

RECREANDO O TUMOR IN VITRO: ESFEROIDES TRIDIMENSIONAIS DE MELANOMA HUMANO PARA ENSAIOS TOXICOGENÔMICOS

Rodrigo Gonçalves Queijo

Larissa Anastácio da Costa Carvalho

Silvya Stuchi Maria-Engler

Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo

rodrigogoncalvesqueijo@usp.br; larissa.anastacio@usp.br e silvya@usp.br

Objetivos

Padronizar a técnica de obtenção e isolamento de modelo tridimensional de esferoides, tendo como base testes com diferentes proporções de melanoma e fibroblastos; observar o comportamento do agregado celular 3D em um modelo de pele humana reconstruída (PHR); e investigar a heterogeneidade do tumor e a expressão de proteínas das vias de proliferação e invasão do melanoma a partir da análise de clones de células humanas de melanoma SKMEL-28, de forma a avaliar a possibilidade de usar esta plataforma para testes de novos compostos visando a descoberta de medicamentos anti-melanoma.

Métodos e Procedimentos

As subpopulações clonais do tumor de SKMEL-28-parental foram isoladas de forma estocástica em três clones distintos – C1, C2 e C3. Posteriormente, em uma placa de 48 poços preparada utilizando 1.5% de soft-agar, o ensaio de obtenção de esferoides se sucedeu pela técnica de *Hanging drop* (descrito em Moraes *et al.*, 2020¹), no qual $2.5 \cdot 10^4$ células foram plaqueada em 30 μ L, em diferentes proporções de melanoma e fibroblasto. Após o período de incubação, os agregados 3D foram obtidos, analisados e posteriormente fixados para processamento histológico.

Para a PHR, foi seguido o protocolo já estabelecido no laboratório, sendo as culturas celulares preparadas em meio a uma matriz de colágeno tipo I, e no equivalente dérmico foram acrescidos os esferoides com diferentes concentrações celulares de melanoma e

fibroblastos, sendo posteriormente incluídos em parafina e com análise histológica em coração com H&E. A avaliação dos níveis de proteína das vias de proliferação, invasão e relacionadas ao metabolismo oxidativo foi, inicialmente, testada e padronizada para obtenção de estrato proteico concentrado de forma a utilizar a técnica de Western Blot para o ensaio.

Resultados

Os esferoides obtidos contendo apenas melanoma apresentaram amorfismo e dificuldade de compactação. À medida que a proporção de fibroblastos aumenta, observa-se a formação de agregados celulares mais concêntricos, compactos e densos em formato esferoidal (Fig. 1).

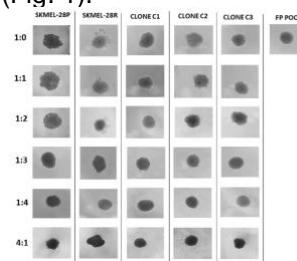


Figura 1: Esferoides em diferentes proporções de melanoma e fibroblastos, obtidos por *Hanging drop*.

Em análise de corte histológico dos agregados tridimensionais de proporção 1:1 é possível notar certa fragmentação, o que será revisto e otimizado, contudo, a modelagem 3D dos esferoides reflete com muita precisão o comportamento *in vivo* do melanoma e o fenótipo tumoral 3D esperado, visto que se observa as células agregadas e seus núcleos irregulares (Fig. 2).

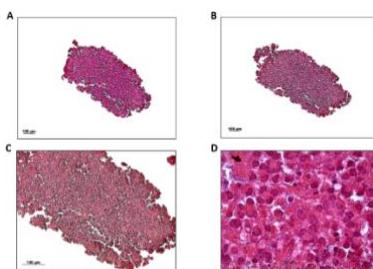


Figura 2: Análise histológica microscópica dos esferoides 1 de proporção 1:1 com coração em H&E. (A/B) sob lente de 10x (C) 20x, (D) 100x.

De modo a mimetizar de forma mais fidedigna a influência do microambiente nas células tumorais, foi adotada a inserção dos esferoides no modelo de pele humana reconstruída (PHR). Foram testadas diferentes concentrações de suspensão celular para a formação de esferoides sólidos, compactos, densos e que não ocupassem grande volume pela formação de ninhos de esferoides agregados após a contração da matriz de colágeno. A padronização protocolar deste método foi possível, sendo observada a presença dos esferoides na derme, apresentando fenótipo invasivo - característico da linhagem celular SKMEL-28, bem como a diferenciação da camada da epiderme e formação de uma camada córnea (Fig. 3).

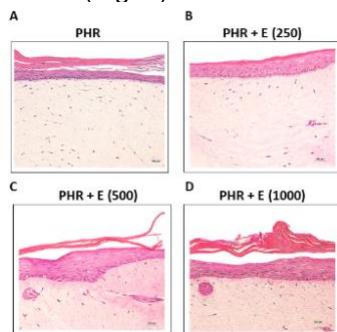


Figura 3: Modelos de PHR com agregados celulares 3D no compartimento dérmico. (A) PHR sob lente de 20x; (B) PHR e esferoides de 250/cél em 20x; (C) PHR e esferoides de 500/cél em 20x; (D) PHR e esferoides de 1000/cél em 20x.

Além disso, a reprogramação metabólica no câncer é um mecanismo que promove adaptação da célula aos ambientes de estresse. Dados anteriores do grupo revelaram que os clones apresentam perfis metabólicos diferentes e que se correlacionam com a expressão de MITF, PGC1 α , Prdx1 e Prdx2. De forma a obter uma comparação mais robusta entre o modelo

de monocamada 2D e dos agregados celulares 3D, é necessária a finalização das replicatas amostrais após a padronização da técnica de Western Blot para amostras de esferoides.

Conclusões

A cultura celular tridimensional promove parâmetros fisiológicos de órgãos e tumores, interações célula-célula/matriz extracelular, bem como imita o ambiente tumoral facilitando o entendimento no comportamento das células tumorais, testes de novos medicamentos, avaliação da heterogeneidade do câncer em perspectiva 3D, além da metástase do câncer². A literatura atual aborda que o tamanho do esferoide não é determinado apenas pelo número de células e que efeitos de interação de indutores de compactação são importantes, bem como podem aumentar na presença de fibroblastos³, o que é consoante com os dados obtidos neste projeto. Ademais, o protocolo de PHR com a incorporação de esferoides é a união de dois modelos tridimensionais, que somados permitem mimetizar o microambiente tumoral mais fielmente, sendo interessante para avaliação de heterogeneidade, resistência e comportamento de células tumorais em uma perspectiva 3D.

Como prospectivo, mais estudos são necessários para comparar os resultados dos modelos 2D e 3D, e elucidar mecanismos de ação de fármacos e surgimento de resistência, com possibilidade de uso desta plataforma padronizada para testar compostos antimelanoma.

Referências Bibliográficas

¹Moraes *et al.*, Simplified low-cost methodology to establish, histologically process and analyze three-dimensional cancer cell spheroid arrays. *Eur J Cell Biol.* 2020 Jun;99(5):151095.

²de Oliveira *et al.*, Organotypic Models in Drug Development "Tumor Models and Cancer Systems Biology for the Investigation of Anticancer Drugs and Resistance Development". *Handb Exp Pharmacol.* 2021;265:269-301

³Mei *et al.*, Development of a model for fibroblast-led collective migration from breast cancer cells spheroids to study radiation effects on invasiveness. *Radiat Oncol.* 2021;16,159