

Universidade do Grande Rio “Prof. José de Souza Herdy”

UNIGRANRIO

TAINÁ DE QUEIROZ FERREIRA PIRES

**Padronização de modelos de cultura híbrida 3D para prospecção de terapias
epigenéticas em Glioblastoma**

Rio de Janeiro

2025

Universidade do Grande Rio “Prof. José de Souza Herdy”

UNIGRANRIO

TAINÁ DE QUEIROZ FERREIRA PIRES

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Universidade do Grande Rio “Prof. José de Souza Herdy”, como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel em Biomedicina.

Orientadora: Katia Carneiro de Paula, PhD

Rio de Janeiro

2025

TAINÁ DE QUEIROZ FERREIRA PIRES


Padronização de modelos de cultura híbrida 3D para prospecção de terapias epigenéticas em Glioblastoma

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Universidade do Grande Rio “Prof. José de Souza Herdy”, como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel em Biomedicina.


Orientadora: Katia Carneiro de Paula, PhD

**Aprovada em:
Barra da Tijuca, 27 de junho de 2025.**


BANCA EXAMINADORA

Documento assinado digitalmente
 **KATIA CARNEIRO DE PAULA**
Data: 30/06/2025 15:39:12-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Katia Carneiro de Paula (orientadora)

Documento assinado digitalmente
 **DANIEL ESCORSIM MACHADO**
Data: 30/06/2025 16:16:49-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Daniel Escorsim Machado

Documento assinado digitalmente
 **CAROLINA BATISTA**
Data: 27/06/2025 15:08:16-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Carolina Batista

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Principais Componentes do Microambiente e Matriz Extra-celular de GBM.....	10
Figura 2 - Vasculatura Aberrante Característica de GBM.....	11
Figura 3 - Esferoides híbridos HBMEC e U-87 MG com modelo 3D.....	16
Figura 4 - Esferoides híbridos HBMEC e U87-MG.....	17
Figura 5 - Comparação dos Parâmetros Morfométricos dos Esferoides em Diferentes Condições.....	17
Figura 6 - Ensaio de Viabilidade Celular dos Esferoides.....	19
Figura 7 - Imagem dos Esferoides por Microscopia Confocal.....	20
Figura 8 —Microscopia Confocal.....	20

SUMÁRIO

1. Introdução.	9
2. Objetivo.	12
2.2. Objetivos Específicos.....	13
3. Materiais e Métodos.	13
3.1. Cultura celular e montagem de esferoides híbridos	13
3.2. Morfometria dos esferoides.....	14
3.3. Ensaio de Viabilidade celular	14
3.4. Microscopia de fluorescência.....	15
3.5. Análises estatísticas.	15
4. Resultados e Discussão.	15
5. Conclusão.	21
6. Perspectivas Futuras.	21
7. Bibliografia.	22

Padronização de modelos de cultura híbrida 3D para prospecção de terapias epigenéticas em Glioblastoma

Tainá de Queiroz Ferreira Pires

Katia Carneiro de Paula

RESUMO

Atualmente, o Glioblastoma (GBM) compreende o tipo de tumor cerebral primário mais prevalente e agressivo em adultos, sendo altamente invasivo e incurável. Apesar do tratamento-padrão atual, que consiste na ressecção cirúrgica da massa tumoral, seguida de radioterapia e quimioterapia, a sobrevida média do paciente com acompanhamento médico permanece em torno de apenas 15 meses após receber o diagnóstico. O prognóstico desfavorável associado a essa neoplasia se dá primordialmente pela heterogeneidade característica de GBM, que dificulta a identificação de abordagens terapêuticas efetivas. Atualmente, os modelos clássicos de estudo de células 2D apresentam diversas limitações em reproduzir as características-chave de GBM, como gradientes de hipóxia e heterogeneidade intra-tumoral. Por isso, modelos de cultura 3D como esferoides e organoides cerebrais vêm emergindo como formas de estudo *in vitro* mais representativos para as terapias em GBM. No presente trabalho, associamos duas linhagens celulares, *Human Brain Microvascular Endothelial Cell* (HBMEC) e U-87 MG (GBM), em cultura celular 3D para desenvolver esferoides híbridos que poderão ser utilizados para avaliar de forma mais fidedigna os efeitos de terapias epigenéticas sobre as diferentes linhagens. Assim, estabelecemos um protocolo-padrão para obtenção de esferoides ideais para uso em ensaios farmacológicos de diferentes abordagens, visando possíveis translações para a clínica.

Palavras-chave: Glioblastoma, Microambiente, Cultura de células 3D

ABSTRACT

Currently, glioblastoma (GBM) constitutes the most prevalent and aggressive primary brain tumor in adults, due to its high invasiveness and incurability. Despite the current standard therapy, which comprises surgical resection of the tumor mass followed by radiotherapy and chemotherapy, the average survival of patients under medical care remains approximately 15 months after diagnosis. The poor prognosis associated with this neoplasm is primarily due to its pronounced heterogeneity, which impairs the identification of effective therapeutic approaches. Currently, classical 2D *in vitro* models present several limitations in accurately recapitulating key GBM characteristics, such as hypoxic gradients and intratumoral heterogeneity. For this reason, 3D culture models such as spheroids and brain organoids have emerged as more representative *in vitro* systems for studying GBM therapies. In the present study, we combined two cell lines, Human Brain Microvascular Endothelial Cells (HBMEC) and U-87 MG (GBM), in 3D cell culture to develop hybrid spheroids that can be used to more reliably evaluate the effects of epigenetic therapies on both cell lines. Hence, we established a standardized protocol for obtaining spheroids suitable for pharmacological assays involving various approaches, seeking potential clinical translations.

Keywords: Glioblastoma, Tumor microenvironment, 3D cell culture

1. Introdução

Dentre os diversos tipos de neoplasias malignas, os tumores que acometem o Sistema Nervoso Central representam de 1,4 a 1,8% de todos os casos, com 88% dos tumores ocorrendo no cérebro (INCA, 2022). Atualmente, o Glioblastoma (GBM) compreende o tipo de tumor cerebral primário mais comum e agressivo em adultos, sendo altamente invasivo e incurável (White *et al.*, 2024). Devido à falta de sintomas iniciais e fatores de risco conhecidos, o diagnóstico de GBM precede um curto prognóstico, no qual menos de 6% dos pacientes atinge 5 anos de sobrevida (Luo *et al.*, 2021). Os sintomas característicos, como dores de cabeça, convulsões, perda de memória e movimento, comprometimento cognitivo e disfunção da linguagem são tardios e genéricos, aparecendo quando o paciente já se encontra em estágios avançados, dificultando o tratamento (Le Rhun *et al.*, 2019).

O padrão de terapia atual compreende a ressecção cirúrgica da massa tumoral seguida de radioterapia associada à quimioterapia com Temozolomida (TMZ). No entanto, a sobrevida média do paciente com acompanhamento médico permanece de apenas 15 meses após receber o diagnóstico (Lowe, Bhat, Olar, 2019), somada à alta taxa de recidiva, na qual os tumores frequentemente reaparecem com um fenótipo mais agressivo e invasivo (Gupta *et al.*, 2018).

