



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA

MILENI FÁTIMA RODRIGUES

**Padronização de protocolos de cultivo de células
tridimensional (3D) pela técnica de sobreposição líquida
para a avaliação de citotoxicidade em linhagens de câncer
de mama**

VITÓRIA, ES

2022

Mileni Fátima Rodrigues

Padronização de protocolos de cultivo de células tridimensional (3D) pela técnica de sobreposição líquida para a avaliação de citotoxicidade em linhagens de câncer de mama

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Espírito Santo, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestra em Bioquímica.

Orientador(a): Renata Dalmaschio Daltoé

VITÓRIA, ES

2022

Ficha catalográfica disponibilizada pelo Sistema Integrado de Bibliotecas - SIBI/UFES e elaborada pelo autor

R696p Rodrigues, Mileni Fátima, 1995-
Padronização de protocolos de cultivo de células tridimensional (3D) pela técnica de sobreposição líquida para a avaliação de citotoxicidade em linhagens de câncer de mama / Mileni Fátima Rodrigues. - 2022.
115 f. : il.

Orientadora: Renata Dalmaschio Daltoé.
Dissertação (Mestrado em Bioquímica) - Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências da Saúde.

1. Neoplasias da mama. 2. Microambiente tumoral. 3. Técnicas de Cultura de Células. 4. Padronização. I. Daltoé, Renata Dalmaschio. II. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências da Saúde. III. Título.

CDU: 61

Mileni Fátima Rodrigues

“Padronização de protocolos de cultivo de células tridimensional (3D) pela técnica de sobreposição líquida para a avaliação de citotoxicidade em linhagens de câncer de mama”

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Espírito Santo como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Bioquímica.

Aprovado(a) em 31 de março de 2022.

BANCA EXAMINADORA:

Profª. Drª. Renata Dalmaschio Daltoé – Orientadora

Profª. Drª. Leticia Batista Azevedo Rangel – Examinador Interno



Drª. Isabella dos Santos Guimarães – Examinador Externo

**Vitória/ES
2022**



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO

PROTOCOLO DE ASSINATURA



O documento acima foi assinado digitalmente com senha eletrônica através do Protocolo Web, conforme Portaria UFES nº 1.269 de 30/08/2018, por
RENATA DALMASCHIO DALTOE - SIAPE 1649136
Departamento de Ciências Farmacêuticas - DCFA/CCS
Em 31/03/2022 às 15:52

Para verificar as assinaturas e visualizar o documento original acesse o link:
<https://api.lepisma.ufes.br/arquivos-assinados/392744?tipoArquivo=O>



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO

PROTOCOLO DE ASSINATURA



O documento acima foi assinado digitalmente com senha eletrônica através do Protocolo Web, conforme Portaria UFES nº 1.269 de 30/08/2018, por
LETICIA BATISTA AZEVEDO RANGEL - SIAPE 1278597
Departamento de Ciências Farmacêuticas - DCFA/CCS
Em 02/05/2022 às 15:04

Para verificar as assinaturas e visualizar o documento original acesse o link:
<https://api.lepisma.ufes.br/arquivos-assinados/461198?tipoArquivo=O>



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO

PROTOCOLO DE ASSINATURA



O documento acima foi assinado digitalmente com senha eletrônica através do Protocolo Web, conforme Portaria UFES nº 1.269 de 30/08/2018, por
JULIANA BARBOSA COITINHO GONCALVES - SIAPE 2077211
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Farmacologia
Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Farmacologia -
PPGBF/CCS
Em 25/05/2022 às 14:04

Para verificar as assinaturas e visualizar o documento original acesse o link:
<https://api.lepisma.ufes.br/arquivos-assinados/481959?tipoArquivo=O>

AGRADECIMENTOS

À Deus, pois por mais tortuosos que fossem os caminhos, nunca me permitiu ser desamparada. Para Ele, por Ele e pra Ele são todas as coisas.

Aos meus pais, Lázaro e Vanilda, que sempre se dedicaram e lutaram pela minha educação. Sem seu apoio incondicional, nada disso teria sido possível.

À UFES, ao Programa de Pós Graduação em Bioquímica e a todos os professores do PPGB que contribuíram para minha formação.

Às agências de fomento FAPES e CAPES.

Aos meus amigos do laboratório, pelas conversas científicas e não científicas, risadas, auxílio e companhia durante os experimentos. Momentos que ficarão na memória, mesmo aqueles em que o azar parecia estar sempre presente.

Aos meus colegas de turma, especialmente Laissa Juvenato, amiga que o mestrado me trouxe. Agradeço por seu companheirismo, apoio e por sempre acreditar em mim. Sua amizade foi fundamental para que essa jornada se tornasse mais leve.

Agradeço à minha orientadora, Profa. Dra. Renata Dalmaschio Daltoé, que mais do que orientadora, é como uma segunda mãe. Sei que falo em nome de todos seus alunos quando digo a honra que é tê-la como professora, educadora, orientadora. Os seus ensinamentos – e não somente na área acadêmica, serão levados comigo por toda a vida. Obrigada por me receber tão prontamente em seu laboratório. Sou grata pela confiança sempre depositada em mim, por sua compreensão sem igual e apoio durante todos esses anos. Não há palavras que expressem a minha gratidão!

Aos professores Dr. Marco Cesar Cunegundes Guimarães e Dr. Breno Valentim Nogueira, por cederem o espaço no laboratório LUCCAR, imprescindível para que esse trabalho pudesse ser realizado. Agradeço também ao Tadeu Zanardo e Flávio Monteiro, pelo auxílio nos experimentos com o MEV.

Aos laboratórios multiusuários do Departamento de Farmácia e LABIOM.

À professora Dra. Leticia Batista Azevedo Rangel e Dra. Isabella dos Santos Guimarães por tão prontamente aceitarem participar da banca e contribuir para a melhoria do trabalho. Além disso, foram essenciais para a execução da pesquisa, tanto no empréstimo de materiais quanto na doação das células MCF-7 e do Paclitaxel.

Aos colegas e amigos que fiz no LACEN, foi essencial o apoio e o companheirismo de vocês, principalmente nessa reta final.

“A ciência se compõe de erros que, por sua vez, são os passos até a verdade.”

Jules Verne.

RESUMO

Entre as mulheres, o câncer de mama é a neoplasia mais comum e a causa principal de morte por câncer. São tumores altamente heterogêneos, com múltiplos subgrupos, além de diferentes manifestações clínicas e padrões de resposta às terapias existentes. Tais comportamentos tumorais, bem como a resposta frente aos tratamentos, não são determinados exclusivamente por suas características intrínsecas, mas são influenciados pelo microambiente tumoral. O crescente interesse em desenvolver modelos de cultivo celular *in vitro* mais representativos do microambiente tumoral culminou no surgimento da cultura celular tridimensional (3D). Nesse contexto, o presente trabalho se propôs a padronizar protocolos de cultivo 3D, verificando aquele que melhor se adequa, em termos de aplicabilidade e efetividade, para a avaliação da citotoxicidade em linhagens de câncer de mama. Os protocolos utilizados se basearam na formação de esferoides pela técnica de sobreposição líquida, com gel de agarose recobrimo os poços de uma placa. Avaliou-se, ainda, a adição de membrana basal reconstituída (Geltrex[®]) na formação dos mesmos. Para MCF-7, esferoides foram obtidos de forma reprodutível em agarose 1,0% (m/v), tanto na ausência quanto na presença de Geltrex[®] (concentração de 1,5% (v/v)). No entanto, MDA-MB-231 não foi capaz de formar esferoides sem a adição da membrana basal, sendo as concentrações de agarose a 1,0% (m/v) e Geltrex[®] a 2,0% (v/v) as melhores condições para geração destes. Para ambas as linhagens, o momento em que a membrana basal é incorporada ao meio interfere diretamente no sucesso na formação das estruturas: apenas a adição de Geltrex[®] 24 horas após os plaqueamentos permitiu bons resultados. Ao avaliar a resposta das células cultivadas em monocamada (2D) e em 3D frente ao Paclitaxel por 72 horas, verificou-se que os esferoides são menos sensíveis aos tratamentos, obtendo IC₅₀ estimadas de 7.054×10^{-6} M (MCF-7 sem Geltrex[®]), 1.751×10^{-5} M (MCF-7 com Geltrex[®]) e 5.053×10^{-6} M (MDA-MB-231 com Geltrex[®]), contra IC₅₀ para as células em 2D de 3.962×10^{-8} M (MCF-7) e 9.502×10^{-8} M (MDA-MB-231). Os resultados demonstram que a tridimensionalidade do modelo, que garante um maior contato célula-célula e que dificulta a difusão da droga, juntamente com a presença de componentes de matriz, influenciam a resposta das células ao taxano. Dessa forma, uma vez que MDA-MB-231 formou esferoides exclusivamente na presença de Geltrex[®], e que o mesmo mimetiza a membrana basal *in vivo*, escolheu-se o referido protocolo como o mais adequado para avaliação de citotoxicidade para MCF-7 e MDA-MB-231.

Palavras-chave: câncer de mama; microambiente tumoral; cultura tridimensional; esferoide; padronização.

ABSTRACT

Breast cancer is the most common and the leading cause of cancer death among woman overall. This highly heterogeneous tumor has multiples subtypes with a wide range of clinical manifestations and therapies responses. The tumor behavior and their response to treatments are not exclusively determined by their intrinsic characteristics, but are influenced by the tumor microenvironment. The growing interest in developing in vitro cell culture models that mimics the tumor microenvironment led to the extensive use of three-dimensional cell culture. In this context, we proposed to standardize 3D culture protocols, verifying which one is best suited for the evaluation of cytotoxicity in breast cancer cell lines, in terms of applicability and effectiveness. The protocols used were based on the formation of spheroids by the liquid overlay technique, with agarose gel coated plates. We also evaluated the addition of reconstituted basement membrane (Geltrex®) in their formation. For MCF-7, spheroids were reproducibly obtained in 1.0% (w/v) agarose, both in the absence and in the presence of Geltrex® (concentration of 1.5% (v/v)). However, MDA-MB-231 was not able to form spheroids without the addition of the basement membrane, and the concentrations of 1.0% (w/v) agarose and 2.0% (v/v) Geltrex® were the best conditions for generating them. For both cell lines, the moment at which the basement membrane is incorporated into the medium directly interferes with the success in the structure formation: only the addition of Geltrex® 24 hours after plating allowed good results. After cells cultured in monolayer (2D) and 3D were treated with Paclitaxel for 72 hours, it was found that spheroids are less sensitive to treatments, with an estimated IC_{50} of 7.054×10^{-6} M (MCF-7 without Geltrex®), 1.751×10^{-5} M (MCF-7 with Geltrex®) and 5.053×10^{-6} M (MDA-MB-231 with Geltrex®), against IC_{50} of 3.962×10^{-8} M (MCF-7) and 9.502×10^{-8} M (MDA-MB-231) for 2D cells. These results demonstrate that the three-dimensionality of the model, which ensures greater cell-cell contact and hinders drug diffusion, and the presence of matrix components, are factors that influence the cancer cell response to taxane. Therefore, since MDA-MB-231 formed spheroids only in the presence of Geltrex®, and it mimics the basement membrane in vivo, this protocol was chosen as the most appropriate for cytotoxicity evaluation for MCF-7 and MDA-MB-231.

Keywords: breast cancer; tumor microenvironment; three-dimensional culture; spheroid; standardization.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Representação esquemática do microambiente tumoral.....	22
FIGURA 2. Representação esquemática de células cultivadas em monocamada.....	33
FIGURA 3. Esquemática da estrutura de um esferoide tumoral multicelular.....	36
FIGURA 4. Representação esquemática das estruturas formadas em cultura 3D e suas respectivas classificações.....	37
FIGURA 5. Linhagem MDA-MB-231 e MCF-7 em cultura em monocamada.....	41
FIGURA 6. Representação esquemática da técnica de sobreposição líquida com agarose....	43
FIGURA 7. Placa de 96 poços recobertos com 50µL/poço de gel de agarose na concentração 1,0% (m/v) e gel de agarose na concentração 1,5% (m/v)	44
FIGURA 8. Representação esquemática da padronização do protocolo de sobreposição líquida com agarose, para as linhagens MDA-MB-231 e MCF-7.....	45
FIGURA 9. Representação esquemática da padronização do protocolo de sobreposição líquida com agarose, com adição de Geltrex [®] diluído em meio de cultura, para as linhagens MDA-MB-231 e MCF-7.....	48
FIGURA 10. Processo de determinação do diâmetro médio dos esferoides.....	49
FIGURA 11. Avaliação do crescimento e da morfologia das células de MDA-MB-231 sobre gel de agarose a 1,0% (m/v)	54
FIGURA 12. Avaliação do crescimento e da morfologia das células de MDA-MB-231 sobre gel de agarose a 1,5% (m/v)	56
FIGURA 13. Avaliação do crescimento e da morfologia das células de MDA-MB-231 sobre gel de agarose a 1,0% e 1,5% (m/v)	58
FIGURA 14. Avaliação do crescimento e da morfologia de células da linhagem MCF-7 sobre gel de agarose nas concentrações 1,0% e 1,5% (m/v)	62
FIGURA 15. Esferoides de células MCF-7 sob gel de agarose 1,0% e 1,5% (m/v) com morfologias variáveis em densidades ≥ 20.000	63

FIGURA 16. Densidades 5.000 e 10.000 células/poço, respectivamente, em placas com agarose a 1,5% (m/v) após 4 e 7 dias de cultivo.....	64
FIGURA 17. Diâmetro médio dos esferoides de MCF-7 gerados em protocolo de sobreposição líquida com agarose a 1,0% (m/v)	65
FIGURA 18. Avaliação do crescimento e da morfologia de células da linhagem MDA-MB-231 com adição de Geltrex [®] a 1,5% e 2,0% (v/v) imediatamente após o plaqueamento.....	71
FIGURA 19. Avaliação do crescimento e da morfologia de células da linhagem MDA-MB-231 com adição de Geltrex [®] a 1,5% e 2,0% (v/v) 24 horas após o plaqueamento.....	72
FIGURA 20. Diâmetro médio dos esferoides de MDA-MB-231 em protocolo de cultivo 3D.....	74
FIGURA 21. Esferoides de MDA-MB-231 formados a partir de 8.000 células/poço na presença de Geltrex [®] a 1,5% (v/v)	76
FIGURA 22. Avaliação do crescimento e da morfologia de células da linhagem MCF-7 com adição de Geltrex [®] a 1,5% e 2,0% (v/v) imediatamente após o plaqueamento.....	77
FIGURA 23. Avaliação do crescimento e da morfologia de células da linhagem MCF-7 cultivadas com adição de Geltrex [®] a 1,5% e 2,0% (v/v) 24 horas após o plaqueamento.....	78
FIGURA 24. Diâmetro médio dos esferoides de MCF-7 gerados em protocolo de sobreposição líquida com agarose a 1,0% (m/v) com adição de Geltrex [®] a 1,5% e 2,0% (v/v)	79
FIGURA 25. Esferoides de MCF-7 formados a partir de 10.000 células/poço e Geltrex [®] a 2,0% (v/v)	81
FIGURA 26. Ultraestrutura de esferoides da linhagem MCF-7 por MEV através do protocolo de sobreposição líquida com agarose.....	82
FIGURA 27. Ultraestrutura de esferoides da linhagem MDA-MB-231 por MEV através do protocolo de sobreposição líquida com agarose na presença de Geltrex [®]	83
FIGURA 28. Viabilidade celular metabólica da linhagem MCF-7 e MDA-MB-231 cultivadas em cultura 2D e 3D.....	86

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Concentrações de Paclitaxel testadas nos ensaios de citotoxicidade.....	50
TABELA 2. Diâmetro médio dos esferoides de MCF-7 gerados em protocolo de sobreposição líquida com agarose a 1,0% (m/v) após 4 e 7 dias de incubação.....	65
TABELA 3. Diâmetro médio dos esferoides de MDA-MB-231 em protocolo de cultivo 3D.....	74
TABELA 4. Diâmetro médio dos esferoides de MCF-7 gerados em protocolo de sobreposição líquida com agarose a 1,0% (m/v) em meio de cultura acrescido de Geltrex [®] a 1,5% e 2,0% (v/v).....	79
TABELA 5. Concentração inibitória estimada de 50% (IC50) de Paclitaxel das linhagens MCF-7 e MDA-MB-231 em monocamada e cultura 3D, após 72 horas de tratamento.....	87
TABELA 6. Resumo das condições de cultivo 3D eficazes para formação de esferoides únicos e compactos por poço para linhagens MCF-7 e MDA-MB-231.....	94

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

2D	Bidimensional
3D	Tridimensional
ANOVA	Análise de variância
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
CAF	Fibroblastos associados ao Câncer
CAM-DR	Resistência a drogas mediada por adesão celular
Dm	Diâmetro médio
DMSO	Dimetilsulfóxido
ECM	Matriz extracelular
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EHS	Sarcoma <i>Engelbreth-Holm-Swarm</i>
EMT	Transição epitélio-mesênquima
GLUT-1	Transportador de glicose 1
HER-2	Fator de crescimento humano epidermal 2
HRE	Elementos responsivos à hipóxia
HIF-1	Fator induzido por hipóxia 1
IARC	Agência Internacional de Pesquisa em Câncer
IC ₅₀	Concentração inibitória de 50% da proliferação celular
INCa	Instituto Nacional de Câncer José de Alencar Gomes da Silva
LDEV	Vírus elevador da lactato desidrogenase
LDH	Lactato desidrogenase (LDH)
LHRH	Hormônio liberador do hormônio luteinizante
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
ml	Mililitro
MAPK	Proteína cinase ativada por mitógenos
mTOR	Alvo mecanístico da rapamicina
MTT	Brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium]
NK	Célula <i>Natural killer</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBS	Tampão fosfato salino
PD-1	ligante 1 de morte celular programada
PDH	Piruvato desidrogenase (PDH)

PDK1	Piruvato desidrogenase quinase 1
PGK1	Fosfoglicerato quinase 1
PI3K	Fosfatidilinositol-4,5-bifosfato 3-cinase
Poly-HEMA	Metacrilato de 2-hidroxietila
PTEN	Fosfatase homóloga à tensina
RE	Receptor de estrogênio
RP	Receptor de progesterona
RPMI	Instituto Memorial Roswell Park
TAM	Macrófagos associados ao tumor
TGF- β	Fator de transformação do crescimento beta
TME	Microambiente tumoral
VCM	Viabilidade Celular Metabólica
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
μ l	Microlitro

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA.....	18
1.1	CÂNCER.....	18
1.2.1	Microambiente tumoral	20
1.2	CÂNCER DE MAMA	26
1.3	CULTURA TRIDIMENSIONAL (3D).....	32
2	OBJETIVOS.....	40
2.1	GERAL.....	40
2.2	ESPECÍFICOS.....	40
3	MATERIAL E MÉTODOS	40
3.1	LINHAGENS CELULARES	40
3.2	CONDIÇÕES DE CULTIVO 2D	41
3.3	CULTIVO CELULAR 3D COM AGAROSE.....	42
3.3.1	Padronização da concentração de agarose	43
3.3.2	Padronização da densidade celular	44
3.4	CULTIVO CELULAR 3D COM GELTREX [®]	45
3.4.1	Padronização da concentração de GELTREX[®]	46
3.4.2	Padronização da densidade celular	47
3.5	AVALIAÇÃO DO TAMANHO DOS ESFEROIDES.....	48
3.6	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)	49
3.7	COMPOSTO TESTADO	50
3.8	ANÁLISE DE VIABILIDADE CELULAR METABÓLICA (VCM)	50
3.9	DETERMINAÇÃO DAS IC ₅₀ DO QUIMIOTERÁPICO TESTADO	51
3.10	ANÁLISE ESTATÍSTICA	52
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	52
4.1	PADRONIZAÇÃO DO PROTOCOLO DE CULTURA 3D COM AGAROSE	52

4.1.1 MDA-MB-231	52
4.1.2 MCF-7.....	61
4.2 PADRONIZAÇÃO DO PROTOCOLO DE CULTURA 3D COM GELTREX®	69
4.2.1 MDA-MB-231	70
4.2.2 MCF-7.....	77
4.3 MICROSCOPIA ELETRONICA DE VARREDURA (MEV)	81
4.4 ANÁLISE DE VIABILIDADE CELULAR METABÓLICA	84
5 CONCLUSÕES	95
6 PERSPECTIVAS	96
BIBLIOGRAFIA	98

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

1.1 CÂNCER

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), o câncer é um conjunto de doenças heterogêneas caracterizadas pelo crescimento desordenado de células transformadas (OMS, 2022). Afetando milhões de indivíduos a cada ano, o câncer é um problema de saúde pública mundial. Segundo a Agência Internacional de Pesquisas em Câncer (IARC), para o ano de 2020 foram estimados 19,3 milhões de novos casos da doença, como demonstram os últimos dados publicados no GLOBOCAN. A estimativa é que até 2040, para ambos os sexos e idades de 0-85 anos, o número total de novos casos seja superior a 30 milhões. Para ambas as populações masculina e feminina, os cânceres de pulmão e colorretal estão entre os mais incidentes, além do câncer de próstata para os homens e mama para as mulheres no mundo todo (IARC, 2020a).

Em relação à mortalidade, os números superam os 9 milhões de casos, para ambos os sexos e todas as idades. Totalizando cerca de 21% das ocorrências, o câncer de pulmão é o tipo de câncer que mais mata entre os homens, seguido do câncer de fígado (~10%). A população feminina, por sua vez, tem o câncer de mama como a principal causa de morte por câncer, com 15.5% do total dos casos (IARC, 2020b).

Considerada uma doença complexa, com apresentação e desenvolvimento variáveis de paciente para paciente, o câncer é um processo com múltiplas etapas, nas quais células normais sofrem alterações metabólicas e comportamentais que levam a uma transformação progressiva em célula maligna. Em seus trabalhos, Hanahan e Weinberg (2000) propuseram a hipótese de que as células tumorais adquirem um conjunto de habilidades funcionais que culminam na proliferação exacerbada e no crescimento local ou disseminado destas populações celulares anormais.

Entre as transformações sofridas, a capacidade de sustentar uma proliferação crônica é uma das propriedades fundamentais dos tumores. Em situações fisiológicas,

os sinais que estimulam ou suprimem o crescimento, bem como a entrada e progressão pelo ciclo celular, são cuidadosamente equilibrados. Esse controle é necessário para a manutenção da homeostase, garantindo a arquitetura e funções teciduais normais. No contexto tumoral, no entanto, sinais indutores de proliferação, normalmente transitórios, são mantidos de forma crônica. Adicionalmente, a adquirida habilidade de escapar dos mecanismos que regulam negativamente a replicação, garantem que as células malignas possam continuamente se dividir e crescer (HANAHAN & WEINBERG, 2000).

Ademais, outras propriedades contribuem para a progressão tumoral, como a evasão aos mecanismos de morte celular, o potencial replicativo ilimitado e a formação de novos vasos sanguíneos (angiogênese), a fim de sustentar a proliferação. Além disso, a aquisição de capacidade invasiva e metastática permite que as células malignas invadam os tecidos adjacentes e atinjam vasos sanguíneos e linfáticos, disseminando-se para sítios distantes do local de origem (HANAHAN & WEINBERG, 2011).

Hanahan e Weinberg (2011) descrevem também a desregulação energética e do metabolismo celular como características adquiridas durante o processo de transformação maligna. Células cancerosas apresentam elevada captação de glutamina, e como observado por Otto Warburg em 1927, a captação de glicose também é aumentada (revisado por DANG *et al.*, 2011; HANAHAN & WEINBERG, 2011). Warburg verificou que 50% da energia gerada pelas células tumorais é proveniente da glicólise e sendo assim, esse comportamento pode ajudar a explicar a maior demanda de glicose nos tumores (FADAKA *et al.*, 2017).

Em virtude da replicação celular exacerbada apresentada pelas células transformadas, as probabilidades de alterações genômicas e mutações que comprometam genes supressores de tumor e reguladores da divisão celular são aumentadas. Essa instabilidade genômica concede vantagens de crescimento às células cancerosas e como resultado, subclones mais agressivos acabam sendo selecionados (HANAHAN & WEINBERG, 2011; YAO & DAI, 2014). Contudo, ao longo do processo de transformação maligna, as células devem encontrar mecanismos para contornar a vigilância imunológica, cujo dever em reconhecer e eliminar células

anormais representa uma barreira ao surgimento de neoplasias incipientes (revisado por TORRENZINI & ATHANAZIO, 2008).

É notório que o sistema imunológico promove uma pressão seletiva no processo de progressão tumoral, levando a sobrevivência de células malignas menos imunogênicas e/ou mais resistentes a destruição, uma vez que sobrevivem a fase de eliminação e continuam a se proliferar (GONZALEZ; HAGERLING; WERB; 2018). A evasão tumoral aos elementos do sistema imune pode ser mediada a partir de vários mecanismos, a citar o desenvolvimento de um microambiente tumoral imunossupressor (MUENST *et al.*, 2016).

De fato, o microambiente tumoral exerce um papel fundamental no processo de tumorigênese, influenciando sua diferenciação, progressão, disseminação e escape do sistema imune (WANG *et al.*, 2017; LABANI-MOTLAGH; ASHJAMAHADEVI; LOSKOG; 2020). A análise compreensiva das complexas interações célula-célula e célula-matriz existentes no microambiente tumoral é de suma importância para o entendimento dos diferentes mecanismos de progressão maligna, metástase e para o desenvolvimento de fármacos mais eficazes e seguros (BAGHBAN *et al.*, 2020).

1.2.1 Microambiente tumoral

Em 1889, o cirurgião inglês Stephen Paget, ao analisar o padrão de distribuição de tumores secundários em pacientes com câncer de mama, elaborou a hipótese conhecida como “*seed and soil*”, ou “semente e solo”. Paget propôs a ideia de que o processo de metástase não ocorre por acaso, mas sim que algumas células cancerosas (“semente”) possuem afinidade específica por certos órgãos (“solo”). Essa afinidade seria o resultado de interações favoráveis dos tumores com o microambiente tecidual do órgão alvo (PAGET, 1889; revisado por FIDLER, 2003). Portanto, os estudos de Paget foram os primeiros a demonstrar o relevante papel do microambiente na formação de metástases (WITZ & LEVY-NISSENBAUM, 2006).

Na era pós-Paget, pesquisas desenvolvidas sobre o papel do microambiente imune e angiogênese no câncer acabaram por fundamentar a ideia da existência de um microambiente tumoral (TME). Embora apresentem um grau elevado de heterogeneidade fenotípica e genética, os tumores são capazes de se organizar

localmente e responder coletivamente aos sinais do microambiente (CARMONA-FONTAINE *et al.*, 2017).

Estudos pioneiros do grupo de pesquisa de Mina Bissel foram fundamentais para consolidar a relevância da arquitetura tecidual e do microambiente no desenvolvimento dos tumores (BISSELL; HALL; PARRY, 1982; LOCHTER & BISSEL, 1995; PETERSEN *et al.*, 1992; WEAVER *et al.*, 1997). Em seus experimentos, o grupo verificou que células tumorais de mama T4-2 haviam perdido a capacidade de responder à membrana basal circundante. Entretanto, ao realizarem o bloqueio da integrina $\beta 1$ e sua interação com a matriz, o resultado foi o resgate da habilidade das células transformadas de formarem junções aderentes, e, interessante, foi capaz de reverter o fenótipo maligno destas. Tal observação permitiu aos autores inferirem que o reestabelecimento e normalização das interações entre as próprias células e entre célula-matriz, podem – em certo grau, suprimir o fenótipo maligno (WEAVER *et al.*, 1997).

De fato, por muitos anos o câncer foi definido apenas como um conjunto de células alteradas em proliferação (ONUCHIC & CHAMMAS, 2010). Entretanto, tais células não se encontram isoladas dentro do organismo. Nesse contexto, o tumor pode ser visto como um tecido complexo, compreendido por células cancerosas e por estroma, além de sinais bioquímicos e biofísicos heterogêneos que culminam na distorção da homeostasia tecidual original (revisado por LI *et al.*, 2020). Não obstante, células transformadas podem promover mudanças críticas no estroma local, criando um TME favorável à progressão maligna (JUNTTILA & DE SAUVAGE, 2013).

O TME representa o local no qual células neoplásicas coexistem e interagem com diferentes tipos de células, bem como componentes não celulares, sendo os vasos sanguíneos e linfáticos outros elementos presentes (figura 1). Os componentes celulares do TME da maioria dos tumores sólidos incluem, além das próprias células malignas, células residentes e infiltrantes. Por sua vez, moléculas de sinalização e a matriz extracelular (ECM) são exemplos bem reconhecidos de elementos não celulares (revisado por LI *et al.*, 2020). As complexas interações presentes no TME permitem a ativação de fatores de transcrição, que como resultado, levam à expressão de genes envolvidos na proliferação e migração celular (MBEUNKUI & JOHANN, 2009). A participação do estroma e de células não tumorais na indução de programas

de transcrição é reconhecida, a citar aqueles envolvidos na aquisição de fenótipo mesenquimal (transição epitélio-mesênquima – EMT) em carcinomas, o que implica em maior capacidade migratória e resistência à apoptose, e ainda, em degradação da ECM (KALLURI & WEINBERG, 2009; MBEUNKUI & JOHANN, 2009).

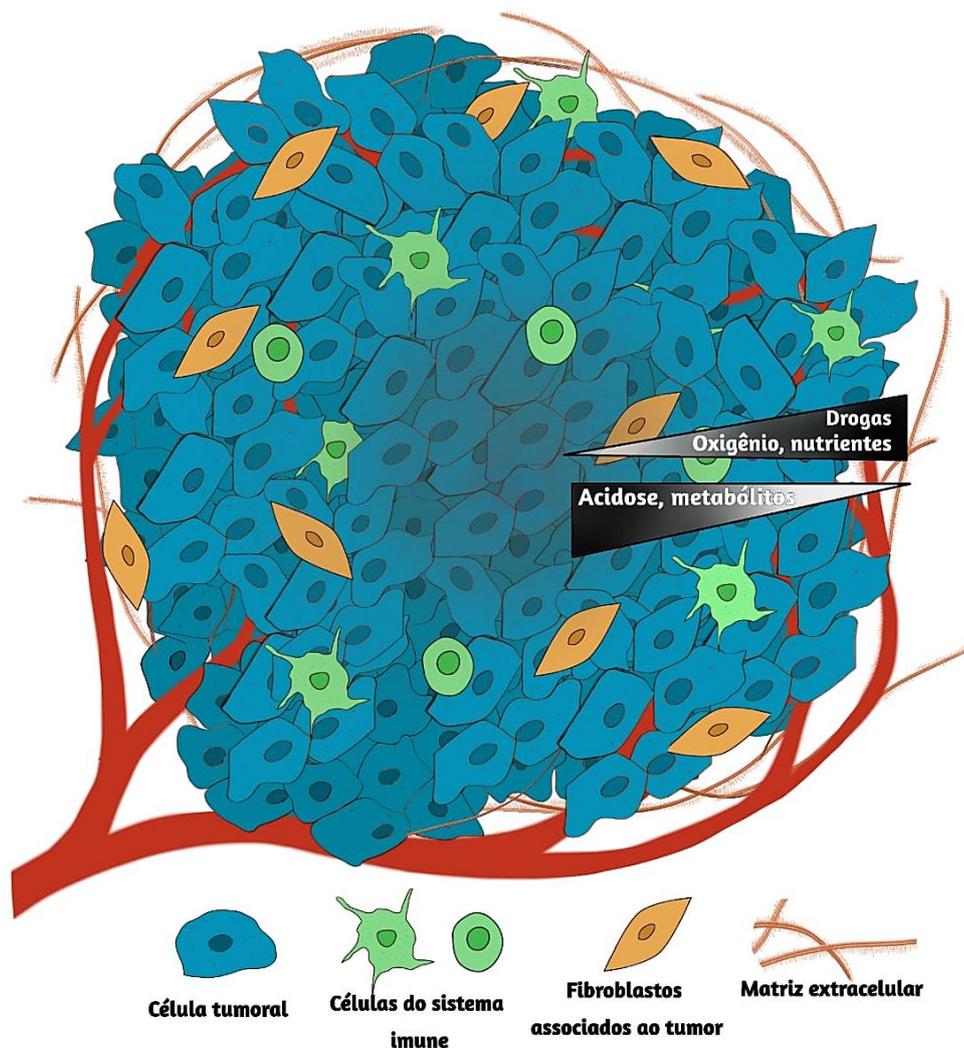


Figura 1. Representação esquemática do microambiente tumoral (TME). No TME, células tumorais interagem entre si e com células do sistema imune, fibroblastos, matriz extracelular (ECM) e vasos sanguíneos. Com o crescimento do tumor, gradientes de concentração vão sendo estabelecidos para o oxigênio, nutrientes, fatores de crescimento e drogas. Regiões centrais podem se tornar hipóxicas e acumular metabólitos e lactato, acidificando o meio intersticial, e eventualmente pode culminar na formação de um núcleo necrótico.

A infiltração celular também é um processo que pode acontecer no TME. Dentre as células infiltrantes, os macrófagos e linfócitos são os mais significantes – recrutados para o ambiente tumoral devido à inflamação local induzida pelo mesmo (revisado por LI *et al.*, 2020). Células do sistema imune têm sido reconhecidas por

desempenharem um complexo papel na regulação das neoplasias, sendo os macrófagos associados ao tumor (TAM) um dos exemplos de classe celular que podem aumentar a proliferação tumoral e estimular a angiogênese (ZALATNAI, 2009; MITTAL; EBOS; RINI, 2014).

Representadas principalmente pelas células endoteliais e fibroblastos, as células residentes são conhecidas por terem um papel chave na regulação do comportamento biológico dos tumores (revisado por PING *et al.*, 2021; HIRATA & SAHAI, 2017). Esses, ao secretarem fatores de crescimento, a citar o fator de transformação do crescimento beta (TGF- β), induzem a transformação de fibroblastos para os chamados “fibroblastos associados ao câncer” (CAF) (revisado por LI *et al.*, 2020). Os CAFs contribuem para a proliferação e sobrevivência das células malignas ao secretarem, continuamente, fatores de crescimento, citocinas promotoras de tumor, além de promoverem migração e invasão através da reprogramação e remodelamento do TME (revisado por PING *et al.*, 2021; FONG *et al.*, 2016; UNDERWOOD *et al.*, 2015).

Destaca-se ainda a participação das células endoteliais no TME, cujo principal papel na carcinogênese consiste na formação de novos vasos sanguíneos (revisado por ARNETH *et al.*, 2019). A proliferação exacerbada das células malignas culmina no surgimento de regiões com níveis diminuídos de oxigênio, tanto pelo aumento de seu consumo quanto pela vascularização deficiente (RAPISARDA & MELILLO, 2010). Tal característica acarreta na heterogeneidade dentro do próprio TME, no qual células na periferia tem maior disponibilidade de O₂, fatores de crescimento, nutrientes como glicose e outras moléculas, do que as células mais centrais. Adicionalmente, o aumento da glicólise aeróbica e o conseqüente acúmulo de lactato reduz o pH intersticial, principalmente no interior do tumor, onde a depuração de metabólitos é dificultada (revisado por TRÉDAN *et al.*, 2007; JUSTUS; DONG; YANG, 2013). A prejudicada perfusão cria um gradiente de concentração para esses componentes, e como conseqüência, células localizadas mais externamente encontram-se em altas taxas proliferativas, ao passo que em regiões mais internas, as mesmas podem se tornar quiescentes ou sofrer necrose (revisado por TRÉDAN *et al.*, 2007).

