

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO  
DEPARTAMENTO  
CURSO

## **Esferóides como Modelo de Cultura Celular Tridimensional para Investigação da Biodistribuição de Nanocarreadores Poliméricos**



Autor: Victor Pessoa de Sousa

Orientador: Arthur Poester Cordeiro

Florianópolis

2025

Palavras Chave: câncer, nanopartículas, esferóides, cultura 3d.

## RESUMO

Modelos de cultura 2D convencionais têm limitações significativas para estudos farmacêuticos de entrega e distribuição de nanocarreadores, tornando o desenvolvimento de modelos 3D, como os esferóides, altamente necessários. Assim este trabalho teve como objetivo estabelecer um protocolo para a formação de esferóides da linhagem de carcinoma mamário 4T1.2 (monocultura) e em co-cultura com fibroblastos NIH/3T3, utilizando a técnica de gota suspensa a fim de investigar a diferença na biodistribuição de nanocarreadores em modelos 2D e 3D. O ajuste nos parâmetros de produção dos esferóides permitiu identificar que a utilizando, um total de 220 células em gotas de 10 µL resultou na maior taxa de sucesso, gerando esferóides com a morfologia esférica e compacta desejada, enquanto concentrações superiores levaram à formação de agregados amorfos. Para a co-cultura, a proporção de 90% de células 4T1.2 para 10% de NIH/3T3 foi a mais eficaz, produzindo esferóides com melhor compactação. O acompanhamento do crescimento dos esferóides até o dia 9 confirmou a viabilidade do modelo, e foi também demonstrado que o manuseio cuidadoso das placas com as gotas é um fator crítico para o sucesso do protocolo, uma vez que o estresse mecânico prejudica ou inviabiliza formação dos esferóides. Os nanocarreadores poliméricos sintetizados apresentaram uma monodistribuição de tamanho médio de partícula de 114,4 nm sendo capazes de incorporar o fluoróforo Rodamina 123 a sua estrutura. Este trabalho estabeleceu com sucesso um protocolo para gerar modelos de esferóides, validando parâmetros críticos e preparando a plataforma para futuros ensaios de biodistribuição de nanocarreadores.

## Introdução

O estudo de sistemas de entrega de fármacos é fundamental para o desenvolvimento de novas terapias que geralmente é feito em estudos *in vitro* para as triagens iniciais. Porém os modelos de cultura 2D convencionais apresentam limitações significativas, principalmente devido à geometria achatada e à exposição uniforme das células ao meio de cultura. Essas formas artificiais não refletem a arquitetura tridimensional dos tecidos, o que pode levar a resultados que não se traduzem para o ambiente *in vivo*, subestimando a complexidade das barreiras de difusão e das interações célula-célula encontradas em tumores sólidos.

Para superar essas limitações, modelos de cultura de células em 3D, como os esferóides tumorais, representam uma ferramenta essencial para a investigação da progressão do câncer, oferecendo maior complexidade e confiabilidade em comparação com as culturas 2D tradicionais. Tais modelos estabelecem uma ponte mais precisa entre estudos *in vitro* e a complexidade dos experimentos *in vivo*.

O microambiente tumoral é um componente crítico da progressão do câncer, neste os fibroblastos desempenham um papel fundamental. Eles são responsáveis pela produção de fatores de crescimento, quimiocinas, moléculas de adesão e pela deposição de matriz extracelular, elementos que influenciam diretamente a arquitetura e o comportamento do tumor. A incorporação de fibroblastos, como a linhagem NIH/3T3, em modelos de esferóides é, portanto, crucial para minimizar essa interação.

Trabalhos anteriores demonstraram a viabilidade da co-cultura de células tumorais e fibroblastos para a formação de esferóides. Almuqbil (2021), por exemplo, otimizou a proporção de células NIH/3T3 e A549 (adenocarcinoma de pulmão), concluindo que uma

população inicial de 10% de fibroblastos era ideal para a formação de esferóides compactos e regulares.

