



Resumo submetido ao XXVIII Congresso {Virtual} de Iniciação Científica da Universidade Estadual de Campinas

Células de melanoma resistentes a Temozolomida: atuação da quercetina na quimiossensibilização em cultura celular 2D e 3D

Beatriz Aires Lopes¹, Caroline Fernanda Sanches Dal Pozzo¹, Carmen Veríssima Ferreira-Halder¹, Henrique Marques-Souza¹

1. Departamento de Bioquímica e Biologia Tecidual, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas.

Apresentação de resultados derivados do projeto de Iniciação Científica desenvolvido pela primeira autora realizado entre Agosto/2019 e Agosto/2020, sob orientação do Prof. Dr. Henrique Marques-Souza e Profa. Dra. Carmen Veríssima Ferreira-Halder.



1. Introdução

O melanoma é caracterizado como o tipo mais grave de câncer de pele, sendo responsável por mais de 75% das mortes causadas por câncer de pele. Essa alta taxa de letalidade deve-se principalmente a sua alta taxa proliferativa, alta capacidade de desenvolver metástase e de desenvolver resistências aos medicamentos utilizados no tratamento [1]. Com o intuito de reverter a resistência, alguns flavonoides, como a quercetina, foram testados em diversos tipos de câncer, e demonstraram sucesso na quimiossensibilização do tumor [2]. A triagem desses compostos é comumente realizada em cultura celular em monocamada (2D), entretanto, esse tipo de cultura é incapaz de mimetizar características tumorais encontradas *in vivo*. Neste sentido, modelos *in vitro* mais complexos foram propostos, como os esferoides (3D), que possibilitam maior fidelidade à fisiologia tumoral encontrada no organismo vivo, visto que mimetiza o gradiente de oxigênio e nutrientes típicos de tumores, além de apresentar alterações em interações celulares [3,4].

2. Objetivos

Considerando os expostos acima, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a atuação da quercetina e do Temozolomida, quimioterápico cujo alguns tipos de melanoma desenvolvem resistência, nas células B16F10 (melanoma de camundongo) cultivadas em monocamada (2D) e em esferoides (3D).

3. Materiais e métodos

3.1 - Cultura celular

As células B16F10 foram cultivadas em meio DMEM suplementado com Soro Fetal Bovino (10%) e Penicilina/Estreptomicina (0,5%). As placas foram mantidas em atmosfera umidificada a 37°C e 5% de CO₂.

3.2 - Obtenção dos esferoides e análise da resposta ao tratamento combinado.

Para a construção do modelo 3D *in vitro* foi utilizado o sistema Bio-Assembler TM n3D (Biosciences, Houston/TX). Inicialmente as células foram cultivadas em placas de 24 poços, e após atingirem aproximadamente 80% de confluência, nanopartículas foram adicionadas à cultura para magnetizar as células. Incubou-se em atmosfera umidificada a 37°C e 5% de CO₂ durante 24 horas. Passado esse período, as células foram tripsinizadas e transferidas para uma placa *cell repellent* de 96 poços (10.000 células/poço). A placa foi incubada sobre um ímã, para a indução da formação do esferoide, a 37°C e 5% de CO₂ durante 24 horas. Após a incubação, os esferoides foram tratados com quercetina durante 3 horas, e, passado esse período, o Temozolomida foi acrescentado ao meio de tratamento. A morfologia dos esferoides foi observada durante 24 e 48 horas.



3.3 - Ensaio de viabilidade celular por redução do MTT

As células foram cultivadas em placas de 96 poços em uma densidade de 7.000 células/poço por 24 horas. Após esse período, as células foram tratadas com diferentes concentrações de quercetina e Temozolomida dissolvidos em DMSO, durante 24 horas. Em seguida, o meio de tratamento foi removido e adicionado o MTT (0,4mg/mL). Após 3 horas de incubação a 37°C a solução de MTT foi removida e foram adicionados 100 μ L de etanol absoluto para a solubilização dos cristais de formazan; a absorbância foi lida em espectrofotômetro (Biotek, λ = 570 nm). O grupo controle foi cultivado na presença de DMSO 0,1%.

4. Resultados e discussão

4.1 - Efeito da quercetina e do Temozolomida na viabilidade das células de melanoma (linhagem B16F10)

As células B16F10 cultivadas em monocamada foram tratadas com diferentes concentrações de quercetina ou Temozolomida durante 24 horas. Notou-se que a quercetina somente comprometeu a viabilidade das células na concentração de 100 μ M, na qual a viabilidade se manteve em torno de 50%. Já em relação ao Temozolomida a B16F10 foi pouco responsiva, apresentando cerca de 30% de toxicidade a partir da concentração de 300 μ M, o que corrobora a baixa taxa de resposta ao medicamento típico deste tipo de câncer (Figura 1).