O estabelecimento de hipóxia pode induzir processos adaptativos por parte das células malignas. A estabilização da subunidade alfa do fator 1 induzido por hipóxia

(HIF-1 α) acontece em situações de baixas concentrações de O₂, o que como consequência permite sua interação e dimerização com HIF-1 β . O fator de transcrição originado então se liga ao DNA por elementos responsivos à hipóxia (HREs) e promove a transcrição de genes, como por exemplo, o gene do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF). A secreção de VEGF, um fator regulador da angiogênese, promove a migração de células endoteliais para regiões hipóxicas, e essas, por sua vez, atuam na formação de novos vasos sanguíneos (revisado por ZIELLO; JOVIN; HUANG, 2007). Em suma, o suporte nutricional permite a sustentação do crescimento e desenvolvimento dos tumores (revisado por ARNETH *et al.*, 2019).

A presença de gradientes de concentração juntamente com a ocorrência de regiões hipóxicas e baixo pH, podem ser considerados elementos não celulares do TME. Ademais, os atributos físicos, a citar pressão intersticial, forças compressoras que se desenvolvem com a progressão tumoral e a rigidez da ECM são outros constituintes do TME com papéis relevantes na tumorigênese (revisado por LI *et al.*, 2020). Fundamentalmente, o termo ECM se refere a matéria orgânica que ocupa o espaço entre as células. É composta por uma rede de macromoléculas e em sua função de unir células e órgãos em organismos multicelulares, providencia a estrutura necessária para manter a integridade tecidual (ENGEL & CHIQUET, 2011; TOPALOVSKI & BREKKEN, 2017). Os elementos da matriz incluem colágenos, proteoglicanos, glicosaminoglicanos, elastina, fibronectina, laminina, entactina, entre outros (ZALATNAI, 2009). Diferentes células são capazes de secretar proteínas de matriz, entretanto, os fibroblastos constituem a principal fonte de produção e secreção de ECM (TOPALOVSKI & BREKKEN, 2017). A composição única desses elementos varia conforme o tecido e a grande diversidade dessas moléculas torna o *crosstalk* entre as células malignas e a matriz extremamente complexo (ZALATNAI, 2009).

Como revisado por Walker, Mojares e Del Rio Hernández (2018), muito mais do que apenas propiciar sustentação tecidual, a ECM atua determinando o fenótipo e a função das células. Providenciando pontos de sustentação e ancoragem, a matriz pode controlar adesão e o movimento celular, bem como a liberação e apresentação de fatores de crescimento para atuarem nas células – através dos diversos sítios de ligação para tais componentes (revisado por WALKER; MOJARES; DEL RÍO HERNÁNDEZ, 2018). Sinais mecânicos são transmitidos da ECM para a célula, ativando diversas vias de sinalização intracelular e, portanto, é evidente que

alterações e/ou o desbalanço de tais interações podem influenciar o desenvolvimento de tumores (revisado por UHLER & SHIVASHANKAR, 2017). A perda de subunidades de integrinas, como $\alpha 2$ e $\alpha 6$, por exemplo, pode promover a carcinogênese. Integrinas são importantes proteínas intermediadoras das interações entre as células e a ECM e regulam diversas funções cruciais para iniciação, progressão e metástase tumoral (revisado por ARNETH *et al.*, 2019; DESGROSELLIER & CHERESH, 2010).

Alguns trabalhos na literatura demonstraram que, a ativação da via PI3K/Akt/Bcl-2, mediada pela integrina $\beta 1$ é capaz de sobrepor a parada do ciclo celular e a apoptose induzidas por tratamentos em tumores sólidos, incluindo o câncer de mama (HODKINSON *et al.*, 2006; AOUDJIT & VUORI, 2001). De fato, a resistência à terapia ou a reincidência no câncer são eventos comuns e os estudos supracitados evidenciam a relevância do TME na resposta das células malignas frente aos tratamentos (revisado por SAMADI *et al.*, 2016).

Em 1999, estudos de Damiano e colaboradores já relatavam o papel das integrinas $\beta 1$ na resistência de células de mieloma à Doxorubicina e Melfalano. Enquanto as células em suspensão apresentavam-se sensíveis aos tratamentos, a adesão das mesmas à fibronectina, em contrapartida, promovia resistência à apoptose induzida pelos fármacos, ilustrando a relevância das integrinas e da matriz na chamada “resistência a drogas mediada por adesão celular” (CAM-DR) (DAMIANO *et al.*, 1999). Não obstante, a ECM associada ao tumor é capaz de modular a resposta a tratamentos atuando como barreira física aos mesmos (FONG *et al.*, 2016). O acúmulo de ácido hialurônico ao redor das células malignas, por exemplo, já foi reportado como fator contribuinte para evasão das mesmas ao sistema imune, além de restringir, fisicamente, o acesso de anticorpos – a citar anticorpos monoclonais usados nos tratamentos (SINGHA *et al.*, 2015).

Sabe-se que a ECM, em conjunto com os outros elementos do TME, incluindo células estromais (fibroblastos, células do sistema imune, células endoteliais), interferem não só na proliferação, invasão e metástase do câncer, mas também na resposta às terapias antitumorais (revisado por SAMADI *et al.*, 2016). Mittal, Brown e Holen (2018), em sua revisão, citam que a densidade da mama, por exemplo, é afetada pela composição do estroma mamário e tal fato influencia o desenvolvimento de tumores (revisado por MITTAL; BROWN; HOLEN, 2018). Estudos demonstram que

mulheres com densidade mamária mais elevadas apresentam um risco de 2 a 6 vezes maior em desenvolver câncer de mama – ressaltando a relação entre o estroma e a carcinogênese (BOYD *et al.*, 2002, 2011). Não obstante, Cuzick e colaboradores, em um extenso estudo em 2011, demonstraram que mulheres em tratamento com Tamoxifeno e que obtiveram redução na densidade mamária em 10% ou mais, apresentaram risco de câncer de mama reduzido em 63% (CUZICK *et al.*, 2011). Os resultados ressaltam como a modulação do microambiente mediado por tratamentos afeta o desenvolvimento dos tumores, em especial o câncer de mama.

1.2 CÂNCER DE MAMA

Segundo dados do Instituto Nacional de Câncer (INCa), estima-se que para cada ano do triênio 2020-2022, um total de 66.280 novos casos de câncer de mama aconteçam no Brasil. A doença é o tipo de câncer mais frequente entre a população feminina em todas as regiões brasileiras, com exceção dos tumores de pele não melanoma (INCa, 2020a). Um estudo de 2017 revelou que, no Brasil, há um crescimento na mortalidade por câncer de mama para as mulheres entre 20 a 49 anos, enquanto as taxas para mulheres de idades entre 50 a 69 anos continuam constantes, porém elevadas (ROCHA-BRISCHILIARI *et al.*, 2017). A doença, que se desenvolve no tecido mamário, também pode acometer homens. Entretanto, é uma ocorrência rara, com porcentagem de 1% do total dos casos (INCa, 2020b).

De acordo com a revisão de Rojas e Stuckey (2016), o câncer de mama é considerado uma doença de etiologia multifatorial, combinando condições genéticas, reprodutivas e ambientais, muitas das quais são passíveis de modificações. Diferentes fatores de risco já foram estabelecidos para as mulheres, sendo a idade um dos mais relevantes, haja vista que a incidência da doença é altamente relacionada ao aumento da idade (FABBRI; CARCANGIU; CARBONE, 2008; SUN *et al.*, 2017). Entende-se que os riscos estão associados a uma exposição cumulativa da mama ao estrogênio, e talvez, à progesterona, pois são hormônios que afetam a taxa de divisão celular (FABBRI; CARCANGIU; CARBONE, 2008). Nesse sentido, entre os fatores de risco relacionados aos níveis hormonais, destacam-se: a menarca precoce (<12 anos), nuliparidade, idade na primeira gestação (acima de 30 anos), menopausa tardia (>55 anos), uso de contraceptivos orais e uso prolongado (>5 anos) de terapia de reposição

hormonal (revisado por ROJAS & STUCKEY, 2016; PEAIRS *et al.*, 2017; BARNARD; BOEKE; TAMIMI, 2015).

Adicionalmente, fatores ambientais como o consumo de álcool, obesidade e ganho de peso em mulheres na pós menopausa (índice de massa corporal – IMC > 25) também estão associados ao risco aumentado da doença (revisado por ROJAS & STUCKEY, 2016; SUN *et al.*, 2017). Além disso, como mencionado anteriormente, mulheres com mamas consideradas densas pelo exame de mamografia, possuem maior risco de desenvolverem tumores que mulheres da mesma idade, com densidades mais baixas (PEAIRS *et al.*, 2017). Ainda, cerca de 5-10% dos cânceres de mama podem ser atribuídos a mutações genéticas herdadas (revisado por ROJAS & STUCKEY, 2016). O número de familiares com histórico da doença, em especial aqueles de primeiro grau, é outro fator que influencia o risco individual para o desenvolvimento do câncer de mama (PEAIRS *et al.*, 2017).

Essa neoplasia maligna é considerada uma doença altamente heterogênea. Os diferentes tipos de tumor apresentam características biológicas e padrões histopatológicos distintos, com variados comportamentos clínicos e respostas às opções terapêuticas disponíveis (VIALE, 2012; WEIGELT & REIS-FILHO, 2009). Um único paciente pode apresentar tumor com variações no padrão de crescimento, assim como nas características estruturais e celulares (REIS-FILHO & LAKHANI, 2008). Devido a essa grande heterogeneidade, histopatologistas têm se esforçado ao longo dos anos para desenvolver sistemas de classificação que abranjam a diversidade fenotípica e classifique a doença em grupos significativos (REIS-FILHO & LAKHANI, 2008; WEIGELT & REIS-FILHO, 2009).

Dentre as diferentes classificações existentes, a apresentação histológica é a base das classificações para o câncer de mama, realizadas pela OMS ao longo dos anos, sendo a última edição publicada em 2019 (CSERNI, 2020; IARC, 2020c). Baseando-se no padrão de crescimento, arquitetura e morfologia celular, os tumores podem ser classificados em carcinomas *in situ* – se os mesmos se limitam ao componente epitelial da mama (localizados), ou são definidos como invasivos ao atingirem a membrana basal para invadir o estroma adjacente (infiltrantes) (MALHOTRA *et al.*, 2010; revisado por DO NASCIMENTO & OTONI, 2020). Ademais, o carcinoma não invasivo pode ser ainda sub-classificado como ductal ou lobular,

sendo o carcinoma ductal *in situ* (DCIS) considerado mais comum do que o carcinoma lobular *in situ* (LCIS) e engloba um grupo heterogêneo de tumores (MALHOTRA *et al.*, 2010).

Similarmente aos carcinomas *in situ*, carcinomas invasivos são um grupo de tumores que se diferenciam em vários subtipos histológicos, sendo a maioria das neoplasias malignas da mama definidas como carcinomas invasivos sem outras especificações (CDI-SOE). Compreendendo 70% a 80% de todos os tumores invasivos, os CDI-SOE não exibem características suficientes para incluí-los nas outras classificações e apresentam grande variabilidade morfológica e diferentes comportamentos clínicos (WEIGELT & REIS-FILHO, 2009; revisado por TSANG & TSE, 2020). Não obstante, tipos histológicos menos comuns incluem: ductal, lobular, ductal/lobular, mucinoso (coloidal), cribiforme, micropapilar, papilar, tubular, medular, metaplásico e apócrino. No entanto, a classificação histológica não reflete completamente a heterogeneidade biológica dos tumores mamários (revisado por TSANG & TSE, 2020).

Sendo assim, a classificação imuno-histoquímica e molecular contribuem para agrupar os tumores em classes, contribuindo no manejo clínico, estudos epidemiológicos, bem como o desempenho de testes clínicos (revisado por DO NASCIMENTO & OTONI, 2020). A análise imuno-histoquímica do câncer de mama objetiva a identificação da expressão de biomarcadores, dentre eles os receptores hormonais de estrogênio (RE), progesterona (RP) e o receptor de fator de crescimento epidérmico humano 2 (HER2) (HUGH *et al.*, 2009; MALHOTRA *et al.*, 2010). A avaliação de ER, RP e HER2 é rotineira no manejo da doença e são considerados marcadores de prognóstico e fatores preditivos para terapias hormonais e terapia-alvo anti-HER2 (revisado por TSANG & TSE, 2020). Ademais, outro marcador utilizado na classificação imuno-histoquímica é a proteína Ki67, cuja expressão reflete o estado proliferativo celular, uma vez que a mesma está ausente durante G0, mas presente em todas as fases do ciclo (CINTRA *et al.*, 2012; ZAHA, 2014; WALKER, 2008). Com os diferentes fenótipos obtidos, os tumores poderão ser classificados em: luminal A luminal B, HER2 hiperexpresso e triplo negativo (GOLDHIRSCH *et al.*, 2011).

Estudos do perfil de expressão gênica levaram a classificação em cinco subtipos moleculares intrínsecos: luminal A, luminal B, HER2 hiperexpresso,

basaloide e normal-símile. Dentre os subtipos citados, tumores definidos como luminal A tipicamente apresentam melhores prognósticos. (YEO & GUAN, 2017; revisado por TSANG & TSE, 2020). Não obstante a essas classificações, Herschkowitz e colaboradores em seus estudos em 2007, descobriram um novo subtipo molecular para a neoplasia, o qual intitularam de *claudin-low* (HERSCHKOWITZ *et al.*, 2007). Caracterizado por uma baixa expressão de proteínas de adesão, incluindo claudinas 3, 4 e 7 e E-caderina, essa classificação recentemente foi considerada, por Fougner e colaboradores (2020), não apenas como um subtipo análogo aos já existentes, mas um fenótipo adicional complexo e heterogêneo que compreende tumores de vários subtipos intrínsecos (FOUGNER *et al.*, 2020).

As características histológicas e moleculares do câncer de mama influenciam diretamente na escolha do tratamento (revisado por HARBECK *et al.*, 2019). As alternativas terapêuticas incluem tratamentos locais, a citar a cirurgia e a radioterapia, bem como tratamentos sistêmicos (revisado por FAHAD ULLAH, 2019). Tumores detectados em estágios iniciais são considerados curáveis, ou seja, quando são limitados ao tecido mamário ou se propagaram apenas para os linfonodos axilares. O câncer de mama avançado (metastático), em contrapartida, não é tido como curável com as terapias disponíveis, mas são passíveis de tratamento com intuito de prolongar a sobrevivência das pacientes e controlar os sintomas (revisado por HARBECK *et al.*, 2019).

A abordagem cirúrgica geralmente é indicada para estágios iniciais da doença e recentemente, cirurgias conservadoras da mama têm sido mais favorecidas em detrimento do procedimento de mastectomia radical. Nesse caso, o tratamento é baseado na remoção do tumor, porém de modo a conservar o tecido mamário saudável, sendo vantajoso por questões estéticas – as quais são relevantes para as pacientes (MAUGHAN; LUTTERBIE; HAM, 2010). A radioterapia, por sua vez, é essencial como complemento aos tratamentos cirúrgicos (adjuvante), com objetivo de eliminar células malignas residuais em tecidos mais profundos ou em linfonodos, como os supra claviculares (MAUGHAN; LUTTERBIE; HAM, 2010; RAMANI *et al.*, 2017).

Em relação às terapias sistêmicas, que também podem ser adjuvantes ou neoadjuvantes (anterior à cirurgia), três modalidades são possíveis: quimioterapia,

terapia hormonal e terapias biológicas (alvo). A quimioterapia neoadjuvante é considerada vantajosa como arsenal terapêutico, pois permite verificar se o tumor é responsivo ao tratamento com as drogas quimioterápicas, antes da realização da cirurgia (RAMANI *et al.*, 2017). Destaca-se ainda, o papel da quimioterapia como tratamento paliativo na doença metastática, sendo a seleção das drogas dependente do tipo de terapia recebida anteriormente, se há toxicidade residual de uma quimioterapia prévia, bem como a situação financeira das pacientes (RAMANI *et al.*, 2017). Fármacos utilizados na referida modalidade terapêutica incluem compostos das classes dos taxanos, antraciclinas e compostos de platina (revisado por WAKS & WINER, 2019). Tumores triplo negativos, por exemplo, não são beneficiados com o uso de terapias hormonais e biológicas, e, portanto, são limitados à quimioterapia. Ressalta-se que para essa modalidade de tratamento, a tolerância aos efeitos adversos devem ser avaliados, haja vista que diferentes esquemas de combinação de quimioterápicos podem ser empregados (revisado por WAKS & WINER, 2019).

Tumores que são positivos para receptores hormonais são tratados com fármacos como Tamoxifeno, Fulvestranto, inibidores da aromatase (Anastrozol, Letrozol, Exemestano) e análogos do hormônio liberador do hormônio luteinizante (LHRH) (Gosserrelina e Leuprolide) (revisado por TONG *et al.*, 2018; RAMANI *et al.*, 2017; MAUGHAN; LUTTERBIE; HAM, 2010; DO NASCIMENTO, 2005). Terapia endócrina adjuvante por cinco anos é capaz de reduzir a recorrência de tumores e aumentar a sobrevida de mulheres em estágios iniciais do câncer. No entanto, a resistência aos tratamentos ainda configura um desafio clínico a ser superado (revisado por FAHAD ULLAH, 2019).

A modalidade terapêutica para pacientes que superexpressam HER2 inclui o uso de anticorpos monoclonais anti-HER2, como Trastuzumabe e Pertuzumabe (revisado por TONG *et al.*, 2018; MAUGHAN; LUTTERBIE; HAM, 2010). A utilização de terapia anti-HER2 tem contribuído consideravelmente tanto na diminuição dos riscos de recorrência quanto no aumento das chances de sobrevivência (RAMANI *et al.*, 2017; revisado por MOO *et al.*, 2018). O Trastuzumabe pode ser utilizado em monoterapia ou em combinação com Paclitaxel e antraciclinas, no entanto, o uso combinado com fármacos dessa última classe deve ser realizado com cautela, haja vista a toxicidade cardíaca desenvolvida em pacientes com mais de dois anos de tratamento (RAMANI *et al.*, 2017; MAUGHAN; LUTTERBIE; HAM, 2010). Não

obstante, o Lapatinibe, um fármaco inibidor de tirosina que bloqueia HER2, é utilizado em pacientes com a doença metastática ou nos casos em que foi desenvolvida resistência ao Trastuzumabe (revisado por TONG *et al.*, 2018; revisado por FAHAD ULLAH, 2019).

Apesar das muitas opções terapêuticas existentes, muitas barreiras são encontradas durante o tratamento, como os muitos efeitos adversos, e a resistência aos fármacos que pode gerar recidiva da doença, afetando assim a sobrevida global das pacientes (DOWSETT *et al.*, 2009; HASSON *et al.*, 2013; DIXON, 2014). A resistência ao Tamoxifeno, por exemplo, pode ser causada por diferentes mecanismos, dentre eles ativação da via PI3K/Akt/mTOR. Adicionalmente, o uso de inibidores da referida via, no intuito de reverter a resistência ao fármaco, acarreta na ativação de mecanismos compensatórios, limitando a eficácia dos mesmos (revisado por YAO *et al.*, 2020). Não obstante, ativação contínua da via, seja pela diminuição dos níveis de PTEN (supressor tumoral) ou mutações em PIK3A, também resulta em resistência ao Trastuzumabe e outros fármacos anti-HER2 (revisado por RIMAWI; DE ANGELIS; SCHIFF, 2015). A resistência aos quimioterápicos, por sua vez, envolve mecanismos como: genes de resistência (MDR1) e bombas de efluxo (Glicoproteína-P), sistemas enzimáticos que inativam drogas antitumorais através de alterações no seu metabolismo (glutathione S-transferase π (GST- π)) e ativação de vias de reparo do DNA – especialmente pelas células tronco tumorais (revisado por JI *et al.*, 2019; LUQUE-BOLIVAR *et al.*, 2020).

No contexto do TME, o desenvolvimento de hipóxia em algumas regiões do tumor não somente pode culminar em alterações metabólicas, mas também promover resistência aos tratamentos, a citar a diminuição da expressão de topoisomerase II e aumento de Glicoproteína P (revisado por JING *et al.*, 2019; LUQUE-BOLIVAR *et al.*, 2020). O estabelecimento de gradientes para pH, oxigênio e nutrientes, também implica na presença de células quiescentes, fato que acarreta em quimiorresistência a fármacos específicos do ciclo celular (revisado por TRÉDAN *et al.*, 2007). Dessa forma, a busca por alternativas menos agressivas, potentes e que geram menos resistência aos pacientes é imprescindível, no entanto, as pesquisas que visam ao desenvolvimento de novas terapias oncológicas encontram o desafio de superar as adversidades do TME (TALUKDAR *et al.*, 2011).

1.3 CULTURA TRIDIMENSIONAL (3D)

O desenvolvimento de novos fármacos, apesar dos esforços dos pesquisadores e da indústria farmacêutica, ainda permanece um grande desafio. Para a área oncológica, por exemplo, a porcentagem de drogas testadas na fase 1 da pesquisa clínica e, que eventualmente são aprovadas para uso, é menor que 10% (TONIATTI *et al.*, 2014; revisado por BAHCECIOGLU *et al.*, 2020). Considerando os elevados custos e tempo demandados no desenvolvimento clínico de novas drogas, melhores plataformas para a avaliação de eficácia e segurança das mesmas são extremamente necessárias (IMAMURA *et al.*, 2015).

Normalmente, as abordagens utilizadas durante os ensaios pré-clínicos incluem estudos em cultura de células *in vitro*, em conjunto com modelos computacionais e *in vivo* (HUGHES *et al.*, 2011). Tradicionalmente, o cultivo de células *in vitro* é baseado na adesão dessas em substratos rígidos planos, geralmente de materiais como vidro ou poliestireno, para a manutenção da viabilidade (BRESLIN & O'DRISCOLL, 2013; revisado por DUVAL *et al.*, 2017). Os substratos dão suporte mecânico às células, que uma vez aderidas, formam uma monocamada celular (figura 2). Esse modelo, conhecido então como cultivo em monocamada ou bidimensional (2D), permite que as células recebam níveis semelhantes de nutrientes e outros componentes presentes no meio de cultura, resultando em crescimento e proliferação homogêneos (revisado por EDMONDSON *et al.*, 2014).

A cultura celular em monocamada é amplamente empregada, não somente nos estudos de potenciais drogas terapêuticas, mas também configura um modelo extremamente útil nas pesquisas que buscam ampliar o conhecimento sobre biologia celular, morfologia tecidual e mecanismos de doenças (revisado por KAPAŁCZYŃSKA *et al.*, 2018). Nesse contexto, o cultivo 2D apresenta vantagens como: i) baixo custo, haja vista que os sistemas de cultivo 2D e suas tecnologias são menos custosos que outros sistemas; ii) facilidade em ser desenvolvido e entendido, uma vez que os pesquisadores envolvidos em estudos com células aprendem os métodos de cultivo 2D tradicionais, sendo tais procedimentos relativamente simples; iii) relativa rapidez na execução dos experimentos e menor complexidade para observação e interpretação dos resultados; iv) é um modelo muito bem estabelecido, uma vez que é empregado desde o início dos anos 1900 e desde então tem ganhado extrema

relevância na ciência e v) a presença de um grande corpo de estudos relatados na literatura, fato que configura uma importante vantagem, sendo então possível comparar os resultados obtidos com inúmeros trabalhos anteriores de outros grupos de pesquisa (WORTHINGTON; POCHAN; LANGHANS, 2015). Tais características tornam o modelo atrativo para as pesquisas, principalmente porque o estabelecimento de linhagens celulares imortalizadas permitiu a realização de estudos controlados e prolongados (revisado por DUVAL *et al.*, 2017).

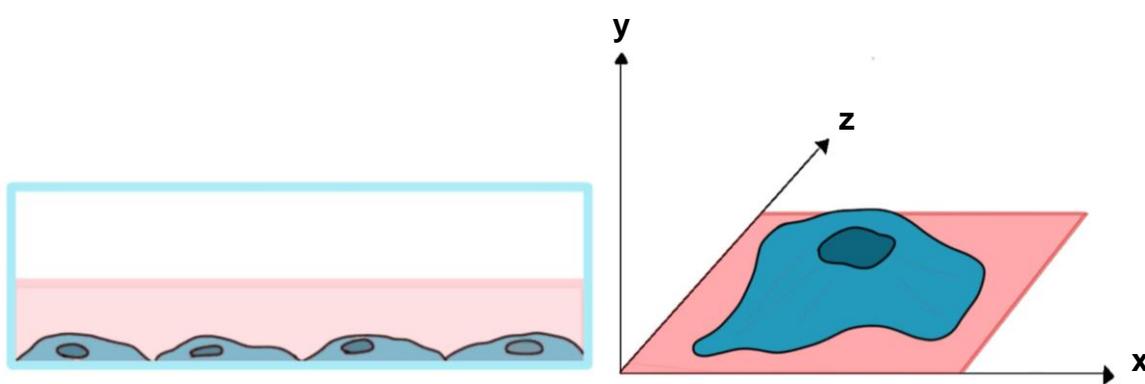


Figura 2. Representação esquemática de células cultivadas em monocamada. As células aderem ao substrato e mantêm contato intercelular limitado. A inexistência de um suporte impede a propagação das mesmas no eixo vertical.

Embora inegavelmente a cultura 2D tenha proporcionado grandes avanços na ciência, suas limitações têm sido reconhecidas. Quando mantidas em monocamada, as células estabelecem contato maior com a superfície do substrato e o meio de cultura do que com as células vizinhas (BAKER & CHEN, 2012), forçando-as em uma polarização que não reflete as condições fisiológicas (FONTOURA *et al.*, 2020). Além disso, são livres para se propagar livremente no plano horizontal, mas a ausência de suporte impede a propagação no plano vertical (figura 2) (BAKER & CHEN, 2012). A consequente alteração na forma e geometria das células, por sua vez, pode afetar seu comportamento (KNIGHT & PRZYBORSKI, 2015). Em 2004, os estudos de Vergani, Grattarola e Nicolini contribuíram para corroborar as observações de que, modificações sofridas pelas células, como o achatamento e remodelamento do citoesqueleto, quando cultivadas em monocamada, podem acarretar em alterações na estrutura da cromatina e na expressão gênica (VERGANI; GRATTAROLA, NICOLINI, 2004). Thomas e colaboradores (2002) também demonstraram que

mudanças na forma do núcleo promovem alterações na expressão de genes e na síntese proteica (THOMAS *et al.*, 2002).

Em contrapartida, as células no organismo vivo crescem circundadas por outras células e ECM numa arquitetura tridimensional (3D), condições que não são representadas nos cultivos 2D (BRESLIN & O'DRISCOLL, 2016). Ademais, no âmbito da cancerologia, os modelos 2D não conseguem representar em sua totalidade as interações presentes no TME, que são papéis-chave na diferenciação, proliferação e função celulares, além da expressão de genes e proteínas e respostas a estímulos e a drogas (revisado por KAPAŁCZYŃSKA *et al.*, 2018). Nesse contexto, a utilização da cultura 3D tem ganhado destaque, pois as características celulares perdidas durante os cultivos em monocamada podem ser reestabelecidas simplesmente cultivando-as num ambiente 3D (BRESLIN & O'DRISCOLL, 2016). Ao serem mantidas em tais condições, as células aumentam o contato intercelular, o que por sua vez, permite maior sinalização entre as mesmas (KNIGHT & PRZYBORSKI, 2015). Adicionalmente, sabe-se que a tridimensionalidade do modelo acarreta respostas celulares diferentes em comparação à cultura 2D. A organização espacial de receptores de superfície celular é reestabelecida e, conseqüentemente, também as interações em que estão envolvidos (revisado por EDMONDSON *et al.*, 2014).

Recentemente, Jensen e Teng (2020) em sua revisão, elencaram as principais características da cultura 3D. Entre elas, destacam-se a preservação da forma natural da células, o fato de que os nutrientes não são distribuídos igualmente entre as mesmas, o maior contato célula-célula estabelecido, taxas de proliferação mais realísticas para cada tipo celular, maior resistência a tratamentos e à apoptose induzida por drogas, níveis proteicos e de expressão gênica mais próximos dos encontrados nas células *in vivo* (JENSEN & TENG, 2020). Tais propriedades têm demonstrado que os modelos de cultura 3D são capazes de melhor representar o comportamento das células nos tecidos dentro do organismo, em especial, o TME (GURSKI *et al.*, 2010). Entretanto, embora seja um método vantajoso por recriar/retomar características que são perdidas no cultivo 2D, os custos são bastante elevados e dificuldades podem ser encontradas para a replicação e interpretação dos experimentos (JENSEN & TENG, 2020).

Apesar das descobertas no que tange ao avanço da cultura 3D sobre a 2D, cabe ao próprio pesquisador decidir qual o modelo de cultivo mais se adequa dentro do contexto de sua pesquisa, sendo a escolha ditada pelo processo de interesse específico. Não obstante, não há atualmente uma plataforma de cultivo 3D universal. Apesar das limitações reconhecidas da cultura 2D tradicional, a mesma permanece sendo extensamente empregada em grande parte dos estudos com células e as inúmeras pesquisas descritas na literatura demonstram que esse modelo permite recapitular alguns comportamentos *in vivo*. Por ser um modelo utilizado desde o início do século XX, os pesquisadores então puderam estudá-lo e melhor compreendê-lo, e ao longo dos anos, aprimoraram e aperfeiçoaram as técnicas para o seu melhor aproveitamento (revisado por DUVAL *et al.*, 2017).

Atualmente, a cultura 2D pode ser usada para prever o efeito *in vivo* de drogas para diferentes alvos e em estudos de diversas vias de sinalização, sendo um modelo ainda muito útil na descoberta de novas drogas, principalmente como uma ferramenta de triagem para aquelas mais promissoras (FANG & EGLIN, 2017). Portanto, o objetivo da pesquisa, bem como fatores como custo, recursos e tempo, são relevantes para a escolha do método adequado. Por exemplo, caso deseja-se obter uma população de células homogêneas em características como o estado do ciclo celular e velocidade de replicação, o cultivo 2D demonstra-se mais adequado. Ao passo que, para a avaliação do perfil de difusão de drogas no microambiente tumoral 3D, com a presença de várias camadas de células com perfis heterogêneos, modelos que permitam reestabelecer essa arquitetura são mais vantajosos.

O cultivo 3D pode ser alcançado cultivando-se as células de modo que formem agregados celulares esféricos tridimensionais, chamados de esferoides (revisado por VERJANS *et al.*, 2017). Tais estruturas foram descritas pela primeira vez em 1952 por Moscona e Moscona, e, em 1971, Sutherland e colaboradores desenvolveram e descreveram os esferoides multicelulares como um modelo *in vitro* para o estudo de tumores sólidos (SUTHERLAND *et al.*, 1971).

Ao formarem os esferoides, as interações célula-célula e célula-matriz mimetizam com maior acurácia o ambiente 3D natural *in vivo*. Não obstante, semelhantemente ao que acontece nos tumores sólidos, esferoides apresentam heterogeneidade quanto às taxas de proliferação, com células com alta capacidade replicativa na periferia, uma camada intermediária de células quiescentes e células hipóxicas localizadas mais centralmente (KHAITAN *et al.*, 2006; revisado por HIRSCHHAEUSER *et al.*, 2010; revisado por EDMONDSON *et al.*, 2014). A estrutura geral de um esferoide pode ser visualizada na figura 3.

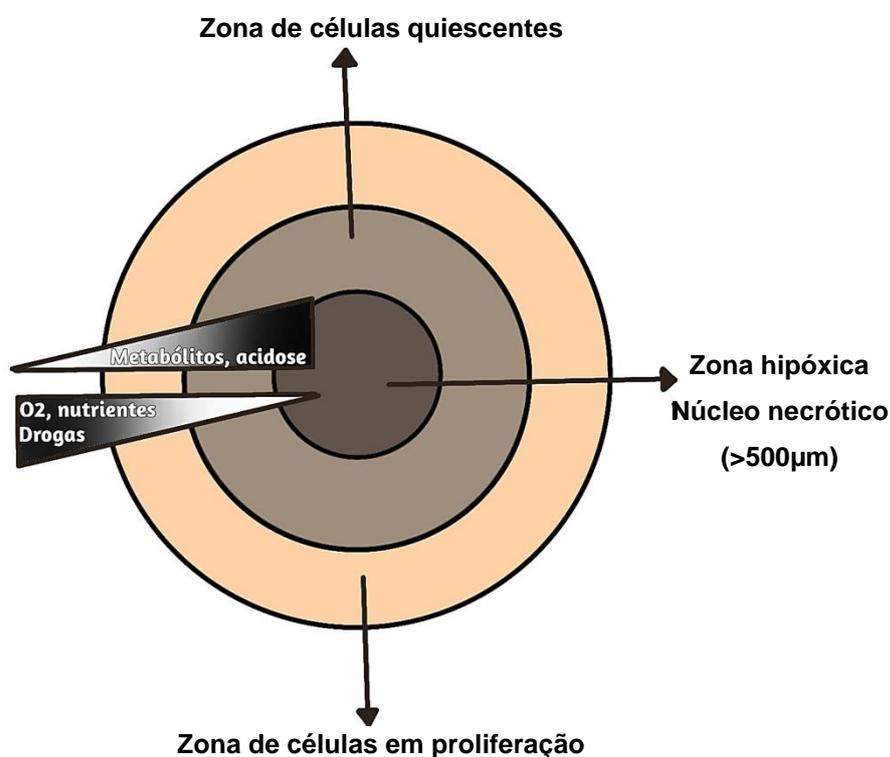


Figura 3. Esquemática da estrutura de um esferoide tumoral multicelular. Células na periferia têm maior acesso ao oxigênio, nutrientes e a tratamentos do que as células centrais e estão em plena proliferação. Mais internamente, estão presentes células quiescentes e na região central, células hipóxicas. Esferoides com tamanhos maiores que 500 µm podem desenvolver núcleo necrótico.

A organização estrutural em 3D permite, ainda, o estabelecimento de gradientes de concentração para oxigênio, nutrientes, metabólitos e pH (FRIEDRICH; EBNER; KUNZ-ZCHUGHART, 2007). A região central dos esferoides é menos exposta aos componentes do meio de cultura e em contrapartida, o aumento da glicólise anaeróbica e a produção de lactato e CO₂ causa a acidificação do espaço intersticial (BLOCH *et al.*, 2014). Além disso, estruturas maiores que 500 µm, por

exemplo, pode apresentar a formação de um núcleo necrótico (figura 3). Além das características elencadas, os esferoides apresentam um perfil de resistência às opções terapêuticas antitumorais compatíveis àqueles encontrados em tumores *in vivo*, o que torna o modelo atrativo para os pesquisadores (RAVI *et al.*, 2015).

Ao longo dos anos, diferentes autores propuseram classificar as estruturas celulares formadas em cultivo 3D. Ivascu e Kubbies em 2007, ao analisarem a morfologia das células de câncer de mama quando cultivadas em 3D, classificaram-nas como esferoides compactos, agregados frouxos ou compactos. Froehlich e colaboradores (2016), ao estenderem a classificação dos autores anteriores, definem morfologicamente as estruturas celulares como: esferoides compactos, pequenos múltiplos esferoides, agregados compactos, agregados frouxos e suspensão de célula única (figura 4).

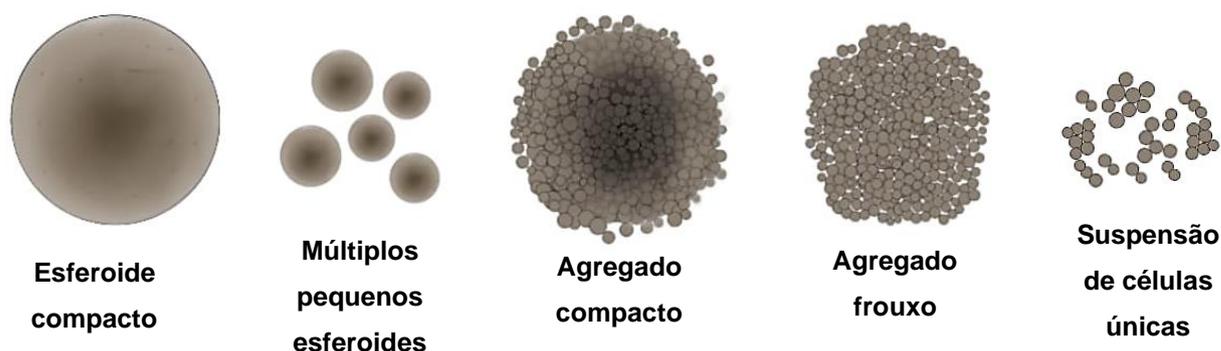


Figura 4. Representação esquemática das estruturas formadas em cultura 3D e suas respectivas classificações, de acordo com Froehlich e colaboradores (2016).

