

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA CENTRO DE CIÊNCIAS  
NATURAIS E EXATAS PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: BIOQUÍMICA TOXICOLÓGICA

JÉSSICA EDUARDA DOS SANTOS BATISTA

**USO DO MODELO CELULAR TRIDIMENSIONAL DE  
ADENOCARCINOMA DE CÂNCER DE PULMÃO NA TRIAGEM  
DE COMPOSTOS ORGANOCALCOGÊNIOS**

Santa Maria, RS 2019

**Jéssica Eduarda dos Santos Batista**

**USO DO MODELO CELULAR TRIDIMENSIONAL DE ADENOCARCINOMA DE  
CÂNCER DE PULMÃO NA TRIAGEM DE COMPOSTOS  
ORGANOCALCOGÊNIOS**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do título de **Mestre em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica**.

Orientador: Prof. Dr. Félix Alexandre Antunes Soares

Santa Maria, RS 2019

Batista, Jéssica Eduarda dos Santos  
USO DO MODELO CELULAR TRIDIMENSIONAL DE  
ADENOCARCINOMA DE CÂNCER DE PULMÃO NA TRIAGEM DE  
COMPOSTOS ORGANOCALOGÊNIOS. / Jéssica Eduarda dos Santos  
Batista.- 2019.  
56 p.; 30 cm

Orientador: Félix Alexandre Antunes Soares  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa  
Maria, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Programa de  
Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica  
Toxicológica, RS, 2019

1. Cultivo tridimensional 2. Câncer de pulmão 3.  
Organocalcogenios 4. Screening I. Antunes Soares, Félix  
Alexandre II. Título.

**Jéssica Eduarda dos Santos Batista**

**USO DO MODELO CELULAR TRIDIMENSIONAL DE ADENOCARCINOMA DE  
CÂNCER DE PULMÃO NA TRIAGEM DE COMPOSTOS  
ORGANOCALCOGÊNIOS**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do título de **Mestre em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica**.

**Aprovada em 04 de Setembro de 2019:**



---

**Félix Alexandre Antunes Soares (UFSM) (Presidente/Orientador)**

---

**Nilda Vargas Barbosa (UFSM)**

---

**Cristina Wayne Nogueira (UFSM)**

---

**Francieli Rohden (UFRGS)**

Santa Maria, RS 2019

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer a Deus por ter me sustentado e guiado meus passos até aqui, sem Ele e a minha fé eu nada seria.

Quero agradecer meus pais pelos o ensinamento passados, por nunca desistirem de mim. Pelo amor que tenho recebido a vida toda, por me mostrarem o caminho correto a seguir, mas sempre respeitando minhas escolhas.

A minha Mãe, a mulher mais incrível e linda que eu já conheci. Essa beleza não é somente física, mas vem de dentro, e apesar do teu gênio forte, nunca deixou de se preocupar com nenhum dos filhos e netos. Sempre disposta a ajudar aqueles que estão a tua volta.

Ao meu Pai, o homem com o maior coração do mundo, que sempre me ensinou a honestidade e o respeito às pessoas devem estar acima de tudo. O homem que nunca pensa nele em primeiro lugar, e que se preocupa comigo em todos os momentos.

Ao meu namorado Muriel por ser minha âncora e meu refúgio. Obrigada por todos esses anos ao meu lado, pelo respeito, carinho, parceria, e principalmente por acreditar e respeitar meus sonhos e objetivos. A ti, todo meu amor.

Quero agradecer ao Professor Félix, por te aceito me orientar neste trabalho. Obrigada pela disposição em sempre me esclarecer todas as dúvidas, pelos ensinamentos e principalmente pela paciência.

Professor Fábio, muito obrigada por ter topado lá em 2016 me orientar no estágio, e me mostrado esse mundo fascinante dos esferóides. Por ser a pessoa mais otimista e entusiasta que eu conheço.

Gostaria de agradecer imensamente aos colegas do Laboratório 24 da Zoeira e da Depressão, pelas extensas horas na bancada, pelos não-eventos, pelos eventos, pelas tardes de chimarrão, café e comilanças. Em especial quero agradecer algumas pessoas deste grupo tão maravilhoso. Primeiramente a Ivi, por ter sido minha primeira co-orientadora, sempre com bom humor, disposição e principalmente por compor ótimos *jingles* científicos. A Dai e a Pati, essa dupla inseparável que sempre me acolheram nos momentos de maior desespero com toda paciência do mundo, e nunca me negaram ajuda.