O GBM é um tumor intra-parenquimatoso classificado como um glioma astrocítico difuso com IDH selvagem. É um glioma de grau IV, o grau mais alto na classificação de neoplasias malignas segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) (Wirsching, Galanis, Weller, 2016; Louis *et al.*, 2021). Seu perfil genômico apresenta comumente mutação do promotor *TERT* (*telomerase reverse transcriptase*) e/ou amplificação do gene *EGFR* (*epidermal growth factor receptor*), associando-o a uma elevada taxa de necrose, imortalidade celular e a microproliferação vascular característica de GBM (Louis *et al.*, 2021). Acredita-se atualmente que a insuficiência terapêutica decorre da resistência à radioterapia e quimioterapia pelas células tumorais, em função da forte heterogeneidade do microambiente em que se encontram (Weth *et al.*, 2022).

As células inseridas no microambiente tumoral de GBM são dotadas de alta plasticidade, transitam entre fenótipos e genótipos e são capazes de reorganizar o microambiente, coexistindo

de forma dinâmica e complexa (Hoogstrate *et al.*, 2023). Esta oncosfera é composta por células de diferentes subpopulações, como células da interface imunológica, vascular, micróglia, neurônios e elementos da matriz extra-celular (MEC) (Erices *et al.*, 2023; Sisakht *et al.*, 2022), além da participação de células com alto potencial de diferenciação e auto-renovação como as células-tronco, chamadas de GBM *stem-like cells* (GSCs) (Galli *et al.*, 2004).

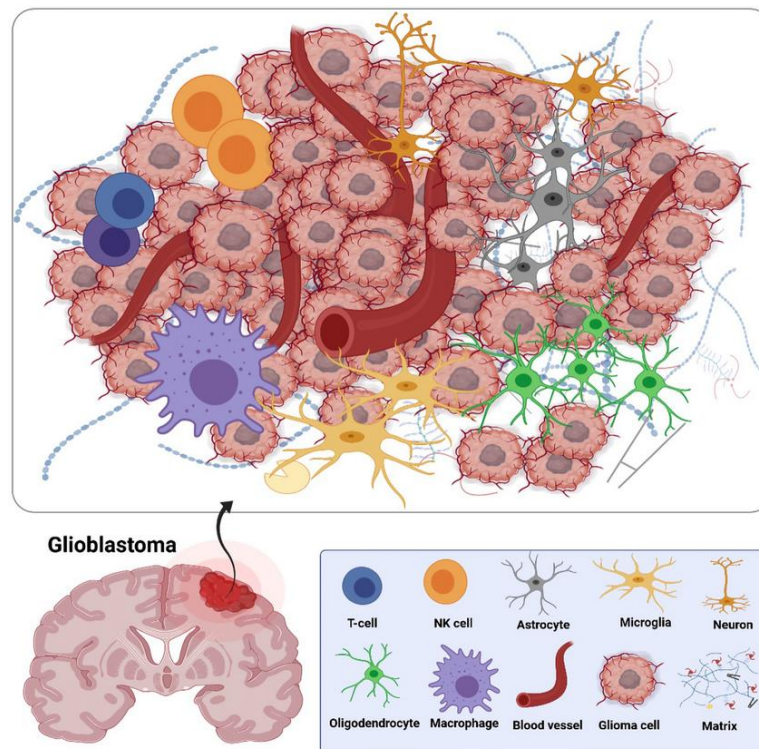


Figura 1. Principais Componentes do Microambiente e Matriz Extracelular de GBM. A comunicação dinâmica entre os diferentes tipos celulares que compõe o tumor incluindo macrófagos, micróglia, células T, astrócitos e oligodendrócitos torna a oncosfera complexa e aumenta sua resistência ao tratamento e dificulta sua caracterização. Fonte: Sisakht *et al.*, 2022.

As células-tronco estão no topo das hierarquias celulares sendo consideradas células raras e quiescentes (Barker *et al.*, 2010). Por serem multipotentes, as células-tronco dão origem a diferentes tipos celulares, agravando no contexto de GBM, a heterogeneidade do microambiente. A ampla diversidade de perfis celulares que compõe oncosfera torna o meio desordenado, dotado tanto zonas hipóxicas quanto zonas proliferativas e infiltrativas, cujas células apresentam perfis transcricionais variáveis e características totalmente distintas entre si (De Vleeschouwer, Bergers, 2017; Lathia *et al.*, 2015).

Ainda, agregam-se à oncosfera células endoteliais (ECs) que, juntamente com os astrócitos, compõe a barreira hemato-encefálica, responsável pela regulação da homeostase do SNC (Vanlandewickck *et al.*, 2018). Sendo o principal componente da barreira, as ECs cerebrais

se dispõem de forma estreita e unida, formando complexos contínuos ricos em junções aderentes e proteínas de contato EC-EC, fornecendo uma barreira estreita e seletiva (Daneman, Prat, 2015). Em concordância com a heterogeneidade descrita, foi constatado que no contexto do GBM, estas células passam a ter fenótipos e perfis transcricionais distintos, sofrendo influência direta dos fatores oncogênicos exercidos pelas células tumorais, como a alta expressão de *PLVAP* (*Plasmalemma Vesicle-Associated Protein*) por algumas células, uma proteína de membrana marcadora da permeabilidade dos vasos sanguíneos e de interrupção da barreira hemato-encefálica associada ao vazamento vascular (Xie *et al.*, 2021).

Somado a isso, o fluxo sanguíneo alterado pelo aumento da pressão intersticial altera também o recrutamento de células do sistema imune adaptativo e inato, como monócitos supressores e linfócitos T para os sítios tumorais (Fecci *et al.*, 2006; Desland, Hormigo, 2020), corroborando com o estado inflamatório que influencia vários aspectos do crescimento e progressão tumoral e afeta substancialmente o microambiente (Yeo *et al.*, 2022). Todos esses aspectos conferem ao GBM sua alta agressividade e infiltração de tecidos saudáveis no cérebro, além de dificultar a caracterização e compreensão total do microambiente e, conseqüentemente, a identificação de abordagens terapêuticas efetivas (Lee *et al.*, 2018).