Diferentes métodos podem ser empregados na obtenção dos esferoides e podem ser divididos basicamente em duas categorias: baseados e não baseados em suporte (revisado por VERJANS *et al.*, 2017). Os suportes, que podem ser de materiais biológicos ou polímeros sintéticos, refletem a microarquitetura do tecido, mimetizando a composição da ECM e permitindo às células aderirem, migrarem, proliferarem e interagirem entre si (revisado por COSTA *et al.*, 2017). Suportes sintéticos podem ser polímeros como polietilenoglicol, enquanto aqueles de origem biológica incluem laminina, colágeno, fibronectina e matrizes tipo hidrogel, a citar o Matrigel[®], Cultrex[®] ou Geltrex[®]. Essas matrizes são compostas de uma mistura de proteínas secretadas por células do sarcoma murino *Engelbreth-Holm-Swarm*, tumor que produz grandes quantidades de componentes de membrana basal, como

laminina, colágeno IV, entactina, heparan sulfato, e formam um gel 3D em temperaturas a 37°C (KLEINMAN & MARTIN, 2005).

Hidrogéis como os supracitados, requerem preparação laboriosa, envolvendo resfriamento dos materiais utilizados e o descongelamento e manutenção em banho de gelo, a fim de prevenir uma polimerização prematura. Ao formarem ligações cruzadas, esses materiais estabelecem uma rede de fibras com grande capacidade de retenção de fluidos. Hidrogéis de origem biológica, como Geltrex[®] ou Matrigel[®], embora exibam características estruturais similares as encontradas *in vivo* – o que os configura como matrizes adequadas para interação de diferentes tipos celulares, algumas limitações devem ser elencadas. Justamente por sua origem animal, esse tipo de material exhibe variabilidade de lote para lote, o que pode culminar em resultados experimentais com baixa reprodutibilidade. Ademais, o Matrigel[®], por exemplo, não contém quantidades apropriadas de colágeno do tipo I ou de ácido hialurônico, quando comparado àquelas encontradas em matrizes de tumores *in vivo*. Adicionalmente, fatores que afetam o crescimento celular, como a rigidez da própria matriz, não é passível de controle ao se empregar esse material (KLEINMAN & MARTIN, 2005; NYGA; CHEEMA; LOIZIDOU, 2011).

Por outro lado, as técnicas sem suporte se baseiam no fato de as células se organizarem em estruturas 3D na ausência de um substrato em que possam aderir, culminando no aumento das forças adesivas entre si, promovendo a agregação celular e a formação dos esferoides (revisado por VERJANS *et al.*, 2017; revisado por COSTA *et al.*, 2017). Um exemplo bastante empregado é a utilização de placas de ultra baixa adesão ou placas recobertas com material de propriedades não aderentes, como agarose ou poly-HEMA (IVASCU & KUBBIES, 2006; NAGELKELKE *et al.* 2013; FRIEDRICH *et al.*, 2009; LEMOS *et al.*, 2019; LI *et al.*, 2011; (FRIEDRICH *et al.* 2009). Essa última abordagem é conhecida como técnica de sobreposição líquida e foi descrita pela primeira vez nos anos 70 por Costăchel, Fadei e Badea (1969) e Yuhas e colaboradores (1977). Géis de agarose ou ágar são muito empregados como materiais não adesivos, devido ao baixo custo e fácil manipulação, no entanto, requer extensa padronização para permitir a reprodutibilidade dos resultados (revisado por COSTA *et al.*, 2017). Não obstante, há de se considerar a possibilidade da influência do contato desses materiais com as células e seus efeitos sobre o crescimento dos

esferoides (GAO *et al.*, 2018). Além disso, algumas linhagens celulares não são capazes de se agregar espontaneamente em esferoides ou formam apenas agregados frouxos, com a utilização da técnica. Dessa forma, aditivos no meio de cultura, como a incorporação de membrana basal reconstituída, podem contribuir e facilitar a agregação celular (DUBOIS *et al.*, 2017; FROEHLICH *et al.*, 2016; VINCI *et al.*, 2012).

Apesar das vantagens na utilização de esferoides em mimetizar tumores *in vivo*, suas limitações devem ser reconhecidas. Além das desvantagens já mencionadas, ainda, os custos são bem mais elevados em relação à cultura 2D, principalmente no que tange a realização de estudos em larga escala. A dificuldade de gerar esferoides de tamanhos e formas semelhantes também é um desafio, e, portanto, os protocolos precisam ser padronizados para que possam ser reprodutíveis. Não obstante, os esferoides não apresentam vasculatura, e essa, por sua vez, possui um papel vital no crescimento dos tumores e na distribuição de drogas. A representação mais acurada do TME pela cultura 3D representa um grande avanço, mas não substitui os estudos em organismos vivos (revisado por EDMONDSON *et al.*, 2014; JENSEN & TENG, 2020). Diante do exposto, acredita-se que o modelo 3D possa ganhar cada vez mais espaço nas pesquisas envolvendo células e que novas técnicas e tecnologias sejam desenvolvidas para aprimorar os métodos já existentes e corrigir as falhas e desvantagens apresentadas pelos mesmos. No entanto, embora se constitua um avanço em relação ao modelo 2D tradicional, esse último tem seu espaço bem estabelecido como ferramenta extremamente útil nos estudos com células, além de ser acessível em termos de custo e facilidade na manipulação e realização de experimentos, cabendo ao pesquisador tomar a decisão de qual modelo, 2D, 3D ou ambos, melhor se adequa para os objetivos de seus estudos.

Sendo assim, considerando a necessidade da contínua realização de pesquisas na área da cancerologia, tanto para o melhor entendimento da doença, quanto para o desenvolvimento de novas opções terapêuticas, bem como o fato de que muitas drogas oncológicas são eliminadas durante os ensaios clínicos, o presente trabalho se propôs a estudar protocolos de cultivo 3D baseados na técnica de sobreposição líquida para melhor representar o TME. A fim de estabelecer o que melhor se adequa em termos de aplicabilidade e efetividade para avaliação de

citotoxicidade em células de câncer de mama, objetivou-se correlacionar os resultados obtidos com o modelo de cultura em monocamada.

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

Padronizar protocolos de cultivo de células tridimensional (3D) baseados na técnica de sobreposição líquida para geração de esferoides tumorais e avaliar o que melhor se adequa em termos de aplicabilidade e efetividade para utilização em ensaios de citotoxicidade em linhagens de câncer de mama.

2.2 ESPECÍFICOS

- Padronizar protocolo de cultivo 3D para geração de esferoides utilizando a técnica de sobreposição líquida com agarose;
- Padronizar protocolo de cultivo 3D para geração de esferoides utilizando a técnica de sobreposição líquida com agarose, com adição de membrana basal reconstituída ao meio de cultura;
- Avaliar a citotoxicidade de quimioterápico utilizado na rotina clínica do câncer de mama nos modelos de cultivo 2D e 3D gerados;
- Comparar os resultados de citotoxicidade obtidos para os modelos de cultivo em 2D e 3D;
- Estabelecer o protocolo mais adequado em termos de efetividade e aplicabilidade para o cultivo em 3D de linhagens de câncer de mama e sua utilização na avaliação de potenciais drogas terapêuticas.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 LINHAGENS CELULARES

Na realização desta pesquisa foram utilizadas duas linhagens de câncer de mama, MDA-MB-231 e MCF-7. A linhagem MDA-MB-231, adquirida comercialmente do Banco de Células do Rio de Janeiro, foi estabelecida a partir de uma efusão pleural

de uma paciente caucasiana de 51 anos, com tumor mamário em metástase. Classificada como uma linhagem de câncer de mama triplo negativo, altamente agressivo e invasivo, não expressa RE e RP, além de se caracterizar pela ausência de expressão e amplificação de HER-2 (CAILLEAU *et al.*, 1974).

Cedida pelo Laboratório de Divisão de Pesquisa Clínica e Desenvolvimento Tecnológico do INCa, a linhagem MCF-7, por sua vez, foi isolada a partir de uma paciente caucasiana de 69 anos com adenocarcinoma de mama. Classificada como luminal A, é positiva para expressão dos receptores hormonais (RE e RP), negativa para HER-2, sendo considerada uma linhagem celular pouco agressiva e não invasiva (COMŞA; CIMPEAN; RAICA, 2015).

De acordo com a *American Type Culture Collection* (ATCC, 2022), ambas as linhagens apresentam morfologia tipo epitelial quando cultivadas em monocamada, como pode ser observado na figura 5.

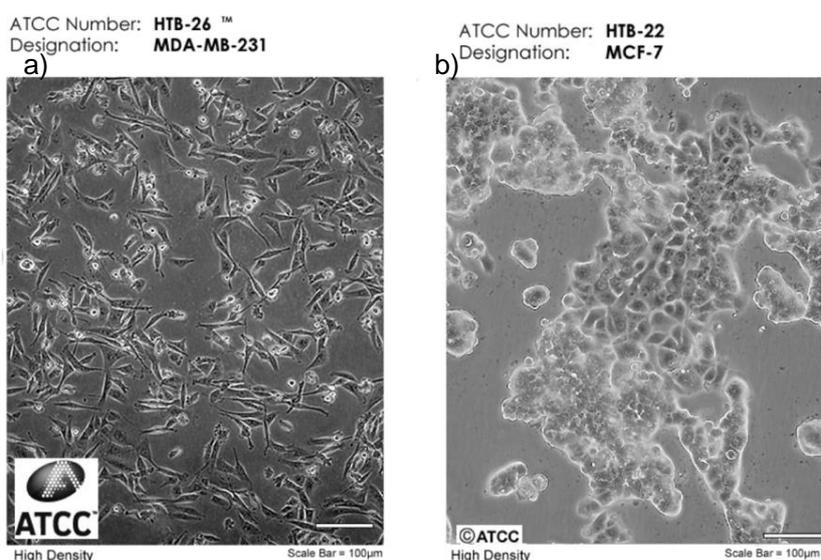


Figura 5. Linhagem MDA-MB-231 (a) e MCF-7 (b) em cultura em monocamada. Células visualizadas sob microscopia óptica de luz invertida. Ambas as fotografias representam as linhagens em alta densidade celular. Escala: 100µm. Fonte: ATCC, 2022.

3.2 CONDIÇÕES DE CULTIVO 2D

No cultivo em monocamada, as linhagens MDA-MB-231 e MCF-7 foram mantidas em meios de cultura RPMI 1640 (Gibco, Grand Island, NY, EUA) e DMEM *High Glucose* (4500.0 mg/L, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), respectivamente. A

suplementação de ambos os meios de cultura se deu por adição de 10% (v/v) de soro fetal bovino (SFB) (CRIPION, Andradina, SP, Brasil), 1% (v/v) de solução Penicilina-Estreptomicina (10000 u/mL - 10 mg/mL) e 0.5% (v/v) de Anfotericina B (250 µg/mL) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).

As células foram cultivadas em garrafas de 75 cm² e mantidas em estufa a 37°C com atmosfera de 5% de CO₂. A troca do meio de cultura foi realizada duas a três vezes por semana, de acordo com o crescimento celular, sendo a análise morfológica células realizada em microscópio óptico de luz invertida (Axio Observer Z1, Carl Zeiss, Jena, TH, Alemanha).

Ao atingir subconfluência, o conteúdo das garrafas foi desprezado e as células lavadas com tampão fosfato-salino (PBS), seguido do processo de dissociação enzimática com solução de tripsina (0.25% tripsina/0.53mM EDTA, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), para o desprendimento das células da garrafa. Após inativação da tripsina por adição de meio de cultura suplementado, foi retirada uma alíquota da suspensão celular resultante para contagem do número total de células viáveis em câmara de Neubauer. Empregou-se o corante azul de tripan 0.4% (v/v) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) para a distinção entre células viáveis e não viáveis.

Após a contagem e realização dos cálculos da concentração celular necessária para os experimentos, o volume adequado da suspensão de células foi transferido para um novo tubo tipo falcon. Meio de cultura fresco foi então adicionado para alcançar a concentração de células/ml ideal calculada para os ensaios. A suspensão de células foi utilizada para a padronização dos protocolos de cultivo celular 3D, bem como nos experimentos de citotoxicidade em monocamada e 3D, como será descrito a seguir.

3.3 CULTIVO CELULAR 3D COM AGAROSE

Para o desenvolvimento do cultivo celular tridimensional com agarose, seguiu-se o modelo esferoide tumoral 3D proposto por Friedrich e colaboradores (2009), com algumas adaptações. O modelo faz parte do método conhecido como sobreposição líquida, que se baseia na inibição da adesão das células à superfície do substrato em que se encontram.

Essa superfície não aderente pode ser alcançada com adição de uma camada de gel de agarose e assim, as células são mais propensas a se agregarem e interagirem entre si, formando os esferoides tumorais multicelulares, conforme esquematizado na figura 6.

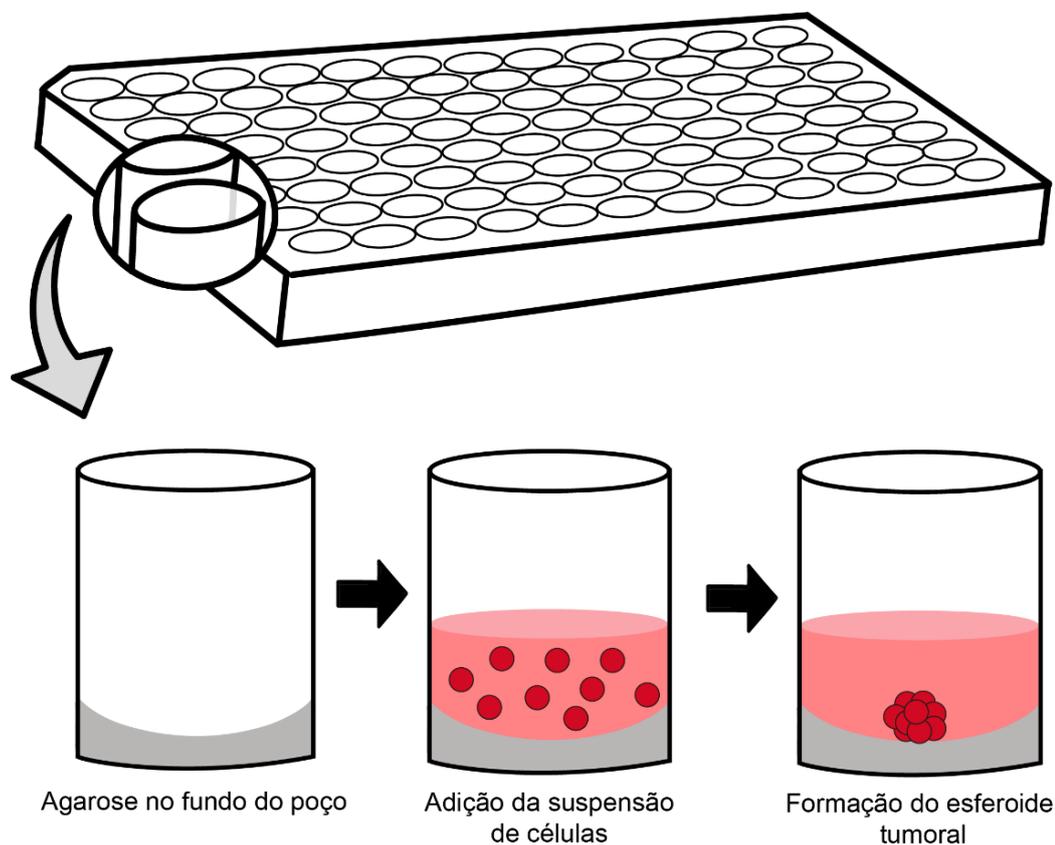


Figura 6. Representação esquemática da técnica de sobreposição líquida com agarose. O material recobrendo a superfície do poço de uma placa impede a adesão das células, que então se aglomeram e aderem entre si, formando a estrutura esférica conhecida como esferoide tumoral multicelular.

3.3.1 Padronização da concentração de agarose

No intuito de determinar a melhor condição para geração dos esferoides, foi realizada a padronização da concentração de agarose para recobrir o fundo dos poços de uma placa. Na literatura não há consenso no que se diz respeito à concentração de agarose ideal para o modelo, sendo as concentrações de gel 1,0% e 1,5% (m/v) amplamente utilizadas nos estudos (BOO *et al.*, 2020; LEMOS *et al.*, 2019; LI *et al.*, 2011; HO *et al.*, 2012). Sendo assim, ambas as concentrações foram escolhidas para teste.

Para tanto, o pó de agarose (Ludwig Biotec, Alvorada, RS) foi dissolvido em água destilada morna, previamente autoclavada, em um tubo cônico estéril tipo falcon de 50mL e a solução resultante mantida em banho-maria a 90°C por 30 minutos. Na etapa seguinte, o tubo contendo o gel de agarose ainda em estado líquido, foi transferido para o interior de uma cabine de segurança biológica e, mantendo-se a temperatura superior a 60°C, o gel foi adicionado às placas de 96 poços de fundo chato (50µL/poço). A esterilização da solução de agarose, que originalmente é alcançada por processo de autoclavação (FRIEDRICH *et al.*, 2009), foi realizada submetendo as placas à luz ultravioleta (UV) por 30 minutos. Após esse período, verificou-se a completa gelificação da agarose (figura 7).



Figura 7. Placa de 96 poços recobertos com 50µL/poço de: a) gel de agarose na concentração 1,0% (m/v) e b) gel de agarose na concentração 1,5% (m/v).

3.3.2 Padronização da densidade celular

Objetivando idealmente a formação de um único esferoide por poço, as células das linhagens MDA-MB-231 e MCF-7 foram plaqueadas em diferentes densidades, de 1.000 a 50.000 células por poço, em um volume de 200µL/poço, como esquematizado na figura 8.

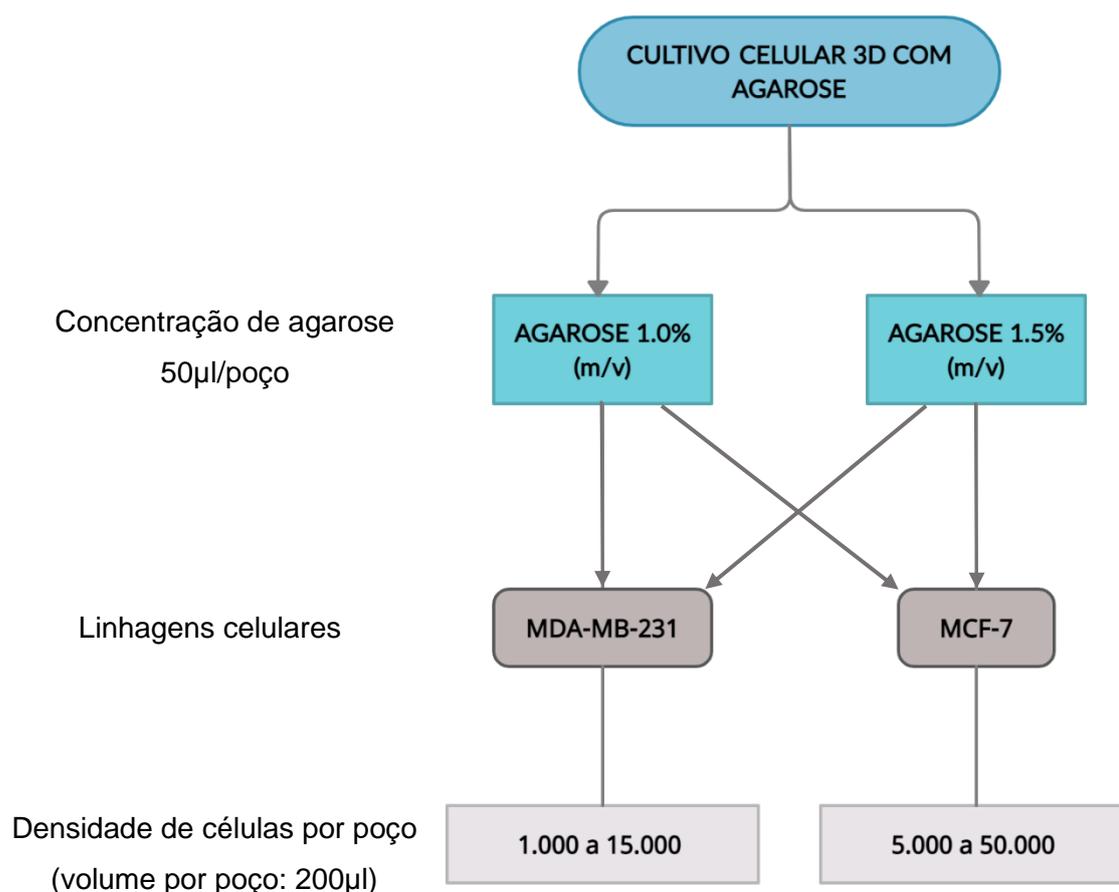


Figura 8. Representação esquemática da padronização do protocolo de sobreposição líquida com agarose, para as linhagens MDA-MB-231 e MCF-7.

Posteriormente à adição das células, com objetivo de facilitar a aglomeração celular no centro dos poços, as placas foram centrifugadas a 1000g por 10 min (ZHANG *et al.*, 2016) e armazenadas em incubadora de CO₂ a 37°C por 96 horas, tempo hábil para a formação dos esferoides. Finalizados os 4 dias iniciais de incubação, os esferoides foram observados em microscópio óptico (Olympus AX70) e fotografados com auxílio do *software* Axio-Vision Rel. 4.8 (Carl Zeiss, Jena, TH, Alemanha). Após essa etapa, as placas retornaram para a incubadora por mais 72 horas. Ao final desse período, totalizando 7 dias de cultivo, os esferoides foram fotografados novamente.

3.4 CULTIVO CELULAR 3D COM GELTREX[®]

A segunda técnica de cultura 3D testada para gerar os esferoides tumorais multicelulares, tem como princípio não só o impedimento da adesão celular ao

substrato no qual as células são cultivadas, mas também a adição de componentes de ECM ao meio de cultura, a fim de facilitar a formação de interações célula-célula e célula-matriz (FRIEDRICH *et al.*, 2009).

Para tanto, foram utilizados os protocolos de Friedrich e colaboradores (2009) e Ivascu e Kubbies (2007), com algumas modificações. Para impedir adesão celular foi empregada solução de agarose a 1,0% (m/v) (FRIEDRICH *et al.*, 2009), além da incorporação de ECM ao meio de cultura (IVASCU & KUBBIES, 2007).

Como aditivo, utilizou-se a membrana basal reconstituída derivada do tumor murino *Engelbreth-Holm-Swarm*, comercialmente conhecida como Geltrex[®]. A solução em questão é uma matriz de origem biológica, escolhida devido à sua consistência no que diz respeito a concentração de proteínas lote a lote (GARGOTTI *et al.*, 2018).

3.4.1 Padronização da concentração de Geltrex[®]

Inicialmente, foi necessário padronizar a concentração final de Geltrex[®] a ser adicionada ao meio de cultura. Baseando-se em relatos da literatura (ROLVER *et al.*, 2020; YU *et al.*, 2021; CAVACO *et al.*, 2021), duas concentrações de Geltrex[®] foram escolhidas para os ensaios: 1,5% e 2,0% (v/v). Ainda, duas condições adicionais foram testadas: a adição de Geltrex[®] imediatamente após o plaqueamento das células – definido como “dia 0”, ou 24 horas depois – “dia 1”.

De acordo com as instruções do fabricante, o Geltrex[®] – livre de vírus (incluindo o vírus elevador da lactato desidrogenase – LDEV) e reduzido em fatores de crescimento (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) – foi descongelado a 4°C *overnight* e mantido em banho de gelo durante o preparo das soluções para evitar sua polimerização. Meios de cultura e materiais como ponteiros também foram mantidos refrigerados antes da sua utilização.

Para o plaqueamento, foi escolhida a concentração de agarose 1,0% (m/v) para recobrir os poços e impedir a adesão das células, uma vez que foi a condição que demonstrou os melhores resultados em ensaios anteriores. Portanto, a preparação e adição da agarose foi realizada de acordo com o protocolo descrito no item 3.3.1.

Imediatamente após a adição das células às placas (dia 0) ou 24 horas depois do plaqueamento (dia 1), o volume adequado de Geltrex[®] foi transferido para um tubo cônico tipo falcon contendo meio de cultura gelado. O volume de Geltrex[®] utilizado foi calculado de forma que, após sua adição aos poços, a sua concentração final fosse de 1,5% ou 2,0% (v/v). Após homogeneização da solução de meio de cultura + Geltrex[®] solubilizado, o volume de 50µL da solução resultante foi adicionado às placas de 96 poços.

3.4.2 Padronização da densidade celular

Objetivando a formação de um único esferoide por poço, as células das linhagens MCF-7 e MDA-MB-231 foram plaqueadas em diferentes densidades, variando de 2.000 a 10.000 células/poço, em um volume final de 200µL (sendo 150µL de suspensão de células + 50µL de Geltrex[®] diluído em meio de cultura).

Após tripsinização e contagem das células, as mesmas foram ressuspensas em meio de cultura e adicionadas aos poços em um volume de 150µL por poço. Como descrito no item 3.4.1, o Geltrex[®] diluído em meio de cultura foi adicionado às placas logo após o plaqueamento das células ou no dia seguinte, em volume de 50µL (figura 9).

Em seguida, as placas foram submetidas a uma etapa de centrifugação a 1000g por 10 min (ZHANG *et al.*, 2016) para facilitar a aglomeração celular no fundo dos poços, e mantidas em incubadora de CO₂ a 37°C por 96 horas. Finalizado esse período, as placas foram visualizadas em microscópio óptico (Olympus AX70) e os poços fotografados com auxílio do *software* Axio-Vision Rel. 4.8 (Carl Zeiss, Jena, TH, Alemanha). As placas retornaram para a incubadora por mais 72 horas e ao total de 7 dias de cultivo, os poços foram novamente fotografados.

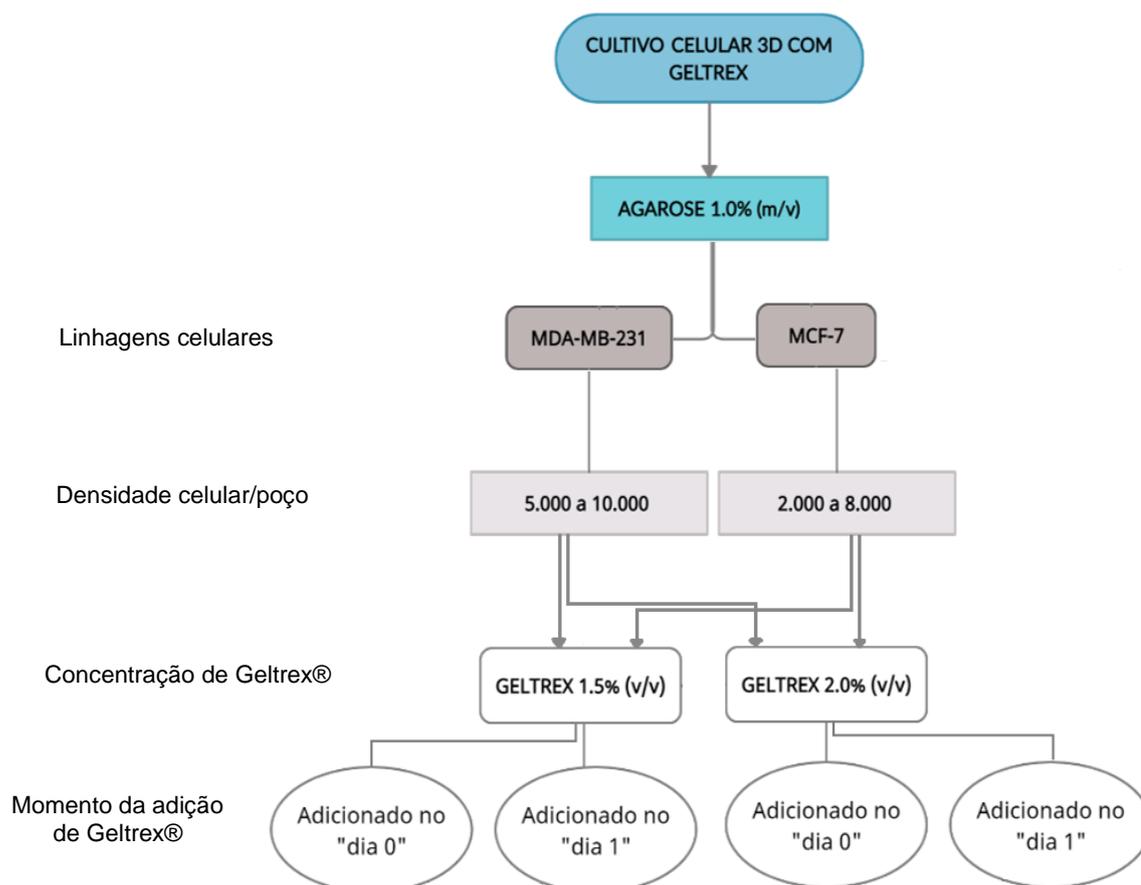


Figura 9. Representação esquemática da padronização do protocolo de sobreposição líquida com agarose, com adição de Geltrex® diluído em meio de cultura, para as linhagens MDA-MB-231 e MCF-7.

3.5 AVALIAÇÃO DO TAMANHO DOS ESFEROIDES

Nos dias 4 e 7 de incubação após plaqueamento, os poços foram fotografados para verificação da formação dos esferoides, assim como seus aspectos morfológicos. Dessa maneira, o diâmetro de cada esferoide foi determinado com auxílio do software livre ImageJ (NIH, Bethesda, MD, USA.).

Considerando que os esferoides formados podem apresentar formato esférico irregular ou oval, utilizou-se a equação 1 para apuração do diâmetro médio (D_m), calculado a partir de duas medidas ortogonais a e b (figura 10). (KUO *et al.*, 2017; WEN *et al.*, 2013).

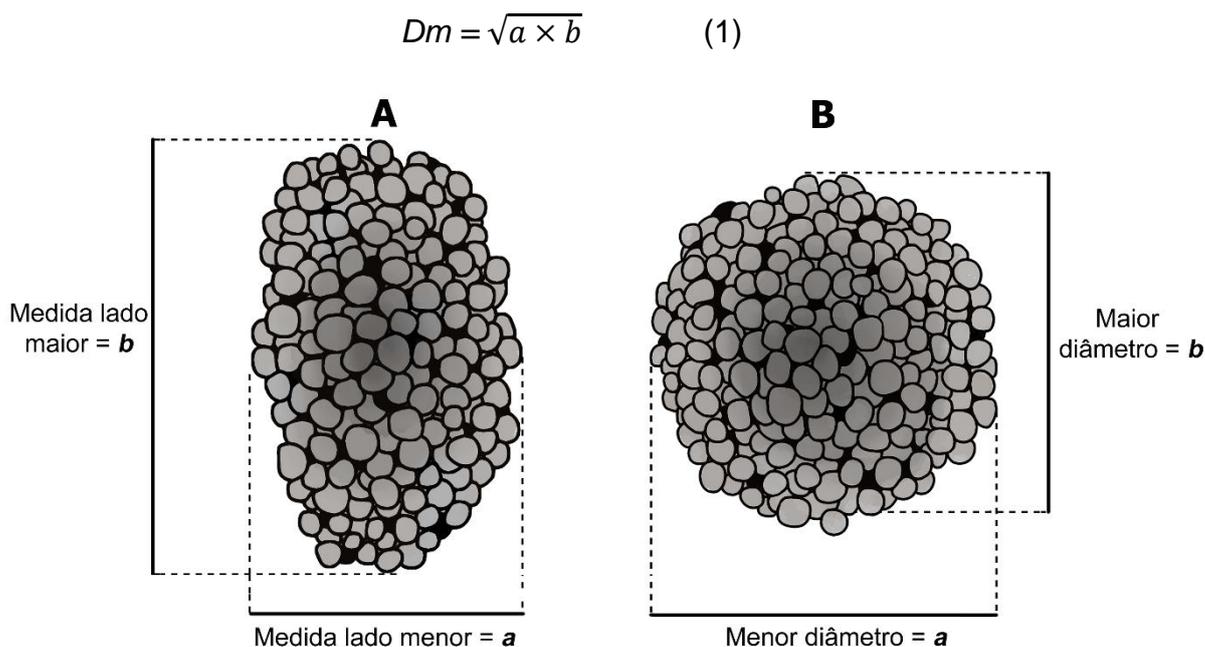


Figura 10. Processo de determinação do diâmetro médio dos esferoides. **A**: Esferoide tumoral multicelular com morfologia irregular; diâmetro médio calculado a partir das medidas do menor (a) e maior lado (b). **B**: Esferoide tumoral multicelular com morfologia circular; diâmetro médio calculado a partir das medidas do menor (a) e maior (b) diâmetro.

3.6 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

Com o objetivo de analisar a ultraestrutura celular tridimensional dos esferoides gerados, foi realizada a microscopia eletrônica de varredura (MEV). Para tanto, cerca de 8 esferoides para cada condição foram transferidos para microtubos e lavados com solução tampão cacodilato de sódio 0.1M (pH 7,2-7,4) para remoção do meio de cultura remanescente. Em seguida, as amostras foram fixadas à temperatura ambiente com glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato. Decorridas 24 horas, os esferoides fixados foram lavados com tampão cacodilato de sódio e pós-fixados por 1 hora com tetróxido de ósmio 0,2% em água e ferrocianeto de potássio 2,5%, em proporção 1:1.

Após uma lavagem com tampão cacodilato de sódio e duas lavagens com água destilada, as amostras passaram pela etapa de desidratação etílica gradual (30%, 50%, 70%, 90% e 3x com 100% etanol), 10 minutos cada banho. Os esferoides então foram montados sobre uma membrana de carbono adesivo em suportes metálicos e deixados à temperatura ambiente para evaporação do etanol residual. Após secagem

completa, as amostras nos suportes foram metalizadas com ouro (Desk V, Denton Vacuum, New Jersey, USA) e visualizadas em microscópio eletrônico de varredura modelo JSM6610LV (JEOL, Tóquio, Japão).

3.7 COMPOSTO TESTADO

Para avaliar o comportamento das células em monocamada e esferoides frente a drogas, o Paclitaxel (Ontax[®], Libbs, 6mg/mL), quimioterápico empregado na clínica oncológica do câncer de mama, foi utilizado nos ensaios celulares para avaliação de citotoxicidade. A droga foi doada pelo Laboratório Divisão de Pesquisa Clínica e Desenvolvimento Tecnológico do INCa e foram preparadas diluições seriadas em dimetilsulfóxido (DMSO) a 5% (v/v) (Neon Comercial, Suzano, SP) devido à sua baixa solubilidade em água (5.56×10^{-3} g/L) (ALVES *et al.*, 2018; BILATI; ALLÉMANN; DOELKER, 2005). A concentração de DMSO foi escolhida por não interferir na viabilidade metabólica das células (concentração final: 0.5% v/v). As concentrações de Paclitaxel utilizadas estão descritas na tabela 1.

Tabela 1. Concentrações de Paclitaxel testadas nos ensaios de citotoxicidade

Quimioterápico	Concentrações finais
Paclitaxel	1×10^{-4} M
	1×10^{-5} M
	1×10^{-6} M
	1×10^{-7} M
	1×10^{-8} M
	1×10^{-9} M
	1×10^{-10} M
	1×10^{-11} M

3.8 ANÁLISE DE VIABILIDADE CELULAR METABÓLICA (VCM)

A avaliação da citotoxicidade do Paclitaxel sobre as linhagens de câncer de mama foi verificada através de ensaios de viabilidade celular metabólica (VCM) por AlamarBlue[®]. O teste se baseia na capacidade da resazurina, um corante azul não fluorescente e permeável à membrana celular, perder, em condições apropriadas, um

íon oxigênio para se converter em resorufina, de cor rosa/vermelha fluorescente. A reação ocorre em células metabolicamente ativas, sendo a intensidade da coloração/fluorescência formada proporcional ao número de células viáveis (O'BRIEN, *et al.*, 2000; IVANOV; GRABOWSKA; GARNETT, 2017; GONZÁLEZ-PINZÓN; HAGGERTY; MYROLD, 2012).

