

PROJETO PIBIC Abril 2025

Adaptação de organoides tumorais do câncer de mama cultivados tridimensionalmente para 2D em sistemas microfisiológicos

Pesquisador Responsável

Renata Spagolla Napoleão Tavares

Co-orientadora

Sandra Dias

Unidade do CNPEM

Será realizado no LN Bio

1. Introdução

O câncer de mama é um problema de saúde pública de grande relevância no mundo, inclusive no Brasil. De acordo com as últimas estatísticas mundiais do Globocan 2018 ¹, é o segundo tipo de câncer mais frequente no mundo (excluindo-se o de pele não-melanoma), sendo contabilizados 2,1 milhões de casos novos de câncer de mama em 2018 e 627 mil óbitos pela doença ².

No Brasil, as estimativas de incidência de câncer de mama para o ano de 2025 são de 73.610 casos novos (Fonte: INCA), sendo o tumor mais prevalente em mulheres, excetuando-se o câncer de pele não-melanoma².

Atualmente, o diagnóstico, o tratamento local e o tratamento sistêmico para o câncer de mama estão sendo aprimorados de forma rápida, em razão de um melhor conhecimento da história natural da doença e das características moleculares dos tumores. Entretanto, em razão da individualização orgânica e da extrema heterogeneidade tumoral associada à presença de fatores de risco conhecidos e não conhecidos, o câncer de mama é considerado uma doença de comportamento dinâmico, em constante transformação². Atualmente, os métodos de desenvolvimento de tratamentos mais comuns envolvem estudos in vitro com modelos celulares simplistas seguidos de estudos pré-clínicos em modelos animais que frequentemente não correspondem a biologia humana. Desta maneira, **é imperativo desenvolver métodos de estudo e avaliação de tratamentos mais rápidos e que reflitam de maneira mais satisfatória a diversidade e complexidade dos tumores dos pacientes.**

2. Estado da Arte

Linhagens de células de câncer têm sido amplamente utilizadas para pesquisas e desenvolvimento de quimioterápicos, mas têm mostrado sucesso modesto na previsão de respostas clínicas devido à capacidade limitada de recapitular a heterogeneidade intratumoral e seu microambiente. Essas limitações são significativas, pois a evolução do subtipo tumoral e do genoma do câncer são os principais desafios no tratamento.

A compreensão crescente da biologia do câncer levou à disponibilização de terapias direcionadas que exploram a dependência em oncogenes específicos. No entanto, a heterogeneidade do câncer dirige processos de resistência aos tratamentos. Assim, o desenvolvimento de protocolos de tratamento bem-sucedidos requer a estratificação e caracterização molecular da heterogeneidade intratumoral.

Este projeto propõe a seleção de sete casos de organoides tumorais do tipo luminal B oriundos de projeto PRONON (Grupo SMC) para adaptação a cultivo bidimensional visando seu futuro uso em chips microfluídicos com sensores para viabilidade e citotoxicidade em ensaios de drogas. Células primárias ancoradas em matriz, cultivadas em 3D, mantêm expressões de marcadores importantes para a classificação tumoral e espera-se que seu comportamento e resposta a quimioterápicos sejam correlacionáveis à resposta no paciente. Precisamos entender o quanto células primárias cultivadas em 2D se correlacionam com organoides e com a resposta clínica do paciente.

O(A) aluno(a) de iniciação científica auxiliará nos cultivos de organoides tumorais 3D, acompanhado pela orientadora e pelo time do projeto PRONON, e executará experimentos com células adaptadas para 2D em monocamada.

3. Objetivos

3.1 Objetivo geral

Este estudo visa investigar a viabilidade de organoides tumorais de pacientes com câncer de mama podem ser cultivados em 2D mantendo suas características para testes com quimioterápicos em sistemas microfisiológicos.