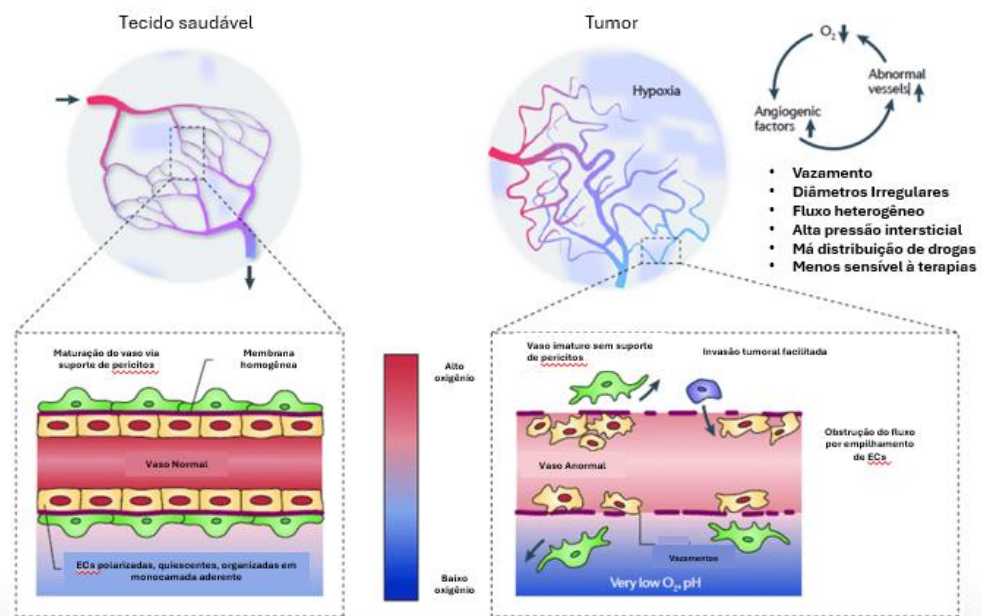


Figura 2. Vasculatura Aberrante Característica de GBM. Os fatores oncogênicos geram vasos frágeis e permeáveis que agravam o estado inflamatório por extravasamento de plasma, disfunção de aporte de oxigênio, recrutamento de células imunes entre outros. Fonte: Jia, Tao, 2016.

O modelo de estudo por esferoides foi introduzido pela primeira vez por Robert Sutherland no início da década de 1970 (Sutherland *et al.*, 1971). Desde então, diferentes tipos de esferoides e métodos para gerá-los vêm sendo desenvolvidos. Estes modelos se formam pela agregação espontânea de células plaqueadas, dada pelo contato inicial célula-célula que estimula expressão de E-caderina nas junções celulares, o que dá ao esferoide uma estrutura compacta com fortes interações intercelulares (Lin *et al.*, 2006). Por esta razão, são capazes de mimetizar propriedades de tumores sólidos, como a organização em multicamadas, que possui uma camada externa de células proliferativas, uma camada intermediária de células quiescentes e uma camada interna de células hipóxicas e necróticas, além de apresentar gradientes metabólicos quando cultivados em tamanhos maiores que 500 μ m (Nunes *et al.*, 2019; Gunti *et al.*, 2021).

Desta forma, o uso de esferoides torna-se efetivo para reproduzir algumas das barreiras físicas que os agentes terapêuticos encontram quando administrados *in vivo* que não são reproduzidas por culturas típicas 2D, como gradientes de hipoxia e difusão impedida. Estas características recapitulam a resistência tumoral à radiação e a medicamentos observadas em neoplasias malignas em humanos, tornando esferoides tumorais amplamente utilizados em estudos clínicos (Melissaridou *et al.*, 2019) dado que representam de forma mais fidedigna a oncoesfera e melhor se aproximam de resultados *in vivo* (Weth *et al.*, 2022). Portanto, visando possíveis translações para a clínica e tendo em vista a forte associação entre células endoteliais e células tumorais em GBM, desenvolvemos um protocolo para padronizar uma cultura 3D híbrida para obtenção de esferoides constituídos de duas linhagens celulares relevantes no contexto de GBM — *Human Brain Microvascular Endothelial Cells* (HBMEC) e U-87 MG, para utilização em posteriores ensaios farmacológicos realizados por nosso grupo, voltados para avaliação de abordagens terapêuticas epigenéticas.

2. Objetivo Geral

Estabelecer um protocolo de padronização das condições ideais para obtenção de esferoides híbridos U-87 MG e HBMEC para uso em posteriores ensaios farmacológicos de nosso grupo.

2.1. Objetivos específicos

- Gerar esferoides híbridos contendo células de GBM da linhagem U-87 MG e células endoteliais da linhagem HBMEC;
- Gerar esferoides em diferentes densidades celulares iniciais e diferentes proporções HBMEC : U-87 MG
- Avaliar a viabilidade celular das diferentes condições produzidas ao final de 72h
- Analisar os parâmetros morfométricos de cada condição produzida ao final de 72h
- Comparar a morfologia dos esferoides produzidos em diferentes condições utilizando microscopia confocal de fluorescência

3. Materiais e Métodos

3.1. Cultura celular e montagem de esferoides híbridos

Para este modelo, utilizamos células da linhagem *Human Brain Microvascular Endothelial Cells* (HBMEC) e células de linhagem de Glioblastoma U-87 MG obtidas a partir do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ). As células foram cultivadas em meio de cultura DMEM F-12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium) e DMEM Low Glucose, respectivamente, suplementados com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB), 0.1% de solução de penicilina e estreptomicina e 1% de L-Glutamina. As células permaneceram plaqueadas em frascos de cultura de 25 cm² em estufa a 37°C com 5% de CO₂ até atingirem a confluência de 90%. Cada garrafa recebeu então 2ml de tripsina 0.25% para dissociação celular, e após observar a dissociação total das células da garrafa, foi adicionado 5ml de meio de cultura suplementado com SFB correspondente à linhagem celular, para inativação da tripsina. Todo o conteúdo foi então centrifugado a 1.600rpm por 7 minutos e o sobrenadante foi então descartado. As células foram ressuspensas em PBS (Cl₂H₃K₂Na₃O₈P₂) 1X para contagem em câmara de Neubauer.

Optamos por produzir esferoides nas seguintes densidades: 10^3 , 3×10^3 , $6,25 \times 10^3$ e $12,5 \times 10^3$ células totais. Essas densidades foram padronizadas com as seguintes proporções: 1:3 (GBM:HBMEC), 1:5 (GBM:HBMEC) e 1:7 (GBM:HBMEC).

A cultura dos esferoides foi feita por suspensão em placas estéreis de 96 poços, previamente tratadas com 50 μ L de gel de agarose 1% por poço. Em cada poço foram adicionados 150 μ L de meio DMEM F-12 suplementado como descrito anteriormente. Diferentes quantidades de células de cada linhagem foram plaqueadas em cada poço para obtenção das diferentes proporções e densidades indicadas, de modo que houvesse um esferoide por poço. Todas as condições foram repetidas em três diferentes placas para colheita e análise dos esferoides após 24, 48 ou 72h. As placas foram mantidas em estufa a 37°C com 5% de CO₂. Todas as condições foram elaboradas em duplicatas, exceto pelos esferoides destinados à microscopia de fluorescência, elaborados em quintuplicada.

3.2. Morfometria dos esferoides

Após os períodos de 24, 48 e 72h, cada poço contendo os esferoides foi fotografado através do microscópio óptico utilizando lentes *Wireless* EP50 (OLYMPUS). Através do *software* AnaSP (MATLAB - F. Piccinini, 2015), as fotografias obtidas foram submetidas a análises morfométricas de parâmetros como diâmetro, volume, área, circularidade e convexidade dos esferoides. Para essa análise, consideramos diâmetro e área como parâmetros relevantes e processamos os dados obtidos com o *software* Graphpad Prism. Utilizamos o *software* ReviSP (MATLAB - F. Piccinini, *et al.*, 2016), para obtenção de representações 3D de cada esferoide, produzidas também a partir das imagens do microscópio óptico.