E finalmente, quero também agradecer as professoras da banca, Cristina, Francieli e Nilda, por terem aceitado avaliar meu trabalho e disporem seu tempo a isso, com certeza toda sugestão e correção irá enriquecer este trabalho

## RESUMO

### USO DO MODELO CELULAR TRIDIMENSIONAL DE ADENOCARCINOMA DE CÂNCER DE PULMÃO NA TRIAGEM DE COMPOSTOS ORGANOCALCOGÊNIOS

AUTORA: Jéssica Eduarda dos Santos Batista  
ORIENTADOR: Félix Alexandre Antunes Soares

O adenocarcinoma pulmonar é uma das principais causas de morte no mundo associadas ao câncer, mas a erradicação ou controle dessa doença está longe de ser realidade. O tratamento com quimioterápicos como a cisplatina vem apresentando sucesso, levando ao aumento da sobrevivência de alguns pacientes. Seu modo de ação ocorre através da ligação direta ao DNA impedindo a replicação, levando a morte celular. Porém, o desenvolvimento de resistência à cisplatina representa um sério problema clínico. Estudos com foco em novas moléculas mais efetivas no tratamento do câncer vêm ganhando notoriedade, como as propriedades antitumorais dos compostos organocalcogênicos que são utilizados em sínteses orgânicas. A identificação de compostos com potencial terapêutico normalmente é iniciada no cultivo celular, pois permite o estudo de células humanas em um número maior de combinações, com diferentes parâmetros. Apesar disso, a cultura de células em monocamada (2D) não reproduz a complexidade espacial das células neoplásicas, assim, não permite as mesmas interações entre os ambientes celular e extracelular, por exemplo. Assim, há um grande interesse em modelos celulares que reproduzam características *in vitro* fisiopatológicas mais acuradas encontradas *in vivo*, como, o cultivo tridimensional. Culturas tridimensionais (esferóides) permitem que as células realizem interações célula-célula ou célula-matriz. Essas interações levam ao aumento da diferenciação celular, ativam a sinalização celular devido a componentes da matriz extracelular, modificam o padrão de expressão gênica previamente observado em cultura 2D e alteram a expressão de moléculas envolvidas na adesão de matriz e célula-célula. Na cultura tridimensional as células estão dispostas em várias camadas conferindo uma barreira biológica à difusão de fármacos, que terão que se difundir entre essas camadas, semelhante ao que ocorre *in vivo*. No câncer, essa cultura tem sido amplamente utilizada, por exemplo, em pesquisas que testam a eficiência de medicamentos. Dessa maneira o objetivo geral deste trabalho foi a padronização do modelo de cultivo celular tridimensional, na linhagem de adenocarcinoma de pulmão A549, e utilizar esse modelo no rastreamento de moléculas com potencial antitumoral. Primeiramente foram testados protocolos que utilizaram ou matrigel ou gel de agarose para a formação dos esferóides. Após a padronização, os parâmetros morfométricos foram avaliados por análise de imagem e a área quantificada. Adicionalmente, os esferóides foram tratados com nove compostos organocalcogênicos e comparados com o quimioterápico cisplatina, a citotoxicidade foi avaliada pelo ensaio de mtt, todos os compostos e a cisplatina foram diluídos em DMSO. Neste estudo, tornamos confiável a formação dos esferóides usando uma linhagem celular de adenocarcinoma humano A549 somente no protocolo de gel de agarose testado. Todos os compostos e a cisplatina diminuíram significativamente a viabilidade celular quando comparados com o grupo controle após 48 horas. O composto 3 apresentou o menor valor de IC50 entre todos os compostos testados após 48h de exposição. Considerando os dados aqui apresentados, demonstramos que um modelo tridimensional de adenocarcinoma é adequado para o rastreamento de possíveis agentes antitumorais.

Palavras-chave: cultura tridimensional, esferóides, agentes antitumorais, cisplatina.