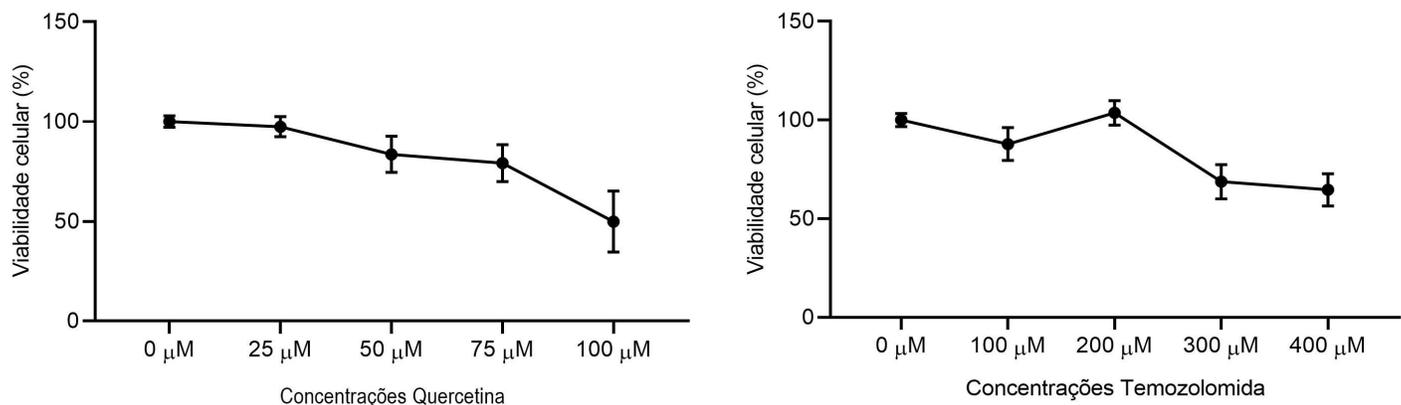


Figura 1 - Efeito da Quercetina e Temozolomida na viabilidade de células de melanoma medida por MTT. As células foram tratadas por 24 horas e em seguida o meio de tratamento foi substituído por meio contendo MTT. Após 4 horas de incubação o MTT foi removido e os cristais de formazan formados foram solubilizados com etanol. A absorbância foi medida a 570 nm. A redução do MTT pelo grupo controle (DMSO 0,1%) foi considerada como 100%.



4.2 - Cultura 3D de células de melanoma e tratamento com quercetina e Temozolomida

Foi realizada a cultura de esferoides com as células B16F10 seguido do tratamento deste com diferentes concentrações de quercetina, Temozolomida e combinação de ambos por 24 e 48 horas (Figura 2). Os esferoides não tratados apresentaram morfologia irregular e a estrutura formada não se encontra muito compactada. A morfologia dos esferoides está de acordo com a literatura para a quantidade de células utilizadas [5]. Nos esferoides que receberam o tratamento combinado, a quercetina foi adicionada ao meio de cultura e, depois de três horas de reação, o Temozolomida foi adicionado ao meio de tratamento.

Baseando-se na morfologia é possível observar que o tratamento das células com Temozolomida causou uma descompactação ou, ainda, inibição da proliferação celular, uma vez que é visível alguns espaços mais frouxos ao longo de todo o esferoide, aspecto bem semelhante ao observado nos esferóides de 24 horas de formação. Os esferoides tratados com quercetina 25 e 50 μM tenderam a adquirir aspecto mais compacto já a partir das 24 horas de tratamento. Este dado indica que a quercetina, nestas concentrações, não apresenta efeito drástico na estrutura organizacional do esferoide, assim como observado no ensaio de redução do MTT. No entanto, no tratamento combinado entre quercetina 25 μM e Temozolomida 200 μM nota-se que o esferoide apresenta-se menos denso (mais claro), podendo indicar morte celular. Vale ressaltar que outras análises serão necessárias para avaliar se o tratamento compromete a viabilidade das células.