O presente estudo teve como objetivo estabelecer um protocolo robusto e reprodutível para gerar esferóides 3D de monocultura da linhagem de carcinoma mamário murino 4T1.2 e de co-cultura com a linhagem de fibroblastos murinos NIH/3T3. Para tal, adaptamos as condições experimentais descritas na literatura e melhoramos os parâmetros como concentração celular, volume de gota e a proporção entre as linhagens celulares utilizando a técnica de gota suspensa

## **Métodos**

## **Materiais e Métodos**

### **2.1 Manutenção de Culturas Celulares 2D**

As linhagens celulares 4T1.2 (carcinoma mamário de BALB/cfC3H) e NIH/3T3 (fibroblastos de camundongo NIH/Swiss) foram mantidas em frascos de cultura T25 ou T75. As células foram cultivadas em meio MEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e 1% de antibiótico (penicilina/estreptomicina). As culturas foram mantidas em estufa a 37°C com atmosfera úmida e 5% de CO<sub>2</sub>.

Para a passagem celular, o meio de cultura foi removido e as monocamadas foram lavadas com solução salina tamponada com fosfato (PBS) com pH 7.4. Em seguida, as células foram incubadas com solução de tripsina por 5 a 10 minutos a 37°C. Após o desprendimento das células, a tripsina foi inativada pela adição de meio de cultura completo. A suspensão celular foi transferida para um tubo cônico de 15 mL e centrifugada a 1500 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* celular foi ressuspendido em meio fresco para contagem em câmara de Neubauer ou para plaqueamento em um novo frasco.

### **2.2 Formação de Esferóides 3D por Gota Suspensa**

Os esferóides foram gerados utilizando a técnica de gota suspensa. Suspensões celulares foram preparadas em meio DMEM completo. Gotas de 10 µL foram depositadas na superfície interna da tampa de uma placa de Petri de 100 mm. Para manter a umidade e evitar a evaporação das gotas, a base da placa foi preenchida com PBS estéril.

### **2.3 Análise Morfológica e Aquisição de Imagens**

O desenvolvimento e a morfologia dos esferóides foram monitorados nos dias 3 e 7 de cultivo por microscopia de campo claro. As imagens foram capturadas utilizando um microscópio invertido (LAMEB). A análise morfológica e a medição do diâmetro de Feret foram realizadas com o software ImageJ.

### **2.4 Síntese de Nanopartículas de PMMA Contendo Rodamina 123**

As nanopartículas foram sintetizadas por polimerização com miniemulsão, adaptada de Cordeiro et al. (2020). Inicialmente, a fase orgânica foi preparada misturando-se 2 g de MMA contendo 0,1% (m/v) de Rodamina 123, 90 mg de lecitina de soja, e 40 mg de AIBN sob agitação magnética até homogeneização. A fase aquosa foi composta por 20 g de água

destilada. A fase orgânica dispersa foi adicionada à fase aquosa contínua, e o sistema foi imediatamente colocado em um dispersor ultrassônico (Ultrasonic Dismembrator Modelo 500, Fischer Scientific) em banho de gelo por 5 min (modo pulsado: 10 s ligado, 5 s desligado) com amplitude de 70% para formar as nanogotas da miniemulsão. O processo de polimerização foi conduzido a 70 °C por 4 h.

As nanopartículas de PMMA contendo Rodamina 123 foram purificadas pelo processo de diálise por 24h para remover os traços de monômero que eventualmente não reagiram no processo de polimerização, bem como o excesso de Rodamina que não foi encapsulado no processo.

## **2.5 Caracterização das Nanopartículas de PMMA Contendo Rodamina 123**

O diâmetro hidrodinâmico das Nanopartículas foi determinado em termos de diâmetro médio de intensidade e dispersividade por espalhamento dinâmico de luz (DLS) (Nanosizer, Malvern Instruments, Reino Unido). Como o trabalho não tinha por objetivo estudar o aprimoramento na encapsulação da Rodamina 123, a incorporação do fluoróforo foi apenas confirmada via microscopia óptica de fluorescência utilizando lente objetiva de 100x (Olympus BX41 with CCD camera).