3.3. Ensaio de viabilidade celular

Após os períodos de 24, 48 e 72h, cada uma das placas contendo os esferoides foi retirada da estufa para avaliação da viabilidade celular nos determinados pontos. O meio de cultura presente em cada poço foi retirado utilizando micropipeta e os poços foram lavados com solução tampão fosfato-salina (PBS 1X) [C₁₂H₃K₂Na₃O₈P₂] três vezes. Em seguida, adicionamos 100 μ L de meio DMEM F-12 livre de suplementação em cada poço, somado de 10% do reagente de Resazurina *In Vitro Toxicology Assay Kit* (Sigma Aldrich – TOX8-1KT).

Após a incubação com o reagente por 2h, foi feita a leitura em espectrofotômetro nos comprimentos de onda de 600-690nm. As leituras foram feitas em duplicatas. O processamento dos dados e análise estatística foram feitos através do *software* Graphpad Prism.

3.4. Microscopia de fluorescência

Para esta etapa, elaboramos esferoides nas densidades de 10^3 e 3×10^3 células iniciais mantendo as três proporções indicadas, após análise dos resultados obtidos pelo ensaio de viabilidade celular. Ao final de cada tempo de incubação, as réplicas de cada condição foram agrupadas em microtubos (Eppendorf) e fixadas com 200 μ l de solução de formaldeído 4% diluído em PBS 1X. Incubamos os esferoides em formaldeído por 15 minutos em temperatura ambiente, e após esse período, realizamos três lavagens com PBS 1X por cinco minutos. Em seguida, adicionamos 100 μ l de solução de Faloidina Alexa Fluor™ 594 (A12381 - ThermoFisher) para marcação dos filamentos de actina presentes no citoesqueleto celular, e DAPI (4',6-Diamidino-2-Phenylindole) (D1306 - ThermoFisher), para marcação do núcleo da célula, na diluição 1:400. Incubamos os esferoides com a solução por 1 hora em temperatura ambiente, protegidos da luz. Os esferoides foram então lavados três vezes com PBS 1X e posicionados cuidadosamente sobre a lâmina para montagem com com ProLong™ Glass Antifade Mountant (P36980 - ThermoFisher). As lâminas foram analisadas em microscópio confocal TCS SP5 (Leica Microsystems).

3.5. Análises estatísticas

Todas as análises estatísticas foram realizadas através do *software* Graphpad Prism, pelo método de análise de variância Two-way ANOVA. Todos os dados foram expressos como média \pm desvio padrão e $P < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

4. Resultados e Discussão

Para determinar a condição ideal de esferoides híbridos a serem utilizados em posteriores ensaios, produzimos esferoides em diferentes proporções de linhagens e quantidades iniciais de células HBMEC e U-87 MG. Esta cultura híbrida 3D foi pensada para

aplicação em culturas organotípicas de parênquima cerebral de roedor, monitoramento em tempo real do comportamento celular por *cell tracking*, entre outros ensaios, que permitirão estudar os efeitos de terapias epigenéticas farmacológicas sobre o comportamento destas células, que coabitam naturalmente o microambiente tumoral de GBM. Sob esta perspectiva, as análises realizadas no presente trabalho permitiram avaliar como a diferença de proporção entre as linhagens e a densidade de cada esferoide influenciariam os futuros ensaios, dadas suas especificidades.

Inicialmente, observamos que as diferentes proporções não interferiram na conformação estrutural dos esferoides nem nos parâmetros de circularidade, área e diâmetro (Figuras 1 e 2). A caracterização morfométrica indicou que os esferoides de 10^3 células atingiram em média $796\mu\text{m}$ de diâmetro, enquanto esferoides das demais densidades variaram entre $1.030\text{-}1.561\mu\text{m}$ após 72 horas de cultivo. O valor médio das áreas de cada esferoide das quatro diferentes densidades foi de 0.50mm^2 , 1.03mm^2 , 1.42mm^2 e 1.81mm^2 respectivamente após 72 horas de cultivo (Figura 3). A análise estatística foi feita pelo teste Two-Way ANOVA e não apontou diferença significativa entre as diferentes proporções de linhagens, exceto entre os esferoides de 10^3 células totais, onde a proporção 1U87:3HBMEC apresentou diâmetro significativamente maior que as demais proporções ($p = 0,0178$).

Baseado em experimentos prévios do nosso grupo de pesquisa e demais dados da literatura, determinamos o período de 72h de cultura como o foco das análises, uma vez que é o período padronizado em que os esferoides deverão ser incubados com os fármacos utilizados (Oliveira-Nunes *et al.*, 2021). Assim, visto que a média de diâmetro da menor condição produzida atingiu $796\mu\text{m}$, observamos que todos os esferoides obtiveram tamanhos favoráveis para recapitular características tumorais importantes, como o gradiente metabólico descrito por Nunes *et al.*

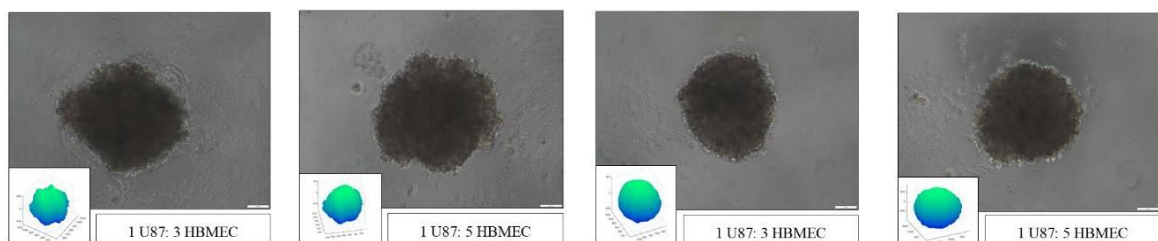


Figura 3 — Esferoides híbridos HBMEC e U-87 MG com modelo 3D. Densidade de 3×10^3 células após 72h. A representação 3D de cada esferoide foi gerada utilizando o *software* ReViSP® a partir de uma fotografia representativa de cada condição. Barra de escala de $200\mu\text{m}$.

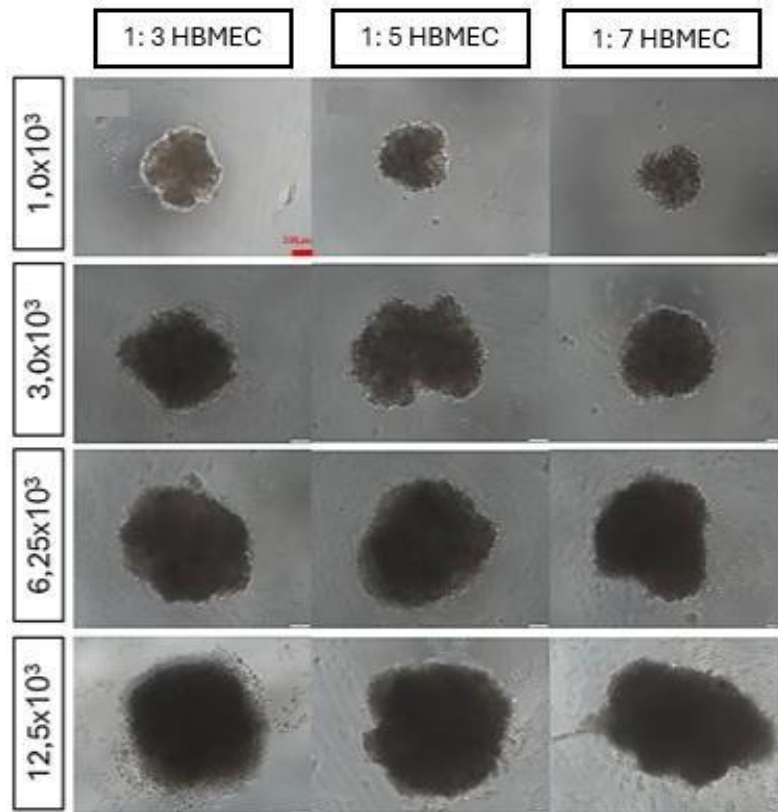


Figura 4 — Esferoides híbridos HBMEC e U87-MG. Fotografados no microscópio óptico após 72h de cultura, os esferoides apresentaram padrões de formato de acordo com o esperado em cultura de células 3D. Barra de escala de 200 μ m.