Para realização do teste em cultura 2D, as células das linhagens MCF-7 e MDA-MB-231 foram plaqueadas, respectivamente, nas densidades de 1×10^5 e 5×10^5 células/mL, em placas pretas opacas de 96 poços de fundo chato e incubadas por 24 horas, para permitir adesão das células à superfície da mesma. Em contrapartida, para a cultura 3D, esferoides com aproximadamente 400 μm de diâmetro médio, obtidos no 4º dia de cultivo, foram gerados de acordo com os itens 3.3 e 3.4. Então, os esferoides foram transferidos para uma nova placa, com adição de meio de cultura fresco.

As células em monocamada e os esferoides foram expostos ao Paclitaxel nas concentrações previamente definidas, por 72 horas. Em todas as placas, poços apenas com células/esferoides e meio de cultura foram utilizados como controle não-tratado (NT) para posteriores comparações. Além disso, quatro poços não receberam células ou tratamento, apenas meio de cultura, sendo empregados como branco para calibração do leitor de placas.

Após o tempo de tratamento, o reagente AlamarBlue® (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), foi adicionado às placas em quantidade equivalente a 10% do volume final dos poços e as mesmas foram mantidas em estufa a 37°C por mais 4 horas. Finalizada a incubação, a leitura da intensidade da fluorescência se deu em espectrofotômetro de microplacas (Synergy H1, Biotek, Winooski, Vermont, EUA), utilizando luz com comprimento de onda de 560nm para excitação e 590nm na emissão. Os resultados foram expressos em porcentagem de células metabolicamente viáveis, quando comparadas ao controle não tratado.

3.9 DETERMINAÇÃO DAS IC_{50} DO QUIMIOTERÁPICO TESTADO

A partir do ensaio de VCM, a curva dose-resposta para o Paclitaxel foi utilizada para estimar os valores da concentração inibitória de 50% da proliferação celular (IC_{50})

para cada modelo. Os cálculos foram realizados com auxílio do *software GraphPad Prism 8.0* (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA).

3.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foram empregados os testes de Shapiro-Wilk e Levene para verificação das premissas de normalidade e homogeneidade das variâncias, respectivamente, para os dados. O teste de ANOVA de duas vias para medidas repetidas, com *post hoc* de Bonferroni, foi realizado para avaliar a relação do diâmetro dos esferoides com a densidade celular e o tempo de incubação. Para os ensaios de citotoxicidade, os dados foram analisados por Kruskal-Wallis com *post hoc* de Dunn (teste não paramétrico correspondente do ANOVA de duas vias). Para todos os ensaios, considerou-se significativo $p < 0.05$. As análises foram realizadas utilizando o *software Graphpad Prism 8.0* (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 PADRONIZAÇÃO DO PROTOCOLO DE CULTURA 3D COM AGAROSE

A padronização da concentração do gel de agarose, bem como a quantidade de células a serem adicionadas a cada poço, foi realizada com intuito de obter as seguintes características – definidas por Vinci e colaboradores (2012): (a) aplicável a placas de 96 poços, (b) formação de um único esferoide compacto por poço, (c) alta reprodutibilidade e (d) facilidade de manipulação por pipetagem visando a coleta dos esferoides para outras possíveis análises.

4.1.1 MDA-MB-231

As células foram plaqueadas nas densidades de 1.000 a 15.000 células em poços recobertos com agarose nas concentrações 1,0% e 1,5% (m/v). Após 4 e 7 dias de incubação, as placas foram visualizadas sob microscópio óptico e os poços fotografados. Três experimentos independentes foram realizados para cada concentração de gel.

Na figura 11 estão apresentados os resultados obtidos com o gel de agarose a 1,0% (m/v). É possível observar que no 4º dia de incubação, as células encontram-se mais dispersas, como suspensão de células únicas, em poços com densidades <8.000, enquanto nos demais, ocorre centralização das mesmas, formando agregados frouxos – de acordo com a classificação de Froehlich e colaboradores (2016), adaptada de Ivascu e Kubbies (2007). A incubação total de 7 dias, permitiu maior aglomeração celular, mas não foi suficiente para a geração de esferoides únicos e compactos nas densidades testadas, uma vez que com auxílio de uma micropipeta, os aglomerados eram facilmente desfeitos. Resultados semelhantes foram obtidos nos ensaios com agarose a 1,5% (m/v) e podem ser visualizados na figura 12.

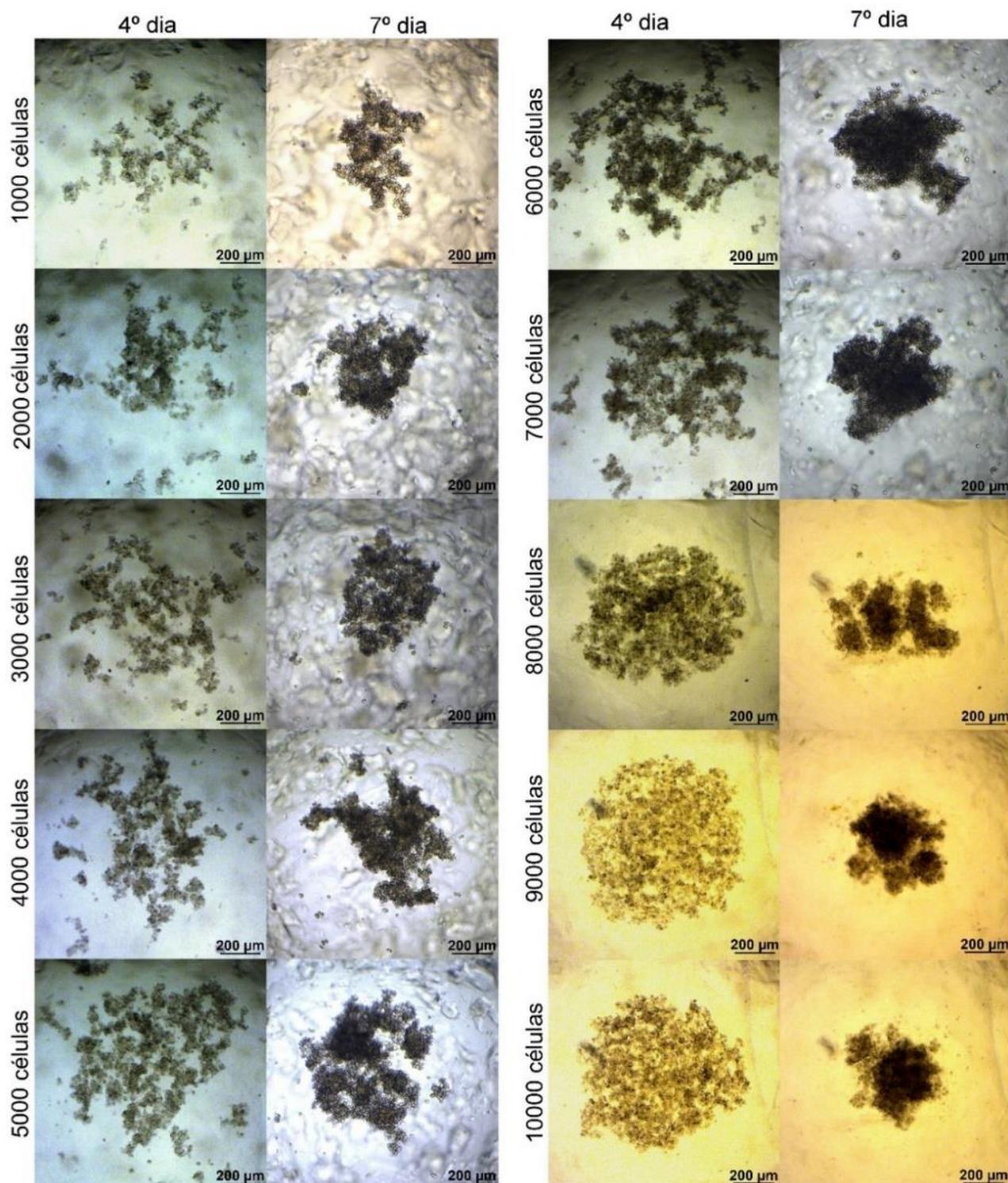


Figura 11. Avaliação do crescimento e da morfologia das células de MDA-MB-231 sobre gel de agarose a 1,0% (m/v). As imagens representam o mesmo poço, para cada densidade, no 4º e 7º dia de cultivo. Apesar da agregação celular visualizada no 7º dia, não foi observada formação de esferoides nas condições testadas e os resultados foram similares para todos os poços. Escala: 200µm.

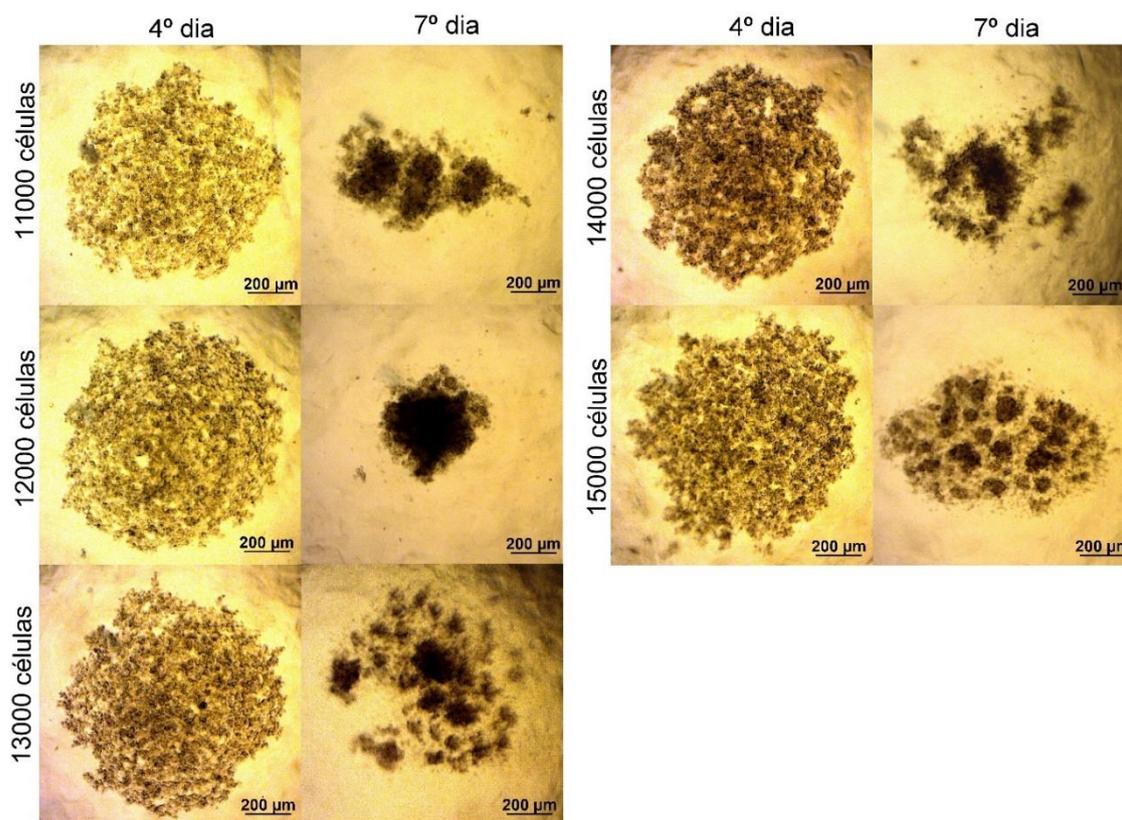


Figura 11 (cont.). Avaliação do crescimento e da morfologia das células de MDA-MB-231 sobre gel de agarose a 1,0% (m/v). As imagens representam o mesmo poço, para cada densidade, no 4º e 7º dia de cultivo. Apesar da agregação celular visualizada no 7º dia, não foi observada formação de esferoides nas condições testadas e os resultados foram similares para todos os poços. Escala: 200µm.

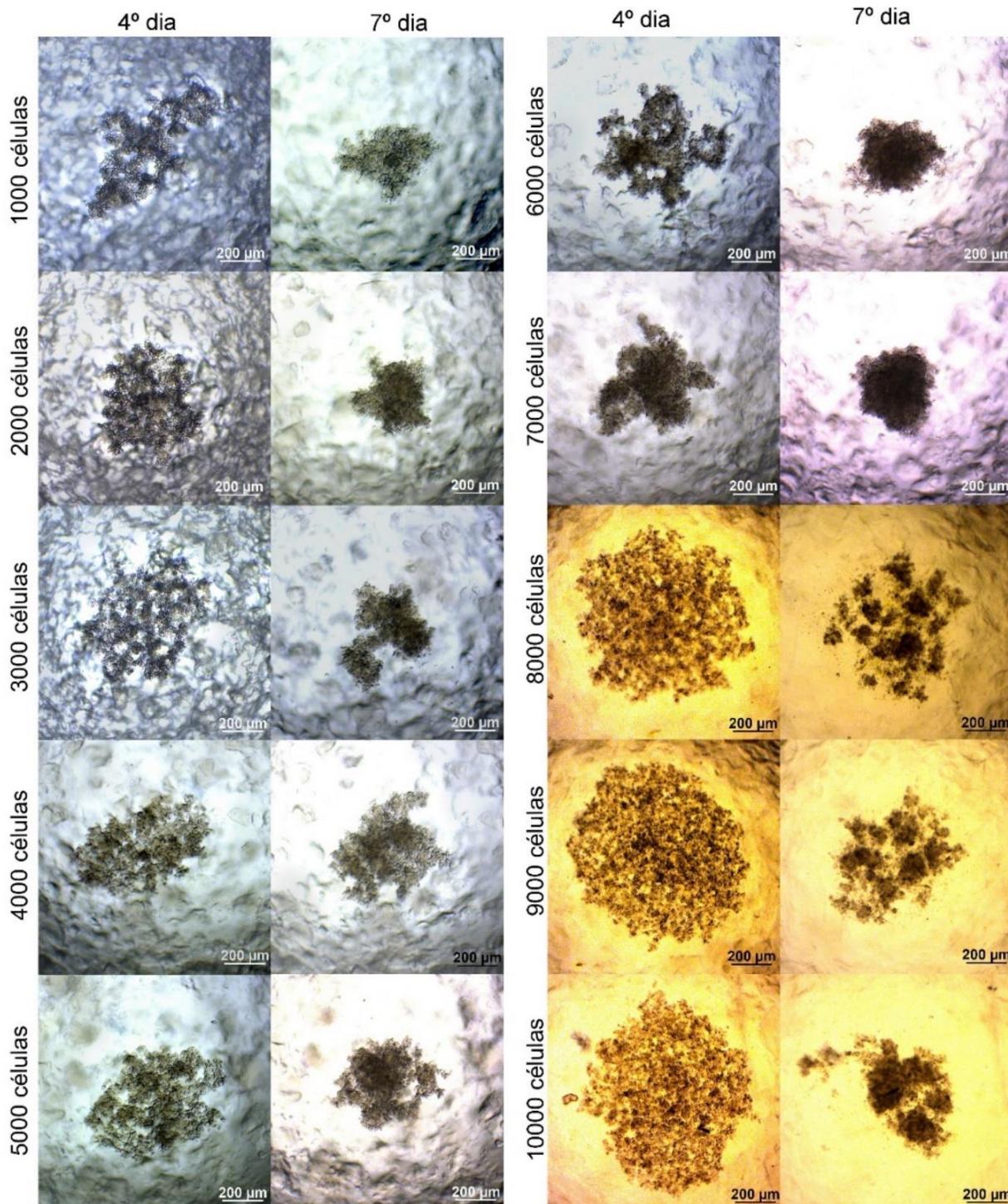


Figura 12. Avaliação do crescimento e da morfologia das células de MDA-MB-231 sobre gel de agarose a 1,5% (m/v). As imagens representam o mesmo poço, para cada densidade, no 4º e 7º dia de cultivo. Apesar da agregação celular visualizada no 7º dia, não foi observada formação de esferoides nas condições testadas e os resultados foram similares para todos os poços. Escala: 200µm.

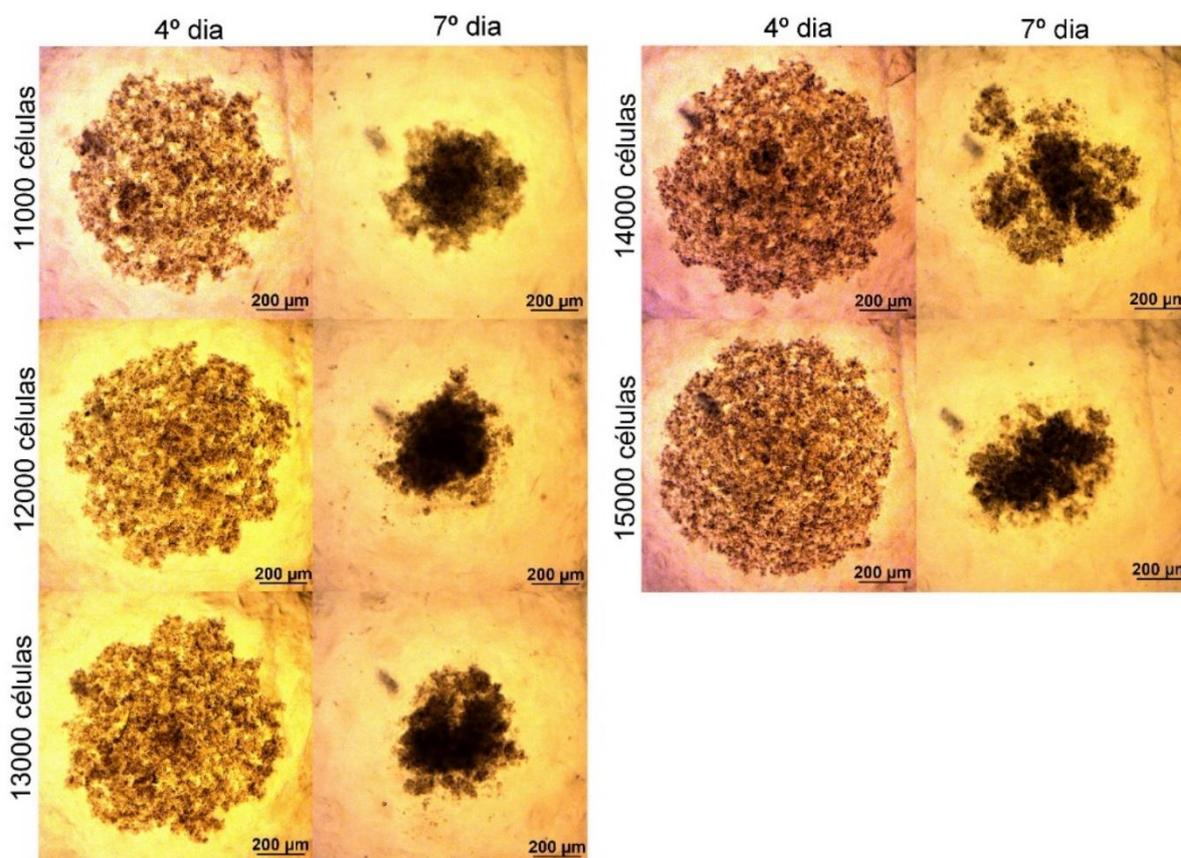


Figura 12 (cont.). Avaliação do crescimento e da morfologia das células de MDA-MB-231 sobre gel de agarose a 1,5% (m/v). As imagens representam o mesmo poço, para cada densidade, no 4º e 7º dia de cultivo. Apesar da agregação celular visualizada no 7º dia, não foi observada formação de esferoides nas condições testadas e os resultados foram similares para todos os poços. Escala: 200µm.

Vinci e colaboradores (2012), ao utilizarem a classificação morfológica dos esferoides proposta por Ivascu e Kubbies (2007), citam MDA-MB-231 como exemplo de linhagem celular cujas estruturas em cultivo 3D se enquadram na classificação de “agregados compactos”. De forma semelhante, Lemos e colaboradores (2019) em seus experimentos, verificaram a formação desses agregados compactos a partir das células da linhagem supracitada (6.000 células/poço) – por meio da utilização de agarose 1,5% (m/v) para recobrir placas de 96 poços. Diferentemente dos resultados dos estudos supracitados, nas condições testadas no presente trabalho não se verificou a formação de agregados compactos, apenas “agregados frouxos”.

Com a finalidade de verificar se um período de incubação mais longo possibilitaria alguma mudança no perfil observado, novos plaqueamentos foram realizados e o tempo de permanência em estufa de CO₂ foi estendido para 12 dias.

Após 4, 7 e 12 dias de cultivo os poços foram observados sob microscopia óptica, com adição de meio de cultura fresco no 7º dia.

Os resultados foram similares aos anteriores, com formação de agregados frouxos no 7º dia para as duas concentrações de agarose. Entretanto, a incubação adicional por 5 dias não culminou na compactação desses aglomerados e um crescimento celular de forma radial foi observado (figura 13).

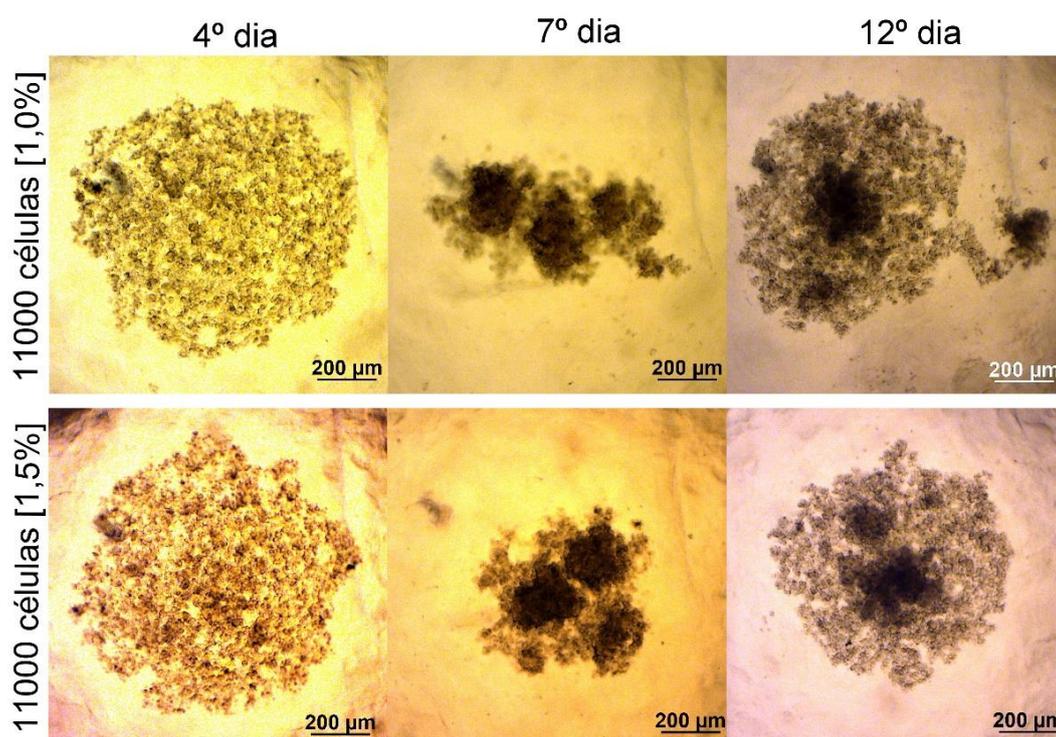


Figura 13. Avaliação do crescimento e da morfologia das células de MDA-MB-231 sobre gel de agarose a 1,0% e 1,5% (m/v). As imagens representam o mesmo poço, em cada condição, no 4º, 7º e 12º dia de cultivo. Pode-se observar uma aglomeração no 7º dia e um crescimento de forma radial no 12º dia, não havendo formação de esferoide. Resultados semelhantes foram obtidos em todas as densidades. Os experimentos foram realizados em duplicata. Escala: 200µm.

Em discordância com os resultados obtidos no presente trabalho, alguns estudos demonstraram a capacidade de formação espontânea de esferoides por células da linhagem MDA-MB-231, através do método de sobreposição líquida (BOO *et al.*, 2017; BAYRAM *et al.*, 2017). Porém, enquanto no trabalho de Boo e colaboradores foram utilizadas placas de 96 poços recobertas com ágar a 1,0% (m/v), Bayram e colaboradores fizeram uso de ágar a 1,5% ((m/v) em meio RPMI-SFB), em

placas de 6 poços. Neste, o número de células plaqueadas por poço foi de 5×10^5 , e naquele, a densidade escolhida foi de 50.000 células.

Em contraste a esses relatos, outros autores concluem que células de MDA-MB-231 não se organizam espontaneamente para gerar esferoides únicos e compactos (ROBERTS *et al.*, 2016; IVASCU & KUBBIES *et al.*, 2007; BADEA *et al.*, 2019, VINCI *et al.*, 2012). Em consonância ao presente estudo, Nagelkerke e colaboradores (2013), ao seguirem o protocolo proposto por Friedrich e colaboradores (2009) relataram que as células da linhagem em questão não originaram esferoides com o grau de compactação almejado, e uma vez que apenas “agregados frouxos” foram obtidos, optaram então por testar outro protocolo.

Ivascu e Kubbies (2006), com o objetivo de padronizar a geração de esferoides únicos pelo método de sobreposição líquida para 8 linhagens de câncer de mama, utilizaram placas de 96 poços recobertas com 50 μ l de poly-HEMA (0.5% (v/v) em 95% etanol) e suspensão celular nas densidades de 5.000 e 10.000 células/poço. Em seus resultados, a linhagem MDA-MB-231, assim como MDA-MB-468, SK-BR-3 e MDA-MB-361, formaram apenas “agregados frouxos” após 24 horas – sendo esse perfil mantido após 14 dias de cultivo. Com uma micropipeta, foi possível desfazer mecanicamente as estruturas formadas, o que pode ser explicado pelas fracas interações célula-célula estabelecidas por essas linhagens.

Stadler e colaboradores (2018), por sua vez, estudaram subpopulações de células que perderam a capacidade original de formar esferoides espontaneamente (referidas como *non-spheroid forming cells*), isoladas a partir de três linhagens de câncer colorretal. Em seus ensaios, os autores verificaram que a falta de interação célula-célula apresentada pelas mesmas, é resultado da perda de moléculas de adesão, como E- e P-caderina, e α -catenina. Ademais, o *knockdown* de E-caderina em células de quatro linhagens de câncer colorretal, também resultou na perda da habilidade de formação de esferoides (STADLER *et al.*, 2018). Similarmente, Smyrek e colaboradores (2019) e Lin e colaboradores (2006), ao bloquearem, respectivamente, a função da referida molécula em linhagens de câncer hepatocelular e de mama, observaram a incapacidade dessas células de gerar esferoides compactos.

De fato, MDA-MB-231 é conhecida por não expressar E-caderina, devido a uma hipermetilação do promotor de seu gene (AMIRABADI *et al.*, 2019). A E-caderina é uma importante molécula de adesão celular presente principalmente em células epiteliais e a diminuição de seus níveis é frequentemente associada com a transição epitélio-mesênquima (EMT) (VAN ROY, 2014; SINGHAI *et al.*, 2011). Durante a EMT, as células perdem características epiteliais, incluindo a expressão de proteínas que promovem contato célula-célula, como E-caderina e ocludina, e adquirem aspectos mesenquimais, a citar o aumento de vimentina e N-caderina, além da mudança de sua morfologia, tornando-se mais fusiforme (TAYLOR; PARVANI; SCHIEMANN, 2010; KO *et al.*, 2019; POWAN *et al.*, 2017; PASTUSHENKO & BLANPAIN, 2019). A ativação inapropriada do processo de EMT possui um importante papel na patologia do câncer, incluindo a invasão e metástase em tumores da mama (TAYLOR; PARVANI; SCHIEMANN, 2010).

Um estudo de Huang, Yu e Tang (2020), demonstrou que células MDA-MB-231, quando cultivadas em cultura 3D, além de não expressarem E-caderina, sofrem um aumento significativo de N-caderina, quando comparadas à cultura 2D (HUANG; YU; TANG, 2020). Esse perfil mesenquimal poderia explicar a dificuldade na geração espontânea de esferoides compactos pela linhagem (LEMOS *et al.*, 2019).

Outros trabalhos mencionam que MDA-MB-231 não é capaz de gerar esferoides sem adição elementos de ECM, como por exemplo, Matrigel® e Geltrex® (membrana basal reconstituída) (DUBOIS *et al.*, 2017; FROEHLICH *et al.*, 2016; BADEA *et al.*, 2019, VINCI *et al.*, 2012). Corroborando com essas observações, Ivascu e Kubbies em 2007 demonstraram que, na presença de proteínas de matriz extracelular, ocorre a compactação dos agregados formados pelas células de MDA-MB-231, exclusivamente pela interação entre a ECM no meio e a integrina $\beta 1$ celular (IVASCU & KUBBIES, 2007).

Sendo assim, diante do exposto e da dificuldade de se obter esferoides espontaneamente com a linhagem, optou-se por manter o protocolo de sobreposição líquida com agarose, porém, testar se a adição de membrana basal reconstituída ao meio de cultura facilitaria a formação dos mesmos.

4.1.2 MCF-7

Para a linhagem de câncer de mama MCF-7, densidades de 5.000, 10.000, 15.000, 20.000 e 50.000 células por poço foram adicionadas em placas com agarose a 1,0% e 1,5% (m/v), em triplicatas.

Ambas as concentrações de gel testadas foram eficientes para a formação de esferoides compactos, após 4 e 7 dias de cultivo em todas as densidades (figura 14). Verificou-se ainda que esferoides gerados a partir de 20.000 células apresentaram grande variabilidade em sua morfologia, em comparação às densidades menores, que geram esferoides com formas homogêneas. Esse perfil pode ser visualizado na figura 15.

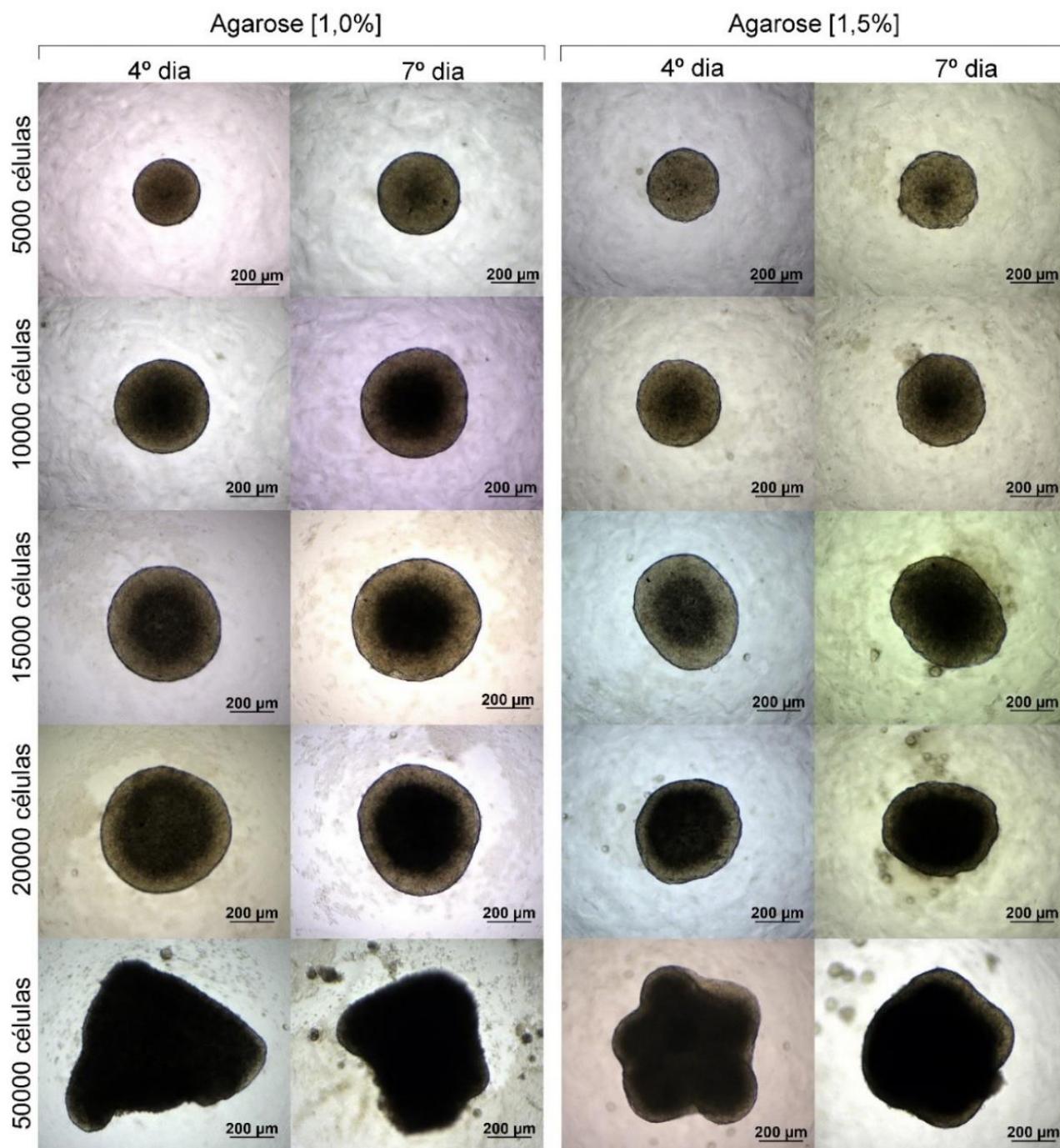


Figura 14. Avaliação do crescimento e da morfologia de células da linhagem MCF-7 sobre gel de agarose nas concentrações 1,0% e 1,5% (m/v). As imagens representam o mesmo poço, em cada condição, no 4º e 7º dia de cultivo. É possível observar que em ambas concentrações de agarose, esferoides únicos e compactos foram gerados, em todas as densidades. Escala: 200µm.

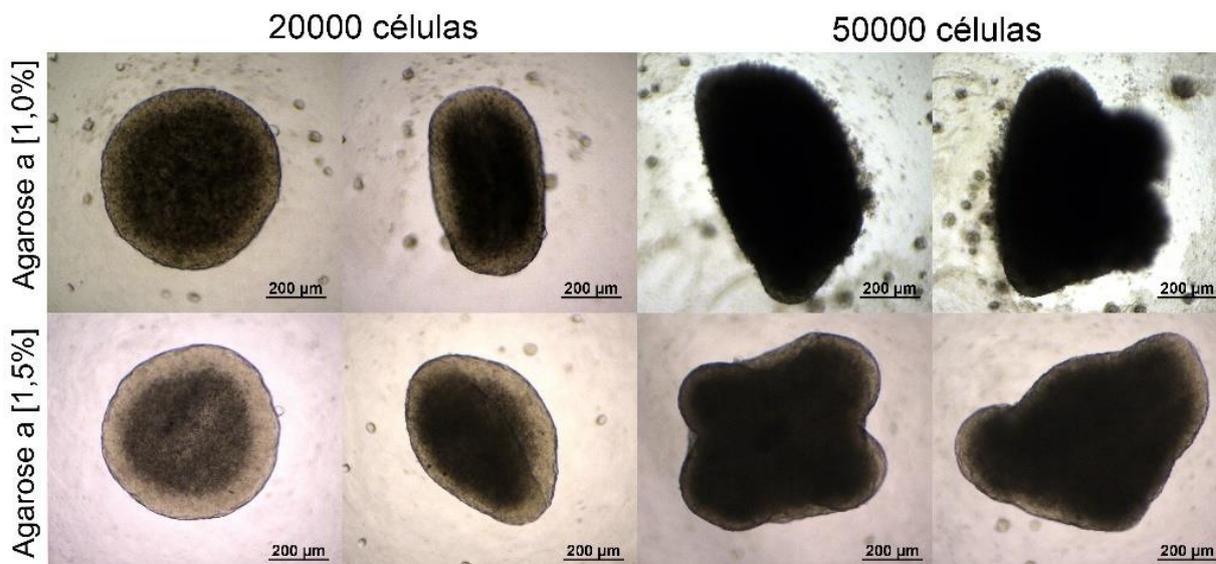


Figura 15. Esferoides de células MCF-7 sob gel de agarose 1,0% e 1,5% (m/v) com morfologias variáveis em densidades ≥ 20.000 . As imagens foram obtidas após 4 dias de cultivo. Escala: 200 μm .

