

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
BACHARELADO EM BIOTECNOLOGIA**

NATHÁLIA LIZ BARRIOS

**Estabelecimento e caracterização morfológica de esferoides derivados da linhagem
celular de hepatocarcinoma humano (Hep-G2)**

São Carlos
2025

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
BACHARELADO EM BIOTECNOLOGIA**

NATHÁLIA LIZ BARRIOS

Estabelecimento e caracterização morfológica de esferoides derivados da linhagem celular de hepatocarcinoma humano (Hep-G2)

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao curso de Bacharelado em Biotecnologia da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), como requisito para obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientadora: Dr^a. Celisnolia M. Leite
Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Cynthia Aparecida de Castro

São Carlos
2025

RESUMO

A cultura celular no modelo 3D mimetiza morfológica e fisiologicamente as condições encontradas *in vivo* e desta forma os resultados obtidos por terapias quanto à toxicidade, resistência e barreiras são mais fidedignos. Adicionalmente, o cultivo 3D mostra-se como uma promissora ferramenta para auxílio da redução do uso de animais na pesquisa científica. Nesse contexto, utilizando a metodologia de sobreposição líquida testamos a formação de esferoides a partir das células de hepatocarcinoma humano (HepG-2). Essa metodologia mostrou-se promissora quando utilizou-se a agarose a 1% como substrato para não adesão celular devido a formação de esferoides compactos e bem regulares, com diâmetros que variaram de 300 a 141 μm . Além disso, essa metodologia mostrou-se ser de fácil manuseio e baixo custo. Devido a sua particularidade de organização morfológica, testes de viabilidade celular convencionais da cultura em monocamada demonstraram não serem indicados para esta finalidade, sendo necessário a adaptação para outros métodos de caracterização dos esferoides como por exemplo, técnicas histológicas. Com relação a capacidade de captação de nanopartículas, os esferoides foram promissores, havendo a captação das nanopartículas em todas as condições de densidade celular e idade do esferoide. No entanto, para seja possível estabelecer e padronizar um protocolo de obtenção de esferoides reprodutível inclusive para linhagens diferentes da HepG-2 uma caracterização mais adequada, principalmente do centro do esferoide precisa ser conduzida. Assim, este estudo contribuiu para o avanço na modelagem de sistemas *in vitro* mais representativos do microambiente tumoral, oferecendo uma plataforma que com uma melhor caracterização poderá ser promissora para ensaios de fármacos e testes toxicológicos.

Palavras-chave: Cultura 3D, esferoides, sobreposição líquida.

ABSTRACT

Cell culture in the 3D model morphologically and physiologically mimics the conditions found in vivo, making the results obtained from therapies regarding toxicity, resistance, and barriers more reliable. Additionally, 3D culture emerges as a promising tool to help reduce the use of animals in scientific research. In this context, using the liquid overlay methodology, we tested the formation of spheroids from human hepatocarcinoma cells (HepG-2). This methodology proved promising when 1% agarose was used as a non-adhesive substrate, as it led to the formation of compact and well-organized spheroids, with diameters ranging from 300 to 141 μm . Moreover, this method was found to be easy to handle and cost-effective. Due to the particular morphological organization of spheroids, conventional cell viability assays used for monolayer cultures were unsuitable for this purpose, requiring adaptations to other spheroid characterization methods, such as histological techniques. Regarding the ability to uptake nanoparticles, the spheroids showed promising results, with nanoparticle internalization observed under all tested cell density conditions and spheroid age. However, a more detailed characterization, especially of the spheroid core, must be conducted to establish and standardize a reproducible protocol for spheroid formation, including for cell lines other than HepG-2. So, this study contributed to advancing the modeling of in vitro systems that better represent the tumor microenvironment, offering a platform that, with further characterization, could be promising for drug screening and toxicological testing.

Keywords: 3D culture, spheroids, liquid overlay.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema representativo do microambiente tumoral (TME). No TME as células tumorais interagem entre si, com as células do sistema imune, fibroblastos, matriz extracelular (MEC) e vasos sanguíneos. FONTE: Autoria própria (2025).	10
Figura 2. Representação esquemática de um esferoide indicando as três regiões características observadas no crescimento celular 3D. A) células em proliferação, B) células quiescentes e C) células necróticas. FONTE: SANT et al., 2017.....	13
Figura 3. Representação do processo de determinação do diâmetro médio dos esferoides. Fonte: Autoria própria (2025).....	17
Figura 4. Micrografias representativas da morfologia das células HepG-2: a-b) registradas em baixa e alta confluência respectivamente e c-d) micrografias de referência disponíveis no banco de células ATCC. FONTE: Autoria própria (2025).	20
Figura 5. Formação de esferoides: a) representação esquemática da evolução esperada para a formação de esferoides quando as células são semeadas em placas de poços com fundo em U e b) agregados das células HepG-2 formados com tamanhos irregulares e lacunas entre as células após semeadura das células em placas de poços com fundo em U. FONTE: Autoria própria (2025).	21
Figura 6. Formação de esferoides: a) representação esquemática da evolução da formação de esferoides quando as células são semeadas em placas de poços com fundo chato revestidos com agarose 1% e b) Esferoides formados com boa compactação após 7 dias de semeadura das células HepG-2. Autoria própria (2025).....	22
Figura 7. Micrografias representativas dos esferoides formados após 5 dias de semeadura das células HepG-2 em diferentes densidades celulares. FONTE: Autoria própria (2025).	23
Figura 8. Micrografias representativas dos esferoides formados após 3, 5 e 7 dias de semeadura das células HepG-2 em diferentes densidades celulares. FONTE: Autoria própria (2025).	24
Figura 9. Diâmetro médio dos esferoides ao longo do 3°, 5° e 7° dias de idade em relação às três densidades testadas. Análise estatística ANOVA de uma via seguida de pós-teste Tukey. FONTE: Autoria própria (2025).....	25
Figura 10. Diâmetro médio dos esferoides ao longo do 3°, 5° e 7° da mesma densidade celular, permitindo a observação do comportamento de compactação e proliferação dos esferoides. Análise estatística ANOVA de uma via seguido de pós-teste Tukey. FONTE: Autoria própria (2025)	26
Figura 11. Representação dos dados obtidos para o ensaio de quantificação da enzima LDH realizado em duplicata para cada amostra, segundo orientação do fabricante. <i>Em a) ilustração da curva padrão fornecida no site do fabricante. Em b) ilustração de uma curva padrão adquirida a partir da média dos valores de absorbância de um ensaio para amostras de 3 dias e c) valores de absorbância obtidos nos ensaios para todas as densidades celulares e todas as idades de cultivo, com n = 3.</i> FONTE: Autoria própria (2025).	30
Figura 12. Imagens representativas de microscopia confocal de varredura a laser (CLSM) dos esferoides com 3, 5 e 7 dias de idade após 24 h de incubação com as nanopartículas marcadas com DiO (NpsDiO) ($\lambda_{ex}=488$ nm). Densidade celular utilizada de 3.500 células/poço. Hoechst 33342 foi utilizado para marcar os núcleos das células ($\lambda_{ex} = 405$ nm, retratado em azul). FONTE: Autoria própria (2025).....	31
Figura 13. Imagens representativas de microscopia confocal de varredura a laser (CLSM) dos esferoides com 3, 5 e 7 dias de idade após 24 h de incubação com as nanopartículas marcadas com DiO (NpsDiO) ($\lambda_{ex}=488$ nm). Densidade celular utilizada de 5.000 células/poço. FONTE: Autoria própria (2025).....	31
Figura 14. Imagens representativas de microscopia confocal de varredura a laser (CLSM) dos esferoides com 3, 5 e 7 dias de idade após 24 h de incubação com as nanopartículas marcadas com DiO (NpsDiO) ($\lambda_{ex}=488$ nm). Densidade celular utilizada de 10.000 células/poço.	

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Diâmetro médio dos esferoides após o 3 ^o , 5 ^o e 7 ^o dia de idade obtidos a partir da aplicação da equação (1) para as densidades de 3.500 células/poço, 5.000 células/poço e 10.000 célula/poço. Os dados representam a média \pm DP dos ensaios em triplicata, n=3. Fonte: Autoria própria (2025).	25
Tabela 2. Viabilidade celular dos esferoides após o 3 ^o , 5 ^o e 7 ^o dias de idade. Os dados representam a média \pm DP dos ensaios em triplicata, com n=3.	28

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	9
1.1 Câncer e câncer de fígado.....	9
1.2 Microambiente tumoral	10
1.3 Cultura Tridimensional (3D)	11
2. OBJETIVOS.....	15
2.1 Objetivo geral	15
2.2 Objetivos específicos.....	15
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	16
3.1 Cultivo celular 2D: HepG-2	16
3.2 Cultivo celular 3D: Técnica <i>Scaffold-free</i>	16
3.3 Padronização da Densidade Celular	17
3.4 Tamanho dos Esferoides.....	17
3.5 Viabilidade Celular dos Esferoides	18
3.5.1 Azul de Tripano (<i>Trypan Blue</i>)	18
3.5.2 Lactato Desidrogenase (LDH).....	18
3.6 Captação de nanopartículas poliméricas pelos esferoides.....	18
3.7 Análise estatística	19
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES	20
4.1 Cultivo celular 2D: HepG-2	20
4.2 Cultivo celular 3D: Técnica <i>Scaffold-free</i>	20
4.3 Padronização da Densidade Celular	22
4.4 Avaliação do Tamanho e Morfologia dos Esferoides	23
4.5 Análise de Viabilidade Celular dos Esferoides	26
4.5.1 Azul de Tripano (<i>Trypan Blue</i>)	26
4.5.2 Lactato Desidrogenase (LDH).....	29
4.6 Análise de internalização.....	30
5. CONCLUSÃO.....	33
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	34

1. INTRODUÇÃO

1.1 Câncer e câncer de fígado

Câncer é o termo atribuído ao crescimento desordenado e descontrolado de células anormais que possuem divisão celular incontrolável e grande agressividade, sendo responsável pela formação de tumores que tendem a invadir tecidos e órgãos vizinhos (INCA, 2020). Dentre os vários tipos de câncer, estima-se que haverá um aumento de até 55% dos casos de câncer de fígado de hepatocarcinoma ou carcinoma celular, tipo mais frequente de câncer de fígado, até 2040 num total de 1,40 milhão de novos diagnósticos em todo mundo com uma taxa de mortalidade em torno de 84% dos casos (ONU, 2022). No Brasil, este tipo de câncer está entre os 10 tipos mais frequentes da doença para a região Norte. Entre os fatores de risco e associações para a ocorrência do aumento desta neoplasia pode-se destacar as infecções hepáticas virais (Hepatites B e C), doenças hepáticas (cirrose), exposição a substâncias químicas tóxicas como uso excessivo de álcool e tabaco (CHEDID et al., 2017; GOMES et al., 2013; WANG et al., 2023).