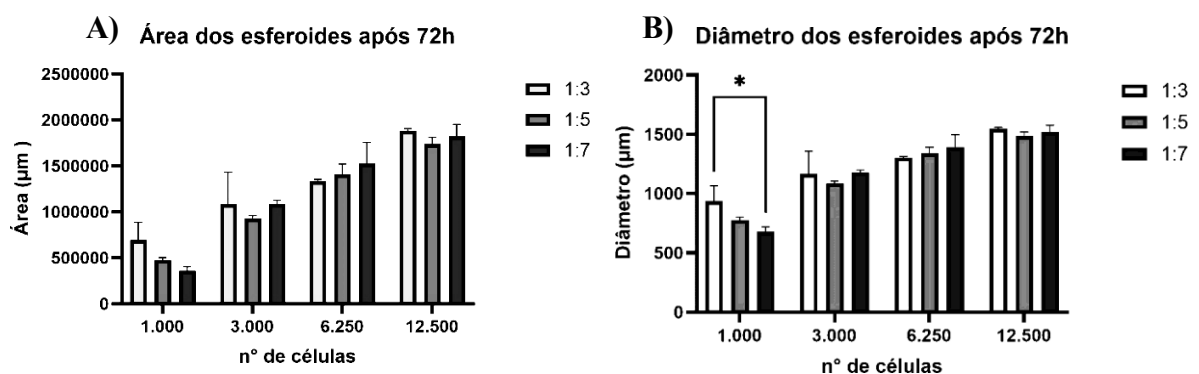


Figura 5 — Comparação dos Parâmetros Morfométricos dos Esferoides em Diferentes Condições. A) Teste two-way ANOVA da área dos esferoides formados após 72 horas de cultura, em diferentes proporções e densidades. As diferenças entre os grupos experimentais não foram significativas. B) Teste two-way ANOVA do diâmetro dos esferoides de diferentes densidades formados após 72 horas de cultura. A diferença de diâmetro entre os grupos experimentais foi significativa apenas entre esferóides de 10^3 células contendo a proporção de 1:3 e 1:7 células U87-MG:HBMEC ($p \leq 0.05$).

Assim, prosseguimos para o ensaio de viabilidade celular nos pontos de 24, 48 e 72h de cultivo. O ensaio de viabilidade celular indicou que os esferoides de 10^3 , 3×10^3 , $6,25 \times 10^3$ e $12,5 \times 10^3$ células apresentaram viabilidade média de 66,95%, 44,9%, 43% e 35% ao final de 72h, respectivamente (Tabela 1, Figura 4). Comparando todos os grupos com os menores esferoides de 10^3 , observamos que os esferoides de 3×10^3 e $6,25 \times 10^3$ apresentaram valores intermediários de viabilidade celular, ainda que consideravelmente menores em relação aos esferoides de 10^3 células, cuja alta taxa de viabilidade está relacionada ao seu pequeno tamanho em relação às demais condições, fenômeno descrito na literatura com estudos de culturas 3D (Glicklis, Merchuk, Cohen, 2004). Os esferoides da densidade de $12,5 \times 10^3$ células não obtiveram uma taxa desejável de viabilidade celular após 72h, sendo esta abaixo de 40%, o que desfavorece a avaliação dos efeitos farmacológicos sobre os esferoides. Dessa forma, ao analisar de forma conjunta os resultados morfométricos e a viabilidade celular, pudemos eliminar o uso de esferoides de $12,5 \times 10^3$ células, bem como esferoides $6,25 \times 10^3$ células dada sua baixa taxa de viabilidade após 72hrs de cultivo, prejudicando assim os resultados de ensaios posteriores que demandariam 72h de incubação com fármacos. Não houve diferença significativa estatisticamente entre as três diferentes proporções de linhagens celulares (Figura 6).

Densidade	Viabilidade média
10^3	66,95%
3×10^3	44,9%
$6,25 \times 10^3$	43%
$12,5 \times 10^3$	35%

Tabela 1 – Distribuição dos valores médios da viabilidade celular dos esferoides de diferentes densidades.