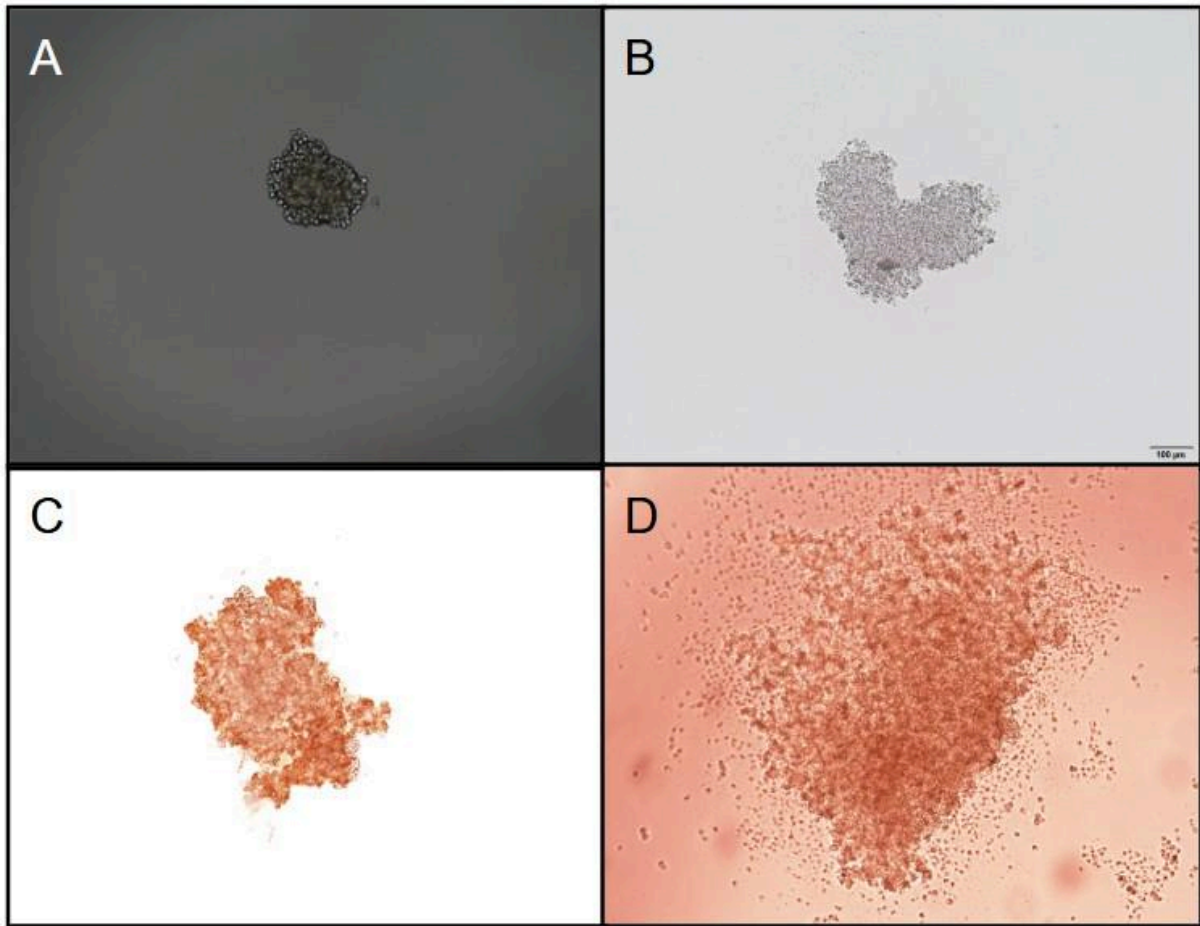
## **2.6 Microscopia de Fluorescência**

Para verificar a presença e distribuição das células 4T1.2 expressando a Proteína Verde Fluorescente (GFP), os esferóides de co-cultura foram analisados em um microscópio de fluorescência invertido. As imagens foram capturadas utilizando um conjunto de filtros apropriado para a excitação e emissão do GFP.

## **Resultados e discussão**

### **Ajustes da Concentração Celular para Monocultura de 4T1.2**

Para estabelecer as condições ideais de formação de esferóides, foi realizado um experimento para otimizar o número de células por gota. Foram testadas concentrações de 220, 600, 1000 e 2000 células/gota em volumes de 10 µL, 15 µL e 20 µL. A formação e a morfologia dos agregados foram avaliadas por microscopia.