## ABSTRACT

### USE OF THE THREE-DIMENSIONAL CELL MODEL OF LUNG CANCER ADENOCARCINOMA IN THE SCREENING OF ORGANOCALCOGEN COMPOUNDS

AUTHOR: Jéssica Eduarda dos Santos Batista

ADVISOR: Félix Alexandre Antunes Soares

Pulmonary adenocarcinoma is one of the leading causes of death in the world associated with cancer, but eradication or control of this disease is not possible yet. Treatment with chemotherapeutic drugs such as cisplatin has been successful, leading to increased survival of some patients. Its mode of action occurs through direct binding to DNA preventing replication, leading to cell death. However, the development of cisplatin resistance represents a serious clinical problem. Studies focusing on new molecules that are more effective in treating cancer have gained notoriety, such as the antitumor properties of organocalcogen compounds that are used in organic syntheses. The identification of compounds with therapeutic potential is usually initiated in *in vitro* studies, as it allows the study of human cells in a larger number of combinations, with different parameters. Nevertheless, monolayer (2D) cell culture does not reproduce the spatial complexity of neoplastic cells, thus does not allow the same interactions between cellular and extracellular environments, for example. Thus, there is great interest in cellular models that reproduce more accurate pathophysiological *in vitro* characteristics found *in vivo*, such as three-dimensional cultivation. Three-dimensional cultures (spheroids) allow cells to perform cell-cell or cell-matrix interactions. These interactions lead to increased cell differentiation, activate cell signaling due to extracellular matrix components, modify the gene expression pattern previously observed in 2D culture, and alter the expression of molecules involved in matrix and cell-cell adhesion. In three-dimensional culture the cells are arranged in several layers giving a biological barrier to drug diffusion, which will have to diffuse between these layers, similar to what happens *in vivo*. In cancer, this culture has been widely used, for example, in research that tests drug efficiency. Thus, the general objective of this work was to develop a three-dimensional cellular model using a lung adenocarcinoma lineage and to use this model to screen for molecules with antitumor potential. Protocols were first tested using either matrigel or agarose gel for spheroid formation. After establishment, the morphometric parameters were evaluated by image analysis and the quantified area. In addition, spheroids were treated with nine organocalcogen compounds and compared with cisplatin chemotherapy, cytotoxicity was evaluated by the mtt assay, all compounds and cisplatin were diluted in DMSO. In this study, we made spheroid formation reliable using an A549 human adenocarcinoma cell line only in the tested agarose gel protocol. All compounds and cisplatin significantly decreased cell viability when compared with the control group after 48 hours. Compound 3 had the lowest IC50 value among all compounds tested after 48h exposure. Considering the data presented here, we demonstrate that a three-dimensional adenocarcinoma model is suitable for screening for possible antitumor agents.

Keywords: three-dimensional culture, spheroids, antitumor agents, cisplatin.

## LISTA DE FIGURAS

### REVISÃO BIBLIGRÁFICA

Figura 1 - Os <i>Hallmarks of cancer</i> .....	12
Figura 2 - Heterogeneidade do câncer.....	12
Figura 3. Explicação da heterogeneidade do câncer, com base nos princípios evolutivos propostos por Charles Darwin.....	13
Figura 4 - Distribuição proporcional por gênero dos dez tipos de câncer mais freqüentes no Brasil. ....	14
Figura 5: Micrografia representando as regiões de um esferóide, mimetizando as situações encontradas <i>in vivo</i> . ....	17
Figura 6. Protocolo Matrigel®. Esquema do protocolo da tentativa de geração de esferóides. ....	20
Figura 7. Protocolo Matrigel®: 2. Esquema do protocolo da tentativa de geração de esferóides. ....	20
Figura 8. Esquematização da formação de esferóides em placa TPP de fundo plano, revestida de gel de agarose. ....	21

### RESULTADOS

Figura 9. Tentativa de formação de esferóides multicelulares. ....	23
Figura 10. Esferóides multicelulares. ....	23
Figura 11. Esferóides multicelulares. ....	23
Figura 12. Tentativa de formação de esferóides multicelulares.....	25
Figura 13. Tentativa de formação de esferóides multicelulares. ....	26
Figura 14. Tentativa de formação de esferóides multicelulares, sem o uso de matrigel em placa não aderente. ....	27
Figura 15. Tentativa de formação de esferóides multicelulares, em placa de fundo plano forrada com gel de agarose. ....	28
Figura 16. Tentativa de formação de esferóides multicelulares, em placa de fundo plano forrada com gel de agarose.....	28