3.2 Objetivos específicos

- Cultivar os 7 casos de tumores luminais B na forma de organoides 3D e acompanhar os estudos de *drug screening* do projeto PRONON (Grupo SMC).
- Adaptar o cultivo de organoides tumorais luminais B para o cultivo 2D.
- Realizar ensaios de IHQ e IF e RTqPCR visando caracterizar as semelhanças e diferenças fenotípicas e moleculares entre as células como organoides tumorais versus cultivo em monocamadas.
- Realizar a testagem de quimioterápicos nas células em monocamadas e associar com os resultados dos ensaios em organoides tumorais 3D.
- Aplicar as células nas condições pré-definidas para ensaios em MPS em parceria com o grupo do Dr. Renato Sousa Lima (LNNano).

4. Metodologia

4.1. Cultivo de organoides tumorais 3D

Os organoides de nosso biorrepositório são oriundas de tecido de tumor mamário luminal B adquirida nos hospitais parceiros (ACC, ICESP e CAISM) e protocolo já empregado em nosso laboratório⁹. Brevemente, as amostras de tecido serão dissociadas mecanicamente e enzimaticamente. As células serão ressuspensas em 12 mg/ml de Matrigel gelado, com fator de crescimento reduzido (Corning #354230). Após a polimerização do Matrigel, serão adicionados 5 ml de meio de cultura para organoides. As células serão incubadas a 37 °C e 5% CO₂. O meio será trocado a cada 4 dias, e os passados a cada 1 a 4 semanas, conforme o crescimento observado⁷. Para a passagem, o Matrigel será despolimerizado, com 5 U/ml de dispase por 30 minutos. Em seguida, os organoides serão dissociados por 15 minutos, usando TrypLE Express Enzyme (ThermoFisher, #12604021). As células cancerosas serão contadas e a viabilidade será avaliada com azul de tripano. O teste de micoplasma será feito utilizando o kit MycoAlert (Lonza, LT07-318).

4.2. Adaptação de organoides tumorais 3D para o cultivo 2D

Para a adaptação dos cultivos de organoides 3D para o cultivo 2D, iremos testar diferentes abordagens. Iremos separar metade dos organoides soltos e neutralizados para placas de cultivo de células aderentes na presença e na ausência de coating (matrigel 100%, matrigel 1:20; colágeno tipo 1 a 0,01%; gelatina 0,01%) e plaqueados em diversas densidades. Já a outra metade dos organoides serão dissociados a células únicas por ação do TrypLE por 15min. As células únicas após neutralizadas serão plaqueadas em placas de cultivo celular de células aderentes na presença de na ausência de diferentes tipos de coating (mesmas condições) em diferentes densidades. Ambas as abordagens de cultivo serão semeadas com o meio de cultivo padrão para o subtipo tumoral adicionado de 5% de matrigel (como sinalizador).

4.3. Caracterização dos cultivos 2D

4.3.1. Extração de RNA e PCR Quantitativa

As células serão plaqueadas para organoides e em paralelo para 2D. Após 7 dias, as células serão passadas e os organoides coletados. O RNA total será extraído utilizando o TRI Reagent® (Sigma) e a produção de cDNA com GoScript™ Reverse Transcriptase (Promega). A quantificação dos transcritos será realizada com SYBR® Green PCR Master Mix (Life Technologies) e normalizada pelo 18S rRNA. Serão avaliados marcadores como CD24-, CD44+, Aldh1+, receptores de progesterona e estrógeno, SNAIL, SLUG, ZEB, beta-catenina e vimentina para identificar células com invasão pós-tratamento

4.3.2. Imunomarcção

Os organoides serão embebidos em tissuetek, congelados por snap-frozen, cortados em seções de 8 μm e aderidos a lâminas tratadas. As células serão plaqueadas em 8 chamber-slides e permeabilizadas com PBS + 0,2% de Triton X-100 por 10 minutos. Após bloqueio, anticorpos primários anti-CD24, anti-CD44, anti-Aldh1, anti-Receptor Estrógeno e Anti-receptor Progesterona serão incubados por 16 horas a 4°C. Anticorpos secundários serão incubados por 3 horas à temperatura ambiente. Núcleos serão corados com DAPI e lâminas montadas com Fluoromount G. Dados serão coletados com microscópio confocal Leica TCS ou Operetta, no Biological Imaging Facility (LIB/LNBio). O mesmo protocolo será utilizado para células em poços.