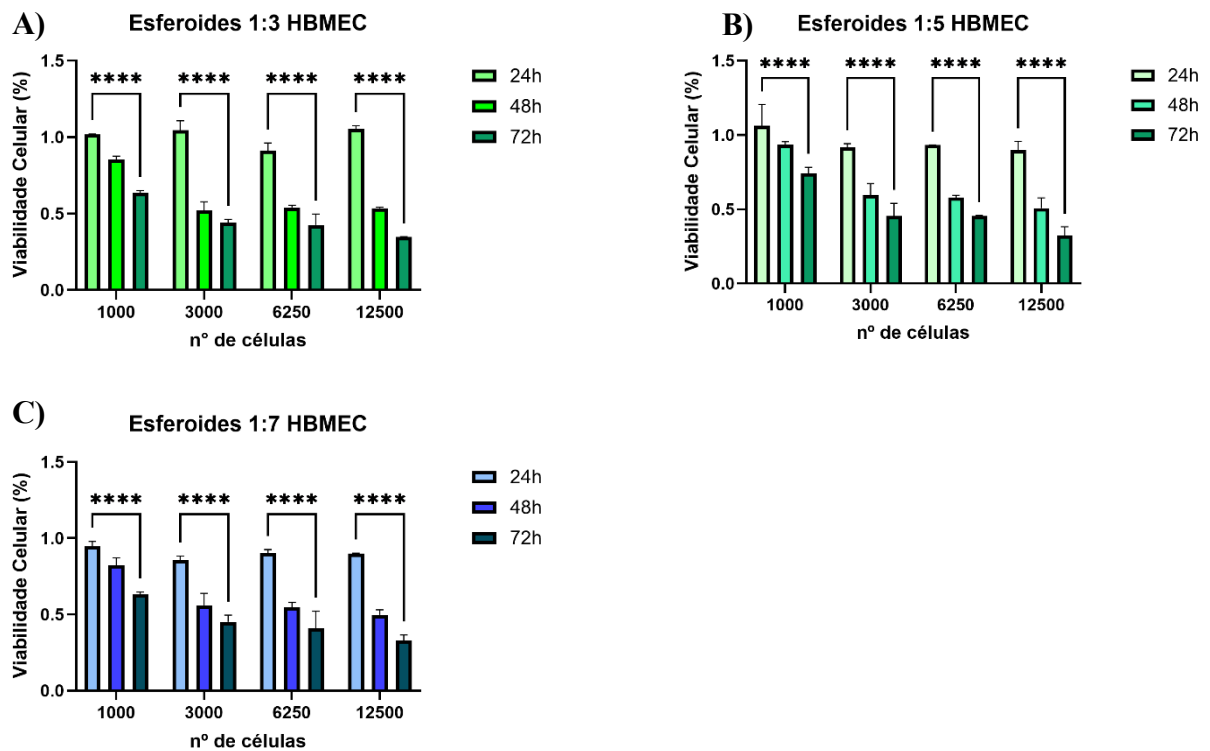


Figura 6 — Ensaio de Viabilidade Celular dos Esferoides. Teste two-way ANOVA da quantificação por espectrofotometria de esferoides de diferentes densidades de partida. A) Viabilidade celular de esferoides na proporção 1:3 (GBM:HBMEC) ao longo de 72h. B) Viabilidade celular de esferoides na proporção 1:5 (GBM:HBMEC) ao longo de 72h. C) Viabilidade celular de esferoides na proporção 1:7 (GBM:HBMEC) ao longo de 72h. **** $p < 0,0001$.

Ademais, demos continuidade ao processo de padronização dos esferoides analisando de forma qualitativa sua morfologia, através da microscopia confocal. Esta análise nos permitiu validar a circularidade característica de esferoides em cultura 3D, bem como homogeneidade no padrão morfológico dos esferoides (Figura 5). Também avaliamos a possível presença de centros necróticos, combinando os canais de fluorescência de ambos os marcadores utilizados em um *merge*. Segundo diversos estudos publicados, o crescimento dos esferoides estabelece um gradiente de oxigênio, explicado pelo aumento na demanda de oxigênio pelas células proliferativas na região externa que leva à hipóxia e morte celular na região central (Grimes, Kelly, Bloch & Partridge, 2014; W. Mueller-Klieser, 1984; W. F. Mueller-Klieser & Sutherland, 1982). Embora novos ensaios devam ser realizados para aferir precisamente esta característica nos esferoides produzidos, as imagens obtidas apontaram uma branda ausência de fluorescência na região central do esferoide em relação à periferia, sugerindo a presença moderada/leve de centros necróticos (Figura 6).

Não observamos variações substanciais na morfologia dos esferoides de diferentes condições, de modo que todas as densidades e proporções apresentaram formato e circularidade semelhantes.

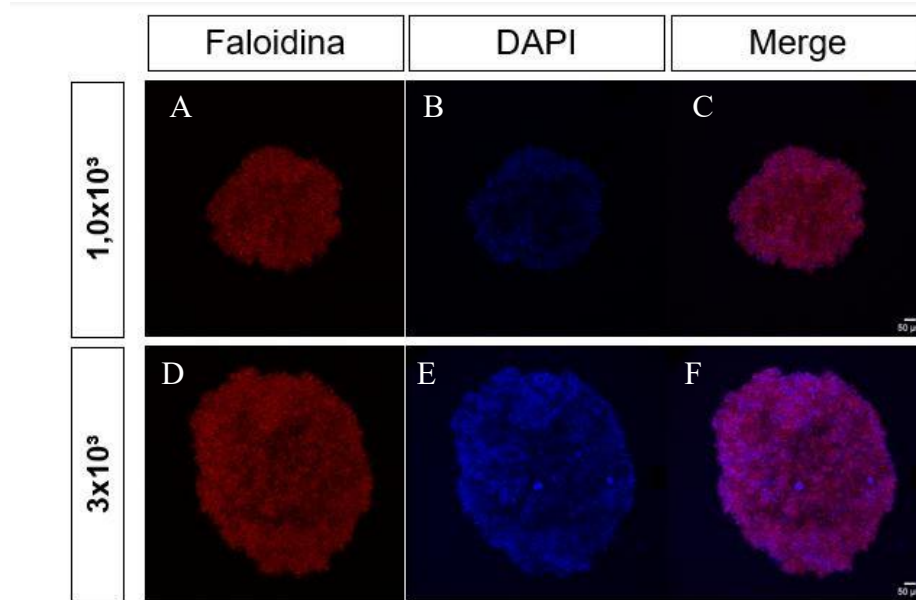


Figura 7 — Imagem dos Esferoides por Microscopia Confocal. Morfologia dos esferoides após 72h de cultura, vistas através de dois diferentes canais: Faloidina (A, D) e DAPI (B, E), e fusão de ambos esses canais (*Merge* – C, F). O processamento das imagens foi feito através do *software* ImageJ. Barra de escala de 50µm.

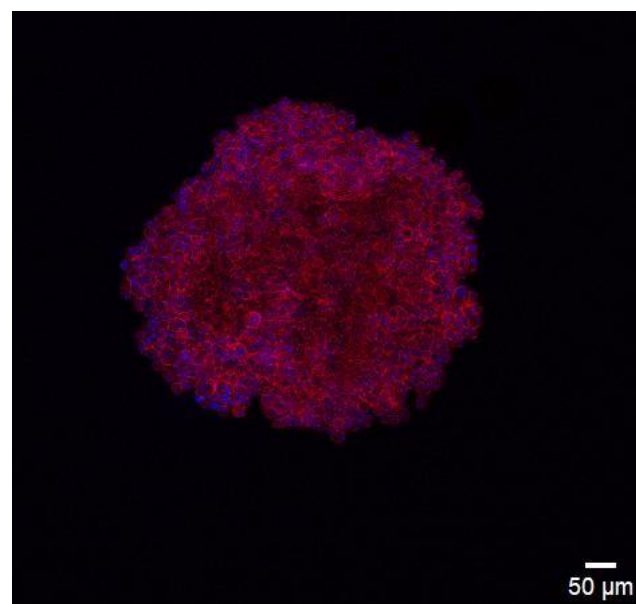


Figura 8 — Microscopia Confocal. Esferoide de 10³ após 72h de cultivo apresentando ausência de fluorescência na região central. O processamento das imagens foi feito através do *software* ImageJ. Barra de escala de 50µm.

5. Conclusão

A dificuldade em caracterizar o microambiente altamente heterogêneo de GBM já é bem estabelecida pela literatura, bem como sua intrínseca relação com a resistência terapêutica e prognóstico do paciente. Com o desenvolvimento de novos modelos de estudo tornando-se padrão para ensaios experimentais no contexto de GBM, a elaboração de esferoides híbridos mostrou-se bem-sucedida e útil para aplicação em ensaios que avaliem os efeitos farmacológicos sobre as linhagens celulares utilizadas. A partir dos resultados obtidos, os esferoides de 10^3 e 3×10^3 células mostraram-se adequados para aplicação em ensaios posteriores dada sua taxa de viabilidade celular ao final de 72h, independentemente da proporção de células entre linhagens. No entanto, esferoides de 10^3 células não atingiram diâmetros que permitissem uma manipulação adequada para os ensaios posteriores, o que dificultaria as etapas seguintes devido a seu pequeno tamanho. Assim, concluímos que esferoides na densidade de 3×10^3 células com as serão utilizados para experimentos *in vitro* posteriores, mantendo o desenvolvimento de esferoides nas três diferentes proporções pensadas, uma vez e a proporção de células U-87 MG para HBMEC não apresentou impacto significativo para a morfologia ou viabilidade dos esferoides. O presente trabalho permitiu, então, validar e padronizar o desenvolvimento de esferoides híbridos aplicáveis em perspectivas futuras, reproduzindo as características tumorais importantes para avaliar as respostas terapêuticas em GBM de forma mais fidedigna.