Figura 17. Tentativa de formação de esferóides multicelulares, em placa de fundo plano forrada com gel de agarose.....29

## ARTIGO

**Figure 1:** Structure of the synthetic organochalcogens evaluated in this study. They were derived from two new series of 1,2,3-triazoles-1,4-disubstituted obtained by the reaction of 1,3-dipolar cycloaddition, were synthesized between the alkaloids derived from benzocalcogenoanilines and the azides of 1,3-chalcogenazoles-2-substituted.....52

**Figure 2:** Routine monitoring of single spheroid formation and growth for A549 human lung adenocarcinoma cell line.....53

**Figure 3:** Lethal dose curves after 24 and 48 h of treatment with cisplatin against A549 human lung adenocarcinoma single spheroids. ....54

**Figure 4:** Lethal dose curves after 24 (top) and 48 h (down) of treatment with organochalcogen compounds against A549 human lung adenocarcinoma single spheroids.....55

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>11</b>
1.1 Câncer.....	11
1.2 Câncer de Pulmão.....	14
1.3 Cultivo celular tridimensional .....	15
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>18</b>
2.1 Objetivo Geral.....	18
2.2 Objetivos Específicos.....	18
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>19</b>
3.1 Cultivo Celular .....	19
3.2 Formação dos Esferóides.....	19
3.2.1 Matrigel® .....	19
3.2.2 Gel de agarose .....	20
3.3 Aquisição de imagens para determinar a curva de crescimento.....	21
3.4 Análise Estatística .....	22
<b>4. RESULTADOS .....</b>	<b>23</b>
4.1 Formação dos esferóides. ....	23
4.1.1 Matrigel® .....	23
4.1.2 Gel de agarose .....	27
<b>5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS.....</b>	<b>30</b>
<b>6. ARTIGO .....</b>	<b>33</b>
<b>7. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>56</b>