A técnica de sobreposição líquida com agarose é largamente empregada na formação espontânea de esferoides para várias linhagens de células tumorais, a citar: tumor neuroendócrino H727 (WANG *et al.*, 2018), câncer de cólon humano HT-29 (RAHMAN *et al.*, 2021) e HCT116 (LI & HUMMON, 2011) e câncer de ovário HEY; OVHS1 (SHIELD *et al.*, 2007), A2780 e CAO-3 (XING *et al.*, 2005).

No estudo de Lemos e colaboradores (2019), utiliza-se agarose na concentração 1,5% (m/v) para obtenção de esferoides com a linhagem MCF-7, sem a adição de componentes de ECM. Outros autores, como Ho e colaboradores (2012) e Yakavets e colaboradores (2020), por sua vez, demonstram a capacidade da linhagem de formar esferoides únicos e compactos ao ser cultivada em placas de 96 poços recobertas com agarose a 1,0% (m/v).

Em congruência com a literatura, os resultados do presente estudo verificaram o sucesso de ambas as concentrações testadas. Entretanto, embora a concentração de 1,5% (m/v) tenha possibilitado a formação de esferoides, observou-se que essa condição não gerou resultados reprodutíveis e consistentes. Mesmo após centrifugação das placas, a homogeneidade na formação dos mesmos não foi alcançada em todos os poços (figura 16 a – c). Em alguns deles, foi possível verificar a presença de múltiplos esferoides, com tamanhos distintos (16b). A formação de esferoides múltiplos, por técnicas como a utilizada no presente trabalho, não é

aconselhada para estudos cujo objetivo é a avaliação de novas drogas, devido à dificuldade de produzir esferoides de tamanhos e morfologias uniformes (BADEA, *et al.*, 2019). Estas são importantes propriedades que podem afetar a reprodutibilidade dos resultados experimentais (HAN; KWON; KIM, 2021).

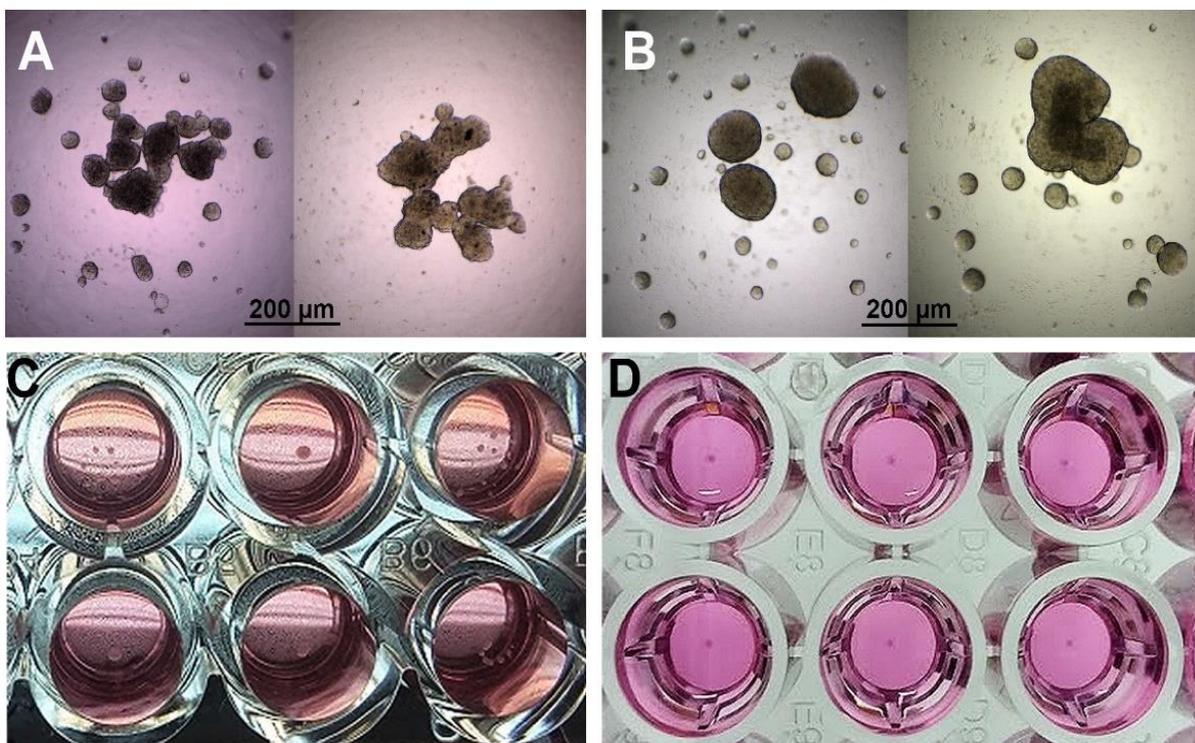


Figura 16. A e B: Densidades 5.000 e 10.000 células/poço, respectivamente, em placas com agarose a 1,5% (m/v) após 4 e 7 dias de cultivo. Pode-se observar que múltiplos pequenos esferoides foram formados. C: Visualização macroscópica de formação inconsistente de esferoides com gel a 1,5% (m/v). D: Visualização macroscópica da formação homogênea de esferoides com gel a 1,0% (m/v).

Sendo assim, uma vez que em gel de agarose a 1,0% (m/v), esferoides únicos foram obtidos com maior grau de reprodutibilidade por toda a placa (figura 12d), essa concentração foi escolhida para a realização dos experimentos de citotoxicidade.

Os esferoides foram então avaliados quanto ao diâmetro médio nas cinco densidades previamente descritas para a linhagem MCF-7. Na tabela 2 estão representados todos as medidas obtidas, descritas como média \pm desvio padrão de 10 esferoides por condição. Para melhor visualização, os dados foram graficamente apresentados na figura 17.

Tabela 2. Diâmetro médio dos esferoides de MCF-7 gerados em protocolo de sobreposição líquida com agarose a 1,0% (m/v) após 4 e 7 dias de incubação.

Densidade celular/poço	Diâmetro médio (μm)	
	4º dia de cultivo	7º dia de cultivo
5.000	329.01 \pm 13.31	417.10 \pm 19.34
10.000	408.38 \pm 6.60	484.80 \pm 32.03
15.000	494.86 \pm 19.33	527.04 \pm 35.73
20.000	536.14 \pm 50.40	537.75 \pm 42.51
50.000	686.51 \pm 96.26	742.20 \pm 50.81

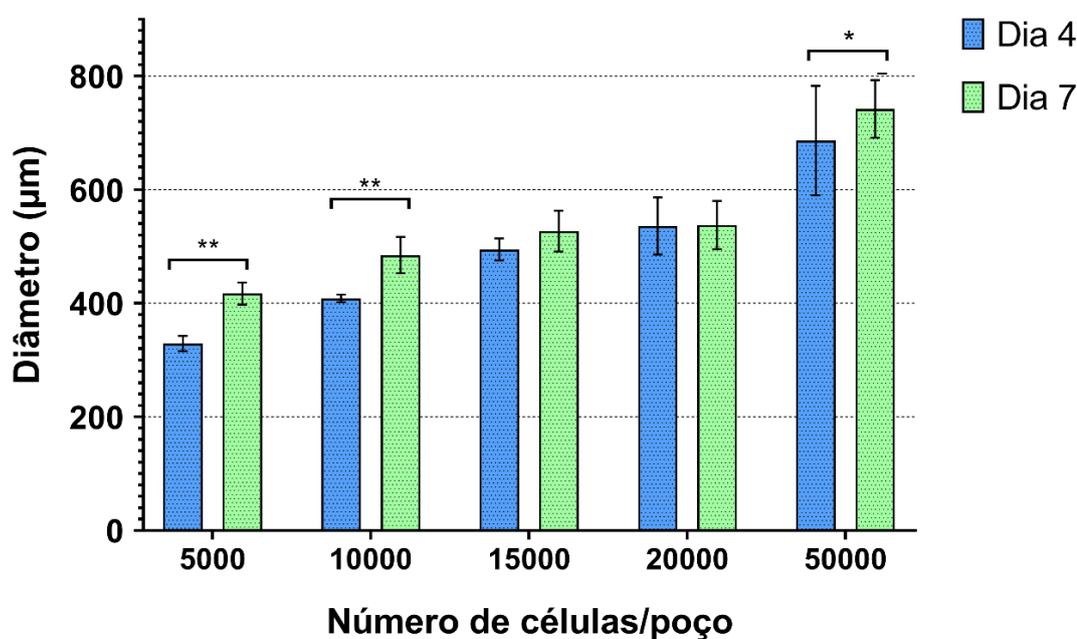


Figura 17. Diâmetro médio dos esferoides de MCF-7 gerados em protocolo de sobreposição líquida com agarose a 1,0% (m/v). Os dados representam média \pm desvio padrão de 10 esferoides após 4 e 7 dias de incubação. Teste de ANOVA de duas vias de medidas repetidas, com *post hoc* de Bonferroni. ** $p < 0.01$ e * $p < 0.05$ representam a comparação do diâmetro dos esferoides de uma mesma densidade nos diferentes dias de incubação.

O diâmetro médio dos esferoides é diretamente proporcional ao número de células plaqueadas ($F [4,5] = 627.9$, $p < 0.0001$) e ao tempo de incubação ($F [1, 5] = 117.8$, $p = 0.0001$). Tais diferenças eram esperadas, haja vista que ao longo dos dias de incubação as células se adaptaram e entraram em divisão celular, promovendo o aumento do diâmetro dos esferoides. Após 4 dias de cultivo, plaqueamentos em

densidades de 10.000 células/poço deram origem a esferoides com diâmetro médio próximo a 400 μm – perfil também alcançado para a densidade de 5.000 células, após 7 dias de incubação. O plaqueamento de densidades mais altas acarreta na formação de estruturas com diâmetro superior a 500 μm .

Os dados relatados confirmam os achados de Seyfoori e colaboradores (2018), nos quais foi demonstrado que o aumento do número de células plaqueadas, assim como o tempo de cultivo, acarreta na elevação proporcional do diâmetro dos esferoides de MCF-7 e U87 (linhagem de glioblastoma humano). Semelhantemente, Gong e colaboradores (2015) também relatam que o diâmetro dos esferoides de MCF-7 aumenta de maneira proporcional à densidade celular.

O tamanho dos esferoides gerados está relacionado com a cinética de crescimento inerente às células de cada linhagem, assim como o tempo de incubação e a densidade escolhida para os plaqueamentos iniciais (NATH & DEVI, 2016). Sendo assim, o diâmetro alcançado é passível de controle pelo próprio pesquisador (ZANONI *et al.*, 2016) e, portanto, essa variável deve ser bem definida no início dos estudos, de acordo com o interesse e necessidade – uma vez que o estado patofisiológico dos esferoides depende de seu tamanho (WEN *et al.*, 2013).

Micro-esferoides <200 μm , por exemplo, gera um ambiente com condições normóxicas e consiste basicamente de células em altas taxas proliferativas, sendo essas características já demonstradas pelos pioneiros no desenvolvimento de esferoides (FREYER & SUTHERLAND, 1986; MUELLER-KLIESER; FREYER; SUTHERLAND, 1986). Essa condição, é suficiente para representar, basicamente, as interações célula-célula e célula-matriz presentes no organismo (HAMILTON & RATH, 2019; WANG *et al.*, 2013).

Em esferoides com tamanhos a partir de 200 μm , por sua vez, uma arquitetura heterogênea começa a se desenvolver, com células em divisão celular na periferia circundando células quiescentes, além do estabelecimento de gradientes de pH, oxigênio, nutrientes e metabólitos – perfil muito similar aos tumores encontrados *in vivo* (DÄSTER *et al.*, 2017; HAMILTON & RATH, 2019; MILLARD *et al.*, 2017; ZANONI *et al.*, 2016; GONG *et al.*, 2015).

A literatura relata que os esferoides são particularmente análogos a pequenos tumores avasculares, com difusão limitada a 105-200 μm para diferentes moléculas, especialmente o oxigênio (LIN & CHANG, 2008; CUI; HARTANTO; ZHANG, 2017; MA *et al.*, 2012; RAGHAVAN *et al.*, 2016). Esferoides maiores (>500 μm) que excedem esse limite de difusão do O_2 , geralmente apresentam uma camada de 100-300 μm de células viáveis e um núcleo necrótico central, aproximando o modelo a regiões tumorais pouco vascularizadas (FRIEDRICH; EBNER; KUNZ-ZCHUGHART, 2007; HIRSCHHAEUSER *et al.*, 2010). Adicionalmente ao estado fisiopatológico, o tamanho é uma variável importante por interferir na penetração e transporte de drogas (HAMILTON & RATH, 2019).

Nos tumores *in vivo*, o desbalanço do suprimento sanguíneo leva ao surgimento de regiões hipóxicas, que apesar da toxicidade tanto para células normais quanto cancerosas, essas últimas podem sofrer mudanças adaptativas e genéticas que permitam sua sobrevivência (HARRIS *et al.*, 2002; CHOI *et al.*, 2011). Um componente chave para essa adaptação é a ativação do fator 1 induzido por hipóxia (HIF-1) (HARRIS *et al.*, 2002; DOUBLIER *et al.*, 2012). Na ausência de oxigênio, a subunidade HIF-1 α é estabilizada, interage com HIF-1 β e ativa a transcrição de genes de resposta à hipóxia, tais como, o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), ativando angiogênese; o transportador de glicose 1 (GLUT-1) e eritropoetina, que por sua vez, promove a eritropoiese (HARRIS *et al.*, 2002).

O estudo de Tian e colaboradores (2010) demonstrou que células tumorais HeLa, sob condições de hipóxia, apresentam aumento da expressão de HIF-1 α em esferoides, mas não quando cultivadas em monocamada. Outros autores relatam que a formação de esferoide por MCF-7 também acarreta, como adaptação à baixa $p\text{O}_2$, na ativação de HIF-1 α , na sua translocação para o núcleo e consequente aumento da expressão dos genes VEGF, PDK1 e PGK1 (esses dois últimos codificando enzimas da via glicolítica e da conversão de piruvato a acetil-coA) (ZENG *et al.*, 2015). Como resultado de altos níveis de HIF-1, esferoides de MCF-7 apresentaram elevada resistência quando tratadas com Doxorubicina (DOUBLIER *et al.*, 2012).

De fato, o núcleo necrótico de esferoides com gradiente significativo de oxigênio pode acarretar em mudanças celulares que levam à resistência a drogas (FISHER & RAO, 2020). Entretanto, o uso de esferoides >500 μm com as

características mencionadas, torna as condições fisiopatológicas complexas e de difícil controle (LABARBERA; REID; YOO, 2012; FRIEDRICH *et al.*, 2009). A utilização de grandes esferoides, com núcleo necrótico, para ensaios de citotoxicidade pode acarretar em resultados de viabilidade alterados – nos quais o efeito da droga pode não ser aparente devido a morte celular já causada pelas condições hipóxicas (SINGH *et al.*, 2020).

Zanoni e colaboradores, em 2016, discutiram sobre as dificuldades existentes na padronização de protocolos para formação de esferoides regulares de forma reprodutível. Não só a técnica de cultivo 3D é relevante, mas também a escolha do método para avaliar o efeito citotóxico induzido por diferentes tratamentos. Essa etapa é um dos pontos críticos a serem considerados, uma vez que o tamanho do esferoide pode interferir na penetração da solução reagente/corante e inclusive, prejudicar a detecção do sinal por distorção e espalhamento da luz, causada pela grande massa celular – em casos de métodos fluorescentes e luminescentes (ZANONI *et al.*, 2016).

Por outro lado, esferoides com essas propriedades podem ser empregados na investigação das alterações sofridas pelas células tumorais em condições hipóxicas, além dos mecanismos envolvidos na resistência à fármacos (GUYON *et al.*, 2020; LABARBERA; REID; YOO, 2012; FRIEDRICH *et al.*, 2009). Ademais, outro exemplo de utilização são estudos com pró-fármacos que são ativados em ambiente hipóxico, trazendo vantagem de seres mais seletivos em relação a tecidos saudáveis (MISTRY *et al.*, 2017).

Haja vista os dados apresentados, a padronização da densidade celular no presente estudo foi realizada objetivando gerar esferoides únicos, com diâmetro aproximado de 400 μm , condição suficiente para o estabelecimento de gradientes fisiológicos para pH, nutrientes, oxigênio e metabólitos, além de maior facilidade no que diz respeito ao controle das condições experimentais (SEYFOORI *et al.*, 2018; HIRSCHHAEUSER *et al.*, 2010; LV *et al.*, 2017; FRIEDRICH *et al.*, 2009). No entanto, estudos futuros envolvendo técnicas como imuno-histoquímica deverão ser realizados com os esferoides no intuito de visualizar a arquitetura e a organização 3D das células, bem como verificar se de fato a condição escolhida de 400 μm permite o estabelecimento dos gradientes mencionados, sem formação de núcleo necrótico.

Importante ressaltar que, além do diâmetro, a geometria esférica também é um fator crítico para o uso racional dos esferoides em testes com drogas antitumorais, uma vez que esses fatores podem afetar diretamente a resposta das células ao tratamento. A padronização de protocolos para obtenção de esferoides com estrutura tridimensional bem definida e geometria uniforme é necessária, não somente para que os gradientes patofisiológicos sejam desenvolvidos, mas para que os resultados sejam reprodutíveis, consistentes e passíveis de serem realizados em larga escala (HIRSCHHAEUSER *et al.*, 2010).

Portanto, considerando que densidades a partir de 20.000 células podem gerar esferoides com morfologias heterogêneas e que o diâmetro adequado foi alcançado a partir do plaqueamento com 10.000 células/poço no menor tempo de cultivo (4 dias), essa última foi utilizada para os ensaios de citotoxicidade.

4.2 PADRONIZAÇÃO DO PROTOCOLO DE CULTURA 3D COM GELTREX[®]

O segundo protocolo de cultura 3D testado também faz parte da técnica de sobreposição líquida, em que é utilizado um material não adesivo que impede as células de aderirem ao fundo das placas. Entretanto, é realizada a adição de ECM ao meio de cultura, como Geltrex[®] ou Matrigel[®], tendo como função mimetizar a membrana basal *in vivo*. Por conseguinte, a presença desses aditivos no meio permite a geração de um ambiente tridimensional que pode afetar o comportamento celular e refletir com mais acurácia a arquitetura dos tecidos no organismo. Além disso, por serem matrizes derivadas de material biológico, seus componentes podem ser capazes de ativar cascatas de sinalização intracelulares que controlam, por exemplo, a resposta das células a drogas (LEE; CUDDIHY; KOTOV, 2008; GURSKI, *et al.*, 2010).

Objetivando a formação de esferoides únicos e compactos por poço, em placas de 96 poços, de forma reprodutível e que possam ser manipulados por pipetagem sem danos à sua estrutura física (VINCI *et al.*, 2012), foi realizada a padronização da concentração de Geltrex[®] a ser incorporada ao meio de cultura, bem como a densidade de células ideal para geração de esferoides com diâmetro médio de 400 μm .

4.2.1 MDA-MB-231

Após o insucesso para a geração espontânea de esferoides com a linhagem, através do protocolo de sobreposição líquida com agarose, avaliou-se a adição de membrana basal reconstituída ao meio de cultura para facilitar a formação das estruturas celulares tridimensionais (VINCI *et al.*, 2012).

Para tanto, as células da linhagem foram plaqueadas nas densidades de 2.000 e 8.000 células por poço, em 200µl de meio de cultura + Geltrex[®] diluído (a 1,5% ou 2,0% v/v) – adicionado no dia 0 do plaqueamento ou 24 horas depois (dia 1). Após incubação por 4 e 7 dias, as placas foram visualizadas sob microscópio óptico e os poços fotografados. Três experimentos independentes foram realizados para cada condição.

Verificou-se que quando o Geltrex[®] é incorporado ao meio de cultura logo após a adição das células aos poços, não há formação de esferoide em nenhuma das densidades escolhidas para os ensaios, apenas suspensões de células únicas. Como pode ser observado na figura 18, as células permanecem dispersas ao longo dos poços independentemente do tempo de incubação, formando a chamada suspensão de células únicas (FROEHLICH *et al.*, 2016).

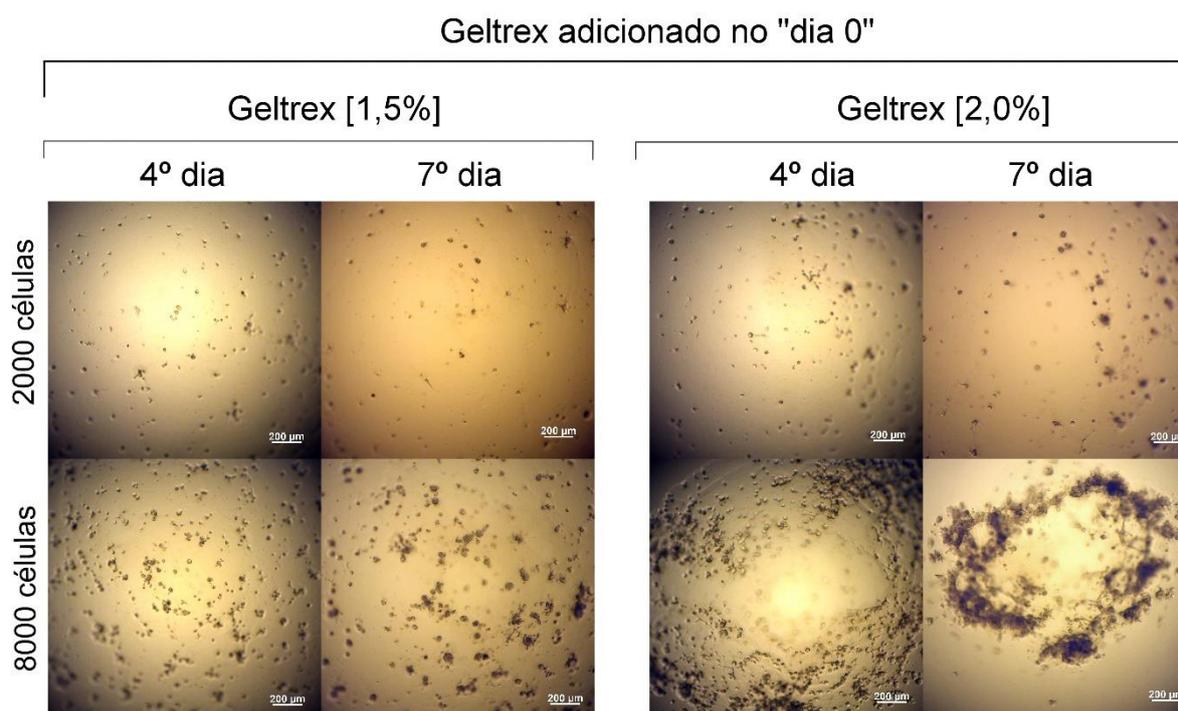


Figura 18. Avaliação do crescimento e da morfologia de células da linhagem MDA-MB-231 com adição de Geltrex[®] a 1,5% e 2,0% (v/v) imediatamente após o plaqueamento. Nenhum esferoide foi formado em nenhuma concentração de aditivo. As imagens representam o mesmo poço, em cada densidade, no 4º e 7º dia de cultivo. Escala: 200µm.

Entretanto, quando se adiciona Geltrex[®] 24 horas após o plaqueamento das células, esse comportamento não se repete. Nas duas densidades de células e concentração de aditivo avaliadas, há aglomeração celular no centro dos poços no 4º dia de cultivo – condição que se manteve até o 7º dia de incubação (figura 19). Apesar de a condição de 2.000 células/poço possibilitar a formação de aglomerados celulares, os mesmos não podem ser classificados como esferoides, mas sim agregados compactos, de acordo com a definição de Froehlich e colaboradores (2016).

A densidade de 8.000 células/poço, por sua vez, foi capaz de formar esferoides únicos e compactos nas duas concentrações de aditivo testadas, perfil que também pode ser observado na figura 19.

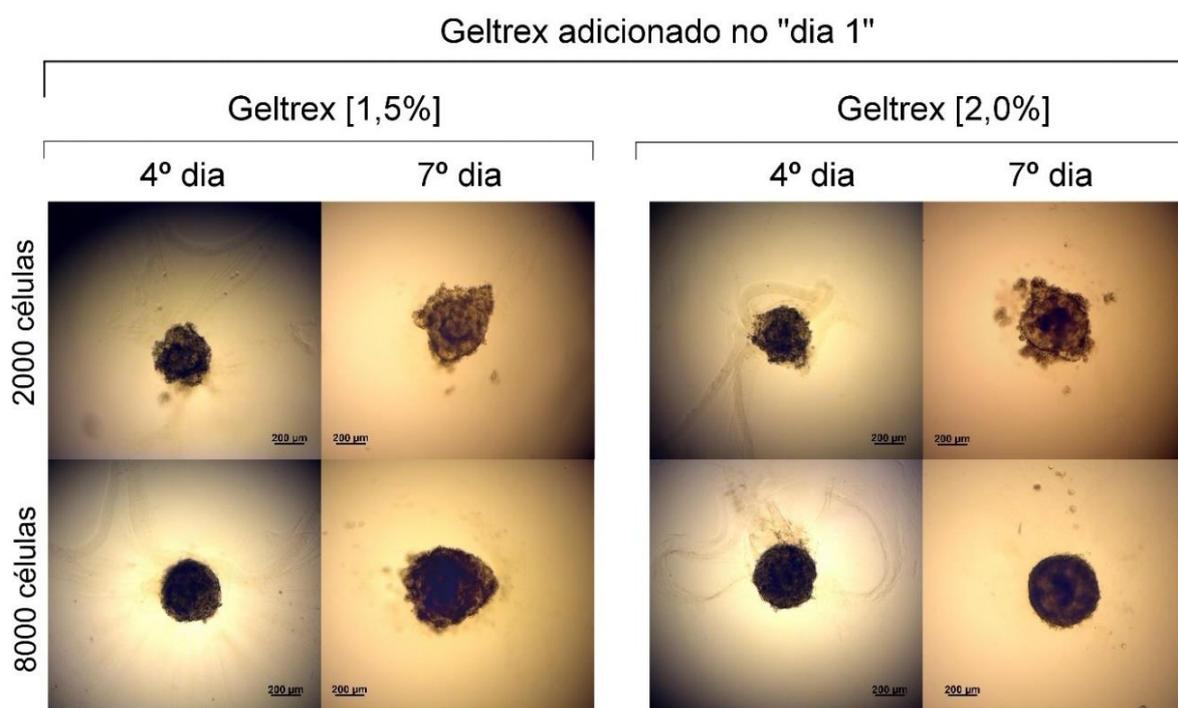


Figura 19. Avaliação do crescimento e da morfologia de células da linhagem MDA-MB-231 com adição de Geltrex[®] a 1,5% e 2,0% (v/v) 24 horas após o plaqueamento. A adição do mesmo ocorreu 24 horas após o plaqueamento. É possível observar que, nas duas concentrações de aditivo testadas, apenas a densidade de 8.000 células foi capaz de formar esferoides únicos e compactos. As imagens representam o mesmo poço, em cada densidade, no 4º e 7º dia de cultivo. Escala: 200µm.

Os resultados demonstram que, não somente a presença de Geltrex[®], mas também o momento em que o mesmo é incorporado aos poços, foi determinante para formação de esferoides tumorais multicelulares para a linhagem em questão. O mesmo foi observado por Dubois e colaboradores (2017), ao testarem a adição de diferentes concentrações de Geltrex[®] no mesmo dia (0) ou no dia seguinte (1) ao plaqueamento das linhagens de câncer de mama SUM1513 e MDA-MB-231. Os autores verificaram que a concentração de 2,0% (v/v) de Geltrex[®], adicionada 24 horas após o plaqueamento, foi a condição ideal para formação de esferoides para ambas as linhagens de câncer de mama triplo-negativo mencionadas (DUBOIS *et al.*, 2017). Gomes e colaboradores (2019) também alcançaram resultados satisfatórios ao acrescentar 4% (v/v) de Matrigel[®] ao meio, 48 horas após o plaqueamento das células.

A avaliação da presença de membrana basal reconstituída na formação de esferoides únicos para a linhagem de MDA-MB-231 também foi realizada por Badea

e colaboradores (2019). Em seus experimentos, verificou-se que densidades de 2.500, 5.000 e 8.000 células, em placas de ultra baixa adesão (96 poços), formam esferoides apenas com a utilização de 2,5% (v/v) de Matrigel[®]. Agregados compactos, cujas bordas irregulares e tamanhos aumentaram com o tempo de cultivo, foram obtidos na ausência do mesmo (BADEA *et al.*, 2019). Num estudo recente, Keller e colaboradores (2021) fazem a utilizações de esferoides da linhagem (4.000 a 8.000 células/poço) também através da utilização de placas de ultra baixa adesão, com adição de 2,5% (v/v) de Cultrex[®], membrana basal reconstituída fabricada pela Bio-Techne.

Outros autores, utilizando o protocolo de sobreposição líquida com agarose a 1,5% (v/v) em placas de 96 poços, observaram a formação de esferoides robustos ao cultivarem a linhagem na presença de 5,0% (v/v) de membrana basal reconstituída. Após 4 dias de cultivo, a densidade de 10.000 células/poço deu origem a esferoides com 500 µm de diâmetro médio (LI *et al.*, 2018). Nagelkelke e colaboradores (2013), através do uso de poly-HEMA para impedir a adesão celular às placas, obtiveram sucesso em gerar esferoides de MDA-MB-231, bem como MCF-7, pela adição de Matrigel[®] a 2,5% (v/v), – com plaqueamentos na mesma densidade celular descrita anteriormente.

Como mencionado no item 4.1.1, a linhagem em estudo é conhecida por apresentar dificuldade em formar esferoides na ausência de componentes de ECM. Em um estudo recente, Devanny, Vancura e Kaufman (2021), confirmaram os achados de Ivascu e Kubbies (2007), de que a formação de esferoides por MDA-MB-231 é mediada pela integrina $\beta 1$ – sem o envolvimento de E-caderina – e, portanto, só é possível pela incorporação de proteínas de matriz ao meio de cultivo. O bloqueio da ligação entre a integrina $\beta 1$ e matriz, através de anticorpos ou siRNA, leva a disrupção do processo de formação dos esferoides (DEVANNY; VANCURA; KAUFMAN, 2021). O mesmo perfil já havia sido reportado por outros autores em estudos anteriores (LOVITT; SHELPER; AVERY, 2018). Interessantemente, a interação entre integrinas e a ECM é geralmente considerada importante na promoção da invasão e migração celular – com papel oposto à E-caderina (LIN *et al.*, 2006).

Considerando então que a adição de Geltrex[®] após 24h dos plaqueamentos possibilitou a formação de esferoides para a maior densidade testada, o diâmetro

médio dos esferoides foi calculado com o auxílio do software *ImageJ* e os resultados apresentados na tabela 3 e na figura 20. As medidas representam a média \pm desvio padrão de 10 esferoides por condição (triplicatas), no 4^o e 7^o dia de cultivo.

Tabela 3. Diâmetro médio dos esferoides de MDA-MB-231 em protocolo de cultivo 3D. Os esferoides foram gerados em protocolo de sobreposição líquida com agarose a 1,0% (m/v) em meio de cultura acrescido de Geltrex[®] a 1,5% e 2,0% (v/v), e as medidas obtidas após 4 e 7 dias de incubação.

Diâmetro médio (μm)				
Densidade celular/poço	Geltrex [®] 1,5% (v/v)		Geltrex [®] 2,0% (v/v)	
	4 ^o dia de cultivo	7 ^o dia de cultivo	4 ^o dia de cultivo	7 ^o dia de cultivo
2.000	Não formou esferoide	Não formou esferoide	Não formou esferoide	Não formou esferoide
8.000	403.82 \pm 18.25	522.30 \pm 40.24	417.26 \pm 20.70	551.35 \pm 30.83

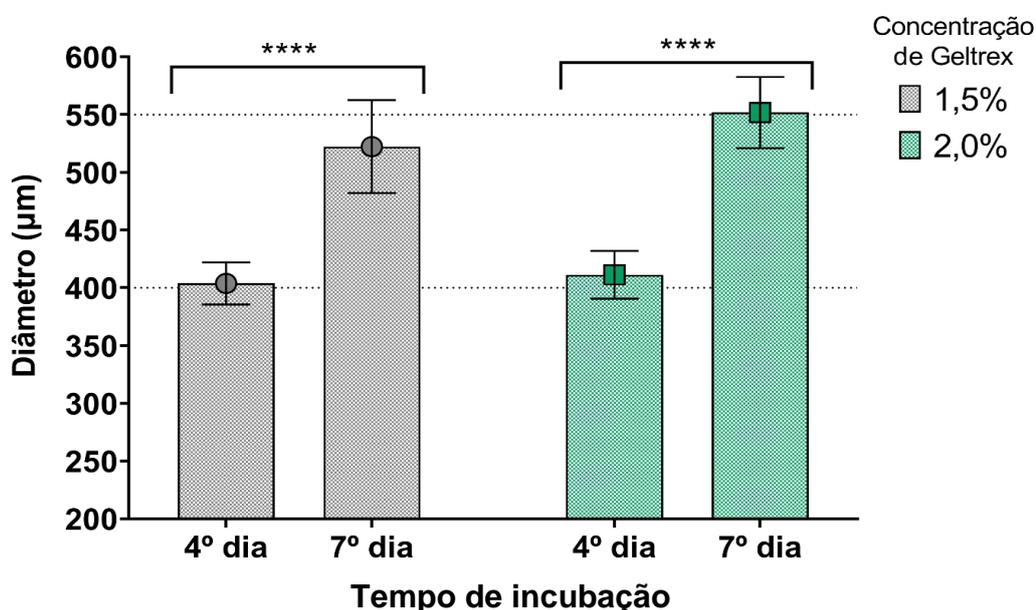


Figura 20. Diâmetro médio dos esferoides de MDA-MB-231 em protocolo de cultivo 3D. Foi utilizado o protocolo de sobreposição líquida com agarose a 1,0% (m/v) com suplementação de Geltrex[®] a 1,5% e 2,0% (v/v). Os dados representam média \pm desvio padrão de 10 esferoides, gerados a partir de 8.000 células após 4 e 7 dias de incubação. O diâmetro médio dos esferoides é diretamente proporcional ao tempo de incubação. Em contrapartida, as concentrações de Geltrex[®] testadas não influenciaram o tamanho dos mesmos. Teste de

ANOVA de duas vias de medidas repetidas, com *post hoc* de Bonferroni. **** $p < 0.0001$ representa comparação do diâmetro dos esferoides obtidos pela mesma quantidade de células, em dias de incubação diferentes.

Para as duas concentrações de Geltrex[®] testadas, o tempo de incubação influencia direta e proporcionalmente no tamanho dos esferoides de MDA-MB-231 ($F [1,36] = 201.3, p < 0.0001$). Em contrapartida, verificou-se que o uso de diferentes concentrações de membrana basal não resultou em diferença significativa entre os diâmetros resultantes ($F [1,36] = 4.803, p = 0.0508$).