6. Perspectivas Futuras

Como descrito anteriormente, visamos com os esferoides apresentados neste trabalho a avaliação dos efeitos de terapias epigenéticas sobre ambas as linhagens celulares U-87 MG e HBMEC. Tendo em vista a crescente elucidação do papel do processo de O-GlcNAcilação na progressão tumoral de diversos cânceres, assim como a modificação das histonas pós-traducionalmente pelo processo de O-GlcNAcilação, temos como objetivo avaliar os efeitos da enzima O-GlcNAcase, responsável por depurar esta via metabólica, sobre o microambiente de GBM. Para isso, utilizaremos o fármaco Thiamet-G (TMG) para tratar as células tumorais U-87 MG por 72h. O secretoma das células tratadas será coletado e exposto aos esferoides híbridos e células HBMEC, a fim de avaliar não só os efeitos sobre o padrão de migração coletiva *in vitro* por microscopia *live Imaging* destas células, como também caracterizar a capacidade

angiogênica do tumor com o modelo híbrido 3D de cultivo celular *in vitro* e em culturas organotípicas.

7. Bibliografia

ABRAMOFF, M. D.; MAGALHAES, P. J.; RAM, S. J. Image processing with ImageJ. *Biophotonics International*, Pittsfield, v. 11, n. 7, p. 36–42, 2004.

AHIR, B. K.; ENGELHARD, H. H.; LAKKA, S. S. Tumor development and angiogenesis in adult brain tumor: glioblastoma. *Molecular Neurobiology*, [S. l.], v. 57, n. 5, p. 2461–2478, maio 2020. DOI: 10.1007/s12035-020-01892-8.

BAISH, J. W. *et al.* Scaling rules for diffusive drug delivery in tumor and normal tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, Washington, DC, v. 108, n. 5, p. 1799–1803, 2011. DOI: 10.1073/pnas.1018154108.

BARKER, N.; BARTFELD, S.; CLEVERS, H. Tissue-resident adult stem cell populations of rapidly self-renewing organs. *Cell Stem Cell*, [S. l.], v. 7, n. 6, p. 656–670, 3 dez. 2010. DOI: 10.1016/j.stem.2010.11.016.

BREM, S. The role of vascular proliferation in the growth of brain tumors. *Clinical Neurosurgery*, Baltimore, v. 23, p. 440–453, 1976. DOI: 10.1093/neurosurgery/23.cn_suppl_1.440.

CARMELIET, P.; JAIN, R. K. Principles and mechanisms of vessel normalization for cancer and other angiogenic diseases. *Nature Reviews Drug Discovery*, [S. l.], v. 10, n. 6, p. 417–427, jun. 2011. DOI: 10.1038/nrd3455.

CUDDAPAH, V. A. *et al.* A neurocentric perspective on glioma invasion. *Nature Reviews Neuroscience*, [S. l.], v. 15, p. 455–465, 2014. DOI: 10.1038/nrn3765.

DANEMAN, R.; PRAT, A. The blood-brain barrier. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, New York, v. 7, n. 1, p. a020412, 2015. DOI: 10.1101/cshperspect.a020412.

DAVIS, M. E. Glioblastoma: visão geral da doença e tratamento. *Clinical Journal of Oncology Nursing*, Pittsburgh, v. 20, suplemento 1, p. S2–S8, 2016. DOI: 10.1188/16.CJON.S1.2-8.

DE BOCK, K.; CAUWENBERGHS, S.; CARMELIET, P. Vessel abnormalization: another hallmark of cancer? Molecular mechanisms and therapeutic implications. *Current Opinion in Genetics & Development*, [S. l.], v. 21, n. 1, p. 73–79, 2011. DOI: 10.1016/j.gde.2010.10.008.

DE VLEESCHOUWER, S.; BERGERS, G. Glioblastoma: to target the tumor cell or the microenvironment? In: DE VLEESCHOUWER, S. (Ed.). *Glioblastoma*. Brisbane: Codon Publications, 2017. p. 315–340.

DESLAND, F. A.; HORMIGO, A. The CNS and the brain tumor microenvironment: implications for glioblastoma immunotherapy. *International Journal of Molecular Sciences*, Basel, v. 21, n. 19, p. 7358, 5 out. 2020. DOI: 10.3390/ijms21197358.

ERICES, J. I. *et al.* Glioblastoma microenvironment and invasiveness: new insights and therapeutic targets. *International Journal of Molecular Sciences*, Basel, v. 24, n. 8, p. 7047, 11 abr. 2023. DOI: 10.3390/ijms24087047.

FECCI, P. E. *et al.* Increased regulatory T-cell fraction amidst a diminished CD4 compartment explains cellular immune defects in patients with malignant glioma. *Cancer Research*, Philadelphia, v. 66, n. 6, p. 3294–3302, 15 mar. 2006. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-05-3773.

FOLKINS, C. *et al.* Glioma tumor stem-like cells promote tumor angiogenesis and vasculogenesis via vascular endothelial growth factor and stromal-derived factor 1. *Cancer Research*, Philadelphia, v. 69, n. 18, p. 7243–7251, 2009. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-09-0167.

GALLI, R. *et al.* Isolation and characterization of tumorigenic, stem-like neural precursors from human glioblastoma. *Cancer Research*, Philadelphia, v. 64, n. 19, p. 7011–7021, 1 out. 2004. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-04-1364.

GILKES, D. M.; SEMENZA, G. L.; WIRTZ, D. Hypoxia and the extracellular matrix: drivers of tumour metastasis. *Nature Reviews Cancer*, [S. l.], v. 14, n. 6, p. 430–439, jun. 2014. DOI: 10.1038/nrc3726.

GLEAVE, M. E. *et al.* Epidermal growth factor receptor-mediated autocrine and paracrine stimulation of human transitional cell carcinoma. *Cancer Research*, Philadelphia, v. 53, n. 21, p. 5300–5307, 1993.

GUNTI, S. *et al.* Organoid and spheroid tumor models: techniques and applications. *Cancers (Basel)*, Basel, v. 13, n. 4, p. 874, 19 fev. 2021. DOI: 10.3390/cancers13040874.

GUPTA, K.; BURNS, T. C. Alterações induzidas por radiação no microambiente do glioblastoma recorrente: implicações terapêuticas. *Frontiers in Oncology*, Lausanne, v. 8, p. 503, 2018. DOI: 10.3389/fonc.2018.00503.

HOOGSTRATE, Y. *et al.* Transcriptome analysis reveals tumor microenvironment changes in glioblastoma. *Cancer Cell*, Cambridge, v. 41, n. 4, p. 678–692.e7, 10 abr. 2023. DOI: 10.1016/j.ccell.2023.02.019.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA (INCA). Câncer do Sistema Nervoso Central. [publicação em página on-line] Rio de Janeiro, 04 jun. 2022. Disponível em: <https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/cancer/tipos/sistema-nervoso-central>. Acesso em: 19 mar. 2025.

