 170 μL de agarose 1,5%, mantidas 1h em temperatura ambiente e 1h em estufa. As suspensões celulares foram ajustadas para 1×10^4 e $7,5 \times 10^4$ células/mL. Foram adicionados a cada poço, 200 μL da suspensão celular, seguidos de centrifugação por 3 minutos. As placas foram incubadas por 96 horas para formação dos esferoides.

Protocolo 3 – Formação de esferoides em placas com agarose com adição de colágeno tipo I

O revestimento com agarose e o plaqueamento das células seguiram o mesmo procedimento do Protocolo 2, utilizando as mesmas duas concentrações celulares e com centrifugação inicial de 3 minutos, mas com um volume de 150 μL de células em cada poço. Após 24 horas de incubação, adicionou-se 50 μL de colágeno tipo I 2% (Cultrex® 5mg/mL) preparado com DMEM gelado, seguido de nova centrifugação por 3 minutos. As placas foram novamente incubadas por 72-96 horas para formação dos esferoides.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

No primeiro protocolo, após 96 horas de incubação, foram formados esferoides estáveis, a partir de 20 e 30 μL da concentração de $2,5 \times 10^4$ e $7,5 \times 10^4$ células/mL semeadas, no entanto, no maior volume houve maior quantidade de esferoides formados, sugerindo que o volume inicial influencia a compactação e a integridade estrutural destes. Além disso, os esferoides permaneceram estáveis por duas semanas, sem perdas. Esses achados estão de acordo com a literatura recente, que destaca a técnica da gota suspensa como eficiente, reprodutível e de baixo custo para a formação de esferoides tumorais estáveis (Moraes et al., 2020; Pinto et al., 2020).

No protocolo 2, não houve sucesso na formação de esferoides em nenhuma das concentrações testadas, mesmo após 96 horas de incubação, evidenciando que, para as células HeLa, condições que não favorecem o contato célula-célula prejudicam a compactação e a manutenção dos agregados.

Já no protocolo 3, observou-se formação consistente em todos os poços, com estabilidade dos esferoides entre 72 e 96 horas, indicando que a suplementação com colágeno tipo I favoreceu a adesão celular e a homogeneidade estrutural. Resultados semelhantes também foram relatados por estudos que demonstram o papel de componentes da matriz extracelular, como o colágeno, na modulação da agregação celular, da morfologia e até da resposta a fármacos, tornando os modelos tridimensionais mais próximos do ambiente tumoral *in vivo* (Moraes et al., 2020).

CONCLUSÕES

Os resultados obtidos demonstram que, entre os protocolos testados, o primeiro e o terceiro foram eficazes na padronização da formação de esferoides no Laboratório de Citologia Clínica e Infecções Sexualmente Transmissíveis da Universidade Estadual de Maringá (LabCito/UEM). Ainda, o primeiro protocolo se destacou por apresentar menor custo de execução e maior disponibilidade de materiais e reagentes, representando uma abordagem eficiente e economicamente viável para a continuidade dos experimentos.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de expressar minha sincera gratidão ao CNPq pelo apoio financeiro da bolsa, bem como à minha orientadora, Professora Vânia, pela valiosa assistência. Agradeço também à professora coorientadora Lyvia pelo constante suporte e orientação durante o desenvolvimento do estudo, e a todos os pesquisadores do LabCito/UEM por todo auxílio.

REFERÊNCIAS

GUNTIS, S.; et al. Three-dimensional cell culture models in cancer research: a review of current techniques and applications. **Cancer Cell International**, v. 21, n. 1, p. 123, 2021.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC). **IARC marks Cervical Cancer Awareness Month 2025**. Lyon: World Health Organization, 2025. Disponível em: <https://www.iarc.who.int/news-events/iarc-marks-cervical-cancer-awareness-month-2025/> Acesso em: 26 ago. 2025.

MERCK. **Spheroids as 3D cell culture models**. Disponível em: <https://www.merckgroup.com/en/research/3d-cell-culture/spheroids.html> Acesso em: 20 mar. 2025.

MORAES, G. S.; et al. Metodologia simplificada e de baixo custo para estabelecer, processar histologicamente e analisar matrizes esferoides de células cancerígenas tridimensionais. **European Journal of Cell Biology**, v. 99, p. 151095, 2020. Disponível em: <https://www.elsevier.com/locate/ejcb> Acesso em: 20 mar. 2025.

NAZARI, H.; et al. Optimization of 3D spheroid culture for cancer research. **BioTechniques**, v. 68, n. 2, p. 77–85, 2020.

PINTO, B.; et al. Three-dimensional spheroids as in vitro pre clinical models for cancer research. **Pharmacological Research**, v. 156, p. 104778, 2020.