# 1. INTRODUÇÃO

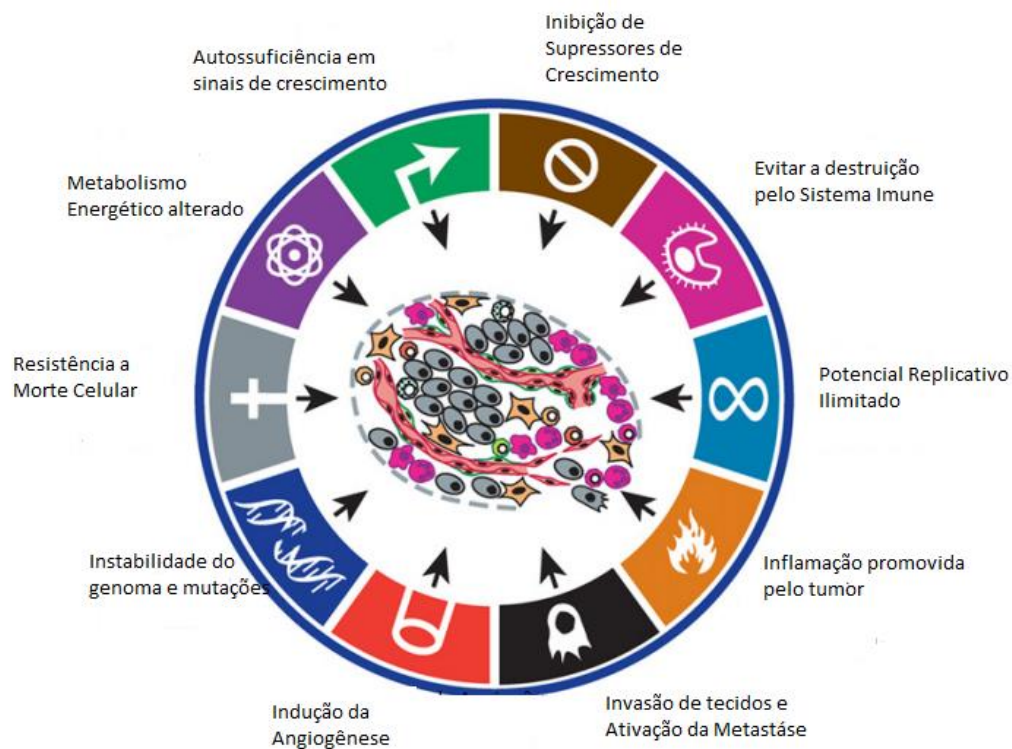
## 1.1 Câncer

A Organização Mundial da Saúde (OMS) define o câncer como um conjunto de centenas de doença caracterizadas pelo crescimento desordenado de células anormais, podendo ocorrer metástase e invadir tecidos adjacentes e espalharem-se para outros órgãos do corpo (OMS, 2019). O câncer é uma preocupação de saúde mundial, sendo uma das principais causas de morte e com maior prevalência em países em desenvolvimento (Jemal *et al*, 2008). Pode ser desencadeado por fatores endógenos (hereditários, imunológicos e hormonais) ou fatores exógenos (fatores dietéticos, tabagismo, radiação, parasitas específicos, bactérias e vírus e hormônios exógenos) (Sinha & El-Bayoumy, 2004).

Inquestionavelmente estamos enfrentando uma epidemia mundial, e como mostram as estatísticas, a sua incidência crescerá em torno de 70% nas próximas duas décadas. Para o biênio 2018-2019 é estimado cerca de 600 mil novos casos de câncer, para cada ano, não contabilizando o câncer de pele não melanoma devido à dificuldade em coletar e contar tais tumores (Brody, 2014; Ferlay *et al.*, 2014; INCA, 2019(a)).

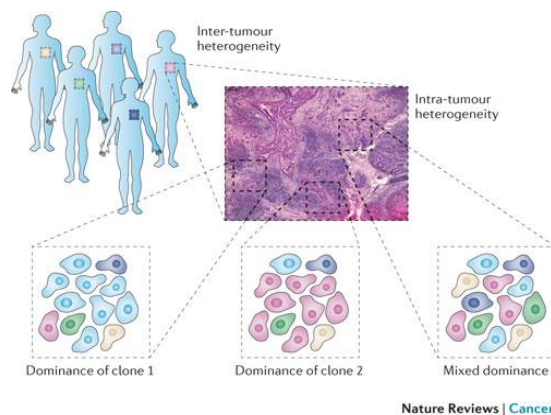
O câncer é caracterizado por uma acumulação sucessiva de mutações em oncogenes chave e supressores tumorais. O acúmulo dessas características em células somáticas tem sido considerado a base de um modelo de desenvolvimento de progressão tumoral, em que as células passam de um estado normal e saudável para fenótipos pré-malignos, malignos e migratórios (Kleppe & Levine, 2014). Hanahan e Weinberg explanaram alguns fatores que estão envolvidos na progressão desta doença (**Figura 1**) que são: (1) auto-suficiência dos sinais para proliferação celular, (2) inativação de supressores de proliferação, (3) escape ao combate imunológico, (4) aquisição de potencial replicativo imortal, (5) promoção de inflamação pelo tumor, (6) ativação de invasão e metástase, (7) indução da formação de novos vasos sanguíneos, (8) instabilidade genômica e mutação, (9) escape dos mecanismos de apoptose e (10) desregulação do metabolismo energético celular (Hanahan & Weinberg, 2011).

**Figura 1.** Os *Hallmarks of cancer*, ou em tradução livre: as características do câncer. O esquema ilustra as condições necessárias para a progressão do câncer. Essas características podem ser adquiridas em diferentes estágios do desenvolvimento do câncer em várias etapas, através de mecanismos distintos em diferentes tipos de câncer humano. Pode existir uma variação de características adquiridas para cada tipo de câncer, que podem ser mais ou menos predominantes. Fonte: Adaptado de Hanahan e Weinberg 2011.