O fígado é um órgão vital para o corpo humano e está relacionado a diversas funções metabólicas como a degradação e metabolização de diversas substâncias nocivas ao organismo, produção de bile para o processo de digestão e síntese de proteínas essenciais para a coagulação sanguínea, ou seja, seu adoecimento compromete significativamente a qualidade e a manutenção da saúde do indivíduo ((MITRA; METCALF, 2012; KALRA et al. 2023). Como já citado, o hepatocarcinoma celular é o tipo mais frequente de câncer de fígado em todo o mundo e as principais mutações genéticas observadas neste caso são os gene *Tumor Protein 53 (TP53)*, *Cateni Beta 1 (CTNNB1)* e *Telomerase Reverse Transcriptase (TERT)*, dos quais contribuem significativamente no caráter de agressividade do tumor (LOMBARDO et al., 2020).

Os principais sintomas associados ao câncer de fígado são alteração da coloração da pele e olhos para tons amarelados, dores abdominais intensas na porção direita do corpo com irradiação da sensação para os ombros, perda de apetite e peso, cansaço, palidez e febre. As principais metodologias empregadas para o diagnóstico desta neoplasia consistem na realização de exames de ultrasonografia, tomografia computadorizada e ressonância magnética do abdômen (GOMES et al., 2013).

O diagnóstico tardio, recorrência da doença e limitação de tratamentos disponíveis são alguns dos desafios clínicos para um bom prognóstico e resolução da doença. Nesse contexto, o desenvolvimento de terapias capazes de conter e erradicar o avanço do tumor

passa pela compreensão do microambiente tumoral que ainda é um dos grandes desafios a ser superado na busca de um tratamento curativo para os pacientes com a doença (FU; WANG, 2018).

1.2 Microambiente tumoral

Para que o tumor cresça e se desenvolva ele necessita de condições e características fisiológicas específicas para manutenção do seu ambiente e promoção do seu crescimento. A esses aspectos e condições singulares denominou-se o termo de microambiente tumoral. Este ambiente é caracterizado por uma diversidade de elementos e tipos celulares, dos quais podemos destacar as células tumorais e estromais, fibroblastos, macrófagos, linfócitos, componentes da matriz extracelular (MEC), fatores de crescimento e hormônios, assim como quimiocinas e citocinas (**Figura 1**) (FENG et al., 2022; YIN et al., 2024, KOONTONGWAEK, 2013). Vale ressaltar que esse ambiente pode ser mais diverso e específico a depender da origem do tumor. Todo esse sistema funciona em conjunto e de forma sincronizada para que haja a sinalização e ativação de fatores de transcrição de genes relacionados a proliferação e migração celular de forma a manter as condições necessárias para crescimento do tumor (CHEN et al., 2023; GUIZHEN et al., 2022). Além disso, o microambiente estimula o processo de angiogênese e formação de novos vasos sanguíneos, de modo a garantir o fornecimento de nutrientes e oxigênio para a progressão do tumor, sendo frequente observar uma maior ativação do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) para o tipo de hepatocarcinoma celular (MEHANNA et al., 2021).

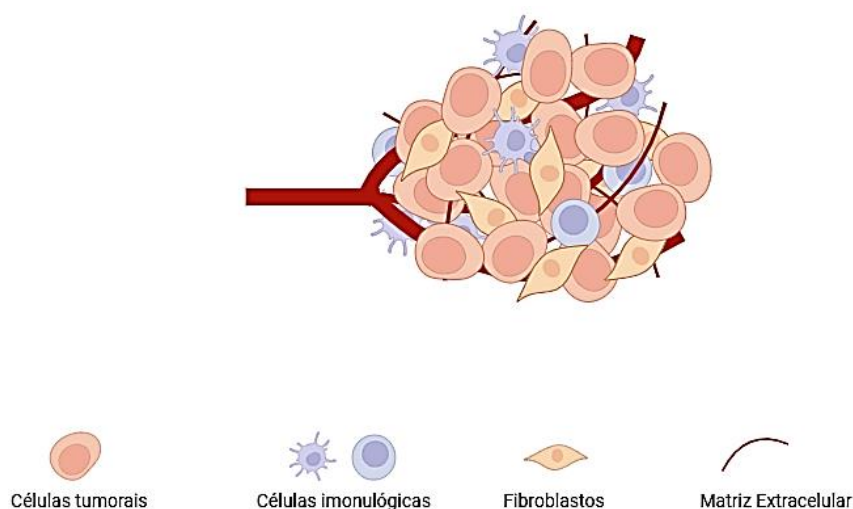


Figura 1. Esquema representativo do microambiente tumoral (TME). No TME as células tumorais interagem entre si, com as células do sistema imune, fibroblastos, matriz extracelular (MEC) e vasos sanguíneos. FONTE: Adaptado de KOONTONGKAEM, 2013.

No microambiente tumoral hepático é frequente encontrar uma acentuada

presença de macrófagos e linfócitos T dos quais estão relacionados, respectivamente, aos processos de inflamação crônica, estimulando os efeitos de fibrose e angiogênese; e à imunossupressão mediada por células T reguladoras (Tregs), favorecendo o escape das células neoplásicas do sistema imunológico do indivíduo (VOLPONI; GAZZILLO; BONAVIDA, 2022). Outra singularidade deste microambiente que é observado principalmente em estágios avançados da doença, consiste na situação de hipóxia, pois o tumor cresce aceleradamente e ainda não houve tempo para o processo de angiogênese contornar essa situação (SIN et al., 2023). Em resposta a essa adversidade, as células tumorais sinalizam para uma maior ativação da via HIF-1 (fator induzido por hipóxia) que por consequência promove uma alteração no metabolismo celular conduzindo-o para a glicólise anaeróbica mesmo que haja a presença de oxigênio (Efeito Warburg). Essa situação provoca uma diminuição do pH na região e culmina no favorecimento da invasão e metástase do tumor (COURTNAY et al., 2015; STUBBS; GRIFFITHS, 2010).

Outra importante observação de alteração neste microambiente está relacionado à alterações na remodelação da Matriz Extracelular (MEC) e fibrose avançada, que promovem alterações na rigidez, degradação e manutenção da estrutura, podendo favorecer a invasão e metástase das células cancerosas (HERNANDEZ-GEA; FRIEDMAN, 2011; WALLACE; BURT; WRIGHT, 2008). A somatória destas alterações contribuem significativamente para a penetração e metástase do câncer, escape das células cancerosas do sistema imune e redução da eficácia de fármacos e terapias contra o câncer. Logo, a compreensão das formas de modular e controlar este microambiente são fundamentais para melhorar os tratamentos e prognóstico no tratamento de cânceres (EGGERT; GRETEN, 2017; YOU et al., 2019). Para tanto as técnicas de cultura tridimensional de células são algumas das ferramentas que podem ser utilizadas nesse sentido, uma vez que essas podem mimetizar de forma mais fidedigna o microambiente tumoral.

1.3 Cultura Tridimensional (3D)

Há anos a biologia celular vem sendo aplicada em estudos com base em modelos de crescimento celular *in vitro* com o intuito de desenvolvimento de terapias mais eficazes contra o câncer. O cultivo celular em monocamada, também conhecido como modelo monocamada ou bidimensional (2D), é o modelo experimental mais empregado nos ensaios de terapia celular porém, apresenta limitações uma vez que neste modelo há o comprometimento das interações de contato célula-matriz extracelular (MEC) e arquiteturas tecido-específicas, essenciais para o estabelecimento do complexo microambiente tumoral e o contato célula-célula fundamentais para suas posteriores sinalizações de diferenciação celular em um tecido

(FITZGERALD; LI; WEINER, 2021) . Neste tipo de cultivo, contato das células com a matriz extracelular (MEC) ocorre em apenas um plano e dessa forma não há um comprometimento no gradiente de difusão de nutrientes, oxigênio e drogas, resultando em uma discrepância de dados obtidos por este modelo (BIAŁKOWSKA et al., 2020; SHEN et al., 2021). Para contornar essas limitações, modelos de crescimento celular tridimensional foram desenvolvidos e aplicados de modo a contribuir como plataforma para triagem de drogas e toxicidade, modelos confiáveis para estudo de tumores sólidos *in vivo* e redução do uso de animais na pesquisa científica, visto que o cultivo 3D possui a capacidade de mimetizar as condições encontradas em tumores sólidos (COSTA et al., 2017).

Os esferoides, por exemplo, correspondem a um modelo de crescimento celular tridimensional no qual as células multiplicam-se num cenário em que sua morfologia e fisiologia são reguladas e divergem do que é observado no tradicional modelo em monocamada (2D) (COSTA et al., 2017; DE DIOS-FIGUEROA et al., 2021). Essas particularidades ocorrem graças às interações célula-célula e célula-matriz, que promovem alterações na expressão gênica, organização citoesquelética e fenótipo celular. Além disso, esse cenário também promove alteração no metabolismo celular uma vez que há um gradiente de oxigênio e nutrientes na estrutura tridimensional (ZANONI et al., 2016). Em razão dessas características e pela possibilidade de criação de uma co-cultura de linhagens celulares, este modelo permite mimetizar melhor o microambiente encontrado *in vivo*, sendo assim um melhor modelo de reprodução de um tumor e desta forma torna-se mais adequado para se alcançar a compreensão sobre a eficácia e resistência a terapias contra o câncer (GOERS; FREEMONT; POLIZZI, 2014).

Esta estrutura tridimensional é composta, simplificadamente, por três regiões gerais bastante distintas e conhecidas, sendo elas: células em proliferação (borda externa do esferoide), células quiescentes (região intermediária) e células necróticas (localizadas no centro), como podemos observar na **Figura 2** que ilustra esquematicamente um esferoide de uma única cultura, mas vale lembrar que a mesma pode ser uma mistura de duas ou mais culturas, a depender do intuito e motivação de pesquisa (SANT et al., 2017).

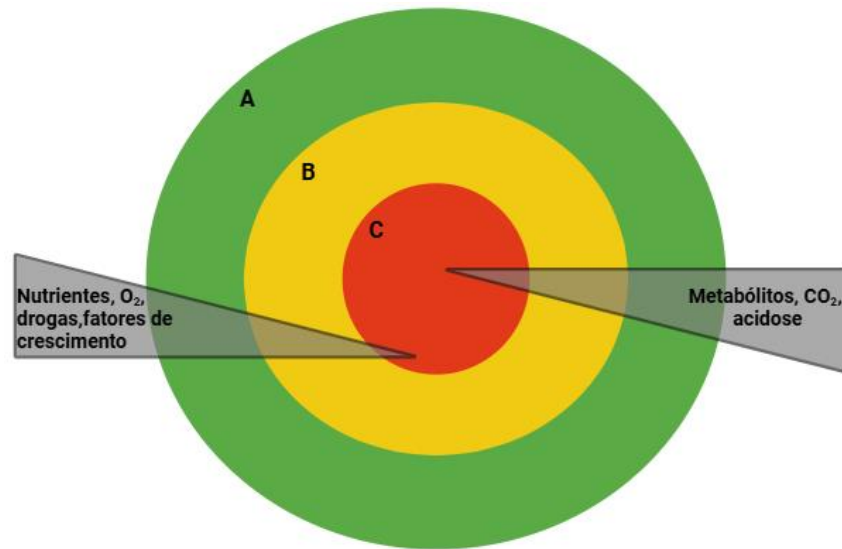


Figura 2. Representação esquemática de um esferoide indicando as três regiões características observadas no crescimento celular 3D. A) células em proliferação, B) células quiescentes e C) células necróticas. FONTE: SANT et al., 2017.