O plaqueamento de 8.000 células por poço gera esferoides de cerca de 400 μm de diâmetro médio, após 4 dias de cultivo, em ambas as concentrações de Geltrex[®]. Todavia, como mencionado por Vinci e colaboradores (2012), há de se considerar que a geração dos esferoides deve ocorrer de forma consistente e reprodutível – característica que não foi alcançada com o uso da menor concentração de aditivo adicionada durante os plaqueamentos. Apesar de alguns poços formarem esferoides compactos, como demonstrado na figura 19, encontrou-se dificuldade em reproduzir os mesmos resultados ao longo de toda placa (Figura 21 a – b). Além disso, percebeu-se que com a contínua proliferação celular ao longo dos dias, houve a perda da estrutura esférica anteriormente formada (Figura 21b).

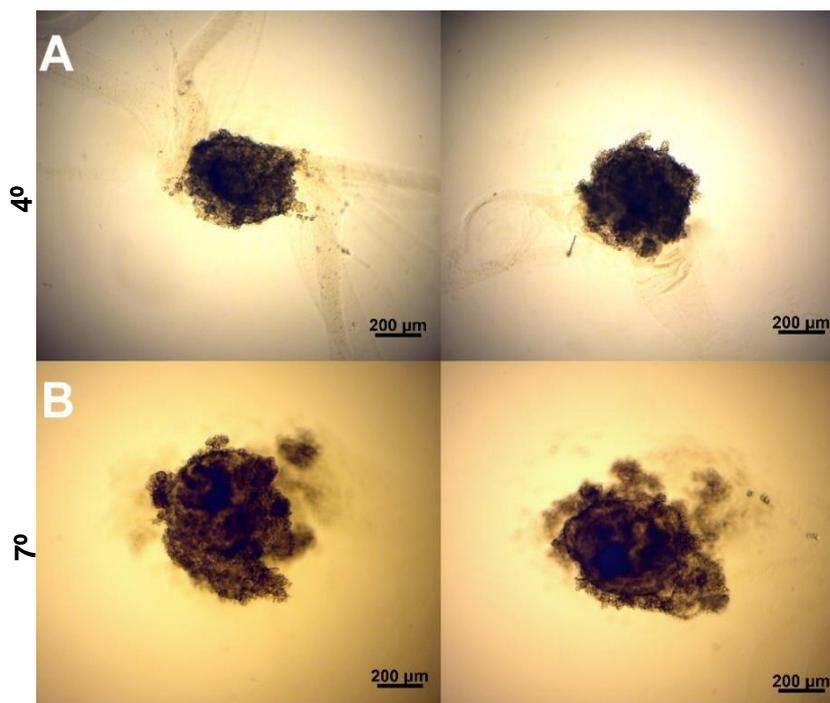


Figura 21. Esferoides de MDA-MB-231 formados a partir de 8.000 células/poço na presença de Geltrex[®] a 1,5% (v/v). A adição do mesmo se deu 24 horas após o plaqueamento. As fotos representam os mesmos esferoides após 4 e 7 dias de cultivo, para cada condição. Percebe-se que os esferoides apresentam bordas irregulares, com variação de diâmetro (**A**) e após 7 dias de incubação, a estrutura esférica é perdida (**B**). Escala: 200µm.

O emprego de esferoides nas pesquisas da área de cancerologia é ampla, porém, requer cuidadosa padronização. Friedrich, Ebner e Kunz-Schughart, em sua revisão em 2007, relatam que muitos “esferoides” mencionados na literatura são apenas agregados celulares, que não apresentam as características patofisiológicas atribuídas aos esferoides tumorais multicelulares, além de não serem aplicáveis a análises mais complexas pelo risco de serem desfeitos durante os processos (FRIEDRICH; EBNER; KUNZ-SCHUGHART, 2007).

Uma vez que plaqueamentos de 8.000 células por poço, com adição de 2,0% (v/v) de Geltrex[®] após 24 horas foi a condição que gerou esferoides com geometria regular, com bom grau de compactação e de forma reprodutível, a mesma foi então escolhida para dar prosseguimento aos ensaios de citotoxicidade para a cultura 3D para a linhagem de câncer de mama triplo negativo.

4.2.2 MCF-7

As células da linhagem MCF-7 foram plaqueadas nas densidades de 5.000 e 10.000 células por poço, em 200µl de meio de cultura com 1,5% ou 2,0% (v/v) de Geltrex[®] – cuja adição se deu após o plaqueamento das células (dia 0) ou no dia seguinte ao mesmo (dia 1). Após 4 e 7 dias de incubação, as placas foram visualizadas sob microscópio óptico e os poços fotografados. Três experimentos independentes foram realizados para cada condição.

Verificou-se que, quando o Geltrex[®], em ambas as concentrações, é adicionado aos poços logo após o plaqueamento das células, não há formação de esferoides em nenhuma das densidades testadas – mesmo após novas etapas de centrifugação (Figura 22). Como já mencionado, resultados semelhantes foram encontrados por Dubois e colaboradores (2017) em linhagens de câncer de mama SUM1315 e MDA-MB-231, ao testarem a adição da membrana basal reconstituída no dia 0 do plaqueamento.

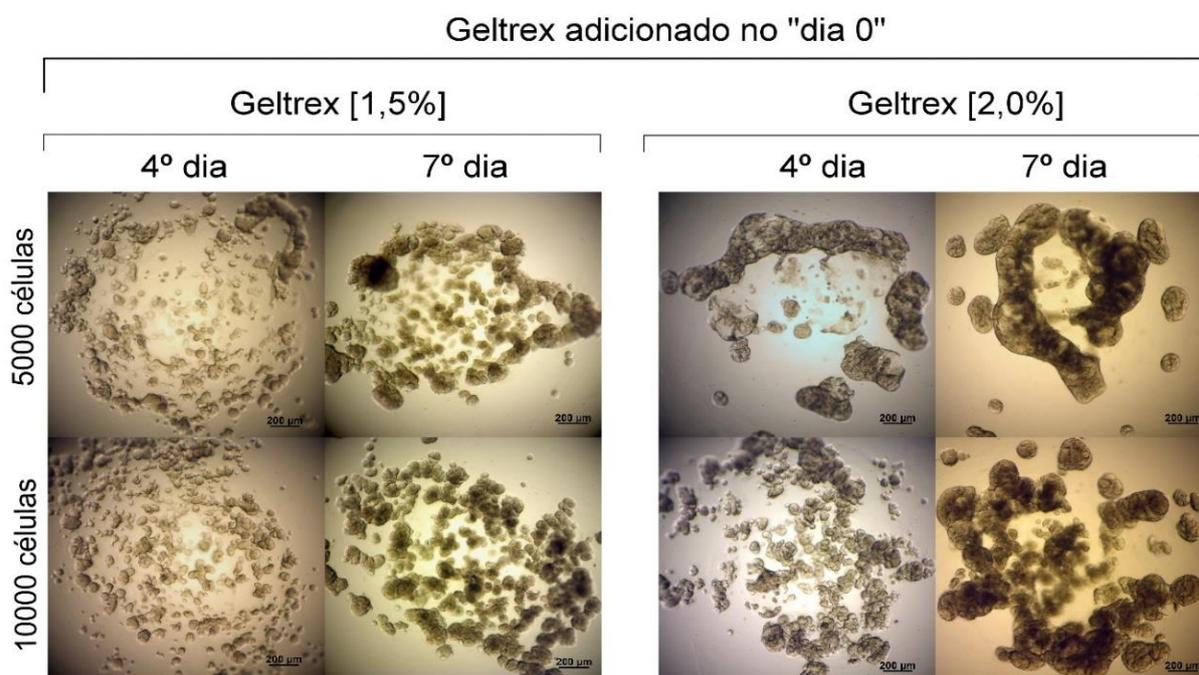


Figura 22. Avaliação do crescimento e da morfologia de células da linhagem MCF-7 com adição de Geltrex[®] a 1,5% e 2,0% (v/v) imediatamente após o plaqueamento. Nenhum esferoide foi formado com adição de Geltrex[®] imediatamente após o plaqueamento das células (dia 0). As imagens representam o mesmo poço, em cada densidade, no 4º e 7º dia de cultivo. Escala: 200µm.

Em contrapartida, a adição de Geltrex[®] após incubação das placas por 24 horas em estufa a 37°C, permite a aglomeração e compactação celular, levando a formação de esferoides únicos por poço nas duas densidades avaliadas, como pode ser observado na figura 23.

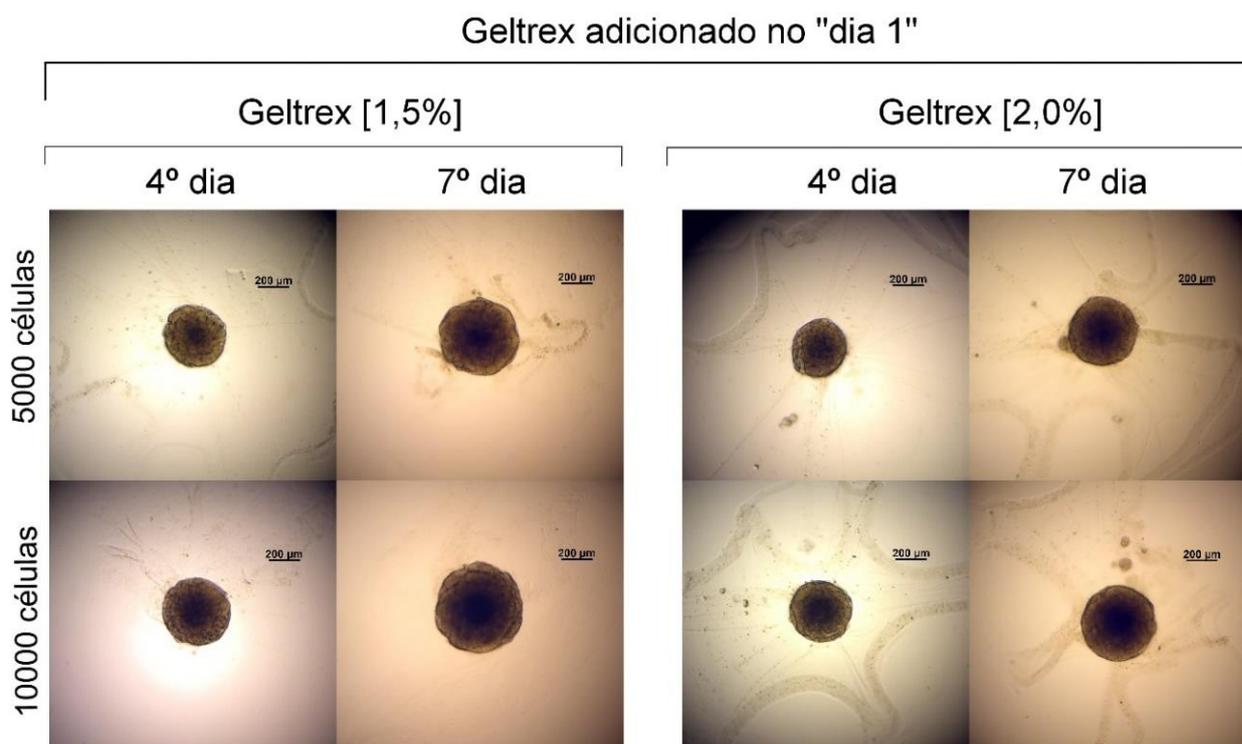


Figura 23. Avaliação do crescimento e da morfologia de células da linhagem MCF-7 cultivadas com adição de Geltrex[®] a 1,5% e 2,0% (v/v) 24 horas após o plaqueamento. É possível observar que esferoides únicos e compactos foram gerados em ambas as densidades celulares e concentrações de aditivo – que foi adicionado 24 horas após o plaqueamento (dia 1). As imagens representam o mesmo poço, em cada densidade, no 4º e 7º dia de cultivo. Escala: 200µm.

Com auxílio do software *ImageJ*, o diâmetro médio dos esferoides foi calculado e os resultados apresentados na tabela 4 na figura 24. As medidas representam a média \pm desvio padrão de 10 esferoides por condição, no 4º e 7º dia de cultivo, a partir de três experimentos independentes.

Tabela 4. Diâmetro médio dos esferoides de MCF-7 gerados em protocolo de sobreposição líquida com agarose a 1,0% (m/v) em meio de cultura acrescido de Geltrex[®] a 1,5% e 2,0% (v/v). Medidas obtidas após 4 e 7 dias de incubação.

Diâmetro médio (µm)				
Densidade celular/poço	Geltrex [®] 1,5% (v/v)		Geltrex [®] 2,0% (v/v)	
	4º dia de cultivo	7º dia de cultivo	4º dia de cultivo	7º dia de cultivo
5.000	385.55 ± 16.61	476.73 ± 20.86	368.46 ± 18.29	469.86 ± 32.96
10.000	402.05 ± 19.69	507.10 ± 36.01	395.52 ± 24.57	514.10 ± 49.59

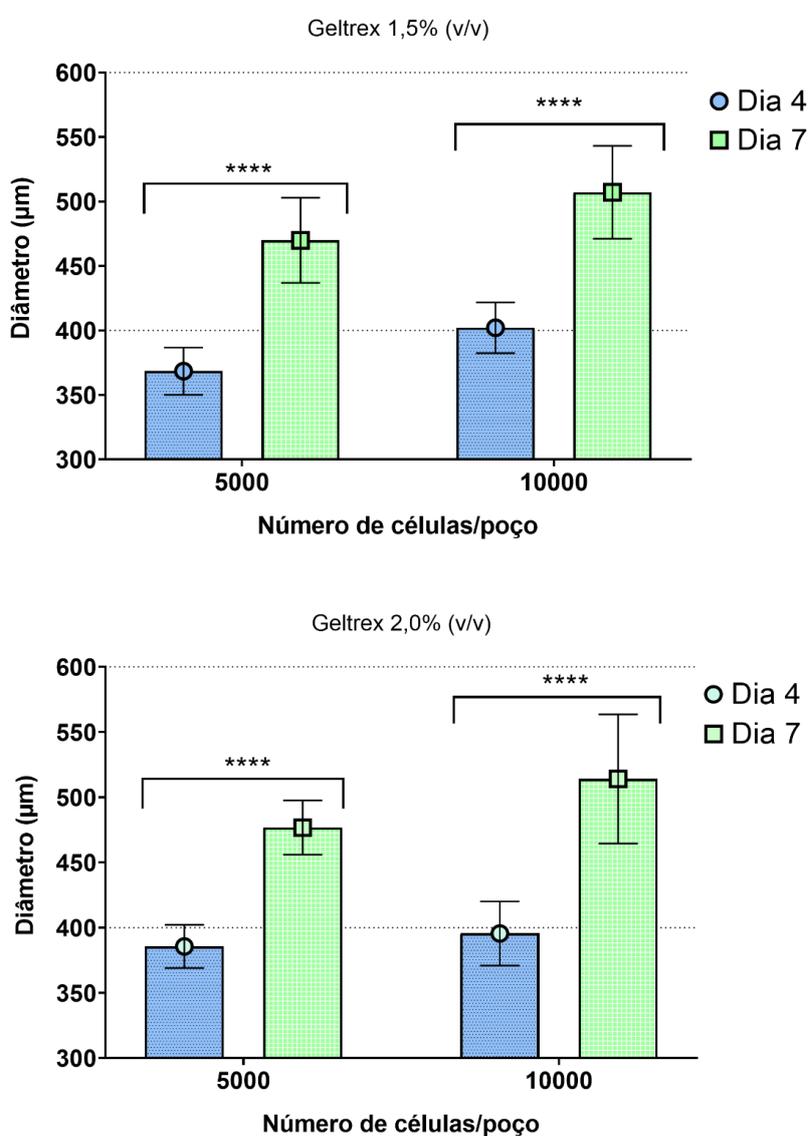


Figura 24. Diâmetro médio dos esferoides de MCF-7 gerados em protocolo de sobreposição líquida com agarose a 1,0% (m/v) com adição de Geltrex[®] a 1,5% e 2,0% (v/v). Os dados

representam média \pm desvio padrão de 10 esferoides após 4 e 7 dias de cultivo. O diâmetro médio dos esferoides é diretamente proporcional à quantidade de células plaqueadas e ao tempo de incubação. Teste de ANOVA de duas vias de medidas repetidas, com *post hoc* de Bonferroni. **** $p < 0.0001$ representa comparação do diâmetro dos esferoides obtidos pela mesma quantidade de células, em dias de incubação diferentes.

Tanto para a concentração 1,5% (v/v) quanto para 2,0% (v/v) de Geltrex[®] testada, os resultados das análises demonstraram que o diâmetro médio dos esferoides é diretamente proporcional ao número de células plaqueadas (Geltrex[®] 1,5% (v/v): $F [1,36] = 11.34$, $p < 0.0018$ e 2,0% (v/v): $F [1,36] = 9.184$, $p < 0.0045$) e ao tempo de incubação (Geltrex[®] 1,5% (v/v): $F [1,36] = 107.9$, $p = 0.0001$ e 2,0% (v/v): $F [1,36] = 160.7$, $p = 0.0001$). De forma semelhante à linhagem MDA-MB-231, a concentração de Geltrex[®] utilizada não influenciou de forma significativa no tamanho dos esferoides ($p > 0.9999$). Tais resultados são esperados, pois entende-se que as células foram capazes de se adaptar às condições e se proliferar, passados os dias de incubação.

Observou-se que apenas a densidade de 10.000 células/poço resultou, no 4º dia de cultivo, em esferoides com diâmetro médio de aproximadamente 400 μm , nas duas concentrações de aditivo testadas, e, portanto, essa densidade foi escolhida para os ensaios de citotoxicidade. Como ambas concentrações de Geltrex[®] foram eficazes, analisou-se a morfologia dos esferoides e o quesito reprodutibilidade para definir a concentração ideal para a realização dos experimentos.

Comparado com a concentração de 1,5% (v/v), a adição de 2,0% (v/v) de Geltrex[®] resultou em maior variabilidade da geometria esférica (figura 25) e do diâmetro dos esferoides, como observado nos altos desvios padrão apresentados na tabela 4. Além disso, concomitantemente ao aumento do diâmetro devido a proliferação celular ao longo dos dias de incubação, verificou-se a perda da borda bem delimitada e da compactação dos esferoides, tornando-se irregulares ao final de 7 dias de incubação (figura 25b).

Alguns estudos, como o de Zanoni e colaboradores (2016), já demonstraram que irregularidades na forma/geometria dos esferoides podem afetar a sua resposta à tratamentos químicos ou físicos. Após avaliarem a viabilidade de esferoides cujos

volumes eram similares, mas suas formas variadas, os autores verificaram diferenças estatisticamente significativas – o que provavelmente se deve pelo fato de que as células em esferoides com morfologias irregulares são expostas de maneiras diferentes ao oxigênio, nutrientes e aos tratamentos (ZANONI *et al.*, 2016).

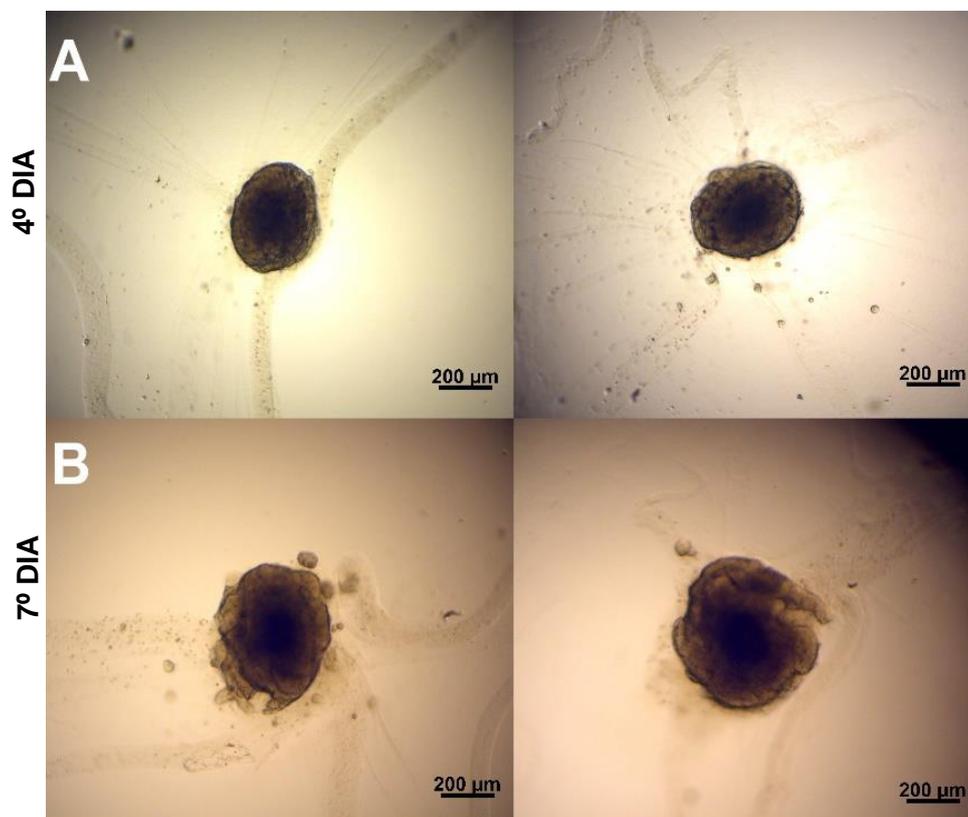


Figura 25. Esferoides de MCF-7 formados a partir de 10.000 células/poço e Geltrex[®] a 2,0% (v/v). As fotos representam os mesmos esferoides após 4 e 7 dias de cultivo. A adição do mesmo se deu 24 horas após o plaqueamento. Percebe-se que os esferoides apresentam geometria mais oval (A), enquanto a incubação por 7 dias resulta na perda da borda bem delimitada, alcançada no 4º dia de cultivo (B). Escala: 200µm.

Sendo assim, a condição que alcançou resultados satisfatórios foi a densidade de 10.000 células por poço, com adição de 1,5% (v/v) de Geltrex[®] no dia seguinte ao plaqueamento (dia 1), e, portanto, foi escolhida para realização dos ensaios de citotoxicidade.

4.3 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

As imagens da ultraestrutura dos esferoides capturada através do uso de MEV revelaram diferenças morfológicas entre as duas linhagens. Na figura 26, é possível

visualizar a ultraestrutura dos esferoides gerados para MCF-7, pela técnica de sobreposição líquida com agarose, na ausência (a-c) e presença (d-f) de Geltrex[®]. Nos esferoides gerados por ambos os protocolos, as células se organizaram para formar estruturas compactas, com fortes adesões célula-célula, uma vez que não foram desfeitos pelos processos de preparação dos esferoides para imagens de MEV. Em magnitudes mais altas (1000x) não é possível identificar células individuais (b, c, f). Verificou-se ainda a formação de fortes ligações célula-célula (seta) entre dois esferoides individuais, uma vez mantidos próximos.

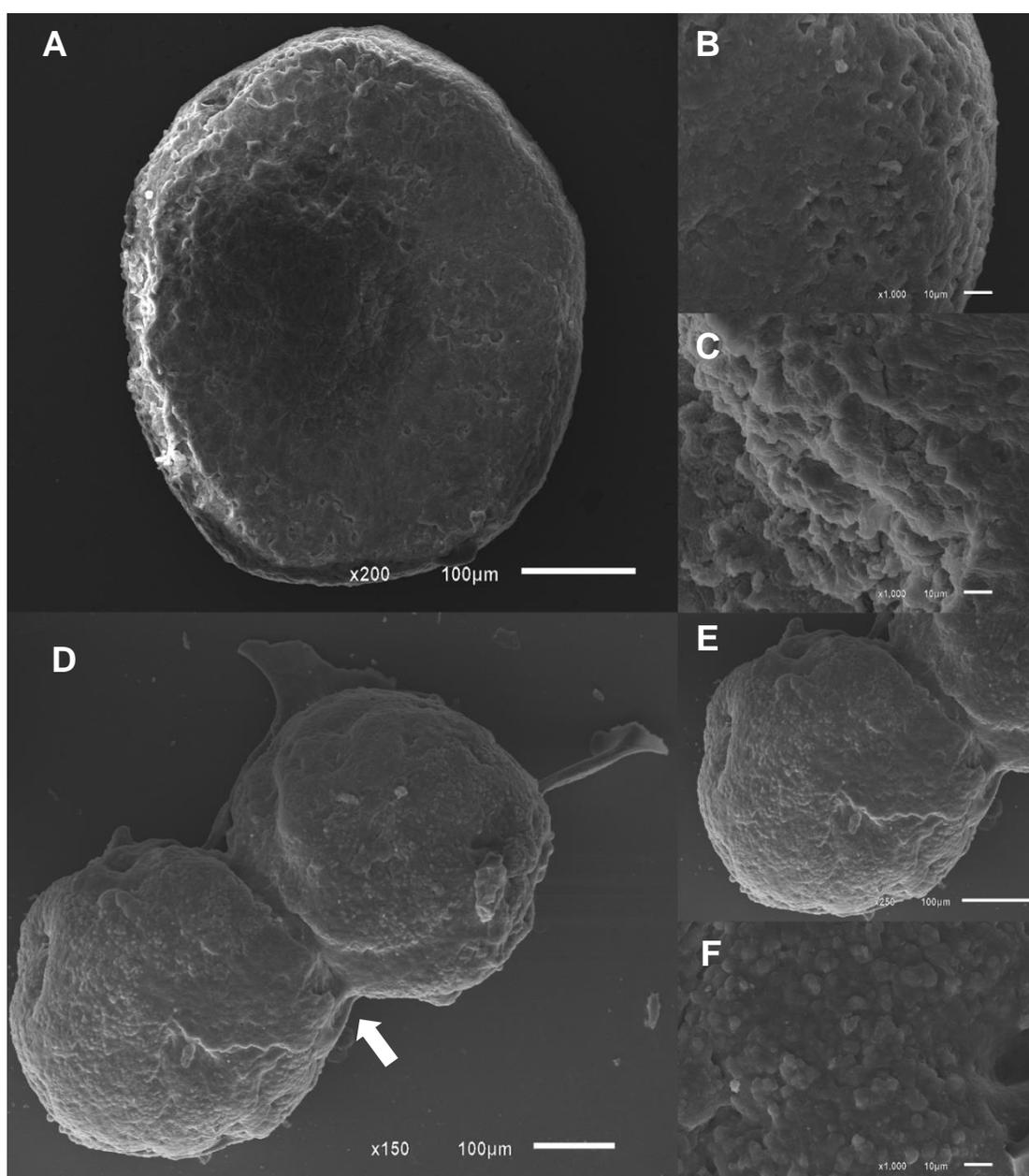


Figura 26. Ultraestrutura de esferoides da linhagem MCF-7 por MEV através do protocolo de sobreposição líquida com agarose. A-C: Esferoides formados na ausência de Geltrex[®]. D-F:

Esferoides gerados na presença de Geltrex[®]. Para ambas as condições, observou-se organização celular em estruturas esféricas compactas cuja visualização de células individuais é impossibilitada mesmo em magnitudes de 1000x (b, c, f). Seta: contato célula-célula permitindo unificação de dois esferoides individuais.

Semelhantemente, células de MDA-MB-231 organizam-se para formar esferoides únicos, porém com menor grau de compactação. Tal como pode ser observado na figura 27, as estruturas apresentam superfície mais irregular quando comparada à linhagem MCF-7, sendo possível a identificação de células individuais em maiores aumentos (Figura 27c). A proximidade entre dois esferoides únicos também possibilitou a interação entre os mesmos (setas), tal qual como verificado para a linhagem luminal A, embora em menor grau – uma vez que as interações entre os mesmos foram mais facilmente desfeitos.

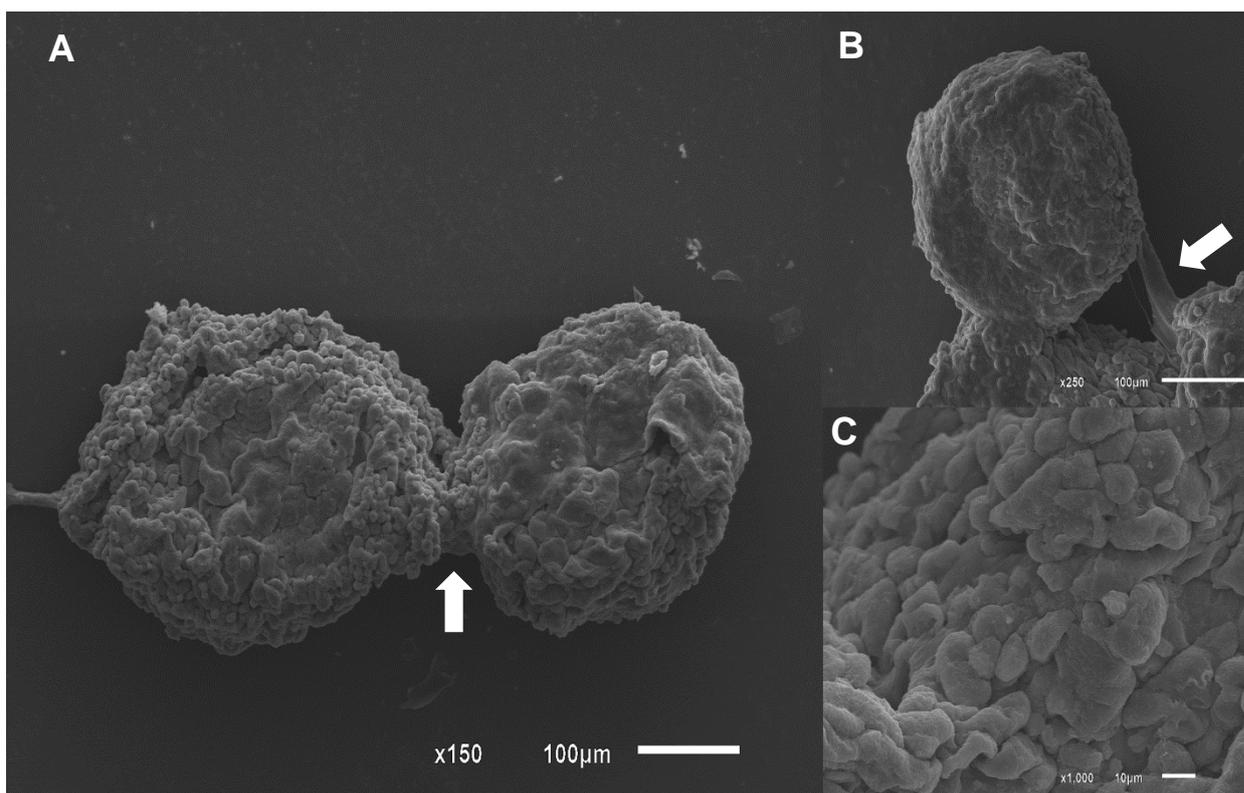


Figura 27. Ultraestrutura de esferoides da linhagem MDA-MB-231 por MEV através do protocolo de sobreposição líquida com agarose na presença de Geltrex[®]. Em comparação a linhagem MCF-7, as células apresentam-se menos compactadas, gerando uma morfologia externa mais irregular. A magnificação em 1000x (c) permite visualização de células individuais. Setas: interação célula-célula entre esferoides individuais.

4.4 ANÁLISE DE VIABILIDADE CELULAR METABÓLICA

O Paclitaxel foi o primeiro composto da classe dos taxanos a ser utilizado como tratamento na quimioterapia do câncer. Sua ação antineoplásica é atribuída à sua capacidade de interagir com a β -tubulina e impedir a despolimerização dos microtúbulos. Essa ação induz a parada do ciclo celular em G2/M e a consequente apoptose, através da estabilização do fuso mitótico (revisado por MARUPUDI *et al.*, 2007).

Sendo assim, a fim de avaliar a atividade citotóxica do Paclitaxel após tratamentos por 72 horas nas linhagens MCF-7 e MDA-MB-231, foi estimada a viabilidade celular metabólica (VCM) das células quando cultivadas em monocamada e em cultura 3D através do ensaio de redução da resazurina (AlamarBlue[®]).

Como o Paclitaxel é um composto com baixa solubilidade em água, escolheu-se o DMSO como veículo para a preparação das diluições seriadas. No entanto, esse solvente orgânico deve ser utilizado em baixas concentrações, pois pode promover danos mitocondriais, assim como induzir apoptose em concentrações a partir de 1% (v/v) (DAMASCENO *et al.*, 2015; DE MÉNORVAL *et al.*, 2012; YUAN *et al.*, 2014; GALVAO *et al.*, 2014). Dessa forma, a concentração escolhida para a diluição foi de 0,5% (v/v), uma vez que a mesma não demonstrou redução significativa da VCM em linhagens de MCF-7 e MDA-MB-231, através de ensaios de MTT (brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazólio]) realizados anteriormente pelo nosso grupo de pesquisa (dados não mostrados).

Representados na figura 28, estão os resultados obtidos nos ensaios de citotoxicidade realizados em cultura 2D e 3D com as linhagens MCF-7 e MDA-MB-231, plotados em gráficos do tipo dose-resposta. Para o cultivo 3D, foram utilizados esferoides com diâmetro médio de 400 μ m, formados pela técnica de sobreposição líquida com agarose, na presença ou ausência de Geltrex[®].

Em relação à cultura em monocamada, foi possível verificar que a redução da viabilidade celular é dependente da concentração da droga usada, tanto para MCF-7 (H_c : 73.55, $p < 0.0001$) quanto para MDA-MB-231 (H_c : 69.59, $p < 0.0001$). Tratamentos com o taxano a partir de 10^{-8} M configuram na diminuição significativa da VCM de

MCF-7, quando comparado ao grupo controle não tratado (NT), atingindo percentuais de viabilidade próximos de 50% até 10^{-6} M, enquanto 10^{-5} M e 10^{-4} M reduzem em mais de 95% a viabilidade celular. Os resultados obtidos para MDA-MB-231, por sua vez, demonstram a eficácia antiproliferativa da droga, sendo a redução da viabilidade celular significativa a partir da concentração 10^{-9} M. Tal como demonstrado na figura 24, o efeito sobre a VCM se torna mais proeminente a partir de 10^{-6} M, que age promovendo a diminuição da mesma em mais de 80%.

Ademais, por MCF-7 ser a única linhagem testada capaz de formar esferoides na ausência e presença de membrana basal, avaliou-se a resposta dos mesmos frente ao quimioterápico nas duas referidas condições. Em contraste com os resultados obtidos quando a linhagem é cultivada em monocamada, a redução da viabilidade dos esferoides, gerados sem adição de Geltrex[®], só passa a ser significativa com o uso de concentrações 100 vezes mais altas (10^{-6} M). Na presença de Geltrex[®], verifica-se também um perfil mais resistente, com a maior concentração testada (10^{-4} M) promovendo redução da VCM em mais de 95%. A comparação dos resultados obtidos nos dois protocolos de cultivo 3D, permite verificar que o efeito dos tratamentos de 10^{-6} M sobre a VCM é similar para ambos (72%: agarose vs 76%: Geltrex[®]), porém, concentrações de 10^{-5} M reduzem a viabilidade de maneira importante apenas na condição sem Geltrex[®] (VCM 52%). Esse perfil sugere que a presença da membrana basal influencia a resposta das células frente ao taxano, resultando em maior resistência ao mesmo. Cabe destacar, no entanto, que para essa última condição os experimentos foram realizados em duplicata, e, portanto, é necessário que mais experimentos sejam realizados a fim de possibilitar análises estatísticas para efeitos de comparação.

Semelhantemente, MDA-MB-231, quando avaliada em cultura 3D, apresenta um perfil mais resistente em comparação à cultura em monocamada. A VCM é reduzida de maneira importante a cerca de 50% na concentração de 10^{-5} M, enquanto no modelo 2D a mesma concentração ocasionou redução da VCM a porcentagens próximas a 3%. A maior concentração de taxano testada (10^{-4} M), no entanto, apresentou perfil citotóxico similar nos dois modelos (2D: 2.07% e 3D: 4.02%). Pode-se verificar que com a utilização do modelo 3D, o efeito antiproliferativo só se tornou

evidente a partir do uso de concentrações 10.000 vezes mais altas (10^{-5} M), em relação ao modelos de cultivo 2D (10^{-9} M).