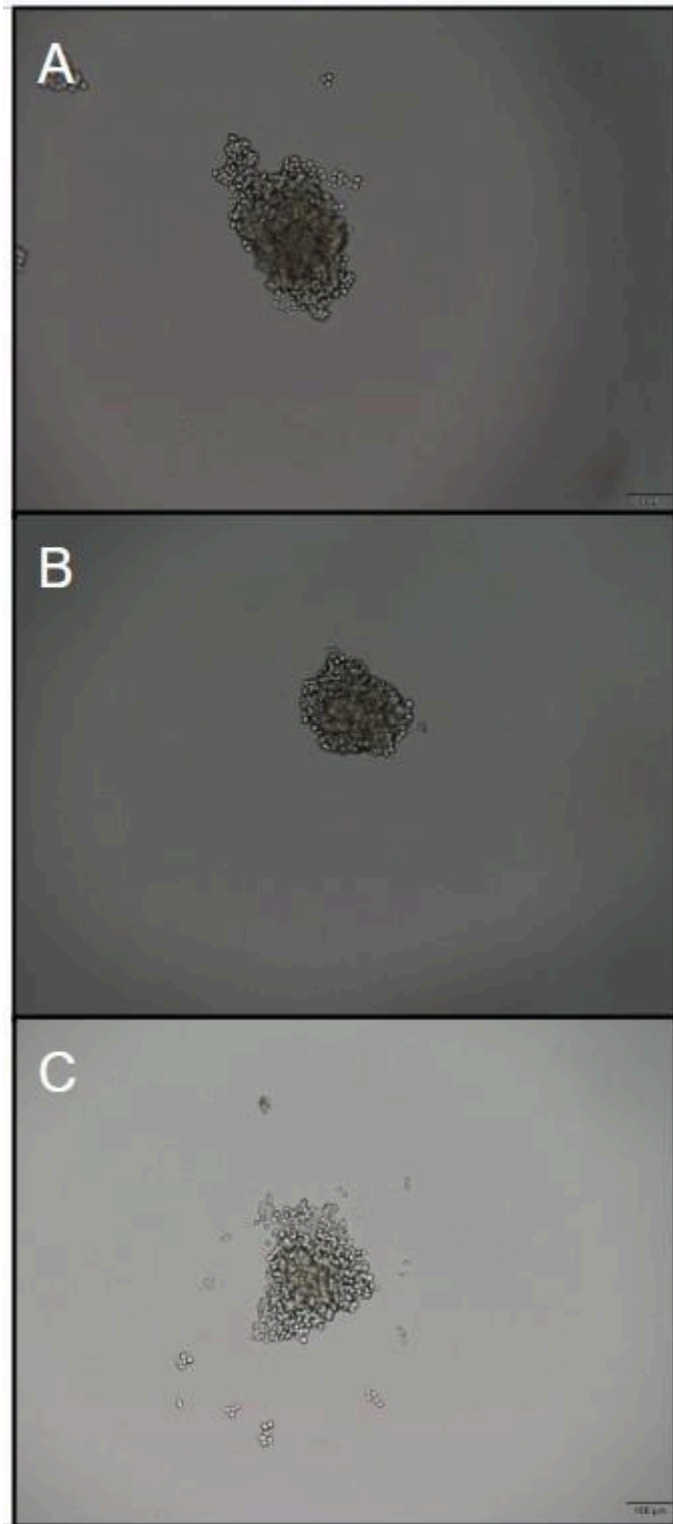


**Figura 1: Ajuste da concentração celular para a formação de esferóides de 4T1.2.** Análise por microscopia de campo claro da morfologia dos agregados celulares após 7 dias de cultivo com diferentes números de células iniciais todas em 10  $\mu$ L de volume de gota.. **(A)** Esferóide formado com 220 células/gota, apresentando a morfologia esférica e compacta desejada. **(B)** Agregado celular formado com 600 células/gota. **(C)** Massa amorfa formada com 1000 células/gota. **(D)** Massa amorfa formada com 2000 células/gota. A concentração de 220 células/gota foi a que apresentou a maior taxa de sucesso na formação de esferóides.