As divergências das características para cada região são observadas nos diferentes níveis de nutrientes, O_2 , fatores de crescimento, citocinas, pH (conjunto 1), CO_2 e outros produtos residuais celulares (conjunto 2) dos quais os três setores estão expostos, sendo a concentração da presença dos itens do conjunto 1 são inversamente proporcionais aos itens expostos no conjunto 2, ou seja, os itens do primeiro conjunto apresentam maior concentração na porção externa e diminuem à medida que há a “internalização” na estrutura tridimensional, enquanto que o segundo conjunto apresenta maior concentração no centro e diminuem à medida que atinge as periferias (SANT et al., 2017). Em se tratando da administração de um fármaco ou droga a essa estrutura tridimensional, temos que a interação do mesmo é análogo ao que ocorre com os itens do conjunto 1, permitindo assim uma melhor compreensão da eficiência da terapia, auxiliando na melhor caracterização da dose a ser aplicada da droga de interesse (GALEANO; CAMPUZANO-BUBLITZ; KENNEDY, 2021).

Dessa forma, os esferoides podem permitir uma melhor compreensão da diferenciação celular, organização dos tecidos, homeostase (SHEN et al., 2021) e devido à possibilidade de obtenção dos mesmos num sistema de co-cultura, pode-se reproduzir mais fielmente o complexo microambiente tumoral, demonstrando ser uma ferramenta indispensável e imprescindível para o avanço do estudo dos mais variados tipos de cânceres sólidos (FRIEDRICH et al., 2009).

Dentre as metodologias disponíveis para obtenção deste modelo, podemos dividi-las em dois grandes grupos, sendo a diferença observada na presença (*Scaffold-based*) ou ausência (*Scaffold-free*) de um suporte para o crescimento celular (SANT et al., 2017). Nos modelos denominados *Scaffold-based*, há a necessidade de um material de suporte para

crescimento das células, sendo as principais técnicas as de uso de material de origem biológica a exemplo a utilização de proteínas como fibronectina, colágeno e laminina, além de matrizes tipo hidrogel a base de Matrigel® , Cultrex® ou Geltrex®; ou sintética, a exemplo o polímero polietilenoglicol (PEG) (HAN; KWON; KIM, 2021). Bioimpressão 3D e culturas em chips microfluídicos são outros exemplos de técnicas disponíveis para este ramo de obtenção de esferoides (BANERJEE et al., 2022; MOSHKAYAN et al., 2018). Em se tratando das técnicas denominadas *Scaffold-free*, estas partem do pressuposto da não necessidade de adicionar um material de suporte pois na ausência de um substrato para que as células possam aderir, promovendo a agregação e compactação celular, resultando na formação dos esferoides (COSTA et al., 2017; VERJANS et al., 2018).

Dentre as metodologias empregadas neste técnica podemos citar a técnica de *hanging drop*, ou gota suspensa, na qual a força da gravidade propicia uma maior interação entre as células e consequentemente a formação da estrutura; métodos baseados em cultura de agitação com o auxílio de biorreatores rotativos e/ou *spinner flasks*; criação da estrutura através de microcavidades pré-definidas, de modo a limitar o espaço disponível e “forçar” a adesão célula-célula; e uso de placas de superfície não aderente ou placas revestidas com material de propriedades não aderentes, a exemplo a agarose, na quais as células cresçam em suspensão líquida (BIAŁKOWSKA et al., 2020; GUNTI et al., 2021). Cada uma das técnicas mencionadas acima apresentam seus benefícios e dificuldades intrínsecas e devem ser avaliadas de acordo com os objetivos desejados e os custos inerentes de cada técnica, bem como equipamentos e materiais necessários para sua execução.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Desenvolver um protocolo de cultura 3D para formação de esferoides da linhagem celular de hepatocarcinoma humano (HepG-2).

2.2 Objetivos específicos

- Cultivo celular da linhagem celular de HepG-2 em monocamada;
- Padronização do método para cultivo tridimensional dos esferoides;
- Caracterização da morfologia e tamanho dos esferoides por imagem de contraste de fase em microscópio óptico invertido;
- Viabilidade dos esferoides pelo método de azul de tripano;
- Viabilidade dos esferoides pelo método LDH;
- Ensaio de internalização de nanopartículas poliméricas nos esferoides;
- Formulação de um protocolo aplicável para o cultivo tridimensional pela determinação da melhor concentração e idade dos esferoides para testagem de terapias.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Cultivo celular 2D: HepG-2

A linhagem celular de hepatocarcinoma humano (HepG-2) utilizada para a realização deste trabalho foi obtida do banco de células ATCC. As células foram cultivadas em monocamada em garrafas de cultura contendo o meio RPMI 1640 (*do inglês*, Roswell Park Memorial Institute 1640 medium) (Vitrocell) suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS) (Vitrocell) e 2 mM de L-gutamina (Vitrocell), sendo mantidas na incubadora em atmosfera contendo 5% de CO₂ e temperatura regulada em 37 °C para adesão, crescimento e divisão até atingirem um número suficiente de células para início dos ensaios. A troca do meio de cultura foi realizada de duas a três vezes por semana. As passagens foram realizadas após a confluência atingir 80%, utilizando-se 5 mL de tampão PBS para lavagem da garrafa, 3 mL de Tripsina 2,5 g/L (Vitrocell) para desprendimento das células aderidas à garrafa e posterior adição de 3 mL do meio suplementado para neutralizar a tripsina. Em seguida, mais 9 mL do meio foram adicionados para manter as células em cultura.

3.2 Cultivo celular 3D: Técnica *Scaffold-free*

Inicialmente duas abordagens foram testadas para a obtenção dos esferoides. Ambas as abordagens baseiam-se na sobreposição de líquidos de modo a impedir que haja adesão celular à superfície do substrato em que é depositado. A primeira consistiu no uso de placas com fundo em “U” com superfície não aderente (Nunclon Sphera, Thermo Fisher) o que promoveria a formação de um único esferoide por poço, pois concentra as células em uma região e a adesão das células às paredes não ocorre devido à falta de tratamento específico para que haja a interação. O outro método testado consistiu em revestir uma placa de 96 poços convencional com agarose, segundo protocolo desenvolvido por FRIEDRICH et al. 2009; LEMOS et al., 2011 (FRIEDRICH et al., 2009; LEMOS et al., 2019), com adaptações. Resumidamente, o preparo da agarose foi realizado pela adição de 1 g da Agarose (Sigma Aldrich) e 100 mL de água Milli-Q (medidos em uma proveta) em um frasco autoclavável para obter agarose em uma concentração de 1% (m/v). O frasco foi agitado realizando-se movimentos circulares e levado ao micro-ondas em ciclos de 30 segundos para aquecimento e completa solubilização da agarose. Em seguida essa solução foi submetida ao processo de autoclavagem. Sempre que necessário seu uso, a agarose foi levada ao micro-ondas em ciclos de 30 segundos até sua completa fusão de modo a garantir a homogeneidade da concentração da solução. Em seguida prosseguiu-se com o preparo do revestimento da placa de 96 poços com

a adição de 80 µL de agarose em cada poço, processo realizado dentro do fluxo laminar. Após a completa solidificação da agarose nos poços, a placa foi mantida aberta e exposta à radiação UV por 30 minutos de modo a garantir a assepsia do material para ser utilizado no plaqueamento das concentrações celulares.

3.3 Padronização da Densidade Celular

Com o intuito de promover a formação de apenas um esferoide por poço, as concentrações celulares de 3.500, 5.000 e 10.000 células/mL, em um volume de 200 µL de meio de cultura foram adicionadas em diferentes poços. Então as células foram deixadas em agitação orbital (Digital Orbital Shaker) por 30 minutos para concentrar as células em um única região. Posteriormente, as células foram mantidas incubadas a 37 °C e 5% CO₂ para a formação dos esferoides que foram observados ao longo de 3, 5 e 7 dias de idade com o auxílio de um microscópio óptico invertido (Eclipse TS100, Nikon).

3.4 Tamanho dos Esferoides

A morfologia e tamanho dos esferoides nos dias 3, 5 e 7 de idade foram analisadas através da microscopia de campo claro, pelo registro de micrografias em objetiva de 4X a partir de uma câmera (DS-Ri1, Nikon) acoplada ao microscópio invertido (Eclipse TS100, Nikon), e posterior análise do diâmetro com o auxílio do software ImageJ-FIJI e, como os esferoides podem apresentar formatos irregulares, o diâmetro médio (D_m) foi calculado a partir de duas medidas ortogonais a e b (**Figura 3**) e calculado a partir da Equação 1 (KUO et al., 2017; WEN et al., 2013).

$$D_m = \sqrt{a + b} \quad (\text{Equação 1})$$

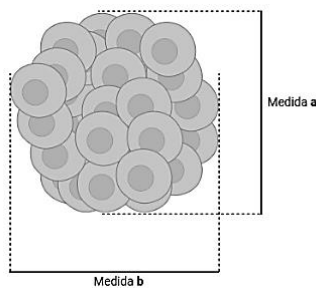


Figura 3. Representação do processo de determinação do diâmetro médio dos esferoides. Fonte: Autoria própria (2025).

3.5 Viabilidade Celular dos Esferoides

3.5.1 Azul de Tripano (*Trypan Blue*)

Para este ensaio, três esferoides referentes às três concentrações foram coletados em um microtubo de 1,5 mL nos dias 3, 5 e 7. Então, o excesso de meio foi removido delicadamente e, em seguida adicionado 300 μ L da solução TrypLE Select (10X) (Thermo Fisher), mantido em incubação no Thermo Shaker a 37 °C e 1000 rpm por 5 minutos. Durante este intervalo as amostras foram homogeneizadas com uma pipeta para garantir a dissociação completa dos esferoides. Ao término desta etapa, foi adicionado 400 μ L de meio para inativar a tripsina e em seguida foi realizada a contagem para verificar a viabilidade celular, adicionando em um novo microtubo de 0,5 mL, 25 μ L de azul de tripano e 25 μ L da solução celular (proporção 1:1). Este preparo foi adicionado em uma lâmina compatível ao contador Countess II e feito registro da viabilidade.

3.5.2 Lactato Desidrogenase (LDH)

A quantificação da enzima citosólica Lactato Desidrogenase (LDH) no meio de cultura em que os esferoides foram cultivados foi realizado utilizando-se o kit MAK066 (Sigma Aldrich). Por se tratar de um ensaio não destrutivo, o mesmo esferoide foi acompanhado ao longo dos 7 dias de cultivo para avaliar o comportamento celular. Toda a montagem do ensaio foi executada seguindo as orientações do fabricante e a leitura (SpectraMax M3, Molecular Devices) da absorbância foi realizada a 450 nm sob incubação da placa contendo as amostras a 37 °C. Este teste foi conduzido de modo a correlacionar a viabilidade celular ao processo de necrose devido às condições de hipóxia encontradas no modelo de esferoide.