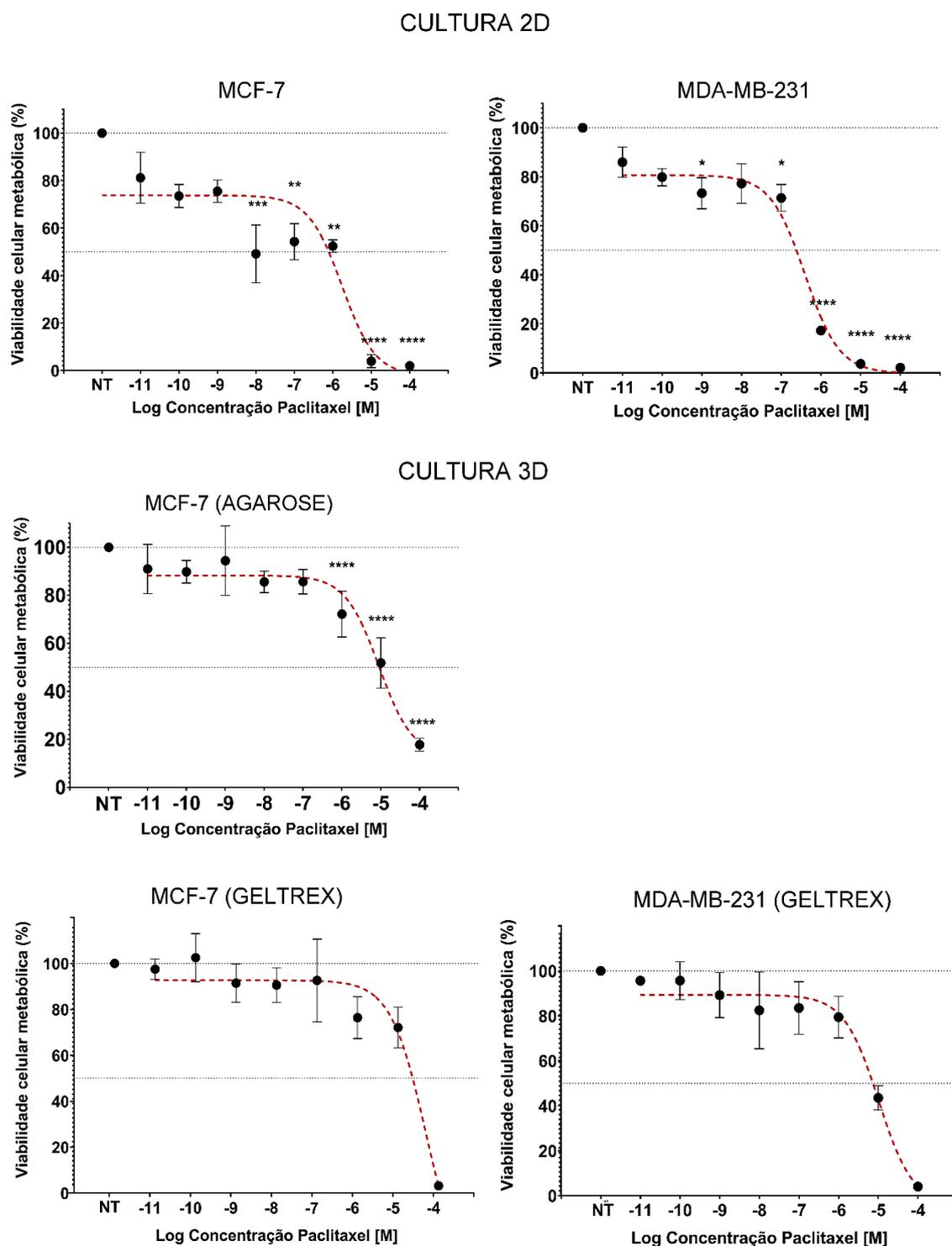


Figura 28. Viabilidade celular metabólica das linhagens MCF-7 e MDA-MB-231 cultivadas em cultura 2D e 3D. Esferoides de MCF-7 foram gerados sem adição de Geltrex[®] (MCF-7 Agarose) e com adição do mesmo (MCF-7 Geltrex[®]). Esferoides de MDA-MB-231 foram obtidos com suplementação de Geltrex[®]. Resultados obtidos após tratamento com Paclitaxel

por 72 horas pelo ensaio de AlamarBlue. Os valores representam média \pm desvio padrão de três experimentos independentes (monocamada e cultivo 3D com agarose). Os experimentos com Geltrex[®] foram realizados em duplicata. Dados analisados pelo teste de Kruskal-Wallis com *post hoc* de Dunn. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, **** $p < 0.0001$, representam a comparação das VCM obtidas em relação ao grupo controle não tratado (NT).

As curvas dose-resposta obtidas foram empregadas para realização dos cálculos da concentração inibitória de 50% da população celular (IC_{50}), para ambas as linhagens, e estão apresentadas na tabela 5.

Tabela 5. Concentração inibitória estimada de 50% (IC_{50}) de Paclitaxel das linhagens MCF-7 e MDA-MB-231 em monocamada e cultura 3D, após 72 horas de tratamento.

	IC_{50} estimada	
	MCF-7	MDA-MB-231
Cultivo 2D	3.962×10^{-8} M	9.502×10^{-8} M
Cultivo 3D com agarose	7.054×10^{-6} M	-
Cultivo 3D com Geltrex[®]	1.751×10^{-5} M	5.053×10^{-6} M

Como pode ser verificado através dos dados expostos na tabela 5, as células de MCF-7 cultivadas como esferoides, formados sem adição de Geltrex[®], apresentaram IC_{50} 178,04 vezes maior em comparação a condição de cultivo em monocamada. A utilização do protocolo baseado na adição de membrana basal, por sua vez, resultou em IC_{50} estimada ainda mais alta, sendo superior àquela alcançada no cultivo 2D em 441,95 vezes. Em contrapartida, ao comparar as IC_{50} obtidas entre os dois protocolos de cultivo 3D, observou-se uma diferença menos expressiva (2,48 vezes). Com relação a linhagem MDA-MB-231, a resposta das células frente aos tratamentos também seguiu o mesmo perfil, sendo a IC_{50} estimada obtida no cultivo 3D 53,18 vezes mais alta em comparação à cultura em monocamada.

A partir dos dados expostos, pode-se concluir que ambas as linhagens apresentam um perfil maior de quimiorresistência quando são cultivadas em contexto 3D. Esse fato permite inferir que os protocolos testados foram capazes de mimetizar, com maior precisão que o cultivo 2D, as condições existentes no microambiente tumoral *in vivo*. No entanto, faz-se oportuno considerar que os desvios obtidos nos experimentos com a cultura 3D, para ambas as linhagens, possam ter acarretado em

interferências nas análises. E ainda, a fim de permitir melhor comparação entre os dois modelos, faz-se necessário realizar a contagem do número células médio nos poços para o cultivo em monocamada e a quantidade média de células que constitui os esferoides.

A cultura celular *in vitro* é amplamente empregada nas pesquisas de diversas áreas da ciência, incluindo pesquisas biológicas, como engenharia de tecidos, medicina regenerativa, além de aplicações industriais (revisado por DUVAL *et al.*, 2017). Ademais, modelos de cultivo 2D ainda são ferramentas úteis para a avaliação da efetividade e segurança de potenciais drogas terapêuticas (BRESLIN & O'DRISCOLL, 2013). Vale salientar também que a taxa de sucesso no desenvolvimento de drogas antitumorais é em média 10% (HAIT, 2010), sendo a falta de eficácia e/ou segurança clínica dessas as principais causas de falha durante seu desenvolvimento (HOPKINS, 2008). Isso significa dizer que a grande maioria dos compostos, avaliados durante a fase pré-clínica como "ativos", apresentam-se ineficazes durante os ensaios clínicos, especialmente na fase III – etapa da pesquisa clínica na qual os custos são mais elevados (EDMONDSON *et al.*, 2014; BRESLIN & O'DRISCOLL, 2013; GOMES *et al.*, 2019). No entanto, essa baixa porcentagem de sucesso é esperada e não necessariamente se correlaciona com a falta de eficiência dos ensaios pré-clínicos, tampouco é exclusiva para a área oncológica. Apesar disso, é plausível que os pesquisadores busquem aprimorar os modelos de estudo cada vez mais robustos para permitir a detecção da ineficácia e/ou toxicidade de potenciais drogas nos estágios iniciais da pesquisa – antes mesmo das etapas de estudos com animais (KUNZ-SCHUGHART *et al.*, 2004; BRESLIN & O'DRISCOLL, 2013).

Sabe-se que no organismo vivo, as células existem em um ambiente 3D, cuja complexidade de interações químicas e componentes celulares variam de tecido para tecido (GOMES *et al.*, 2019). Esse fato sugere que a cultura em monocamada não representa com precisão as condições existentes *in vivo*, incluindo aquelas presentes no microambiente tumoral (BRESLIN & O'DRISCOLL, 2017). Nesse âmbito, há de se considerar que esses sistemas com características 2D antinaturais podem afetar o comportamento celular, uma vez que o crescimento em substratos plásticos planos acarreta no achatamento das mesmas, bem como remodelamento de seu citoesqueleto (KNIGHT & PRZYBORSKI, 2015). Apesar das limitações reconhecidas

desse modelo, a cultura 2D ainda permanece como uma ferramenta útil nos estudos com células e não deve ser completamente substituída por outros modelos.

Durante as investigações sobre o câncer, a citar o câncer de mama, é imprescindível que os modelos celulares utilizados sejam capazes de mimetizar a doença no que se refere à complexidade da mesma: expressão de receptores, genes, proteínas importantes para o crescimento e sobrevivência celular, bem como a atividade de enzimas responsáveis pelo metabolismo de drogas (BRESLIN & O'DRISCOLL, 2016). Nesse contexto, surge a cultura 3D como alternativa ou complemento aos cultivos celulares 2D com características planas, com objetivo de refletir de forma mais acurada o comportamento dos tecidos e tumores *in vivo* – ao menos em parte (ANTONI *et al.*, 2015). As similaridades entre esse modelo *in vitro* e o microambiente tumoral tem motivado o seu aperfeiçoamento, no intuito de preencher a lacuna existente entre a cultura 2D e os modelos animais (GONG *et al.*, 2015).

Em condições de cultivo 3D, a organização celular se dá de forma que o contato célula-célula e célula-matriz – sendo os componentes da matriz adicionados ao meio ou secretados pelas próprias células – é reestabelecido (revisado por DUVAL *et al.*, 2017). Tais interações influenciam os comportamentos celulares, como demonstrado em vários relatos na literatura. Ramaiahgari e colaboradores (2014) demonstraram as vantagens do uso da cultura 3D, por exemplo, para estudos preditivos de danos hepáticos induzidos por drogas, através da utilização da linhagem de hepatoma humano (HepG2). Em comparação à cultura em monocamada, em que hepatócitos de linhagens imortalizadas demonstram pouca similaridade à hepatócitos primários, no que se refere a função e expressão gênica, os autores verificaram que o cultivo dessas células em condições 3D permite melhor manutenção das funções e morfologia do tecido hepático. Como esferoides, as células de HepG2 recuperaram características perdidas durante o cultivo 2D, como o armazenamento de glicogênio, ocorrendo também o aumento na expressão de albumina e enzimas do metabolismo de fase I e II, além de maior atividade funcional vários componentes da família do citocromo P450 (RAMAIAHGARI *et al.*, 2014).

Estudos de Chitcholtan e colaboradores (2013) verificaram que células de linhagens de câncer endometrial, com maior grau de diferenciação, foram capazes de formar estruturas com morfologia glandular-símile em cultivo 3D, demonstrando a

proximidade do modelo às condições *in vivo*. Em contrapartida, células endometriais malignas pouco diferenciadas apresentaram estruturas multicelulares desorganizadas, o que evidencia que a morfologia das células cultivadas tridimensionalmente depende das características de cada linhagem.

Em 2012, os resultados de Zschenker e colaboradores corroboraram com relatos da literatura, no que diz respeito às alterações na expressão gênica de células cultivadas em condições 3D. Fazendo uso de duas linhagens tumorais de origens e características distintas (A549, câncer de pulmão e UT-SCC15, carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço), os autores observaram que, em condições 3D, mudanças em genes relacionados a funções biológicas como adesão celular, resposta ao sistema imune e desenvolvimento tecidual ocorreram para ambas as linhagens. Não obstante, ao exporem as células à radiação ionizante ou Cisplatina, aquelas em cultura 3D demonstraram-se mais resistentes. Especulou-se que, uma vez que genes envolvidos na reparação do DNA permaneceram inalterados ao cultivarem as células em ambiente 3D, a radio e quimiorresistência apresentadas resultam das mudanças na arquitetura celular e o consequente reestabelecimento das interações célula-célula e célula-matriz, influenciando o comportamento das mesmas (ZSCHENKER *et al.*, 2012).

Como revisado recentemente por Han, Kwon e Kim (2021), de fato os esferoides tumorais multicelulares apresentam elevada resistência a tratamentos, tais como quimio e radioterapia, além de fototerapia. Estudos nos anos 2000, como os de Desoize e Jardillier, já demonstravam esse perfil. Experimentos com a linhagem A549 evidenciaram um aumento da resistência à Vimblastina em 6.625 vezes quando as células eram cultivada como esferoides, com IC_{50} de $5,3 \times 10^{-5}$ M para a cultura 3D e $8,0 \times 10^{-9}$ M para o cultivo em monocamada (DESOIZE & JARDILLIER, 2000).

Outros relatos demonstram similaridade aos resultados obtidos na presente pesquisa, como por exemplo o estudo de Gomes e colaboradores (2019). Os autores verificaram que esferoides de MCF-7 e MDA-MB-231 demonstram maior resistência aos tratamentos com Cisplatina por 72 horas, apesar de apresentarem os mesmos níveis de danos ao DNA que as células em cultivo 2D – medidos pela imunodeteção de γ -H2AX, um marcador de quebra de fita dupla do DNA. Adicionalmente, Ho e colaboradores (2012) observaram menor toxicidade do quimioterápico Tamoxifeno em

células de MCF-7 cultivadas em modelo 3D pela técnica de sobreposição líquida, sem adição de ECM. Os autores atribuíram esse perfil, exclusivamente, à barreira gerada pelo arranjo das células no esferoide, definido como “resistência multicelular” – descrita pela primeira vez por Sutherland em 1988 (HO *et al.*, 2012; SUTHERLAND, 1988).

Como explicado por Gong e colaboradores (2015), as interações intercelulares, com grandes pressões intersticiais, geram uma barreira física e isso prejudica a difusão da droga e conseqüentemente contribui para uma maior quimiorresistência. Além disso, os estudos desses mesmos autores com a linhagem MCF-7 indicaram que, quando cultivada num contexto 3D, uma taxa maior de células se encontra em fase G0/G1, em comparação ao cultivo tradicional em monocamada. Essa observação demonstra que as células nos esferoides têm velocidade replicativa reduzida ou se tornaram quiescentes, provavelmente pela baixa difusão de nutrientes e oxigênio na região mais central dos mesmos. Esse fator contribuiu, juntamente com a “resistência multicelular”, para explicar a menor sensibilidade da linhagem aos tratamentos realizados com Doxorrubicina, em experimentos de citotoxicidade realizados em cultura 3D (GONG *et al.*, 2015).

Não obstante, as revisões de Holle, Young e Spatz (2016), Dickreuter e Cordes (2017) e Langhans (2018) discutem a importância das interações célula-matriz e sua influência na resposta a drogas. A ligação de células normais à matriz através de integrinas é um dos fatores determinantes conhecidos para a sobrevivência celular e prevenção a apoptose, por exemplo. Adicionalmente, estudos com linhagens de células tumorais demonstraram a existência da chamada resistência induzida por adesão (do inglês *induced-adhesion resistance*), que leva a menor sensibilidade das mesmas à radioterapia e drogas citotóxicas (revisado por DICKREUTER & CORDES, 2017). Muranen e colaboradores (2012), por sua vez, observaram que ao tratar células de linhagens de câncer de ovário com inibidores de PI3K/mTOR, células da parte mais externa do esferoide – em contato com a matriz, demonstravam resistência ao tratamento. Em contrapartida, células centrais, sem o estabelecimento de ligações com a matriz, sofreram indução de apoptose pelos inibidores (MURANEN *et al.*, 2012).

Gomes e colaboradores (2019), ao tratarem esferoides de MCF-7 com Cisplatina, verificaram que os mesmos eram mais resistentes ao tratamento do que

as células em monocamada. Com intuito de avaliar se esse efeito era resultado do contato célula-matriz (pela adição de 4% (v/v) de Matrigel®) ou das alterações morfológicas que ampliam o contato entre as células, os autores realizaram ensaios na presença e na ausência de Matrigel®. Os resultados indicaram que a tridimensionalidade foi o fator mais importante na quimiorresistência à Cisplatina demonstrada pelos esferoides, uma vez que, em todas as condições experimentais, a redução da viabilidade das células foi significativamente menor quando comparado ao cultivo em monocamada. Entretanto, apenas a alteração morfológica não foi suficiente para alcançar o mesmo perfil de resistência demonstrado pelos esferoides formados na presença de Matrigel®. Sendo assim, os autores concluíram que tanto a morfologia do esferoide, com seu maior contato intercelular, quanto as interações formadas com a matriz, são fatores importantes que culminaram na maior quimiorresistência ao composto de platina (GOMES *et al.*, 2019).

Outros estudos, como de Wang e colaboradores (2002), já demonstraram o relevante papel da matriz na sinalização e fenótipo do câncer. Cultivando células de câncer de mama MCF-7, MDA-MB-231 e Hs578T (linhagem triplo-negativa) em cultivo 3D na presença de componentes de matriz, os autores realizaram tratamentos com inibidores de integrina $\beta 1$ e de vias de sinalização relacionadas (PI3K e MAPK). As três linhagens celulares apresentaram reversão parcial do fenótipo maligno após tratamentos com os inibidores separadamente, enquanto MCF-7 e MDA-MB-231 reverteram completamente o fenótipo após o bloqueio de integrina $\beta 1$ em conjunto com inibição de PI3K ou MAPK. Adicionalmente, os mesmos tratamentos na linhagem Hs578T promoveram morte celular (WANG *et al.*, 2002). Essas informações ilustram a importância da comunicação célula-matriz e, portanto, enfatiza que os modelos de esferoides tumorais multicelulares que incorporam elementos de ECM exógenos são capazes de mimetizar tumores sólidos *in vivo* de forma mais precisa que aqueles modelos sem a presença da mesma (LABARBERA; REID; YOO, 2012).

Diante dos resultados obtidos nos experimentos no presente estudo e pelos dados da literatura expostos, sugeriu-se que a menor sensibilidade ao Paclitaxel apresentada pelas linhagens MCF-7 e MDA-MB-231 quando cultivadas como esferoides, é consequência de alguns fatores: i) a tridimensionalidade dos modelos, permitindo o rearranjo das células em esferoides, uma vez que as camadas de células interagindo entre si geram a “resistência multicelular” citada anteriormente – o que

dificulta a difusão do Paclitaxel e o mesmo não atinge todas as células de forma homogênea; ii) o estabelecimento de gradientes de pH, oxigênio e nutrientes, que podem alterar o comportamento celular; iii) a presença de células em velocidade e taxas proliferativas mais baixas na região central, o que prejudicaria a ação do fármaco e iv) as interações da célula com a matriz presente no meio (no protocolo com adição de Geltrex[®]), interferindo no comportamento celular frente ao taxano. Contudo, análises mais detalhadas são necessárias, bem como experimentos que permitam a verificação do perfil de difusão do Paclitaxel, do índice de proliferação, do estágio do ciclo celular em que as células dos esferoides se encontram e a avaliação da expressão de proteínas de adesão no intuito de melhor compreender os mecanismos que estão por trás da quimiorresistência.

A proposta da pesquisa atual é a padronização e comparação de dois protocolos de cultivo 3D, utilizando a técnica de sobreposição líquida com agarose para geração de esferoides – que apesar de suas inegáveis limitações enquanto modelo pré-clínico em representar a doença em sua totalidade, representa um avanço em relação à cultura em monocamada por considerar alguns fatores que são perdidos durante o cultivo 2D. O reestabelecimento de gradientes para oxigênio, nutrientes, pH, contato entre células e entre célula e matriz, torna o modelo uma melhor ferramenta nos estudos para a compreensão do câncer, assim como para a avaliação de potenciais drogas. Embora vantajoso em vários aspectos, a pesquisa atual não visa substituir o modelo em monocamada pelos novos métodos de cultivo 3D, mas sim utilizar esse último como uma ferramenta complementar aos modelos já existentes. Ainda, se faz necessária a padronização do método para que esferoides únicos e compactos, com morfologia regular, sejam obtidos com o maior grau de reprodutibilidade possível. Na tabela 6 estão apresentadas as melhores condições para geração de esferoides para as linhagens MDA-MB-231 e MCF-7.

Para MDA-MB-231, apesar da incapacidade de gerar esferoides espontaneamente pela ausência de E-caderina, obteve-se sucesso na formação dos mesmos a partir da adição de membrana basal reconstituída, pela provável interação da mesma com a integrina $\beta 1$. Dessa forma, pode-se concluir que o protocolo de sobreposição líquida com agarose proposto por Friedrich e colaboradores (2009), sozinho, não é adequado para formação de esferoides com a linhagem. Todavia,

MCF-7, que expressa E-caderina, foi capaz de formar esferoides através da utilização dos dois protocolos testados. Em ambos, estruturas esféricas compactas foram obtidas, com bom grau de reprodutibilidade, indicando que os mesmos são adequados para a produção de esferoides para a linhagem.

Tabela 6. Resumo das condições de cultivo 3D eficazes para formação de esferoides únicos e compactos por poço para linhagens MCF-7 e MDA-MB-231.

Cultivo 3D		Linhagem	
Técnica de sobreposição líquida	Variáveis	MCF-7	MDA-MB-231
Agarose	Concentração de agarose	1,0% (m/v)	-
	Densidade celular	10.000 células/poço	-
Agarose + Geltrex [®] diluído no meio de cultura	Concentração de Geltrex [®]	1,5% (v/v)	2,0% (v/v)
	Densidade celular	10.000 células/poço	8.000 células/poço
	Momento da adição de Geltrex [®]	24 horas após o plaqueamento celular (dia 1)	24 horas após o plaqueamento celular (dia 1)

Os resultados de viabilidade celular metabólica realizados com as células de MCF-7 e MDA-MB-231 em cultura 3D, revelaram que, após exposição ao Paclitaxel por 72 horas, a redução da VCM foi alcançada a partir de tratamentos com concentrações mais altas, quando comparado com o cultivo 2D. Esse perfil sugere a menor sensibilidade das células frente ao taxano ao serem cultivadas num contexto 3D. Para MCF-7, as curvas dose-resposta obtidas nos ensaios com os esferoides sugerem que a presença de Geltrex[®] influencia a resposta celular frente ao fármaco testado (uma vez que mimetiza a membrana basal *in vivo*), em adição à alteração na morfologia em decorrência da tridimensionalidade do modelo.

Apesar de serem necessários mais experimentos a fim de se confirmar os achados, conclui-se ser vantajoso, para a realização de ensaios de citotoxicidade, a utilização do protocolo 3D com Geltrex[®]. Além disso, a junção da técnica de sobreposição líquida com agarose e a adição de componentes de ECM na formação de esferoides, permite a redução da quantidade de Geltrex[®] nos ensaios. Em comparação com a técnica de sobreposição líquida descrita na literatura, que se baseia na adição de membrana basal para recobrir os poços de uma placa, o protocolo utilizado na presente pesquisa utiliza a ECM apenas como aditivo no meio – o que reduz o volume de Geltrex[®] necessário em cada experimento.

Não obstante, como citado anteriormente, a adição de ECM exógena permite uma representação mais acurada do TME dos tumores sólidos *in vivo*, pois além das células tumorais estabelecerem maior contato entre si, também interagem com os componentes de matriz, o que pode, em troca, alterar seu comportamento. Faz-se oportuno destacar, ainda, que apenas uma das linhagens (MCF-7) foi capaz de formar esferoides sem suplementação de Geltrex[®]. Nesse contexto, visando a possíveis experimentos em cultivo 3D para outras linhagens que não as testadas, a utilização de Geltrex[®] se mostra vantajosa, haja vista que outras linhagens possam apresentar dificuldades na formação espontânea de esferoides na ausência do mesmo, tal qual como MDA-MB-231.

5 CONCLUSÕES

Considerando a necessidade emergente da utilização de modelos *in vitro* que possam, não somente melhor predizer a eficácia e/ou toxicidade de potenciais drogas, mas de aprimorar os estudos para a compreensão do câncer, o presente trabalho se propôs a estabelecer um protocolo de cultivo 3D, com bom custo-benefício, para avaliação da citotoxicidade em linhagens de câncer de mama. Os resultados permitiram concluir que:

- O protocolo de sobreposição líquida com agarose é eficaz para geração de esferoides espontâneos para MCF-7, mas não para MDA-MB-231;

- MDA-MB-231, pelas baixas interações intercelulares apresentadas pela mesma, só é capaz de gerar esferoides após adição de membrana basal reconstituída;
- MCF-7 também se organiza para formar esferoides quando na presença de Geltrex[®];
- A concentração de Geltrex[®], bem como o momento em que o mesmo é incorporado ao meio, influencia na formação de esferoides geometricamente homogêneos e com diâmetros semelhantes para ambas as linhagens;
- O tamanho dos esferoides formados é diretamente proporcional ao número de células plaqueadas;
- Células cultivadas em monocamada são mais sensíveis ao tratamento com Paclitaxel do que aquelas cultivadas num contexto 3D, para ambas as linhagens;
- Esferoides de MCF-7, formados com adição de Geltrex[®] ao meio, apresentam IC₅₀ estimada maior quando comparados aos formados espontaneamente sem membrana basal, permitindo inferir que a ECM possui papel relevante na resposta das células frente a drogas.

6 PERSPECTIVAS

- Realização de novos ensaios de citotoxicidade com Paclitaxel em modelo 3D com Geltrex[®], para MCF-7 e MDA-MB-231, a fim de possibilitar análises estatísticas para comparação com o modelo 2D e 3D sem Geltrex[®];
- Realização de ensaios de citotoxicidade com outros quimioterápicos usados na rotina do câncer de mama, utilizando o modelo de cultivo 3D padronizado;
- Análise da expressão de proteínas de adesão, como caderinas e integrinas, em células MCF-7 e MDA-MB-231 quando cultivadas em monocamada e em 3D;
- Análise do ciclo celular de MCF-7 e MDA-MB-231 para avaliar o perfil proliferativo das células após se organizarem como esferoides;
- Avaliar a estrutura 3D dos esferoides quanto a presença ou não de núcleo necrótico para estruturas até 400 µm de diâmetro médio;

- Estabelecimento de protocolo de cultivo 3D em modelo de co-cultura, incorporando células estromais, como fibroblastos, para avaliação do comportamento de células de câncer de mama na presença das mesmas;
- Avaliação de citotoxicidade em cultivo 3D de co-cultura, comparando com resultados alcançados quando as células tumorais de mama são mantidas em modelo 3D de monocultura.

BIBLIOGRAFIA

- ALVES, R. C. *et al.* Characteristics, properties and analytical methods of paclitaxel: a review. **Critical reviews in analytical chemistry**, v. 48, n. 2, p. 110-118, 2018.
- AMERICAN TYPE CULTURE COLLECTION (ATCC). MCF7 (ATCC[®] HTB-22[™]). Disponível em: <<https://www.atcc.org/products/all/htb-22.aspx>>. Acesso em: 25 mar. 2021.
- AMERICAN TYPE CULTURE COLLECTION (ATCC). MDA-MB-231 (ATCC[®] HTB-26[™]). Disponível em: <<https://www.atcc.org/products/all/htb-26.aspx>>. Acesso em: 25 mar. 2021.
- AMIRABADI, H. E. *et al.* Characterizing the invasion of different breast cancer cell lines with distinct E-cadherin status in 3D using a microfluidic system. **Biomedical microdevices**, v. 21, n. 4, p. 1-11, 2019.
- ANTONI, D. *et al.* Three-dimensional cell culture: a breakthrough in vivo. **International journal of molecular sciences**, v. 16, n. 3, p. 5517-5527, 2015.
- AOUJIT, F.; VUORI, K. Integrin signaling inhibits paclitaxel-induced apoptosis in breast cancer cells. **Oncogene**, v. 20, n. 36, p. 4995-5004, 2001.
- ARNETH, B. Tumor microenvironment. **Medicina**, v. 56, n. 1, p. 15, 2019.
- BADEA, M. A. *et al.* Influence of Matrigel[®] on single-and multiple-spheroid cultures in breast cancer research. **SLAS DISCOVERY: Advancing Life Sciences R&D**, v. 24, n. 5, p. 563-578, 2019.
- BAGHBAN, R. *et al.* Tumor microenvironment complexity and therapeutic implications at a glance. **Cell Communication and Signaling**, v. 18, n. 1, p. 1-19, 2020.
- BAHCECIOGLU, G. *et al.* Breast cancer models: Engineering the tumor microenvironment. **Acta biomaterialia**, v. 106, p. 1-21, 2020.
- BAKER, B. M.; CHEN, C. S. Deconstructing the third dimension—how 3D culture microenvironments alter cellular cues. **Journal of cell science**, v. 125, n. 13, p. 3015-3024, 2012.
- BARNARD, M. E.; BOEKE, C. E.; TAMIMI, R. M. Established breast cancer risk factors and risk of intrinsic tumor subtypes. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer**, v. 1856, n. 1, p. 73-85, 2015.
- BAYRAM, D. *et al.* The apoptotic effects of silibinin on MDA-MB-231 and MCF-7 human breast carcinoma cells. **Human & experimental toxicology**, v. 36, n. 6, p. 573-586, 2017.

- BILATI, U.; ALLÉMANN, E.; DOELKER, E. Development of a nanoprecipitation method intended for the entrapment of hydrophilic drugs into nanoparticles. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 24, n. 1, p. 67-75, 2005.
- BISSELL, M. J.; HALL, H. G.; PARRY, G. How does the extracellular matrix direct gene expression?. **Journal of theoretical biology**, v. 99, n. 1, p. 31-68, 1982.
- BLOCH, Katarzyna et al. Metabolic alterations during the growth of tumour spheroids. **Cell biochemistry and biophysics**, v. 68, n. 3, p. 615-628, 2014.
- BOO, L. *et al.* Phenotypic and microRNA characterization of the neglected CD24+ cell population in MCF-7 breast cancer 3-dimensional spheroid culture. **Journal of the Chinese Medical Association**, v. 83, n. 1, p. 67-76, 2020.
- BOO, L. *et al.* Phenotypic and microRNA transcriptomic profiling of the MDA-MB-231 spheroid-enriched CSCs with comparison of MCF-7 microRNA profiling dataset. **PeerJ**, v. 5, p. e3551, 2017.
- BOYD, N. F. *et al.* Heritability of mammographic density, a risk factor for breast cancer. **New England Journal of Medicine**, v. 347, n. 12, p. 886-894, 2002.
- BOYD, N. F. *et al.* Mammographic density and breast cancer risk: current understanding and future prospects. **Breast cancer research**, v. 13, n. 6, p. 1-12, 2011.
- BRESLIN, S.; O'DRISCOLL, L. Three-dimensional cell culture: the missing link in drug discovery. **Drug discovery today**, v. 18, n. 5-6, p. 240-249, 2013.
- BRESLIN, S.; O'DRISCOLL, L. The relevance of using 3D cell cultures, in addition to 2D monolayer cultures, when evaluating breast cancer drug sensitivity and resistance. **Oncotarget**, v. 7, n. 29, p. 45745, 2016.
- BRESLIN, S.; O'DRISCOLL, L. The relevance of using 3D cell cultures, in addition to 2D monolayer cultures, when evaluating breast cancer drug sensitivity and resistance. **Oncotarget**, v. 7, n. 29, p. 45745, 2016.
- CAILLEAU, R. *et al.* Breast tumor cell lines from pleural effusions. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 53, n. 3, p. 661-674, 1974.
- CARMONA-FONTAINE, C. *et al.* Metabolic origins of spatial organization in the tumor microenvironment. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 114, n. 11, p. 2934-2939, 2017.
- CAVACO, M. *et al.* Development of Breast Cancer Spheroids to Evaluate Cytotoxic Response to an Anticancer Peptide. **Pharmaceutics**, v. 13, n. 11, p. 1863, 2021.

- CHITCHOLTAN, K. *et al.* Differences in growth properties of endometrial cancer in three dimensional (3D) culture and 2D cell monolayer. **Experimental cell research**, v. 319, n. 1, p. 75-87, 2013.
- CHOI, S. B. *et al.* Molecular mechanism of HIF-1-independent VEGF expression in a hepatocellular carcinoma cell line. **International journal of molecular medicine**, v. 28, n. 3, p. 449-454, 2011.
- CINTRA, J. R. D. *et al.* Perfil imuno-histoquímico e variáveis clinicopatológicas no câncer de mama. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 58, n. 2, p. 178-187, 2012.
- COMŞA, Ş.; CIMPEAN, A. M.; RAICA, M. The story of MCF-7 breast cancer cell line: 40 years of experience in research. **Anticancer research**, v. 35, n. 6, p. 3147-3154, 2015.
- COSTA, E. C. *et al.* Spheroids formation on non-adhesive surfaces by liquid overlay technique: Considerations and practical approaches. **Biotechnology journal**, v. 13, n. 1, p. 1700417, 2017.
- COSTĂCHEL, O.; FADEI, L.; BADEA, E. Tumor cell suspension culture on non adhesive substratum. **Zeitschrift für Krebsforschung**, v. 72, n. 1, p. 24-31, 1969.
- CSERNI, G. Histological type and typing of breast carcinomas and the WHO classification changes over time. **Pathologica**, v. 112, n. 1, p. 25, 2020.
- CUI, X.; HARTANTO, Y.; ZHANG, H. Advances in multicellular spheroids formation. **Journal of the Royal Society Interface**, v. 14, n. 127, p. 20160877, 2017.
- CUZICK, J. *et al.* Tamoxifen-induced reduction in mammographic density and breast cancer risk reduction: a nested case–control study. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 103, n. 9, p. 744-752, 2011.
- DAMASCENO, J. P. L. *et al.* Preformulation study and influence of DMSO and propylene glycol on the antioxidant action of isocoumarin paepalantine isolated from *Paepalanthus bromelioides*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 25, n. 4, p. 395-400, 2015.
- DAMIANO, J.S. *et al.* Cell adhesion mediated drug resistance (CAM-DR): role of integrins and resistance to apoptosis in human myeloma cell lines. **Blood, the Journal of the American Society of Hematology**, v. 93, n. 5, p. 1658-1667, 1999.
- DANG, C. V. *et al.* Therapeutic targeting of cancer cell metabolism. **Journal of molecular medicine**, v. 89, n. 3, p. 205-212, 2011.