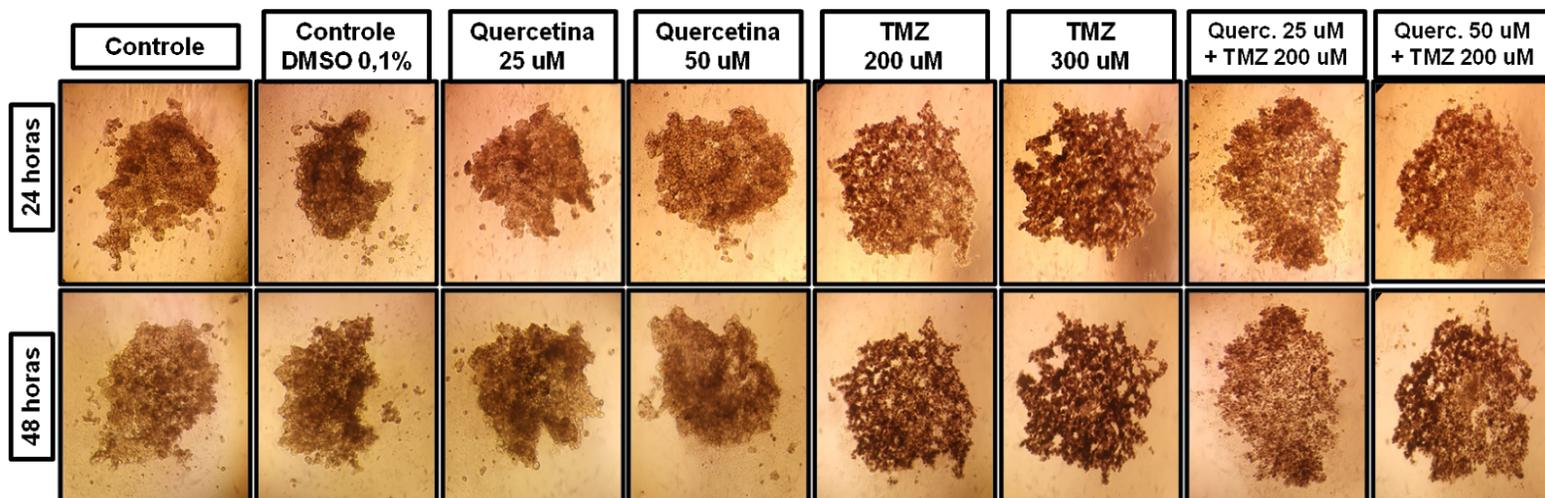


Figura 2 – Avaliação da resposta de esferoides de células de melanoma ao tratamento com quercetina e Temozolomida em diferentes concentrações. As células magnetizadas (10.000 células/poço) foram plaqueadas em placas cell repellent de 96 poços. A placa foi deixada sobre um magneto, na estufa umidificada, a 37°C e 5% de CO₂. Os esferoides que receberam o tratamento combinado foram submetidos ao tratamento com quercetina durante 3 horas e, passado esse período, o Temozolomida foi acrescentado ao meio de tratamento. Imagens dos esferóides foram capturadas em campo claro, com aumento de 10X, após 24 e 48 horas do início do tratamento.



5. Conclusão

Esses resultados apontam que as células cultivadas em cultura em monocamada (2D) e em esferoides (3D) podem responder distintamente ao tratamento e que esses modelos podem auxiliar na definição de protocolos terapêuticos mais assertivos, permitindo a definição de concentrações de drogas *in vitro* e aumentando a eficácia dos experimentos *in vivo*, diminuindo o uso excessivo de animais e o custo geral do desenvolvimento de fármacos. Ademais, os esferoides tratados com a combinação de quercetina e Temozolomida responderam sinergicamente, aumentando a resposta das células ao quimioterápico.

6. Referências Bibliográficas

- [1] Corrie P., et al. (2014). Management of melanoma. *British Medical Bulletin*, 111(1): 149–162.
- [2] Harris Z., et al. (2016). Quercetin as an emerging Anti-Melanoma Agent: A Four-Focus Area Therapeutic Development Strategy. *Front Nutr.* 3):48.
- [3] Menshykau D. (2017) Emerging technologies for prediction of drug candidate efficacy in the preclinical pipeline. *Drug Discovery Today.* 22(11):1598–1603.
- [4] Nyga A, et al. (2011). 3D tumour models: novel in vitro approaches to cancer studies. *J Cell Commun Signal.* (3):239–248. doi: 10.1007/s12079-011-0132-4
- [5] Jeong Y G. et al. (2016). A scaffold-free surface culture of B16F10 murine melanoma cells based on magnetic levitation. *Cytotechnology.* 68:2323–2334