3.6 Captação de nanopartículas poliméricas pelos esferoides

Para o ensaio de captação das nanopartículas pelos esferoides, as nanopartículas poliméricas foram obtidas pelo método de síntese de nanoprecipitação em que a fase orgânica composta de 0,5 mg de 3,3'- Perclorato de Dioctadeciloxacarbocianina (DiO) (marcador fluorescente) e 2,9 mg de PLGA 50:50 diluídos em 0,8 mL de acetona foi adicionada gota a gota na fase aquosa composta por 60 mg de Pluronic F127 em 2 mL de água Milli-Q. A mistura foi deixada em agitação por 30 minutos para evaporação da fase orgânica. Então as nanopartículas foram lavadas 3 \times por centrifugação com amicon (500 rpm, 15 minutos, 15C) e caracterizadas quanto ao tamanho e concentração, pela técnica de NTA (*do inglês*, Nanoparticle Tracking Analysis) para posterior uso no ensaio. Em seguida, três esferoides de mesma

concentração e idade foram recolhidos em um microtubo de 1,5 mL, o meio de cultivo foi removido com uma pipeta e posteriormente uma solução de meio de cultura contendo as nanopartículas fluorescentes a uma concentração de 5×10^{10} partícula/mL foi aplicada aos esferoides, em um volume de 200 μ L em cada microtubo. Furos foram realizados nas tampas do microtubos de modo a permitir a difusão de CO₂ pelas próximas 24 horas em que os esferoides permaneceram co-incubados com as nanopartículas.

Após o período de incubação, 200 μ L de formalina a 5% foi adicionada aos esferoides para a pré-fixação dos esferoides por 10 minutos. Em seguida esse meio foi removido e 200 μ L de formalina a 5% foram adicionados aos esferoides para fixação por 20 minutos. Ao término da fixação, o fixador foi removido, os esferoides lavados delicadamente com tampão PBS e seguiu-se para a etapa de marcação das amostras com Hoeschst 33342 (5 μ g/mL). O marcador permaneceu em contato com as amostras por 30 minutos e após, as amostras foram lavadas 3x em tampão PBS. Ao término da bateria de marcação, as amostras foram estocadas em meio de montagem contendo Glicerol e 0,5% Ácido ascórbico (m/v) em tampão Tris (5 mM, pH 8) na proporção (1:1) para posterior análise das internalizações no Confocal.

3.7 Análise estatística

Os ensaios foram realizados em triplicata técnica e com grupo amostral $n = 3$. Os resultados foram expressos em média \pm desvio padrão e analisados estatisticamente, por meio do programa *GraphPad Prism 8*, utilizando a análise de variância (ANOVA) de uma via seguida do teste de Tukey. Um valor de probabilidade menor que 0,05 ($p < 0,05$) foi considerado estatisticamente significativo.

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Cultivo celular 2D: HepG-2

O cultivo da linhagem celular de hepatocarcinoma humano foi conduzido segundo protocolos já bem estabelecidos na literatura (DONATO; TOLOSA; GÓMEZ-LECHÓN, 2015) tendo demonstrado crescimento satisfatório e alcançado boa confluência. As células apresentaram características esperadas para a linhagem, como o crescimento em ilhas ou aglomerados celulares, conforme ilustrado na **Figura 4**. Além disso, a morfologia dessas células apresentou-se semelhante à epitelial com pouca microvilosidade consistente com as micrografias de referência disponíveis no banco de células de onde a linhagem foi adquirida (**Figura 4**).

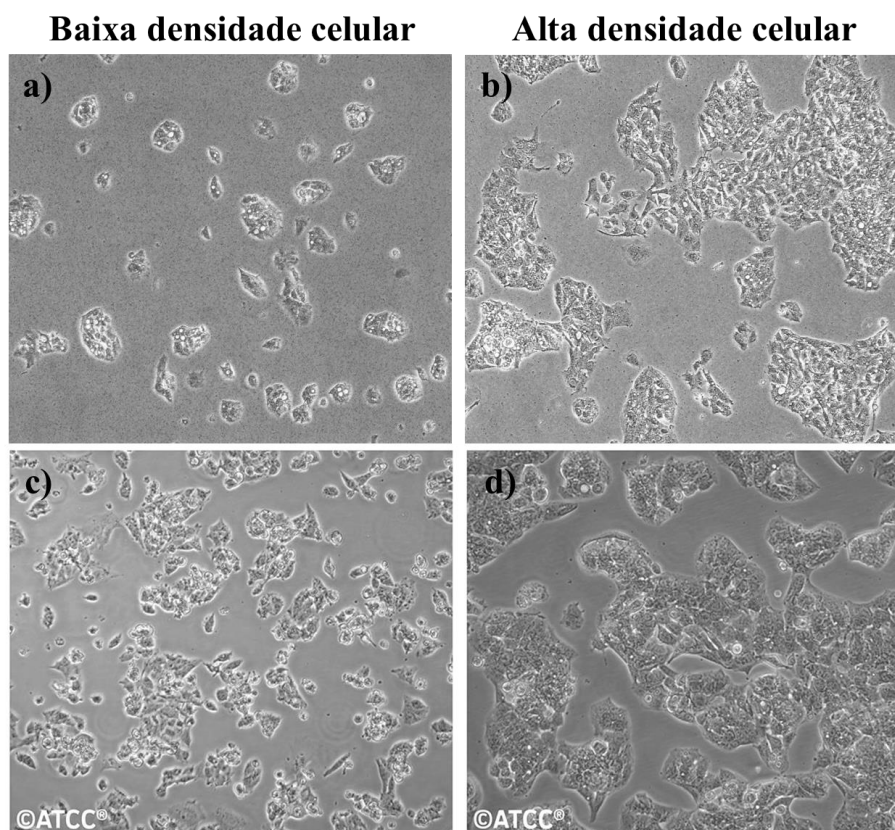


Figura 4. Micrografias representativas da morfologia das células HepG-2: **a-b)** registradas em baixa e alta confluência respectivamente e **c-d)** micrografias de referência disponíveis no banco de células ATCC. FONTE: Autoria própria (2025).

4.2 Cultivo celular 3D: Técnica *Scaffold-free*

Esferoides são agregados de células bem definidos e compactos que podem mimetizar características de tecido *in vivo*, tornando-os ferramentas valiosas para uma série de avaliações, como por exemplo, testar eficácia de medicamentos. Para a obtenção desses

agregados muitas técnicas foram sendo desenvolvidas com o avanço da biotecnologia, incluindo o crescimento de células em frascos giratórios, em gotas suspensas, dentro de uma matriz, em cultura de sobreposição líquida, entre outras. (FU; WANG, 2018; GUNTI et al., 2021) Aqui os experimentos foram conduzidos para avaliarmos dois métodos de cultura de sobreposição líquida. O primeiro deles consistiu na utilização de placas com fundo em U, adquiridas comercialmente, projetadas para formar esferoides individuais como ilustrado esquematicamente na **Figura 5a**. Entretanto, a formação dos esferoides não ocorreu como esperado e observou-se a formação de mais de um agregado de células por poço, com tamanhos irregulares e lacunas entre as células (**Figura 5b**). Portanto, considerando esses resultados, uma das possibilidades é que mesmo a placa sendo configurada para baixa adesão, interações entre a parede da placa e as células ainda podem acontecer, o que explicaria a formação de mais de um agregado, embora a placa de fundo em U seja frequentemente utilizada na formação de esferoides bem organizados e individuais (VINCI; BOX; ECCLES, 2015).

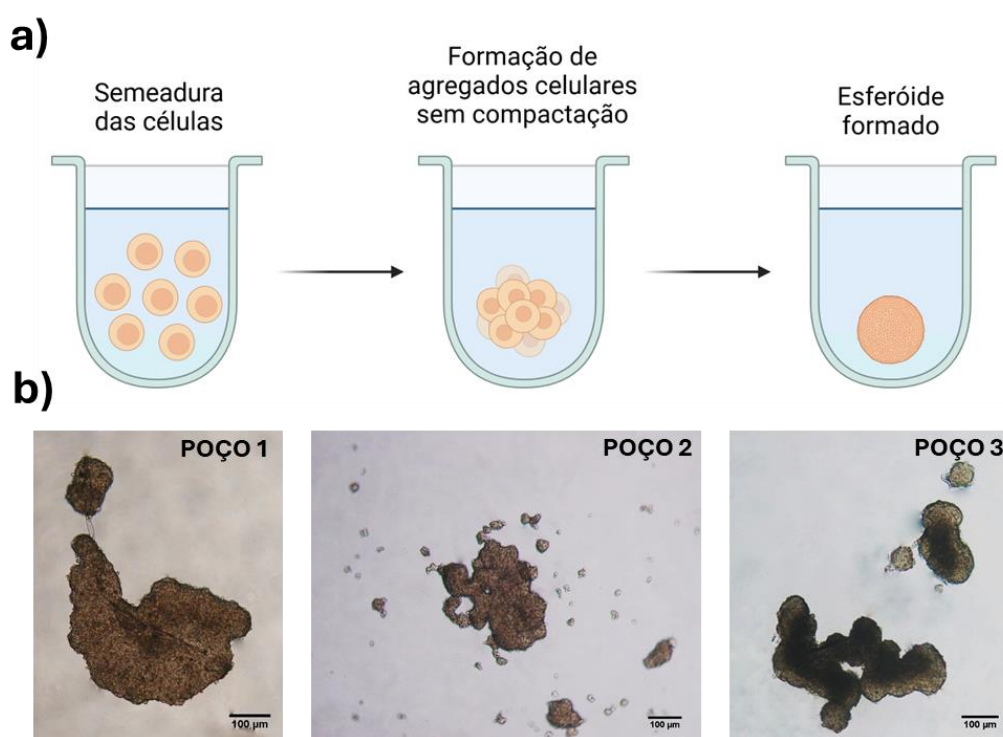


Figura 5. Formação de esferoides: a) representação esquemática da evolução esperada para a formação de esferoides quando as células são semeadas em placas de poços com fundo em U e b) agregados das células HepG-2 formados com tamanhos irregulares e lacunas entre as células após semeadura das células em placas de poços com fundo em U. FONTE: Autoria própria (2025).

O outro método de cultura de sobreposição líquida avaliado consistiu na utilização de uma placa de 96 poços de fundo chato revestida com agarose a 1%. Neste método a suspensão de células foi adicionada na placa e esta foi deixada sobre agitação orbital para

promover a formação de esferoides individuais. A formação individual dos esferoides é ilustrada esquematicamente na **Figura 6a**. O revestimento com agarose é amplamente utilizado para essa finalidade, além de ser um material acessível, econômico e de fácil manipulação.(JIANG et al., 2023) A concentração de 1% mostrou-se eficaz, mantendo sua integridade estrutural durante os 7 dias, período correspondente à duração dos ensaios. Adicionalmente esse método foi eficaz na formação de esferoides individuais e bem compactados a partir das células HepG-2 como pode ser observado nas micrografias de esferoides com 7 dias de idade (**Figura 6b**). Esses resultados reforçaram a eficácia da agarose como material de revestimento, praticidade e reprodutibilidade em laboratório.