4.4. Campanha de testagem de quimioterápicos sobre organoides 3D

Para testar compostos, organoides de 50-100 μm de diâmetro serão semeados em placas de 384 poços revestidas com Matrigel. Leituras de linha de base serão realizadas no "dia 0" e compostos adicionados, replicados em quatro poços. Após seis dias de incubação, a viabilidade celular será avaliada usando CellTiterGlo3D (Promega), que mede a luminescência para quantificar a atividade metabólica. Dados serão normalizados em relação aos controles, e mudanças de intensidade calculadas para representar o impacto dos compostos. Métricas GR avaliarão a potência e eficácia dos compostos nos diferentes organoides⁹.

4.5. Campanha de testagem de quimioterápicos sobre monocamadas 2D

A densidade de células, ainda a ser definida, será plaqueada em poços de 384 na presença ou na ausência do revestimento que se mostrar o mais adequado para manter as células com as características semelhantes ao do organoides tumoral. Os compostos serão aplicados nas mesmas concentrações que o ensaio 3D. A viabilidade celular ao final do experimento será avaliada usando o ensaio CellTiterGlo (Promega) para monocamadas. Os dados obtidos no ensaio serão normalizados em relação aos valores de controle, e mudanças de intensidade serão calculadas para representar com precisão o impacto dos compostos. As métricas de inibição de taxa de crescimento (GR) serão aplicadas para avaliar a potência e a eficácia dos compostos nos diferentes casos e tipos de cultivo (2D e 3D), de maneira que os resultados não sejam afetados pelas particularidades de proliferação de cada célula⁹.

4.6. Análise estatística

Para avaliar a similaridade dos níveis de expressão gênica, dados de caracterização fenotípica e eficácia do ensaio (métricas de GR) entre os cultivos 2D e 3D, serão conduzidas análises de clusterização hierárquica baseada na distância euclidiana e método de ligação Ward, seguida por apresentação de dendrogramas e mapas de calor. Adicionalmente, as correlações das variáveis estudadas entre os cultivos 2D e 3D serão exploradas por meio dos coeficientes de correlação de Pearson ou Spearman, quando apropriado. O nível de significância adotado será de 5%. As análises serão conduzidas no software R (R Core Team, 2023, *A Language and Environment for Statistical Computing*).

4.7. Cronograma

Atividades	Meses											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Cultivo 3D	X	X	X									
Adaptações para 2D			X	X	X							
Caracterização fenotípica					X	X	X	X				
Caracterização molecular								X	X	X		
Relatório											X	X

4.8. Referências

1. Bray, F. *et al.* Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA. Cancer J. Clin.* **68**, 394–424 (2018).
2. INCA. *A situação do câncer de mama no Brasil : Síntese de dados dos sistemas.* (2019).
3. Heiser, L. M. *et al.* Subtype and pathway specific responses to anticancer compounds in breast cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**, 2724–2729 (2012).
4. Sharma, S. V., Haber, D. A. & Settleman, J. Cell line-based platforms to evaluate the therapeutic efficacy of candidate anticancer agents. *Nat. Rev. Cancer* **10**, 241–253 (2010).
5. Kim, H. S., Sung, Y. J. & Paik, S. Cancer cell line panels empower genomics-based discovery of precision cancer medicine. *Yonsei Med. J.* **56**, 1186–1198 (2015).
6. Kaelin, W. G. The concept of synthetic lethality in the context of anticancer therapy. *Nat. Rev. Cancer* **5**, 689–698 (2005).
7. Luo, J., Solimini, N. L. & Elledge, S. J. Principles of Cancer Therapy: Oncogene and Non-oncogene Addiction. *Cell* **138**, 807 (2009).
8. Torti, D. & Trusolino, L. Oncogene addiction as a foundational rationale for targeted anti-cancer therapy: Promises and perils. *EMBO Mol. Med.* **3**, 623–636 (2011).
9. Scherer SD, Zhao L, Butterfield AJ, Yang CH, Cortes-Sanchez E, Guillen KP, et al. Breast cancer PDxO cultures for drug discovery and functional precision oncology. *STAR Protoc* 2023;4. <https://doi.org/10.1016/j.xpro.2023.102402>.