

**ANALI DEL MILAGRO BERNABE GARNIQUE**

**Caracterização de culturas celulares homotípicas e heterotípicas em 3D de NSCLC e seu uso para *screening* de quimioterápicos**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia de Sistemas, do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo para a obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Biologia de Celular, Tecidual e do Desenvolvimento.

Orientadora: Profa. Dra. Gláucia Maria Machado-Santelli.

Versão original.

São Paulo

2022

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)  
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica  
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Bernabe Garnique, ANALI DEL MILAGRO

Caracterização de culturas celulares homotípicas e heterotípicas em 3D de NSCLC e seu uso para screening de quimioterápicos / ANALI DEL MILAGRO Bernabe Garnique; orientadora Gláucia Maria Machado Santelli. -- São Paulo, 2022.

109 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Cultivo celular em 3D (Esferoides). 2. Fibroblasto associado a câncer. 3. Macrófago associado ao tumor. 4. Microambiente tumoral. 5. NSCLC. I. Machado Santelli, Gláucia Maria, orientador. II. Título.

## RESUMO

GARNIQUE, AMB. **Caracterização de culturas celulares homotípicas e heterotípicas em 3D de NSCLC e seu uso para *screening* de quimioterápicos.** 2022. N° de folhas.107 Tese (Doutorado em Biologia de Sistemas) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo. São Paulo, 2022.

Nos últimos anos o estudo do cultivo celular em 3D tem aumentado como um modelo que mimetiza o microambiente tumoral (TME). O TME caracteriza-se por apresentar grande heterogeneidade celular, permitindo a modulação de diferentes vias de sinalização que permitem enriquecer esse microambiente. Vários tumores apresentam duas populações que se encontram em proporções elevadas, os fibroblastos associados a câncer (CAFs) e os macrófagos associados ao tumor (TAM). Estas células estão entre as maiores responsáveis pela interação e modulação de diferentes vias de sinalização como citocinas e o remodelamento de matriz que resulta em vantagens na proliferação, invasão e metástase. Essa interação é a responsável pelo enriquecimento e manutenção de uma população que tem sido relacionada à recidiva e metástase no câncer, elas apresentam características de autorenovação e início de tumor, e são chamadas de células tronco de câncer e apresentam expressão diferencial de fatores de transcrição assim como de marcadores de membrana celular. Assim, o objetivo deste trabalho é o estudo de culturas celulares em 3D de NSCLC sozinhas e em combinação com fibroblastos dérmicos de curta duração e com macrófagos diferenciados da linhagem THP-1. Foram caracterizados esferoides homotípicos A549, LC-HK2 e FDH e heterotípicos A549/FDH, LC-HK2/FDH, A549/Mcf e LC-HK2/Mcf, foram mantidos na cultura por 7 dias, a caracterização morfológica foi por meio de medida do diâmetro, acompanhamento da densidade celular, imunofluorescência do citoesqueleto das células que formam os esferoides, microscopia eletrônica de transmissão. Foi avaliada a viabilidade celular e proliferação por meio de coloração com Hoechst e IP, perfil do ciclo celular por citometria de fluxo, e ensaio de migração celular numa superfície aderente. Foi analisado também a expressão proteica de CSC e proteínas de adesão celular. Os esferoides homotípicos e heterotípicos foram tratados com Doxorubicina, Estaurosporina, Cisplatina e Cromomicina A5. E foram avaliados seus efeitos na viabilidade celular, ciclo celular, senescência, e consumo de ATP. Os esferoides formados apresentaram diferentes características que permitem o estudo tanto na interação das diferentes células que compõem o microambiente tumoral quanto para o uso no teste de quimioterápicos.

**Palavras-chave:** Cultivo celular em 3D (Esferoides). Fibroblasto associado a câncer. Macrófago associado ao tumor. Microambiente tumoral. NSCLC.

## ABSTRACT

GARNIQUE AMB. **Characterization of 3D homotypic and heterotypic cell cultures of NSCLC and their use for chemotherapy screening.** 2022. N° de folhas 107. Thesis (Ph. D. thesis in Systems Biology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo. São Paulo, 2022.

In recent years the study of 3D cell culture has increased as a model that mimics the tumor microenvironment (TME). The TME is characterized by showing cellular heterogeneity, allowing the modulation of different signaling pathways that enrich this microenvironment. Tumors exhibit two populations found in high proportions: Cancer-associated fibroblasts (CAFs) and Tumor-associated macrophages (TAM). These cells are responsible for the interaction and modulation of different signaling pathways such as cytokines and matrix remodeling that result in advantages in proliferation, invasion, and metastasis. This interaction is responsible for the enrichment and maintenance of a population that has been related to resistance and metastasis in cancer, they have characteristics of self-renewal and tumor initiation, they are called cancer stem cells (CSC), and have different expression of transcriptional factors and cell membrane markers. Thus, the aim of this work is the study of 3D cell cultures of NSCLC alone and in combination with short-lived dermal fibroblasts and with differentiated macrophages of the THP-1 lineage. Homotypic spheroids A549, LC-HK2, and FDH and heterotypic spheroids A549/FDH, LC-HK2/FDH, A549/Mcf, and LC-HK2/Mcf were characterized, they were kept in culture for 7 days, and the morphological characterization was by measuring the diameter, monitoring of cell density, immunofluorescence of the cytoskeleton of cells that form the spheroids, transmission electron microscopy. Hoechst and PI staining evaluated cell viability and proliferation, cell cycle profiling by flow cytometry, and cell migration assay on an adherent surface. The protein expression of CSC and cell adhesion proteins was also analyzed. Homotypic and heterotypic spheroids were treated with Doxorubicin, Staurosporine, Cisplatin, and ChromomycinA5. And their effects on cell viability, cell cycle, senescence, and ATP consumption were evaluated. These spheroids showed different characteristics that allow the study of the interaction of the different cells that compose the tumor microenvironment and for use in chemotherapy screening.

**Keywords:** Cell culture in 3D (Spheroids). Cancer-associated Fibroblasts. Tumor-associated macrophage. Tumor microenvironment. NSCLC.