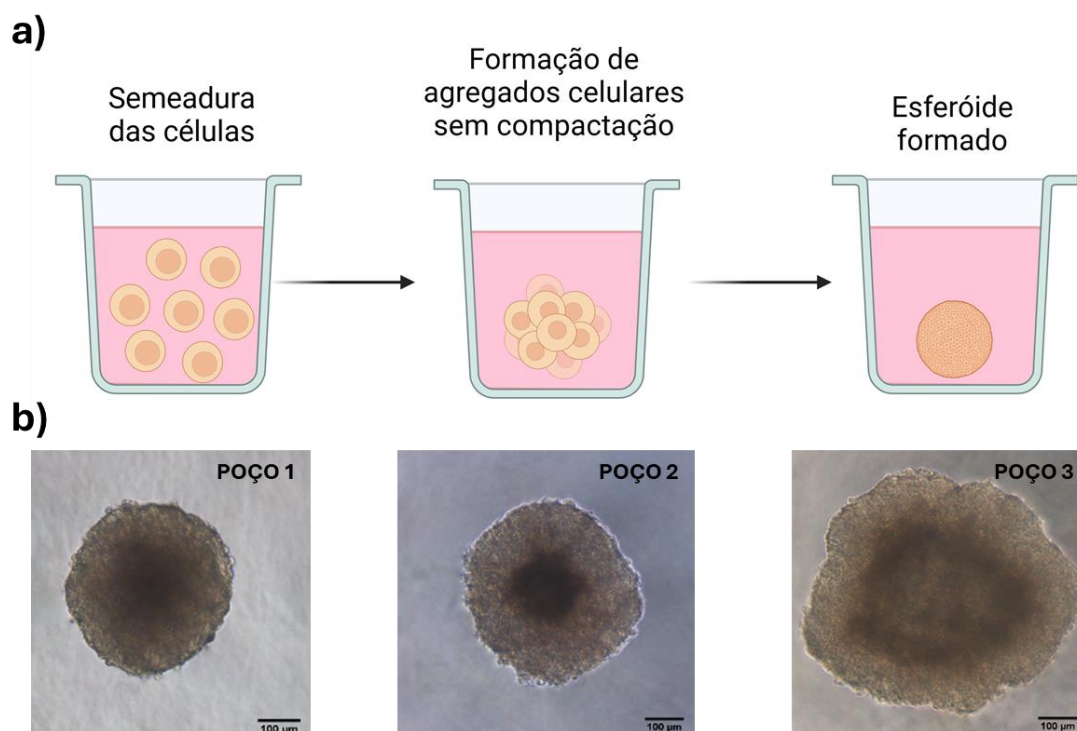


Figura 6. Formação de esferoides: a) representação esquemática da evolução da formação de esferoides quando as células são semeadas em placas de poços com fundo chato revestidos com agarose 1% e b) Esferoides formados com boa compactação após 7 dias de semeadura das células HepG-2. Autoria própria (2025).

4.3 Padronização da Densidade Celular

A etapa de determinação da padronização da densidade celular é um fator fundamental para que haja a correta formação de apenas um esferóide por poço. Além disso, a densidade celular de semeadura está intrinsecamente relacionada aos parâmetros de viabilidade celular e tamanho dos esferoides, uma vez que, quanto maior for a densidade celular, maior será o diâmetro médio de um esferóide e, conseqüentemente, haverá mais dificuldade de permeabilização dos gradientes do meio de cultura como nutrientes, oxigênio e fatores de

crescimento, por exemplo, para o interior da estrutura e vice-versa, impactando diretamente na viabilidade celular (SANT & JOHNSTON, 2017).

Assim, visando a obtenção de apenas um esferoide que tenha boas condições de viabilidade celular, três densidades iniciais foram escolhidas para início dos testes nomeadas como: concentração 1 (C1), concentração 2 (C2) e concentração 3 (C3) que são, respectivamente, 3.500, 5.000 e 10.000 células/poço. Estas três densidades foram escolhidas após revisão da literatura e comparação a outros trabalhos realizados utilizando-se a mesma linhagem e tendo o sucesso de alcançar a formação de apenas um esferoide por poço (ŠTAMPAR et al., 2020). A **Figura 7** mostra as micrografias representativas da formação dos esferoides que indicam que as três densidades foram capazes de gerar esferoides únicos e bem compactados.

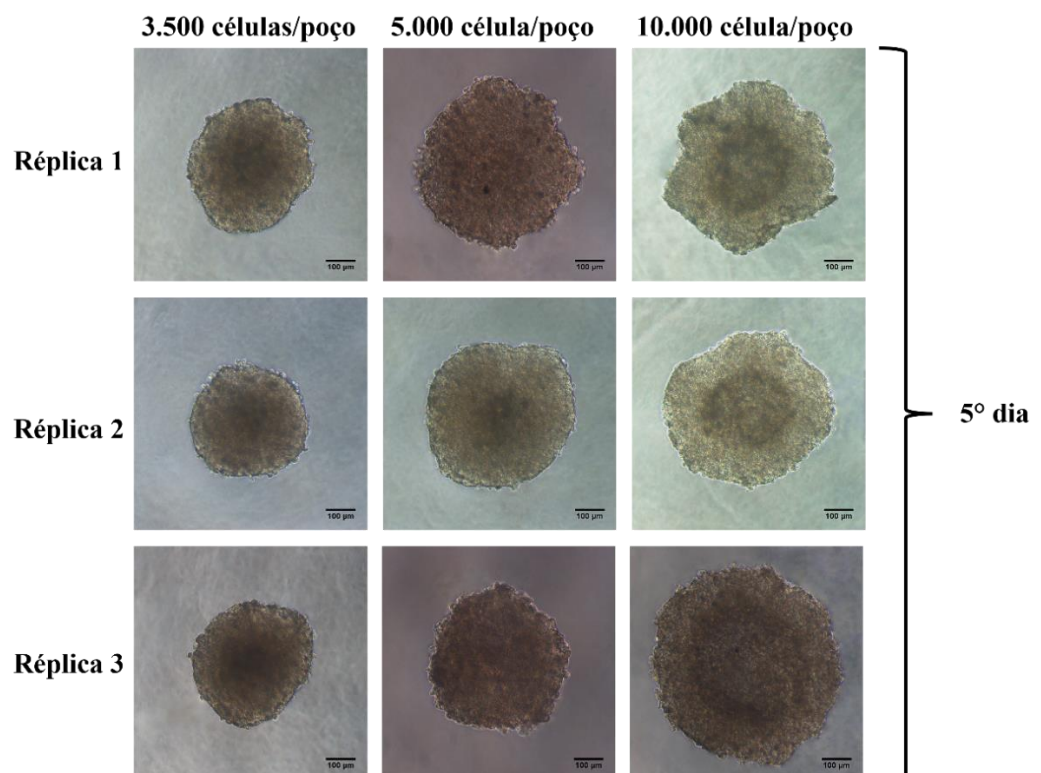


Figura 7. Micrografias representativas dos esferoides formados após 5 dias de semeadura das células HepG-2 em diferentes densidades celulares. FONTE: Autoria própria (2025).

4.4 Avaliação do Tamanho e Morfologia dos Esferoides

O registro das micrografias dos esferoides é uma ferramenta fundamental para a caracterização morfológica e tamanho dos esferoides, pois permite a observação do comportamento de migração, aglomeração celular e o acompanhamento do diâmetro médio conforme a idade dos esferoides avançam. Deste modo, podemos observar a compactação do

esferoide e possível proliferação celular, tendo sido realizado os registros das micrografias ao longo de 3, 5 e 7 dias de idades dos esferoides de forma a acompanhar a progressão da estrutura tridimensional.

A partir das micrografias (**Figura 8**) foi possível observar que no terceiro dia de cultivo todas as células já migraram para uma mesma região e inicia-se a aglomeração ainda que a estrutura possa assumir um formato irregular. A partir do quinto dia já é possível notar a estrutura mais organizada e agregada em um formato esférico e uma leve região mais escura no centro dos esferoides. No sétimo dia, foi possível notar uma melhor compactação do material, apresentando bordas mais definidas e um relevante aumento da intensidade de cor da região central dos esferoides. A região mais escura pode ser em consequência da necrose das células do interior do esferoide por falta de nutrientes ou também devido a produção de matriz extracelular que é uma das características de estruturas 3D de células.

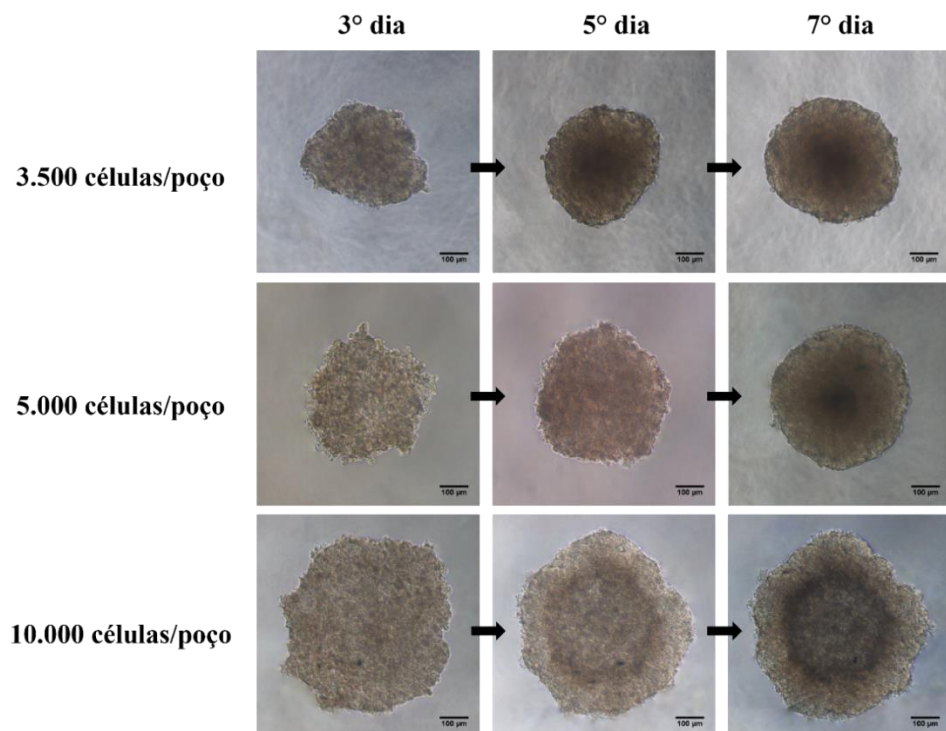


Figura 8. Micrografias representativas dos esferoides formados após 3, 5 e 7 dias de semeadura das células HepG-2 em diferentes densidades celulares. FONTE: Autoria própria (2025).

Com relação aos tamanhos dos esferoides, os diâmetros médios mensurados e apresentados na **Tabela 1** mostram valores próximos para todas as concentrações testadas. Ademais, uma análise estatística desses dados (**Figura 9**) mostraram que as concentrações C1 e C2 produziram no terceiro dia, a formação de esferoides com tamanhos estatisticamente iguais. No quinto dia todas as concentrações apresentaram diferença estatística no tamanho dos

esferoides o que pode ter relação com o processo de compactação e proliferação celular que influencia nesse parâmetro. No dia 07 as concentrações C1 e C2 também geraram esferoides com tamanhos estatisticamente iguais, o que também pode estar relacionado à proliferação e compactação celular.

Tabela 1. Diâmetro médio dos esferoides após o 3°, 5° e 7° dia de idade obtidos a partir da aplicação da equação (1) para as densidades de 3.500 células/poço, 5.000 células/poço e 10.000 célula/poço. Os dados representam a média \pm DP dos ensaios em triplicata, n=3. Fonte: Autoria própria (2025).