A condição que resultou na maior taxa de sucesso na formação de esferóides com morfologia esférica e compacta foi a de 220 células em um volume de 10  $\mu$ L. Concentrações celulares mais altas ou volumes de gota superiores resultaram em uma diminuição acentuada na taxa de sucesso, frequentemente levando à formação de agregados amorfos e desestruturados. Este resultado indica que um número excessivo de células ou um volume de gota inadequado podem interferir nos processos de auto agregação celular, essenciais para a formação de uma estrutura 3D coesa.

#### **Ajuste da Proporção Celular para Co-cultura (4T1.2:NIH3T3)**

Utilizando os parâmetros escolhidos (220 células totais em 10  $\mu$ L), investigamos a proporção ideal entre células 4T1.2 e NIH/3T3 para a formação de esferóides de co-cultura. Foram testadas as proporções 95:5, 90:10 e 80:20 (4T1.2:NIH/3T3).



**Figura 2: Otimização da proporção entre células 4T1.2 e NIH/3T3 para a formação de esferóides de co-cultura.** Análise por microscopia de campo claro da morfologia dos agregados após 7 dias. **(A)** Proporção 95:5, onde se observa um agregado com células mais dispersas em sua periferia. **(B)** Proporção 90:10, demonstrando ser a condição mais eficaz, com a formação de um esferóide esférico e compacto. **(C)** Proporção 80:20, observamos uma diminuição na esfericidade e menor compactação do esferóide. *Barra de escala = 100 µm.*

A proporção de 90% de células 4T1.2 para 10% de NIH/3T3 foi a mais eficaz, resultando em uma taxa de formação de aproximadamente 90% e esferóides com maior esfericidade e compactação. Este resultado corrobora os achados de Almuqbil (2021), que também identificou a proporção de 10% de fibroblastos como ótima para a formação de esferóides de co-cultura, ainda que com uma linhagem celular tumoral diferente. Nas demais proporções testadas (95:5 e 80:20), observou-se uma maior incidência de falhas, como a formação de múltiplos agregados por gota ou a presença de células desagregadas ao redor do esferóide principal. Isso sugere que a presença de 10% de fibroblastos promove um equilíbrio ideal, possivelmente mediando a adesão intercelular e a deposição de matriz de forma mais eficiente.

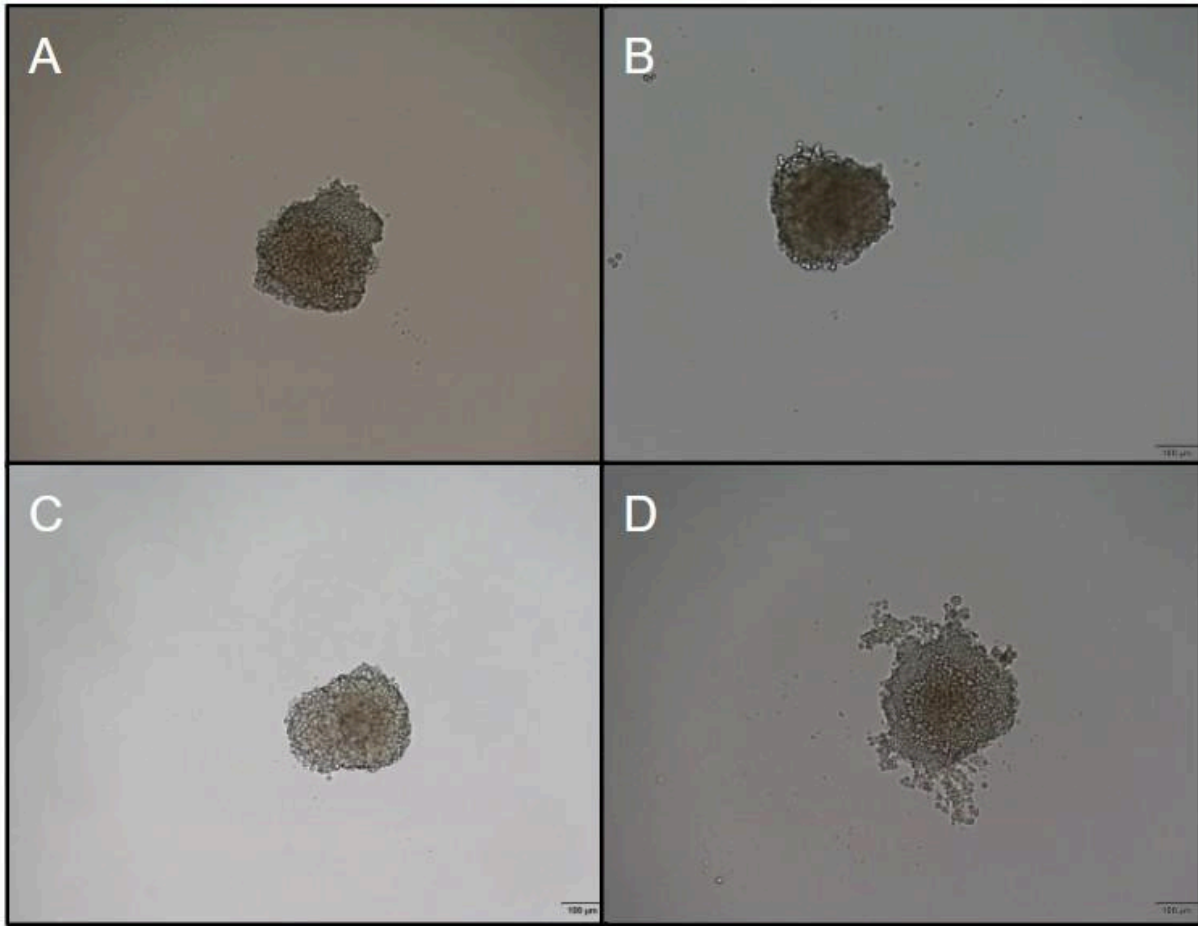
### **Validação do Protocolo e Influência de Fatores Mecânicos**