Para um maior entendimento do câncer, devemos levar em consideração que os tumores são heterogêneos, apresentam diversidade genética complexa e possuem fenótipos morfológicos diversificados. A heterogeneidade ocorre de duas maneiras, intratumoral (quando ocorre dentro do tumor), e intertumoral (quando se refere à heterogeneidade entre os diferentes tipos de tumores) (Figura 2)(Marusyk *et al.*, 2012).

**Figura 2.** Heterogeneidade do câncer. Fonte: Marusyk *et al.*, 2012

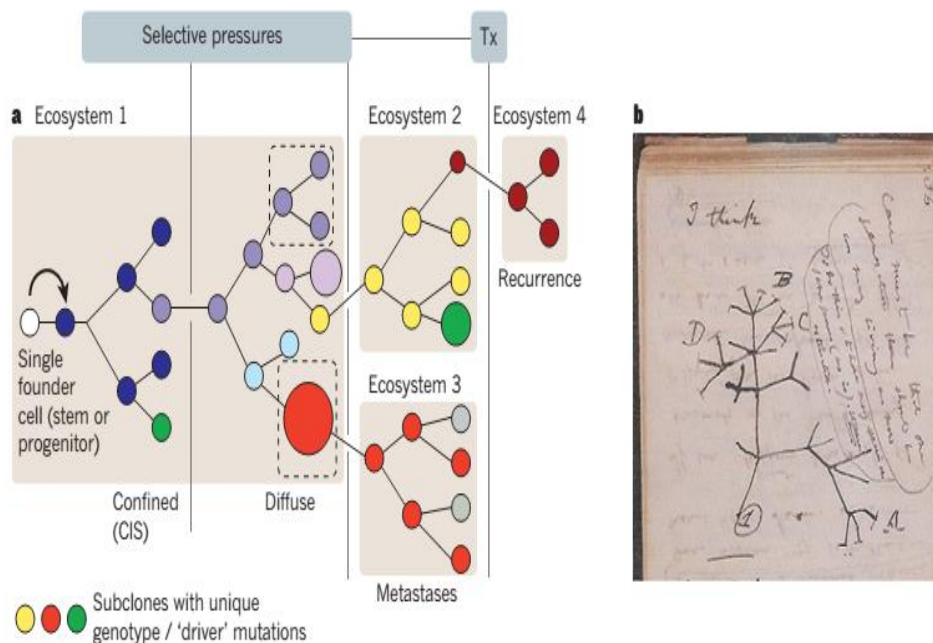


O entendimento que temos nos dias atuais para explicar a heterogeneidade tumoral, é baseado nos princípios básicos evolutivos propostos por Charles Darwin, sendo a essência do crescimento e desenvolvimento neoplásico. Esse princípio afirma que uma única célula

somática possui característica hereditária para a proliferação com mutação, que confere uma vantagem de sobrevivência sobre aquelas células sem essa característica (Kleppe & Levine, 2014; Almendro *et al*, 2013).

O câncer é uma doença que pode se desenvolver por fatores genéticos, hábitos alimentares, estilo de vida e condições ambientais. Mas para que o câncer ocorra é necessário que aconteçam várias mutações, que ao mesmo tempo não sejam letais para a célula, e causem lesões estruturais suficientes para acarretar uma desregulação no mecanismo de crescimento e multiplicação. A seleção natural irá atuar selecionando vários subclones com diferentes capacidades para a proliferação, migração e invasão. Os fatores que promovem a sobrevivência do tumor são mantidos entre os subclones, já as mudanças nos microambientes do local do tumor irão influenciar a diversidade genética e os resultados fenotípicos, levando a instabilidade genômica, como resultado será a heterogeneidade como observada nos genomas do câncer (Figura 3). (Poliak, 2014; Meachman & Morrison, 2013; Greaves & Maley, 2012).

**Figura 3.** Explicação da heterogeneidade do câncer, com base nos princípios evolutivos propostos por Charles Darwin. A) Pressões seletivas permitem que alguns subclones mutantes se expandem, enquanto outros se tornam extintos ou permanecer dormentes. As linhas verticais representam restrições ou pressões seletivas. As caixas 1-4 representam os diferentes ecossistemas de tecidos ou habitats. Cada círculo de cor diferente representa um subclone geneticamente distinto. B) Árvore evolutiva ramificada de Darwin de especiação, de seu caderno em 1837.