Diâmetro médio (μm)			
Densidade celular/poço	3° dia	5° dia	7° dia
3500	159,82 \pm 6,70	174,79 \pm 11,94	199,76 \pm 15,68
5000	182,56 \pm 18,21	190,96 \pm 19,27	211,89 \pm 25,18
10000	259,42 \pm 23,41	255,12 \pm 21,08	256,97 \pm 18,59

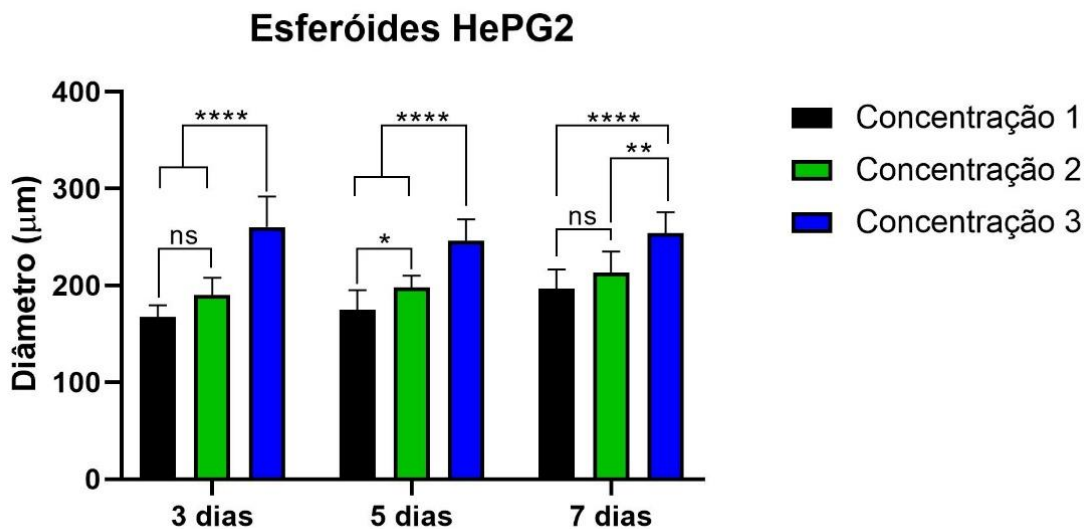


Figura 9. Diâmetro médio dos esferoides ao longo do 3°, 5° e 7° dias de idade em relação às três densidades testadas. Análise estatística ANOVA de uma via seguida de pós-teste Tukey. FONTE: Autoria própria (2025).

A **Figura 10** mostra a análise do diâmetro da mesma concentração nos diferentes dias. A concentração C1 que é a menor das densidades semeadas mostrou diferença estatística no tamanho do diâmetro dos esferoides do terceiro para o quinto e do quinto para o sétimo dia de idade. Esse resultado sugere que houve proliferação celular, uma vez que mesmo tendo ocorrido a compactação celular, um aumento do diâmetro ao longo dos dias também foi observado. As concentrações C2 e C3 não foram capazes de permitir a formação de esferoides em que a proliferação celular fosse bem ativa, como sugere o não aumento do tamanho dos esferoides, principalmente na maior densidade de células utilizadas.

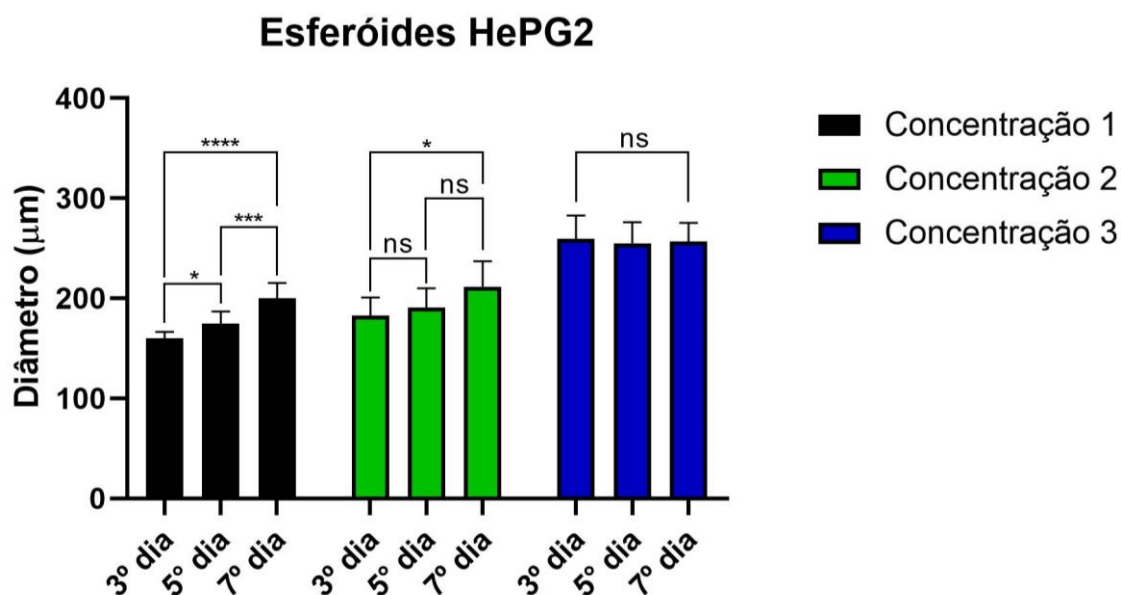


Figura 10. Diâmetro médio dos esferóides ao longo do 3º, 5º e 7º da mesma densidade celular, permitindo a observação do comportamento de compactação e proliferação dos esferóides. Análise estatística ANOVA de uma via seguido de pós-teste Tukey. FONTE: A autoria própria (2025)

Ademais, segundo a literatura (GALEANO et al. 2021), os melhores esferóides para aplicação em terapias e de interesse de estudo da toxicologia são esferóides de diâmetro médio entre 200 a 300 µm, o que vai de encontro aos tamanhos dos esferóides obtidos com nossa metodologia. Com relação à concentração, a de menor densidade pode ser a mais indicada pois é a concentração a qual indica uma maior proliferação celular. No entanto, a escolha da concentração e idade dos esferóides a ser definida para um estudo de testagem de terapia, por exemplo, também depende de outros fatores como a forma de execução e a duração do experimento.

4.5 Análise de Viabilidade Celular dos Esferóides

4.5.1 Azul de Tripiano (*Trypan Blue*)

O azul de tripiano é um corante validado e amplamente utilizado em ensaios de viabilidade celular para o modelo de cultivo bidimensional, pois uma vez que a membrana celular está permeável, este composto de cor azul possui a capacidade de se ligar a proteínas e componentes intracelulares e, portanto, marcando/corando as células de azul permitindo assim avaliar e diferenciar células viáveis (membrana íntegra) e células inviáveis (membrana permeável) (AVELAR-FREITAS et al., 2014; CHUNG; KIM; KIM, 2015).

Este tipo de análise pode contribuir no momento da escolha de uma densidade celular a ser utilizada em ensaios de testagem de um fármaco, por exemplo, pois é fundamental definir uma situação em que as células que irão receber um tratamento estejam aptas e viáveis

de modo a validar a eficácia de uma terapia.

A **Tabela 2** mostra os resultados de viabilidade celular em que para todos os esferoides a viabilidade foi baixa. Esses resultados indicam que mesmo que o método possa ser bem validado para a cultura em monocamada, este pode não ser aplicável para a cultura 3D, uma vez que o próprio método para dissociação das estruturas já pode comprometer a viabilidade das amostras, pois as estruturas são submetidas a tratamento enzimático para desmontagem do esferoide, podendo ocorrer o comprometimento da membrana celular. Portanto, o método de análise por Azul de Tripano não mostrou-se uma forma adequada e aplicável para mensurar a viabilidade dos esferoides.

Tabela 2. Viabilidade celular dos esferoides após o 3°, 5° e 7° dias de idade. Os dados representam a média \pm DP dos ensaios em triplicata, com n=3.

Viabilidade celular							
celular	Densidade	3° dia		5° dia		7° dia	
		Viáveis (%)	Não viáveis (%)	Viáveis (%)	Não viáveis (%)	Viáveis (%)	Não viáveis (%)
	3.500	75 \pm 32	25 \pm 32	41 \pm 6	59 \pm 6	36 \pm 16	64 \pm 16
	5.000	52 \pm 8	48 \pm 8	43 \pm 8	57 \pm 8	41 \pm 6	59 \pm 6
	10.000	40 \pm 22	60 \pm 22	54 \pm 20	46 \pm 20	33 \pm 7	67 \pm 7

4.5.2 Lactato Desidrogenase (LDH)

Lactato Desidrogenase (LDH) é uma enzima citosólica envolvida no metabolismo energético da interconversão de piruvato a lactato a partir da redução do NAD^+/NADH . Por ser uma enzima localizada no citosol, quando há o rompimento da membrana celular, a LDH, e tantos outros componentes celulares, são liberados para o meio em que as células estão presentes e dessa forma, torna-se possível a verificação e quantificação da presença da enzima (KAJA et al., 2017).

A partir deste ensaio é possível inferir de forma indireta e satisfatória a viabilidade celular dos esferoides, pois à medida que as membranas do agregado celular são rompidas, a enzima LDH é liberada para o meio e dessa forma é possível a quantificação da presença da enzima no volume de amostra recolhido pelo monitoramento longitudinal da necrose crescente (COX et al., 2021).

No geral, o ensaio de análise pela enzima LDH realizado não foi satisfatório, por não ter sido observado uma progressão da presença da enzima ao longo dos 7 dias de cultivo. Para algumas amostras, a leitura inicial não apresentou sinal e, portanto, não foi possível utilizá-las para o cálculo da presença da enzima (**Figura 11**). Em contrapartida, outras amostras mostraram-se altamente reativas ultrapassando a linearidade da curva padrão (**Figura 11**), embora tenhamos conseguido curvas padrões com r^2 dentro de valores permitidos para ensaios que utilizam moléculas biológicas (**Figura 11**).