Para validar a reprodutibilidade do protocolo otimizado (220 células/gota, 10 µL, proporção 90:10), o experimento foi repetido. Em uma das tentativas, a taxa de sucesso foi drasticamente reduzida para cerca de 10%. A observação microscópica revelou que as gotas na placa correspondente estavam morfologicamente deformadas, sugerindo que um estresse mecânico (agitação ou impacto) durante o manuseio das placas comprometeu a formação dos esferóides.

Para confirmar essa hipótese, um experimento de validação foi conduzido em triplicata. Uma das placas foi intencionalmente submetida a um leve impacto lateral para deformar as gotas. Os resultados confirmaram que a integridade esférica da gota é um fator crítico: na placa impactada, não houve formação de esferóides, enquanto as duas placas de controle, manuseadas com cuidado, exibiram a taxa de sucesso esperada de aproximadamente 90%. Este achado é de grande importância prática, pois destaca um ponto crítico de falha no protocolo de gota suspensa: a necessidade de um manuseio extremamente cuidadoso para garantir que a tensão superficial mantenha a gota em um formato hemisférico perfeito, condição necessária para que a gravidade promova a agregação celular em um único ponto central.

### **Acompanhamento do Crescimento dos Esferóides de Co-cultura**

Após a padronização dos esferóides de co-cultura (proporção 90:10) foram acompanhados em cultura para avaliar seu crescimento e estabilidade em dias distintos. A **Figura 3** ilustra o desenvolvimento de dois esferóides representativos, monitorados nos dias 6 e 9.