LAKKA, S. S.; RAO, J. S. Antiangiogenic therapy in brain tumors. *Expert Review of Neurotherapeutics*, London, v. 8, n. 10, p. 1457–1473, 2008. DOI: 10.1586/14737175.8.10.1457.

LATHIA, J. D. *et al.* Cancer stem cells in glioblastoma. *Genes & Development*, Cold Spring Harbor, v. 29, n. 12, p. 1203–1217, 15 jun. 2015. DOI: 10.1101/gad.261982.115.

LECLECH, C. *et al.* Topography-induced large-scale antiparallel collective migration in vascular endothelium. *Nature Communications*, [S. l.], v. 13, n. 1, p. 2797, 19 maio 2022. DOI: 10.1038/s41467-022-30488-0.

LEE, E. *et al.* Comparison of glioblastoma (GBM) molecular classification methods. *Seminars in Cancer Biology*, [S. l.], v. 53, p. 201–211, dez. 2018. DOI: 10.1016/j.semcancer.2018.07.006.

LE RHUN, E. *et al.* Terapia molecular direcionada para glioblastoma. *Cancer Treatment Reviews*, [S. l.], v. 80, p. 101896, 2019. DOI: 10.1016/j.ctrv.2019.101896.

LIN, R. Z. *et al.* Dynamic analysis of hepatoma spheroid formation: roles of E-cadherin and beta1-integrin. *Cell and Tissue Research*, Berlin, v. 324, n. 3, p. 411–422, jun. 2006. DOI: 10.1007/s00441-005-0148-2.

LOUIS, D. N. *et al.* The 2021 WHO Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Neuro-Oncology*, [S. l.], v. 23, n. 8, p. 1231–1251, ago. 2021. DOI: 10.1093/neuonc/noab106.

LOWE, S.; BHAT, K. P.; OLAR, A. Current clinical management of patients with glioblastoma. *Cancer Reports (Hoboken)*, [S. l.], v. 2, n. 6, e1216, dez. 2019. DOI: 10.1002/cnr2.1216.

LUO, C.; SONG, K.; WU, S.; HAMEED, N. U. F.; KUDULAITI, N.; XU, H.; QIN, Z. Y.; WU, J. S. The prognosis of glioblastoma: a large, multifactorial study. *British Journal of Neurosurgery*, v. 35, n. 5, p. 555-561, out. 2021. DOI: 10.1080/02688697.2021.1907306. Epub 8 jul. 2021. PMID: 34236262.

MELISSARIDOU, S. *et al.* The effect of 2D and 3D cell cultures on treatment response, EMT profile and stem cell features in head and neck cancer. *Cancer Cell International*, London, v. 19, p. 16, 14 jan. 2019. DOI: 10.1186/s12935-019-0733-1.

METALLO, C. M.; VANDER HEIDEN, M. G. Metabolism strikes back: metabolic flux regulates cell signaling. *Genes & Development*, Cold Spring Harbor, v. 24, n. 24, p. 2717–2721, 2010.

NUNES, A. S. *et al.* 3D tumor spheroids as in vitro models to mimic in vivo human solid tumors resistance to therapeutic drugs. *Biotechnology and Bioengineering*, New York, v. 116, n. 1, p. 206–226, jan. 2019. DOI: 10.1002/bit.26845.

PAPETTI, M.; HERMAN, I. M. Mechanisms of normal and tumor-derived angiogenesis. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, Bethesda, v. 282, n. 5, p. C947–C970, 2002. DOI: 10.1152/ajpcell.00389.2001.

RIFKIN, D. B.; MOSCATELLI, D. Recent developments in the cell biology of basic fibroblast growth factor. *Journal of Cell Biology*, New York, v. 109, p. 1–6, 1989. DOI: 10.1083/jcb.109.1.1.

SCHAAF, M. B.; GARG, A. D.; AGOSTINIS, P. Defining the role of the tumor vasculature in antitumor immunity and immunotherapy. *Cell Death & Disease*, London, v. 9, n. 2, p. 115, 25 jan. 2018. DOI: 10.1038/s41419-017-0061-0.

SISAKHT, A. K. *et al.* Cellular conversations in glioblastoma progression, diagnosis and treatment. *Cellular and Molecular Neurobiology*, [S. l.], v. 43, n. 2, p. 585–603, mar. 2023. DOI: 10.1007/s10571-022-01212-9.

STACKER, S. A. *et al.* VEGF-D promotes the metastatic spread of tumor cells via the lymphatics. *Nature Medicine*, New York, v. 7, n. 2, p. 186–191, 2001. DOI: 10.1038/84635.

SUTHERLAND, R. M.; MCCREDIE, J. A.; INCH, W. R. Growth of multicell spheroids in tissue culture as a model of nodular carcinomas. *Journal of the National Cancer Institute*, Bethesda, v. 46, n. 1, p. 113–120, jan. 1971. PMID: 5101993.

URBANO, A. M. Otto Warburg: the journey towards the seminal discovery of tumor cell bioenergetic reprogramming. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, v. 1867, n. 1, p. 165965, 2021. DOI: [10.1016/j.bbadis.2020.165965](https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2020.165965).

VANLANDEWIJCK, M. *et al.* A molecular atlas of cell types and zonation in the brain vasculature. *Nature*, London, v. 554, n. 7693, p. 475–480, 22 fev. 2018. DOI: 10.1038/nature25739. Erratum in: *Nature*, London, v. 560, n. 7716, p. E3, ago. 2018. DOI: 10.1038/s41586-018-0232-x.

WETH, F. R. *et al.* Utility of the cerebral organoid glioma 'GLICO' model for screening applications. *Cells*, Basel, v. 12, n. 1, p. 153, 30 dez. 2022. DOI: 10.3390/cells12010153.

WHITE, J.; WHITE, M. P. J.; WICKREMESEKERA, A. et al. The tumour microenvironment, treatment resistance and recurrence in glioblastoma. *Journal of Translational Medicine*, v. 22, p. 540, 2024. DOI: 10.1186/s12967-024-05301-9.

WIRSCHING, H. G.; GALANIS, E.; WELLER, M. Glioblastoma. In: GELDERBLUM, H. (ed.). *Handbook of Clinical Neurology*. [S. l.]: Elsevier, 2016. v. 134, p. 381–397.

XIE, Y. et al. Key molecular alterations in endothelial cells in human glioblastoma uncovered through single-cell RNA sequencing. *JCI Insight*, v. 6, n. 15, e150861, 9 ago. 2021. DOI: 10.1172/jci.insight.150861.

YEO, A. T. et al. Single-cell RNA sequencing reveals evolution of immune landscape during glioblastoma progression. *Nature Immunology*, v. 23, n. 6, p. 971–984, jun. 2022. DOI: 10.1038/s41590-022-01215-0.

ZHOU, W.; WAHL, D. R. Metabolic abnormalities in glioblastoma and metabolic strategies to overcome treatment resistance. *Cancers (Basel)*, v. 11, n. 9, p. 1231, 23 ago. 2019. DOI: 10.3390/cancers11091231.