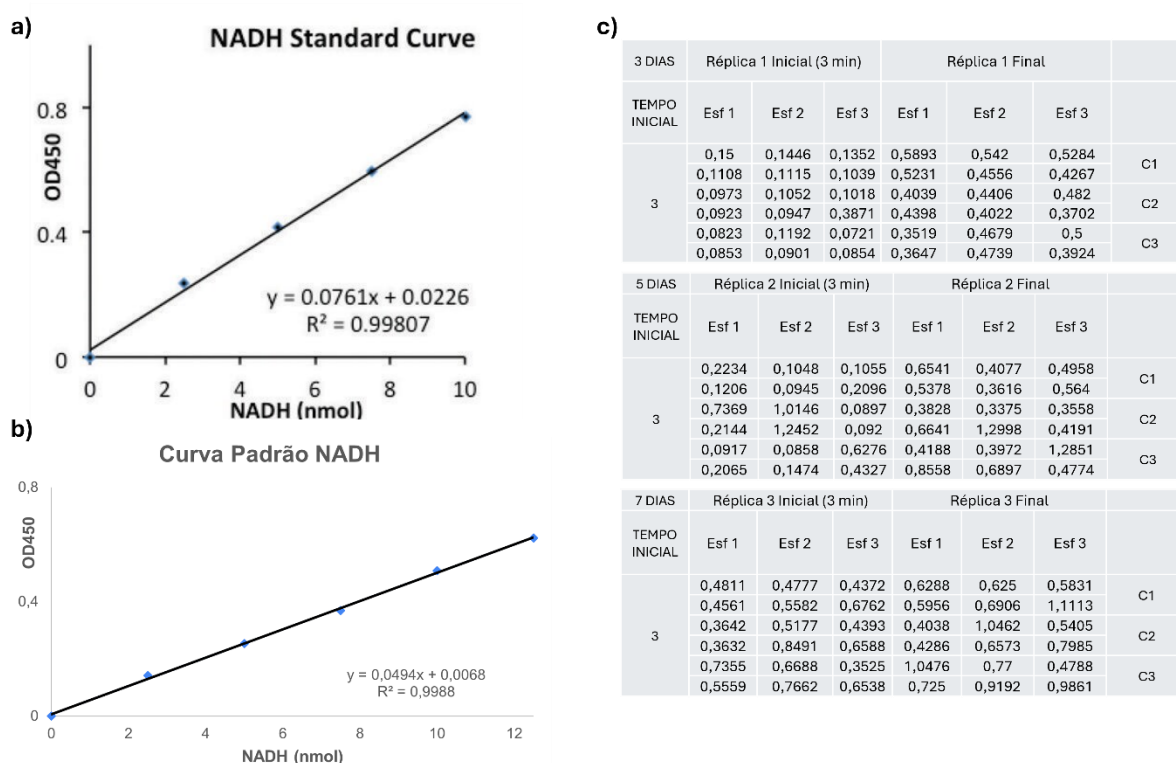


Figura 11. Representação dos dados obtidos para o ensaio de quantificação da enzima LDH realizado em duplicata para cada amostra, segundo orientação do fabricante. Em a) ilustração da curva padrão fornecida no site do fabricante. Em b) ilustração de uma curva padrão adquirida a partir da média dos valores de absorvância de um ensaio para amostras de 3 dias e c) valores de absorvância obtidos nos ensaios para todas as densidades celulares e todas as idades de cultivo, com $n = 3$. FONTE: Autoria própria (2025).

4.6 Análise de internalização

Para avaliarmos a capacidade dos esferoides de serem utilizados como modelo para triagem de nanoformulações, os esferoides foram testados quanto à sua capacidade de captar nanopartículas poliméricas marcadas com um marcador fluorescente (DiO), de tamanho de 149 nm e concentração de $2,68 \times 10^{11} \pm (1,93 \times 10^{10})$ partículas/mL. Para tanto, os esferoides foram incubados com as nanopartículas (5×10^{10} partículas/mL) pelo período de 24 horas e observou-se que para todas as concentrações de células, e em todos os dias de idade houve a captação das nanopartículas pelos esferoides. No entanto, esses resultados não mostraram resposta com relação a densidade de células mais indicada, já que a interação com as nanopartículas ocorreram em todas as condições (**Figuras 12-14**). Outra observação que pode ser feita é que houve aglomeração da nanoformulação, como indicado pelas setas nas **Figuras 12-14** que pode ter impactado na internalização. Ademais, embora nossa análise tenha sido apenas qualitativa os esferoides com 3 dias de idade parecem ter captado mais nanopartículas em comparação às outras idades. Isto pode ser explicado pelo fato de que com 3 dias os esferoides ainda não estão totalmente compactos, uma vez que uma maior compactação

dificulta o processo de difusão das nanopartículas.

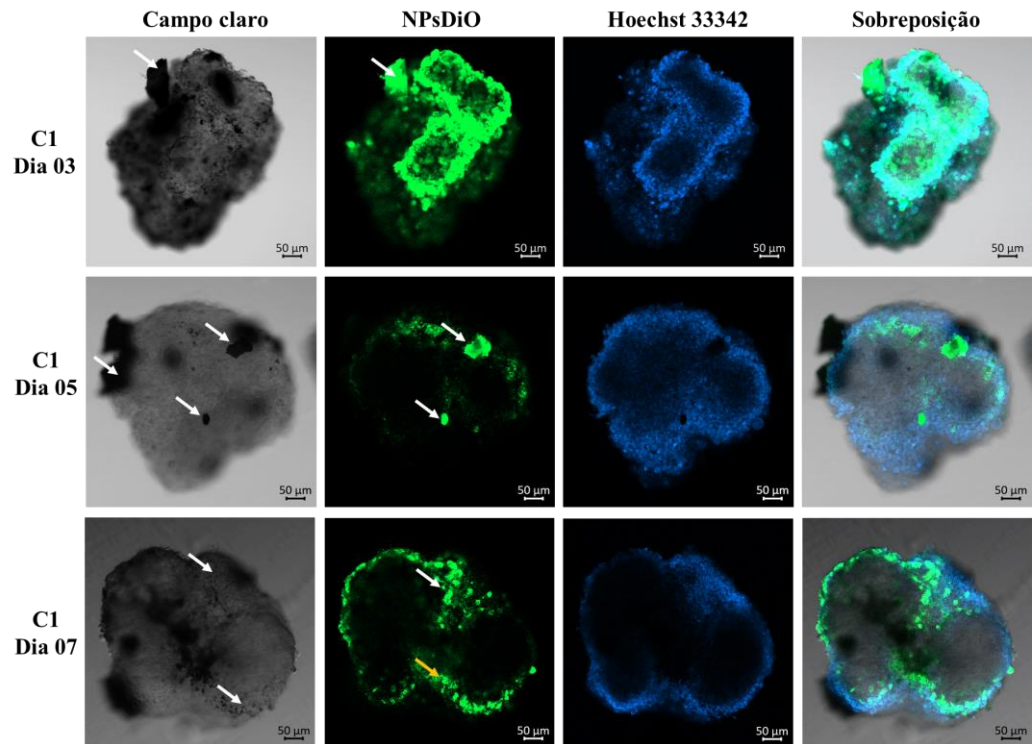


Figura 12. Imagens representativas de microscopia confocal de varredura a laser (CLSM) dos esferoides com 3, 5 e 7 dias de idade após 24 h de incubação com as nanopartículas marcadas com DiO (NpsDiO) ($\lambda_{ex}=488$ nm). Densidade celular utilizada de 3500 células/poço. Hoechst 33342 foi utilizado para marcar os núcleos das células ($\lambda_{ex} = 405$ nm, retratado em azul). FONTE: Autoria própria (2025).

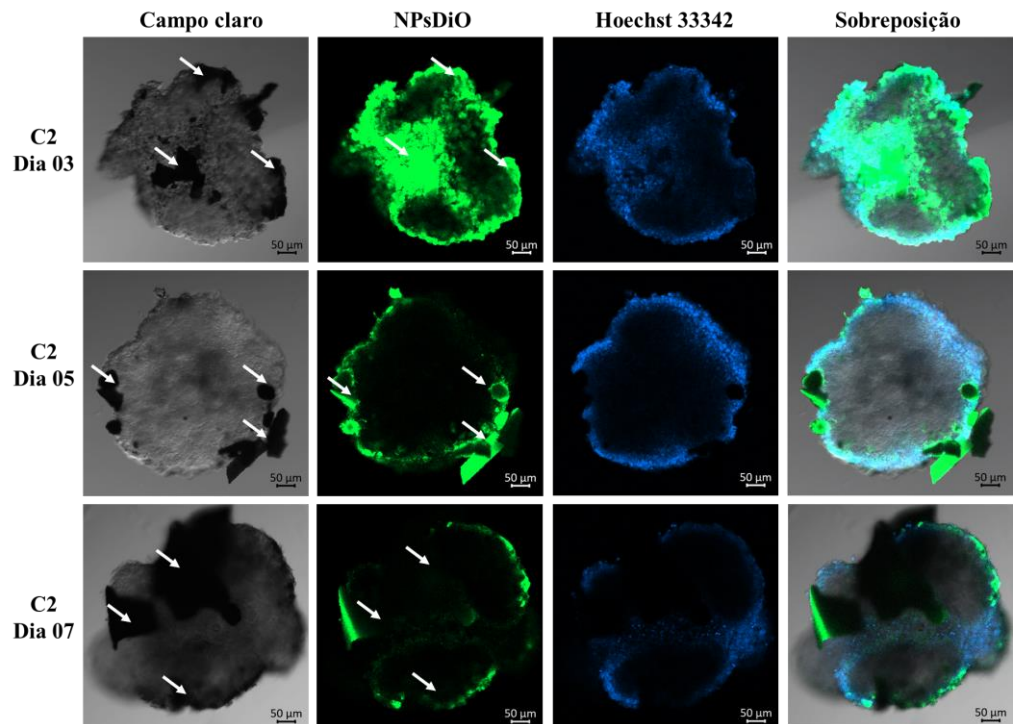


Figura 13. Imagens representativas de microscopia confocal de varredura a laser (CLSM) dos esferoides com 3, 5 e 7 dias de idade após 24 h de incubação com as nanopartículas marcadas com DiO (NpsDiO) ($\lambda_{ex}=488$ nm). Densidade celular utilizada de 5.000 células/poço. FONTE: Autoria própria (2025).

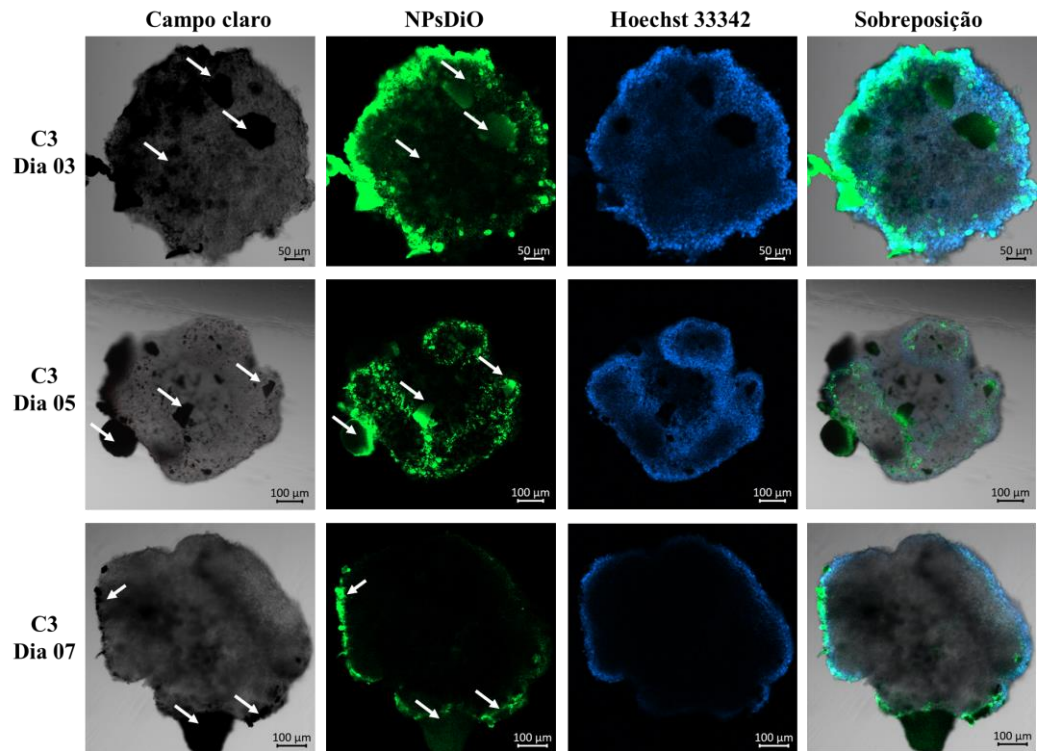


Figura 14. Imagens representativas de microscopia confocal de varredura a laser (CLSM) dos esferoides com 3, 5 e 7 dias de idade após 24 h de incubação com as nanopartículas marcadas com DiO (NpsDiO) ($\lambda_{ex}=488$ nm). Densidade celular utilizada de 10.000 células/poço. FONTE: Autoria própria (2025).