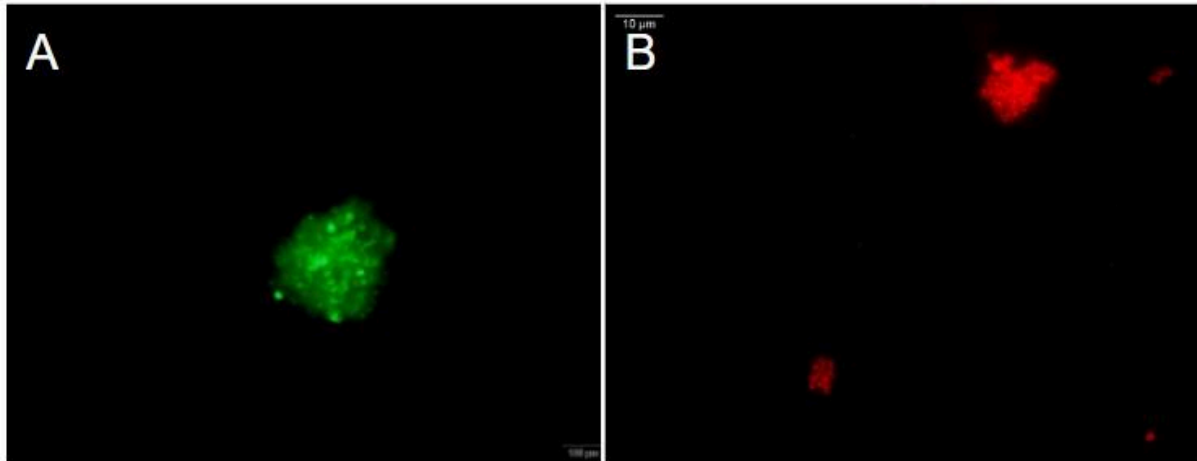
**Figura 3: Monitoramento do crescimento de esferóides dia 6 e o dia 9.** Microscopia de campo claro de dois esferóides para avaliar a viabilidade. **(A)** Esferoide 1 no dia 6 (diâmetro de Feret = 323  $\mu\text{m}$ ). **(B)** O mesmo esferoide no dia 9, mostrando um crescimento para 333  $\mu\text{m}$ . **(C)** Esferoide 2 no dia 6 (diâmetro de Feret = 329  $\mu\text{m}$ ). **(D)** O mesmo esferoide no dia 9, com diâmetro aumentado para 396  $\mu\text{m}$  e um leve desprendimento de células periféricas. *Barra de escala = 100  $\mu\text{m}$ .*

Foi observado um crescimento, indicando que o modelo se mantém viável por um período prolongado. No primeiro esferóide (**Figuras 3A-B**) apresentou um aumento modesto em seu diâmetro de Feret, passando de 323  $\mu\text{m}$  no dia 6 para 333  $\mu\text{m}$  no dia 9, mantendo sua integridade estrutural e compactação. O segundo esferóide (**Figuras 3C-D**) exibiu um crescimento mais pronunciado, com o diâmetro aumentando de 329  $\mu\text{m}$  para 396  $\mu\text{m}$  no mesmo período. No entanto, no dia 9, foi possível observar um leve deslocamento de algumas células na periferia deste esferóide. Em conjunto, esses dados sugerem que os esferóides continuam a proliferar, mas que alterações morfológicas, como o desprendimento celular, podem começar a ocorrer em culturas mais longas.

### **Verificação da Fluorescência dos esferóides (4T1.2:NIH3T3) e da nanopartículas carregadas com Rodamina 123**

Para verificar a manutenção da expressão da Proteína Verde Fluorescente (GFP) nas células 4T1.2 geneticamente modificadas após a formação dos agregados 3D, os esferóides de co-cultura foram analisados por microscopia de fluorescência (**Figura 4**). A análise revelou um sinal verde intenso e distribuído por toda a estrutura do esferóide. Este resultado confirma que as células 4T1.2-GFP mantêm sua fluorescência e viabilidade mesmo após o processo de agregação e cultivo em três dimensões. A estabilidade da

expressão de GFP é um requisito fundamental para futuros ensaios que utilizem este sinal para rastrear a população de células tumorais. Já em relação aos nanomateriais sintetizados, as nanopartículas de PMMA contendo Rodamina 123 apresentaram tamanho média de partícula de 114,4 nm e índice de polidispersão de 0,13. Assim, a verificação da presença do fluoróforo em sua estrutura é possível apenas nas maiores nanopartículas e em alguns aglomerados, devido à baixa ampliação do microscópio (aumento máximo de 100x) (BECKER PERES, 2016).



**Figura 4: Verificação da fluorescência das células 4T1.2-GFP no esferoide. (A)** Esferoide de co-cultura (4T1.2-GFP/NIH/3T3) no dia 7. O sinal verde intenso demonstra que as células 4T1.2 mantêm a expressão da Proteína Verde Fluorescente (GFP) após o processo de agregação e cultivo 3D *Barra de escala = 100 µm.* **(B)** Imagem de aglomerados de nanopartículas com a rodamina 123, visto no filtro de fluorescência vermelho *Barra de escala 10 µm.*