- DÄSTER, S. *et al.* Induction of hypoxia and necrosis in multicellular tumor spheroids is associated with resistance to chemotherapy treatment. **Oncotarget**, v. 8, n. 1, p. 1725, 2017.
- DE MENORVAL, M.-A. *et al.* Effects of dimethyl sulfoxide in cholesterol-containing lipid membranes: a comparative study of experiments in silico and with cells. **PloS one**, v. 7, n. 7, p. e41733, 2012.
- DESGROSELLIER, J. S.; CHERESH, D. A. Integrins in cancer: biological implications and therapeutic opportunities. **Nature Reviews Cancer**, v. 10, n. 1, p. 9-22, 2010.
- DESOIZE, B.; JARDILLIER, J.-C. Multicellular resistance: a paradigm for clinical resistance?. **Critical reviews in oncology/hematology**, v. 36, n. 2-3, p. 193-207, 2000.
- DEVANNY, A. J.; VANCURA, M. B.; KAUFMAN, L. J. Exploiting differential effects of actomyosin contractility to control cell sorting among breast cancer cells. **Molecular biology of the cell**, v. 32, n. 21, p. ar24, 2021.
- DICKREUTER, E.; CORDES, N. The cancer cell adhesion resistome: mechanisms, targeting and translational approaches. **Biological chemistry**, v. 398, n. 7, p. 721-735, 2017.
- DIXON, J. M. Endocrine resistance in breast cancer. **New Journal of Science**, v. 2014, 2014.
- DO NASCIMENTO, F. C. Terapia Hormonal Adjuvante no Câncer de Mama em Mulheres Pré-menopáusicas. **Rev. Bras. Oncologia Clínica**, v. 2, n. 6, p. 9-14, 2005.
- DO NASCIMENTO, R. G.; OTONI, K. M. Histological and molecular classification of breast cancer: what do we know. **Mastology**, v. 30, p. 1-8, 2020.
- DOUBLIER, S. *et al.* HIF-1 activation induces doxorubicin resistance in MCF7 3-D spheroids via P-glycoprotein expression: a potential model of the chemo-resistance of invasive micropapillary carcinoma of the breast. **BMC cancer**, v. 12, n. 1, p. 1-15, 2012.
- DOWSETT, M. *et al.* Meta-analysis of breast cancer outcomes in adjuvant trials of aromatase inhibitors versus tamoxifen. **Journal of Clinical Oncology**, v. 28, n. 3, p. 509-518, 2009.
- DUBOIS, C. *et al.* Development and cytotoxic response of two proliferative MDA-MB-231 and non-proliferative SUM1315 three-dimensional cell culture models of triple-negative basal-like breast cancer cell lines. **Oncotarget**, v. 8, n. 56, p. 95316, 2017.

- DUVAL, K. *et al.* Modeling physiological events in 2D vs. 3D cell culture. **Physiology**, v. 32, n. 4, p. 266-277, 2017.
- EDMONDSON, R. *et al.* Three-dimensional cell culture systems and their applications in drug discovery and cell-based biosensors. **Assay and drug development technologies**, v. 12, n. 4, p. 207-218, 2014.
- ENGEL, J.; CHIQUET, M. An overview of extracellular matrix structure and function. **The extracellular matrix: an overview**, p. 1-39, 2011.
- FABBRI, A.; CARCANGIU, M. L.; CARBONE, A. Histological classification of breast cancer. In: **Breast Cancer**. Springer, Berlin, Heidelberg, 2008. p. 3-14.
- FADAKA, A. *et al.* Biology of glucose metabolism in cancer cells. **Journal of Oncological Sciences**, v. 3, n. 2, p. 45-51, 2017
- FAHAD ULLAH, M. Breast cancer: current perspectives on the disease status. **Breast Cancer Metastasis and Drug Resistance**, p. 51-64, 2019.
- FANG, Y.; EGLIN, R. M. Three-dimensional cell cultures in drug discovery and development. **Slas discovery: Advancing Life Sciences R&D**, v. 22, n. 5, p.456-472, 2017.
- FIDLER, I. J. The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. **Nature reviews cancer**, v. 3, n. 6, p. 453-458, 2003.
- FISHER, M. F.; RAO, S. S. Three-dimensional culture models to study drug resistance in breast cancer. **Biotechnology and bioengineering**, v. 117, n. 7, p. 2262-2278, 2020.
- FONG, E. L. S. *et al.* Heralding a new paradigm in 3D tumor modeling. **Biomaterials**, v. 108, p. 197-213, 2016.
- FONTOURA, J. C. *et al.* Comparison of 2D and 3D cell culture models for cell growth, gene expression and drug resistance. **Materials Science and Engineering: C**, v. 107, p. 110264, 2020.
- FOUGNER, C. *et al.* Re-definition of claudin-low as a breast cancer phenotype. **Nature communications**, v. 11, n. 1, p. 1-11, 2020.
- FREYER, J. P.; SUTHERLAND, R. M. Regulation of growth saturation and development of necrosis in EMT6/Ro multicellular spheroids by the glucose and oxygen supply. **Cancer research**, v. 46, n. 7, p. 3504-3512, 1986.
- FRIEDRICH, J. *et al.* Spheroid-based drug screen: considerations and practical approach. **Nature protocols**, v. 4, n. 3, p. 309, 2009.

- FRIEDRICH, J.; EBNER, R.; KUNZ-SCHUGHART, L. A. Experimental anti-tumor therapy in 3-D: spheroids—old hat or new challenge?. **International journal of radiation biology**, v. 83, n. 11-12, p. 849-871, 2007.
- FROEHLICH, K. *et al.* Generation of multicellular breast cancer tumor spheroids: comparison of different protocols. **Journal of mammary gland biology and neoplasia**, v. 21, n. 3, p. 89-98, 2016.
- GALVAO, J. *et al.* Unexpected low-dose toxicity of the universal solvent DMSO. **The FASEB Journal**, v. 28, n. 3, p. 1317-1330, 2014.
- GAO, W. Development of a novel and economical agar-based non-adherent three-dimensional culture method for enrichment of cancer stem-like cells. **Stem Cell Research & Therapy**, v. 9, n. 1, p. 1-13, 2018.
- GARGOTTI, M. *et al.* Comparative studies of cellular viability levels on 2D and 3D in vitro culture matrices. **Cytotechnology**, v. 70, n. 1, p. 261-273, 2018.
- GOLDHIRSCH, Aron *et al.* Strategies for subtypes—dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011. **Annals of oncology**, v. 22, n. 8, p. 1736-1747, 2011.
- GOMES, L. R. *et al.* ATR mediates cisplatin resistance in 3D-cultured breast cancer cells via translesion DNA synthesis modulation. **Cell death & disease**, v. 10, n. 6, p. 1-15, 2019.
- GONG, X. *et al.* Generation of multicellular tumor spheroids with microwell-based agarose scaffolds for drug testing. **PloS one**, v. 10, n. 6, p. e0130348, 2015.
- GONZALEZ, H.; HAGERLING, C.; WERB, Z. Roles of the immune system in cancer: from tumor initiation to metastatic progression. **Genes & development**, v. 32, n. 19-20, p. 1267-1284, 2018.
- GONZÁLEZ-PINZÓN, R.; HAGGERTY, R.; MYROLD, D. D. Measuring aerobic respiration in stream ecosystems using the resazurin-resorufin system. **Journal of Geophysical Research: Biogeosciences**, v. 117, n. G3, 2012.
- GURSKI, L. A. *et al.* 3D matrices for anti-cancer drug testing and development. **Oncology issues**, v. 25, n. 1, p. 20-25, 2010.
- GUYON, J. *et al.* A 3D Spheroid Model for Glioblastoma. **Journal of visualized experiments: JoVE**, n. 158, 2020.
- HAIT, W. N. Anticancer drug development: the grand challenges. **Nature reviews: Drug discovery**, v. 9, n. 4, p. 253-254, 2010.

- HIRATA, E.; SAHAI, E. Tumor microenvironment and differential responses to therapy. **Cold Spring Harbor perspectives in medicine**, v. 7, n. 7, p. a026781, 2017.
- HAMILTON, G.; RATH, B. Applicability of tumor spheroids for in vitro chemosensitivity assays. **Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology**, v. 15, n. 1, p. 15-23, 2019.
- HAN, S. J.; KWON, S.; KIM, K. S. Challenges of applying multicellular tumor spheroids in preclinical phase. **Cancer Cell International**, v. 21, n. 1, p. 1-19, 2021.
- HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The hallmarks of cancer. **cell**, v. 100, n. 1, p. 57-70, 2000.
- HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **cell**, v. 144, n. 5, p. 646-674, 2011.
- HARBECK, N. *et al.* Breast cancer. **Nature reviews Disease primers**, v. 5, n. 1, p. 1-31, 2019.
- HARRIS, A. L. Hypoxia — a key regulatory factor in tumour growth. **Nature reviews cancer**, v. 2, n. 1, p. 38-47, 2002.
- HASSON, S. P. *et al.* Endocrine resistance in breast cancer: focus on the phosphatidylinositol 3-kinase/akt/mammalian target of rapamycin signaling pathway. **Breast care**, v. 8, n. 4, p. 248-255, 2013.
- HERSCHKOWITZ, J. I. *et al.* Identification of conserved gene expression features between murine mammary carcinoma models and human breast tumors. **Genome biology**, v. 8, n. 5, p. 1-17, 2007.
- HIRSCHHAEUSER, F. *et al.* Multicellular tumor spheroids: an underestimated tool is catching up again. **Journal of biotechnology**, v. 148, n. 1, p. 3-15, 2010.
- HO, W. Y. *et al.* Development of multicellular tumor spheroid (MCTS) culture from breast cancer cell and a high throughput screening method using the MTT assay. **PLoS One**, v. 7, n. 9, 2012.
- HODKINSON, P. S. *et al.* ECM overrides DNA damage-induced cell cycle arrest and apoptosis in small-cell lung cancer cells through β 1 integrin-dependent activation of PI3-kinase. **Cell Death & Differentiation**, v. 13, n. 10, p. 1776-1788, 2006.
- HOLLE, W.; YOUNG, J. L.; SPATZ, J. P. In vitro cancer cell–ECM interactions inform in vivo cancer treatment. **Advanced drug delivery reviews**, v. 97, p. 270-279, 2016.
- HOPKINS, A. L. Network pharmacology: the next paradigm in drug discovery. **Nature chemical biology**, v. 4, n. 11, p. 682-690, 2008.

- HUANG, Z.; YU, P.; TANG, J. Characterization of triple-negative breast cancer MDA-MB-231 cell spheroid model. **OncoTargets and therapy**, v. 13, p. 5395, 2020.
- HUGH, J. *et al.* Breast cancer subtypes and response to docetaxel in node-positive breast cancer: use of an immunohistochemical definition in the BCIRG 001 trial. **Journal of clinical oncology**, v. 27, n. 8, p. 1168, 2009.
- HUGHES, J. P. *et al.* Principles of early drug discovery. **British journal of pharmacology**, v. 162, n. 6, p. 1239-1249, 2011.
- IMAMURA, Y. *et al.* Comparison of 2D-and 3D-culture models as drug-testing platforms in breast cancer. **Oncology reports**, v. 33, n. 4, p. 1837-1843, 2015.
- INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA (a). Estimativa 2020. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files//media/document//estimativa-2020-incidencia-de-cancer-no-brasil.pdf>>. Acesso em: 11 fev. 2022.
- INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA (b). Tipos de câncer: Câncer de mama. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-de-mama>. Acesso em: 24 mar. 2021.
- INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH OF CANCER (a). Cancer tomorrow, 2020. Disponível em: <<https://gco.iarc.fr/tomorrow/en/dataviz/isotype>>. Acesso em: 24 mar. 2021.
- INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH OF CANCER (b). Estimated number of new cases in 2020, worldwide, both sexes, all ages (2020). Disponível em: https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-pie?v=2020&mode=cancer&mode_population=continents&population=900&populations=900&key=total&sex=0&cancer=39&type=0&statistic=5&prevalence=0&population_group=0&ages_group%5B%5D=0&ages_group%5B%5D=17&nb_items=7&group_cancer=1&include_nmsc=1&include_nmsc_other=1&half_pie=0&donut=0. Acesso em: 24 mar. 2021.
- INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH OF CANCER (c). WHO Classification of Tumours: Breast Tumours, 2020. Disponível em: <<https://publications.iarc.fr/Book-And-Report-Series/Who-Classification-Of-Tumours/Breast-Tumours-2019>>. Acesso em: 25 fev. 2022.
- IVANOV, D. P.; GRABOWSKA, A. M.; GARNETT, M. C. High-Throughput spheroid screens using volume, resazurin reduction, and acid phosphatase activity. In: **Cell Viability Assays**. Humana Press, New York, NY, p. 43-59, 2017.

- IVASCU, A.; KUBBIES, M. Diversity of cell-mediated adhesions in breast cancer spheroids. **International journal of oncology**, v. 31, n. 6, p. 1403-1413, 2007.
- IVASCU, A.; KUBBIES, M. Rapid generation of single-tumor spheroids for high-throughput cell function and toxicity analysis. **Journal of biomolecular screening**, v. 11, n. 8, p. 922-932, 2006.
- JENSEN, C.; TENG, Y. Is it time to start transitioning from 2D to 3D cell culture?. **Frontiers in molecular biosciences**, v. 7, p. 33, 2020.
- JI, X. *et al.* Chemoresistance mechanisms of breast cancer and their countermeasures. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 114, p. 108800, 2019.
- JING, X. *et al.* Role of hypoxia in cancer therapy by regulating the tumor microenvironment. **Molecular cancer**, v. 18, n. 1, p. 1-15, 2019.
- JUNTTILA, M. R.; DE SAUVAGE, F. J. Influence of tumour micro-environment heterogeneity on therapeutic response. **Nature**, v. 501, n. 7467, p. 346-354, 2013.
- JUSTUS, C. R.; DONG, L.; YANG, L. V. Acidic tumor microenvironment and pH-sensing G protein-coupled receptors. **Frontiers in physiology**, v. 4, p. 354, 2013.
- KALLURI, R.; WEINBERG R. A. The basics of epithelial-mesenchymal transition. **The Journal of clinical investigation**, v. 119, n. 6, p. 1420-1428, 2009.
- KAPAŁCZYŃSKA, M. *et al.* 2D and 3D cell cultures—a comparison of different types of cancer cell cultures. **Archives of medical science: AMS**, v. 14, n. 4, p. 910, 2018.
- KELLER, F. *et al.* Extracellular Matrix Components Regulate Bone Sialoprotein Expression in MDA-MB-231 Breast Cancer Cells. **Cells**, v. 10, n. 6, p. 1304, 2021.
- KHAITAN, D. *et al.* Establishment and characterization of multicellular spheroids from a human glioma cell line; Implications for tumor therapy. **Journal of translational medicine**, v. 4, n. 1, p. 1-13, 2006.
- KLEINMAN, H. K.; MARTIN, G. R. Matrigel: basement membrane matrix with biological activity. In: **Seminars in cancer biology**. Academic Press, 2005. p. 378-386.
- KNIGHT, E.; PRZYBORSKI, S. Advances in 3D cell culture technologies enabling tissue-like structures to be created in vitro. **Journal of anatomy**, v. 227, n. 6, p. 746-756, 2015.
- KO, J-H. *et al.* Theacrine attenuates epithelial mesenchymal transition in human breast cancer MDA-MB-231 cells. **Phytotherapy Research**, v. 33, n. 7, p. 1934-1942, 2019.
- KUNZ-SCHUGHART, L. A. *et al.* The use of 3-D cultures for high-throughput screening: the multicellular spheroid model. **Journal of biomolecular screening**, v. 9, n. 4, p. 273-285, 2004.

- KUO, C-T. *et al.* Three-dimensional spheroid culture targeting versatile tissue bioassays using a PDMS-based hanging drop array. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 1-10, 2017.
- LABANI-MOTLAGH, A.; ASHJA-MAHDAVI, M.; LOSKOG, A. The tumor microenvironment: a milieu hindering and obstructing antitumor immune responses. **Frontiers in Immunology**, v. 11, p. 940, 2020.
- LABARBERA, D. V.; REID, B. G.; YOO, B. H. The multicellular tumor spheroid model for high-throughput cancer drug discovery. **Expert opinion on drug discovery**, v. 7, n. 9, p. 819-830, 2012.
- LANGHANS, S. A. Three-dimensional in vitro cell culture models in drug discovery and drug repositioning. **Frontiers in pharmacology**, v. 9, p. 6, 2018.
- LEE, J.; CUDDIHY, M. J.; KOTOV, N. A. Three-dimensional cell culture matrices: state of the art. **Tissue Engineering Part B: Reviews**, v. 14, n. 1, p. 61-86, 2008.
- LEMOIS, L. G. T. *et al.* The LQB-223 Compound Modulates Antiapoptotic Proteins and Impairs Breast Cancer Cell Growth and Migration. **International journal of molecular sciences**, v. 20, n. 20, p. 5063, 2019.
- LI, H.; HUMMON, A. B. Imaging mass spectrometry of three-dimensional cell culture systems. **Analytical chemistry**, v. 83, n. 22, p. 8794-8801, 2011.
- LI, N. T. *et al.* Tissue-engineered 3D cancer microenvironment for screening therapeutics. In: **Biomaterials for 3D Tumor Modeling**. p. 453-479, 2020.
- LI, Q. *et al.* 3D models of epithelial-mesenchymal transition in breast cancer metastasis: high-throughput screening assay development, validation, and pilot screen. **Journal of biomolecular screening**, v. 16, n. 2, p. 141-154, 2011.
- LIN, R-Z. *et al.* Dynamic analysis of hepatoma spheroid formation: roles of E-cadherin and β 1-integrin. **Cell and tissue research**, v. 324, n. 3, p. 411-422, 2006.
- LIN, R-Z; CHANG, H-Y. Recent advances in three-dimensional multicellular spheroid culture for biomedical research. **Biotechnology Journal: Healthcare Nutrition Technology**, v. 3, n. 9-10, p. 1172-1184, 2008.
- LOCHTER, A.; BISSELL, M. J. Involvement of extracellular matrix constituents in breast cancer. In: **Seminars in cancer biology**. Lawrence Berkeley National Lab. (LBNL), Berkeley, CA (United States), 1995.
- LOVITT, C.J.; SHELPER, T.B.; AVERY, V.M. Doxorubicin resistance in breast cancer cells is mediated by extracellular matrix proteins. **BMC cancer**, v. 18, n. 1, p. 1-11, 2018.

LUQUE-BOLIVAR, A. *et al.* Resistance and overcoming resistance in breast cancer. **Breast Cancer: Targets and Therapy**, v. 12, p. 211, 2020.

LV, D. *et al.* Three-dimensional cell culture: A powerful tool in tumor research and drug discovery. **Oncology letters**, v. 14, n. 6, p. 6999-7010, 2017.

MA, H-I. *et al.* Multicellular tumor spheroids as an in vivo-like tumor model for three-dimensional imaging of chemotherapeutic and nano material cellular penetration. **Molecular imaging**, v. 11, n. 6, p. 7290.2012. 00012, 2012.

MALHOTRA, G. K. *et al.* Histological, molecular and functional subtypes of breast cancers. **Cancer biology & therapy**, v. 10, n. 10, p. 955-960, 2010.

MARUPUDI, N. I. *et al.* Paclitaxel: a review of adverse toxicities and novel delivery strategies. **Expert opinion on drug safety**, v. 6, n. 5, p. 609-621, 2007.

MAUGHAN, K. L.; LUTTERBIE, M. A.; HAM, P. Treatment of breast cancer. **American family physician**, v. 81, n. 11, p. 1339-1346, 2010.

MBEUNKUI, F.; JOHANN, D. J. Cancer and the tumor microenvironment: a review of an essential relationship. **Cancer chemotherapy and pharmacology**, v. 63, n. 4, p. 571-582, 2009.

MILLARD, M. *et al.* Drug delivery to solid tumors: the predictive value of the multicellular tumor spheroid model for nanomedicine screening. **International journal of nanomedicine**, v. 12, p. 7993, 2017.

MISTRY, I N. *et al.* Clinical advances of hypoxia-activated prodrugs in combination with radiation therapy. **International Journal of Radiation Oncology* Biology* Physics**, v. 98, n. 5, p. 1183-1196, 2017.

MITTAL, K.; EBOS, J.; RINI, B. Angiogenesis and the tumor microenvironment: vascular endothelial growth factor and beyond. In: **Seminars in oncology**, v. 14, n. 2, p. 235-251, 2014.

MITTAL, S.; BROWN, N. J.; HOLEN, I. The breast tumor microenvironment: role in cancer development, progression and response to therapy. **Expert review of molecular diagnostics**, v. 18, n. 3, p. 227-243, 2018.

MOO, T-A *et al.* Overview of breast cancer therapy. **PET clinics**, v. 13, n. 3, p. 339-354, 2018.

MOSCONA, A.; MOSCONA, H. The dissociation and aggregation of cells from organ rudiments of the early chick embryo. **Journal of anatomy**, v. 86, n. Pt 3, p. 287, 1952.

MUELLER-KLIESER, W.; FREYER, J. P.; SUTHERLAND, R. M. Influence of glucose and oxygen supply conditions on the oxygenation of multicellular spheroids. **British journal of cancer**, v. 53, n. 3, p. 345-353, 1986.

MUENST, S. *et al.* The immune system and cancer evasion strategies: therapeutic concepts. **Journal of internal medicine**, v. 279, n. 6, p. 541-562, 2016.

MURANEN, T. *et al.* Inhibition of PI3K/mTOR leads to adaptive resistance in matrix-attached cancer cells. **Cancer cell**, v. 21, n. 2, p. 227-239, 2012.

NAGELKERKE, A. *et al.* Generation of multicellular tumor spheroids of breast cancer cells: how to go three-dimensional. **Analytical biochemistry**, v. 437, n. 1, p. 17-19, 2013.

NATH, S.; DEVI, G. R. Three-dimensional culture systems in cancer research: Focus on tumor spheroid model. **Pharmacology & therapeutics**, v. 163, p. 94-108, 2016.

NYGA, A.; CHEEMA, U.; LOIZIDOU, M. 3D tumour models: novel in vitro approaches to cancer studies. **Journal of cell communication and signaling**, v. 5, n. 3, p. 293-248, 2011.

O'BRIAN, J. *et al.* Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity, **Eur J Biochem**, vol. 267, p. 1432-1327, 2000.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Cancer: overview, 2022. Disponível em: <https://www.who.int/health-topics/cancer#tab=tab_1>. Acesso em: 12 de nov. de 2021.

ONUCHIC, A. Cl.; CHAMMAS, R. Câncer e o microambiente tumoral. **Revista de Medicina**, v. 89, n. 1, p. 21-31, 2010.

Paget, S. The distribution of secondary growths in cancer of the breast. **Lancet**, p. 571-573, 1889.

PASTUSHENKO, I.; BLANPAIN, C. EMT transition states during tumor progression and metastasis. **Trends in cell biology**, v. 29, n. 3, p. 212-226, 2019.

PEAIRS, K. S. *et al.* Screening for breast cancer. In: **Seminars in Oncology**. WB Saunders, 2017. p. 60-72.

PETERSEN, O. W. *et al.* Interaction with basement membrane serves to rapidly distinguish growth and differentiation pattern of normal and malignant human breast epithelial cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 89, n. 19, p. 9064-9068, 1992.

- PING, Q. *et al.* Cancer-associated fibroblasts: Overview, progress, challenges, and directions. **Cancer gene therapy**, v. 28, n. 9, p. 984-999, 2021.
- POWAN, P. *et al.* Molecular Pathways in Cell Signaling: Detachment-induced E-cadherin expression promotes 3D tumor spheroid formation but inhibits tumor formation and metastasis of lung cancer cells. **American journal of physiology-cell physiology**, v. 313, n. 5, p. C556, 2017.
- RAGHAVAN, S. *et al.* Comparative analysis of tumor spheroid generation techniques for differential in vitro drug toxicity. **Oncotarget**, v. 7, n. 13, p. 16948, 2016.
- RAHMAN, A. U. R. Confocal Microscopy in Conjunction With Haemocytometry to Evaluate the Imperative Physical Characteristics of Multicellular Tumor Spheroids. 2021.
- RAMAIAHGARI, S. C. *et al.* A 3D in vitro model of differentiated HepG2 cell spheroids with improved liver-like properties for repeated dose high-throughput toxicity studies. **Archives of toxicology**, v. 88, n. 5, p. 1083-1095, 2014.
- RAMANI, K. V. *et al.* Breast cancer: Medical treatment, side effects, and complementary therapies. **Momentum Press**, v.1, p. 31-41, 2017.
- RAPISARDA, A.; MELILLO, G. Combination strategies targeting hypoxia inducible factor 1 (HIF-1) for cancer therapy. In: **The tumor microenvironment**. Springer, p.3-21, 2010.
- RAVI, M. *et al.* 3D cell culture systems: advantages and applications. **Journal of cellular physiology**, v. 230, n. 1, p. 16-26, 2015.
- REIS-FILHO, J. S.; LAKHANI, S. R. Breast cancer special types: why bother?. **The Journal of Pathology: A Journal of the Pathological Society of Great Britain and Ireland**, v. 216, n. 4, p. 394-398, 2008.
- RIMAWI, M. F.; DE ANGELIS, C.; SCHIFF, R. Resistance to anti-HER2 therapies in breast cancer. **American Society of Clinical Oncology educational book**, v. 35, n. 1, p. e157-e164, 2015.
- ROBERTS, G. C. *et al.* An evaluation of matrix-containing and humanised matrix-free 3-dimensional cell culture systems for studying breast cancer. **PLoS one**, v. 11, n. 6, p. e0157004, 2016.
- ROCHA-BRISCHILIARI, S. C. *et al.* The rise in mortality from breast cancer in young women: trend analysis in Brazil. **PLoS One**, v. 12, n. 1, p. e0168950, 2017.
- ROJAS, K.; STUCKEY, A. Breast cancer epidemiology and risk factors. **Clinical obstetrics and gynecology**, v. 59, n. 4, p. 651-672, 2016.

- ROLVER, M. G. *et al.* Pyrazine ring-based Na⁺/H⁺ exchanger (NHE) inhibitors potently inhibit cancer cell growth in 3D culture, independent of NHE1. **Scientific reports**, v. 10, n. 1, p. 1-17, 2020.
- SAMADI, N. *et al.* Tumor microenvironment-mediated chemoresistance in breast cancer. **The Breast**, v. 30, p. 92-100, 2016.
- SEYFOORI, A. *et al.* Self-filling microwell arrays (SFMA) for tumor spheroid formation. **Lab on a Chip**, v. 18, n. 22, p. 3516-3528, 2018.
- SHIELD, K. *et al.* $\alpha 2\beta 1$ integrin affects metastatic potential of ovarian carcinoma spheroids by supporting disaggregation and proteolysis. **Journal of carcinogenesis**, v. 6, p. 11, 2007.
- SINGH, S. K. *et al.* Critical role of three-dimensional tumorsphere size on experimental outcome. **Biotechniques**, v. 69, n. 5, p. 333-338, 2020.
- SINGHA, N. C. *et al.* Tumor-associated hyaluronan limits efficacy of monoclonal antibody therapy. **Molecular cancer therapeutics**, v. 14, n. 2, p. 523-532, 2015.
- SINGHAI, R. *et al.* E-Cadherin as a diagnostic biomarker in breast cancer. **North American journal of medical sciences**, v. 3, n. 5, p. 227, 2011.
- SMYREK, I. *et al.* E-cadherin, actin, microtubules and FAK dominate different spheroid formation phases and important elements of tissue integrity. **Biology open**, v. 8, n. 1, p. bio037051, 2019.
- STADLER, M. *et al.* Exclusion from spheroid formation identifies loss of essential cell-cell adhesion molecules in colon cancer cells. **Scientific reports**, v. 8, n. 1, p. 1-16, 2018.
- SUN, Y-S. *et al.* Risk factors and preventions of breast cancer. **International journal of biological sciences**, v. 13, n. 11, p. 1387, 2017.
- SUTHERLAND, R. M. Cell and environment interactions in tumor microregions: the multicell spheroid model. **Science**, v. 240, n. 4849, p. 177-184, 1988.
- SUTHERLAND, R. M. *et al.* Growth of multicell spheroids in tissue culture as a model of nodular carcinomas. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 46, n. 1, p. 113-120, 1971.
- SUTHERLAND, R. M. *et al.* Growth of multicell spheroids in tissue culture as a model of nodular carcinomas. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 46, n. 1, p. 113-120, 1971.
- TALUKDAR, S. *et al.* Engineered silk fibroin protein 3D matrices for in vitro tumor model. **Biomaterials**, v. 32, n. 8, p. 2149–2159, 2011.

- TAYLOR, M. A.; PARVANI, J. G.; SCHIEMANN, W. P. The pathophysiology of epithelial-mesenchymal transition induced by transforming growth factor- β in normal and malignant mammary epithelial cells. **Journal of mammary gland biology and neoplasia**, v. 15, n. 2, p. 169-190, 2010.
- THOMAS, C. H. *et al.* Engineering gene expression and protein synthesis by modulation of nuclear shape. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 99, n. 4, p. 1972-1977, 2002.
- TIAN, X. *et al.* Hypoxia-inducible factor-1 α enhances the malignant phenotype of multicellular spheroid HeLa cells in vitro. **Oncology letters**, v. 1, n. 5, p. 893-897, 2010.
- TONG, C. WS *et al.* Recent advances in the treatment of breast cancer. **Frontiers in oncology**, v. 8, p. 227, 2018.
- TONIATTI, C. *et al.* Oncology drug discovery: planning a turnaround. **Cancer discovery**, v. 4, n. 4, p. 397-404, 2014.
- TOPALOVSKI, M.; BREKKEN, R. A. The extracellular matrix of tumors: a focus on fibronectin and fibulin-5. In: **Extracellular matrix in tumor biology**. Springer, p. 1-15, 2017.
- TORRENZINI, T.; ATHANAZIO, D.I A. Imunovigilância e imunoeedição de neoplasias: implicações clínicas e potencial terapêutico. **Rev. bras. cancerol**, p. 63-77, 2008.
- TRÉDAN, O. *et al.* Drug resistance and the solid tumor microenvironment. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 99, n. 19, p. 1441-1454, 2007.
- TSANG, J.; TSE, G. M. Molecular classification of breast cancer. **Advances in anatomic pathology**, v. 27, n. 1, p. 27-35, 2020.
- UHLER, C.; SHIVASHANKAR, G. V. Regulation of genome organization and gene expression by nuclear mechanotransduction. **Nature reviews Molecular cell biology**, v. 18, n. 12, p. 717-727, 2017.
- UNDERWOOD, T. J. *et al.* Cancer-associated fibroblasts predict poor outcome and promote periostin-dependent invasion in oesophageal adenocarcinoma. **The Journal of pathology**, v. 235, n. 3, p. 466-477, 2015.
- VAN ROY, F. Beyond E-cadherin: roles of other cadherin superfamily members in cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 14, n. 2, p. 121-134, 2014.
- VERGANI, L.; GRATTAROLA, M.; NICOLINI, C. Modifications of chromatin structure and gene expression following induced alterations of cellular shape. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 36, n. 8, p. 1447-1461, 2004.

- VERJANS, E-T. *et al.* Three-dimensional cell culture models for anticancer drug screening: Worth the effort?. **Journal of cellular physiology**, v. 233, n. 4, p. 2993-3003, 2018.
- VIALE, G. The current state of breast cancer classification. **Annals of oncology**, v. 23, p. x207-x210, 2012.
- VINCI, M. *et al.* Advances in establishment and analysis of three-dimensional tumor spheroid-based functional assays for target validation and drug evaluation. **BMC biology**, v. 10, n. 1, p. 1-21, 2012.
- WAKS, A. G.; WINER, E. P. Breast cancer treatment: a review. **Jama**, v. 321, n. 3, p. 288-300, 2019.
- WALKER, C.; MOJARES, E.; DEL RÍO HERNÁNDEZ, A. Role of extracellular matrix in development and cancer progression. **International journal of molecular sciences**, v. 19, n. 10, p. 3028, 2018.
- WALKER, R. A. Immunohistochemical markers as predictive tools for breast cancer. **Journal of clinical pathology**, v. 61, n. 6, p. 689-696, 2008.
- WANG, M. *et al.* Role of tumor microenvironment in tumorigenesis. **Journal of Cancer**, v. 8, n. 5, p. 761, 2017.
- WANG, X. *et al.* Doxorubicin delivery to 3D multicellular spheroids and tumors based on boronic acid-rich chitosan nanoparticles. **Biomaterials**, v. 34, n. 19, p. 4667-4679, 2013.
- WANG, Z. *et al.* H727 multicellular spheroids and its resistance to antitumor drugs sunitinib and axitinib. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 18, n. 12, p. 8078-8084, 2018.
- WEAVER, V. M. *et al.* Reversion of the malignant phenotype of human breast cells in three-dimensional culture and in vivo by integrin blocking antibodies. **The Journal of cell biology**, v. 137, n. 1, p. 231-245, 1997.
- WEIGELT, B.; REIS-FILHO, J. S. Histological and molecular types of breast cancer: is there a unifying taxonomy?. **Nature reviews Clinical oncology**, v. 6, n. 12, p. 718-730, 2009.
- WEN, Z. *et al.* A spheroid-based 3-D culture model for pancreatic cancer drug testing, using the acid phosphatase assay. **Brazilian journal of medical and biological research**, v. 46, n. 7, p. 634-642, 2013.

- WORTHINGTON, P.; POCHAN, D. J.; LANGHANS, S. A. Peptide hydrogels—versatile matrices for 3D cell culture in cancer medicine. **Frontiers in oncology**, v. 5, p. 92, 2015.
- WITZ, I. P.; LEVY-NISSENBAUM, O. The tumor microenvironment in the post-PAGET era. **Cancer letters**, v. 242, n. 1, p. 1-10, 2006.
- XING, H. *et al.* Effect of the cyclin-dependent kinases inhibitor p27 on resistance of ovarian cancer multicellular spheroids to anticancer chemotherapy. **Journal of cancer research and clinical oncology**, v. 131, n. 8, p. 511-519, 2005.
- YAKAVETS, I. *et al.* Advanced co-culture 3D breast cancer model for investigation of fibrosis induced by external stimuli: Optimization study. **Scientific reports**, v. 10, n. 1, p. 1-11, 2020.
- YAO, J. *et al.* Progress in the understanding of the mechanism of tamoxifen resistance in breast cancer. **Frontiers in Pharmacology**, p. 1848, 2020.
- YAO, Y.; DAI, W. Genomic instability and cancer. **Journal of carcinogenesis & mutagenesis**, v. 5, 2014.
- YEO, S. K.; GUAN, J-L. Breast cancer: multiple subtypes within a tumor?. **Trends in cancer**, v. 3, n. 11, p. 753-760, 2017.
- YU, Q. *et al.* Investigating the influence of block copolymer micelle length on cellular uptake and penetration in a multicellular tumor spheroid model. **Nanoscale**, v. 13, n. 1, p. 280-291, 2021.
- YUAN, C. *et al.* Dimethyl sulfoxide damages mitochondrial integrity and membrane potential in cultured astrocytes. **PloS one**, v. 9, n. 9, p. e107447, 2014.
- YUHAS, J. M. *et al.* A simplified method for production and growth of multicellular tumor spheroids. **Cancer research**, v. 37, n. 10, p. 3639-3643, 1977.
- ZAHA, D. C. Significance of immunohistochemistry in breast cancer. **World journal of clinical oncology**, v. 5, n. 3, p. 382, 2014.
- ZALATNAI, A. Tumor Microenvironment: Aspects of Stromal-Parenchymal Interaction. In: **Cancer Microenvironment and Therapeutic Implications**. Springer, p. 19-38, 2009.
- ZANONI, M. *et al.* 3D tumor spheroid models for in vitro therapeutic screening: a systematic approach to enhance the biological relevance of data obtained. **Scientific reports**, v. 6, n. 1, p. 1-11, 2016.
- ZENG, W. *et al.* Hypoxia and hypoxia inducible factors in tumor metabolism. **Cancer letters**, v. 356, n. 2, p. 263-267, 2015.

ZHANG, W. *et al.* Optimization of the formation of embedded multicellular spheroids of MCF-7 cells: How to reliably produce a biomimetic 3D model. **Analytical biochemistry**, v. 515, p. 47-54, 2016.

ZIELLO, J. E.; JOVIN, I. S.; HUANG, Y. Hypoxia-Inducible Factor (HIF)-1 regulatory pathway and its potential for therapeutic intervention in malignancy and ischemia. **The Yale journal of biology and medicine**, v. 80, n. 2, p. 51, 2007.

ZSCHENKER, O. *et al.* Genome-wide gene expression analysis in cancer cells reveals 3D growth to affect ECM and processes associated with cell adhesion but not DNA repair. **PloS one**, v. 7, n. 4, p. e34279, 2012.