5. CONCLUSÃO

Os resultados demonstraram que a utilização da agarose na concentração 1% como substrato para o cultivo tridimensional da linhagem celular HepG-2 foi eficaz permitindo a formação de esferoides bem definidos e compactos. Com relação à densidade celular destacamos a concentração de 3.500 células/poço, uma vez que a análise morfológica dos esferoides formados a partir dessa densidade de semeadura evidenciou um processo progressivo de compactação celular e possível proliferação ao longo do tempo, com aumento do diâmetro médio dos esferoides até o sétimo dia de cultivo.

A presença de uma região central mais escura em todos os esferoides a partir do dia 05 de idade pode indicar a formação de um núcleo necrótico, característica comum em esferoides, devido à limitação na difusão de nutrientes e oxigênio do meio para o interior da estrutura. Essa região mais escura também pode ocorrer devido a produção de matriz extracelular pelas células. Por isso uma análise mais precisa da parte interior dos esferoides, por exemplo usando técnicas de histologia, quanto a sua viabilidade e diferenciação celular seria indicada para uma melhor caracterização da região necrótica dos mesmos.

Os ensaios de viabilidade celular mostraram desafios na adaptação de métodos tradicionais, como o uso do Azul de Tripiano, que não se mostrou adequado para avaliar a viabilidade dos esferoides devido à necessidade de dissociação celular, a qual pelo protocolo de dissociação já pode comprometer a viabilidade celular. A quantificação de LDH também apresentou inconsistências, evidenciando a necessidade de otimizações metodológicas para essa análise em culturas 3D.

Dessa forma, os resultados obtidos reforçam a importância de métodos *scaffold-free* para o cultivo tridimensional de células HepG-2 e a viabilidade da agarose como um substrato eficiente e econômico para essa finalidade. O estudo contribui para o avanço na modelagem de sistemas *in vitro* mais representativos do microambiente tumoral, oferecendo uma plataforma promissora para ensaios de fármacos e testes toxicológicos.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AVELAR-FREITAS, B. A. et al. Trypan blue exclusion assay by flow cytometry. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 47, n. 4, p. 307–315, 2014.

BANERJEE, D. et al. **Strategies for 3D Bioprinting of Spheroids: A Comprehensive Review**. Pennsylvania: Elsevier, 2022. v. 291

BIAŁKOWSKA, K. et al. Spheroids as a type of three-dimensional cell cultures—examples of methods of preparation and the most important application. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 17, p. 1–17, 1 set. 2020.

CHEDID, M. F. et al. HEPATOCELLULAR CARCINOMA: DIAGNOSIS AND OPERATIVE MANAGEMENT. **Arquivos brasileiros de cirurgia digestiva : ABCD = Brazilian archives of digestive surgery**, v. 30, n. 4, p. 272–278, 16 ago. 2017.

CHEN, C. et al. Tumor microenvironment-mediated immune evasion in hepatocellular carcinoma. **Frontiers in Immunology**, v. 14, 10 fev. 2023.

CHUNG, D. M.; KIM, J. H.; KIM, J. K. Evaluation of MTT and Trypan blue assays for radiation-induced cell viability test in HepG2 cells. **International Journal of Radiation Research**, v. 13, n. 4, p. 331–335, 1 out. 2015.

COSTA, E. C. et al. 3D tumor spheroids: an overview on the tools and techniques used for their analysis. Em: **Biotechnology Advances**. [s.l.] Elsevier Inc., 2016. v. 34p. 1427–1441.

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, 19 out. 2017.

COURTNAY, R. et al. Cancer metabolism and the Warburg effect: the role of HIF-1 and PI3K. **Molecular biology reports**, v. 42, n. 4, p. 841–851, 1 abr. 2015.

COX, M. C. et al. Application of LDH assay for therapeutic efficacy evaluation of ex vivo tumor models. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, 1 dez. 2021.

DE DIOS-FIGUEROA, G. T. et al. 3d cell culture models in covid-19 times: A review of 3d technologies to understand and accelerate therapeutic drug discovery. **Biomedicines**, v. 9, n. 6, 1 jun. 2021.

DONATO, M. T.; TOLOSA, L.; GÓMEZ-LECHÓN, M. J. Culture and functional characterization of human hepatoma HepG2 cells. Em: **Protocols in In Vitro Hepatocyte Research**. [s.l.] Springer New York, 2015. p. 77–93.

EGGERT, T.; GRETEN, T. F. Tumor regulation of the tissue environment in the liver. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 173, p. 47–57, 1 maio 2017.

FENG, H. et al. Tumor Microenvironment in Hepatocellular Carcinoma: Key Players for Immunotherapy. **Journal of Hepatocellular Carcinoma**, v. Volume 9, p. 1109–1125, out. 2022.

FITZGERALD, A. A.; LI, E.; WEINER, L. M. 3D culture systems for exploring cancer immunology. **Cancers**, v. 13, n. 1, p. 1–19, 1 jan. 2021.

FRIEDRICH, J. et al. Spheroid-based drug screen: Considerations and practical approach. **Nature Protocols**, v. 4, n. 3, p. 309–324, 2009.

FU, J.; WANG, H. **Precision diagnosis and treatment of liver cancer in China**. [s.l.] Elsevier Ireland Ltd, 2018. v. 412

GALEANO, A. K.; CAMPUZANO-BUBLITZ, M. A.; KENNEDY, M. L. Modelos in vitro utilizados para predecir hepatotoxicidad de medicamentos en la fase pre-clínica. 20 out. 2021.

GOERS, L.; FREEMONT, P.; POLIZZI, K. M. Co-culture systems and technologies: Taking synthetic biology to the next level. **Journal of the Royal Society Interface**, v. 11, n. 96, 22 abr. 2014.

GOMES, M. A. et al. Hepatocellular carcinoma: Epidemiology, biology, diagnosis, and therapies. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 59, n. 5, p. 514–524, 2013.

GUIZHEN, Z. et al. The tumor microenvironment of hepatocellular carcinoma and its targeting strategy by CAR-T cell immunotherapy. **Frontiers in Endocrinology**, v. 13, 25 ago. 2022.

GUNTI, S. et al. Organoid and spheroid tumor models: Techniques and applications. **Cancers**, v. 13, n. 4, p. 1–18, 2 fev. 2021.

HAN, S. J.; KWON, S.; KIM, K. S. Challenges of applying multicellular tumor spheroids in preclinical phase. **Cancer Cell International**, v. 21, n. 1, 1 dez. 2021.

HERNANDEZ-GEA, V.; FRIEDMAN, S. L. Pathogenesis of liver fibrosis. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, v. 6, p. 425–456, 28 fev. 2011.

JIANG, F. et al. Extraction, Modification and Biomedical Application of Agarose Hydrogels: A Review. **Marine Drugs**, v. 21, n. 5, 1 maio 2023.

KAJA, S. et al. Quantification of lactate dehydrogenase for cell viability testing using cell lines and primary cultured astrocytes. **Current Protocols in Toxicology**, v. 2017, p. 1–10, 1 maio 2017.

KOONTONGKAEW, S. The tumor microenvironment contribution to development, growth, invasion and metastasis of head and neck squamous cell carcinomas. **Journal of Cancer**, v. 4, n. 1, p. 66–83, 2013.

KUO, C. TE et al. Three-dimensional spheroid culture targeting versatile tissue bioassays using a PDMS-based hanging drop array. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, 1 dez. 2017.

LEMOS, 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, 2 out. 2019.

LOMBARDO, D. et al. Frequency of somatic mutations in TERT promoter, TP53 and CTNNB1 genes in patients with hepatocellular carcinoma from Southern Italy. **Oncology Letters**, v. 19, n. 3, p. 2368–2374, 2020.

MEHANNA, S. H. et al. artigo-1604-revista-medica-do-parana-79-edicao-01-2021_1689601359. **Revista Médica Paraná**, v. 79, n. 1, p. 106–111, 2021.

MITRA, V.; METCALF, J. Metabolic functions of the liver. **Anaesthesia and Intensive Care Medicine**, v. 13, n. 2, p. 54–55, 1 fev. 2012.

MOSHKAYAN, K. et al. **Spheroids-on-a-chip: Recent advances and design considerations in microfluidic platforms for spheroid formation and culture**. [s.l.: s.n.].

SANT, S. et al. TECHNOLOGIES DRUG DISCOVERY The production of 3D tumor spheroids for cancer drug discovery. 2017.

SHEN, H. et al. Recent advances in three-dimensional multicellular spheroid culture and future development. **Micromachines**, v. 12, n. 1, p. 1–21, 1 jan. 2021.

ŠTAMPAR, M. et al. Characterization of In Vitro 3D Cell Model Developed from Human Hepatocellular Carcinoma (HepG2) Cell Line. **Cells**, v. 9, n. 12, 28 nov. 2020.

STUBBS, M.; GRIFFITHS, J. R. The altered metabolism of tumors: HIF-1 and its role in the Warburg effect. **Advances in Enzyme Regulation**, v. 50, n. 1, p. 44–55, 2010.

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, 1 abr. 2018.

VINCI, M.; BOX, C.; ECCLES, S. A. Three-dimensional (3D) tumor spheroid invasion assay. **Journal of Visualized Experiments**, v. 2015, n. 99, 1 maio 2015.

VOLPONI, C.; GAZZILLO, A.; BONAVIDA, E. The Tumor Microenvironment of Hepatocellular Carcinoma: Untying an Intricate Immunological Network. **Cancers**, v. 14, n. 24, 1 dez. 2022.

WALLACE, K.; BURT, A. D.; WRIGHT, M. C. Liver fibrosis. **Biochemical Journal**, v. 411, n. 1, p. 1–18, 1 abr. 2008.

WANG, H. et al. Editorial: The role of tumor microenvironment in the development, treatment and prognosis of hepatocellular carcinoma. **Frontiers in Pharmacology**, v. 14, 2023.

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.

YIN, Y. et al. Immunosuppressive tumor microenvironment in the progression, metastasis, and therapy of hepatocellular carcinoma: from bench to bedside. **Experimental Hematology and Oncology**, 1 dez. 2024.

YOU, Z. et al. Mechanical microenvironment as a key cellular regulator in the liver. **Acta Mechanica Sinica/Lixue Xuebao**, v. 35, n. 2, p. 289–298, 3 abr. 2019.

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, 11 jan. 2016.