## Desafios e Perspectivas Futuras

A padronização de um modelo de esferoide 3D de co-cultura reprodutível, conforme detalhado neste relatório, representa a conclusão bem-sucedida da primeira fase deste projeto. A perspectiva futura e objetivo principal é utilizar este modelo para ensaios funcionais, testando a interação com as nanopartículas de PMMA contendo rodamina 123. O próximo passo fundamental consiste em avaliar a capacidade de penetração das nanopartículas no microambiente tumoral tridimensional simulado pelos esferoides. Para isso, os esferóides de co-cultura (4T1.2-GFP/NIH-3T3) serão incubados com as nanopartículas fluorescentes. A análise será realizada por microscopia de fluorescência, fazendo a sobreposição das imagens dos canais verde (proveniente da GFP das células 4T1.2) e vermelho (da rodamina 123). Esta abordagem permitirá visualizar a profundidade de penetração e a distribuição das nanopartículas em relação às células tumorais. A realização destes experimentos, embora planejada, não foi possível de ser concluída no período de um ano deste projeto de iniciação científica. O principal desafio encontrado foi de ordem logística, como a alta demanda e a agenda para utilização de equipamentos de análise essenciais, como o microscópio de fluorescência. Adicionalmente, intercorrências pontuais na estufa de cultura celular impactaram o cronograma experimental, exigindo tempo para a reestabilização das linhagens. Superados estes desafios, a continuidade do projeto permitirá a geração de dados valiosos sobre a eficácia deste nanossistema em um modelo tumoral mais complexo e relevante.

## Conclusão

Utilizando o método de gota suspensa foi possível estabelecer um protocolo para a formação de esferóides 3D, tanto de monocultura (4T1.2) quanto de co-cultura (4T1.2 e NIH/3T3), com características morfológicas desejáveis para serem utilizados como um modelo de estudo na biodistribuição de nanocarreadores. Ainda, foi possível produzir e caracterizar as nanopartículas que seriam utilizadas no estudo dos esferóides como modelo de biodistribuição de nanocarreadores, porém, como apresentado na seção de *desafios e perspectivas futuras*, não foi possível realizar os experimentos pretendidos de interação e distribuição dos nanocarreadores no modelo 3D..

Foi demonstrado que o modelo de esferóide se mantém viável e em crescimento por pelo menos nove dias e que a estabilidade mecânica das gotas durante o manuseio é um fator crítico para o sucesso do protocolo. Portanto, este estudo apresenta um protocolo para a geração de modelos de esferóides 3D, preparando uma plataforma experimental para futuras investigações sobre a interação e distribuição de nanossistemas em um microambiente tumoral tridimensional, superando diversas limitações dos modelos de cultura 2D.

## Avaliação

Quanto a minha experiência nesta iniciação científica, foi muito positiva, pois acompanhado do meu orientador Arthur consegui aprender a rotinas importantes para a carreira científica, como maneiras corretas de estudar as fontes confiáveis para entender os projetos em trabalho no laboratório, pude acompanhar e aprender a rotina de bancada, com técnicas de cultura de célula e biomol, além de acompanhar alguma dificuldade que podemos nos deparar no dia a dia da pesquisa, como problemas nos equipamentos, dificuldade de conseguir agenda nos equipamentos multiusuários entre outros.

Vou continuar no mesmo laboratório até o final do da minha graduação tendo um dos professores responsável pelo mesmo como meu orientador do TCC, em resumo gostei muito dessa experiência e recomendo a muitos colegas na universidade entrarem neste mesmo laboratório para terem a oportunidade de trabalhar com pessoas incríveis.

## Referências

ALMUQBIL, R. M. Overcoming Mechanisms of Acquired and Innate Doxorubicin Resistance Using Nanomedicine and Tumor-Associated Macrophage Immunotherapy. [s.l.] Virginia Commonwealth University, 2021.

CORDEIRO, Arthur P. et al. Encapsulation of magnetic nanoparticles and copaíba oil in poly (methyl methacrylate) nanoparticles via miniemulsion polymerization for biomedical application. In: Macromolecular Symposia. 2020. p. 2000112.

BECKER PERES, L. et al. Solid lipid nanoparticles for encapsulation of hydrophilic drugs by an organic solvent free double emulsion technique. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, v. 140, p. 317–323, 1 abr. 2016.