## 1.2 Câncer de Pulmão

O câncer de pulmão lidera as estatísticas de mortalidade mundial em relação aos outros tipos de câncer. São estimados cerca de 18.740 casos novos de câncer de pulmão entre homens, sendo o segundo mais frequente e de 12.530 ocupando a quarta posição nas mulheres para cada ano do biênio 2018-2019 (**Figura 4**). O tabagismo é um dos principais fatores relacionados ao câncer de pulmão, sendo responsável por mais de 80% dos casos. Entre os fumantes, a chance de desenvolver essa doença aumenta em cerca de 20 a 30 vezes. Existem outros fatores relacionados ao câncer de pulmão como a exposição a carcinogênicos (ex: fibras de amianto); infecções pulmonares frequentes, tuberculose e deficiência ou excesso de vitamina A (INCA, 2019 (b)).

**Figura 4** - Distribuição proporcional por gênero dos dez tipos de câncer mais frequentes no Brasil, em 2018. Fonte: INCA (b)\*

Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2018 por sexo, exceto pele não melanoma\*

Homens			Mulheres		
Localização Primária	Casos	%	Localização Primária	Casos	%
Próstata	68.220	31,7%	Mama Feminina	59.700	29,5%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	18.740	8,7%	Cólon e Reto	18.980	9,4%
Cólon e Reto	17.380	8,1%	Colo do Útero	16.370	8,1%
Estômago	13.540	6,3%	Traqueia, Brônquio e Pulmão	12.530	6,2%
Cavidade Oral	11.200	5,2%	Glândula Tireoide	8.040	4,0%
Esôfago	8.240	3,8%	Estômago	7.750	3,8%
Bexiga	6.690	3,1%	Corpo do Útero	6.600	3,3%
Laringe	6.390	3,0%	Ovário	6.150	3,0%
Leucemias	5.940	2,8%	Sistema Nervoso Central	5.510	2,7%
Sistema Nervoso Central	5.810	2,7%	Leucemias	4.860	2,4%

\*Números arredondados para múltiplos de 10.

A maioria dos tumores pulmonares são classificados como: carcinoma de pequenas células (10-15% dos casos e associado com o fumo), tumores carcinóides (menos de 5% dos casos) e carcinoma de não pequenas células (do inglês *NSCLC: non small cell lungcancer*, 85-90% dos casos); com os subtipos: adenocarcinoma, carcinoma de células escamosas, e carcinoma de células grandes (Tabela1) (Sharma & Settleman, 2009).

**Tabela 1.** Classificação dos tumores do câncer de pulmão e as suas características.

Carcinoma de pequenas células	É o mais maligno dos cânceres pulmonares e, em geral, manifesta-se na forma de tumor central e tende a estenotar os brônquios por compressão extrínseca. Está fortemente associado ao hábito de fumar. Os aspectos microscópicos incluem a presença
-------------------------------	---

	de pequenas células semelhantes aos grãos de aveia, com pequena quantidade de citoplasma, sem diferenciação escamosa ou glandular e com grânulos neurosecretores.
Adenocarcinoma	Constitui o câncer do pulmão mais comum em mulheres e homens. Com frequência manifesta-se na forma de massa periférica. Seus aspectos microscópicos característicos incluem formação glandular, geralmente com produção de mucina.
Carcinoma de células escamosas	Exibe a maior correlação observada com o tabagismo. Esses tumores surgem, em sua maioria, no hilo ou próximo a ele. Geralmente origina-se em um brônquio central, tem crescimento endobrônquico e, por isso, pode apresentar sintomas clínicos locais, tais como tosse e hemoptise, e tem maior probabilidade de ser diagnosticado nas suas formas iniciais, pela citologia do escarro. Geralmente dissemina-se para os linfonodos regionais e, em torno de dez por cento dos casos, apresenta-se com cavitação. Microscopicamente variam desde neoplasias ceratinizantes bem diferenciadas a tumores anaplásicos com diferenciação ceratinizante apenas focal.
Carcinoma de grandes células	Provavelmente representa carcinomas de células escamosas ou adenocarcinomas pouco diferenciados, em certas ocasiões com elementos histológicos peculiares: células gigantes, células claras, células fusiformes.

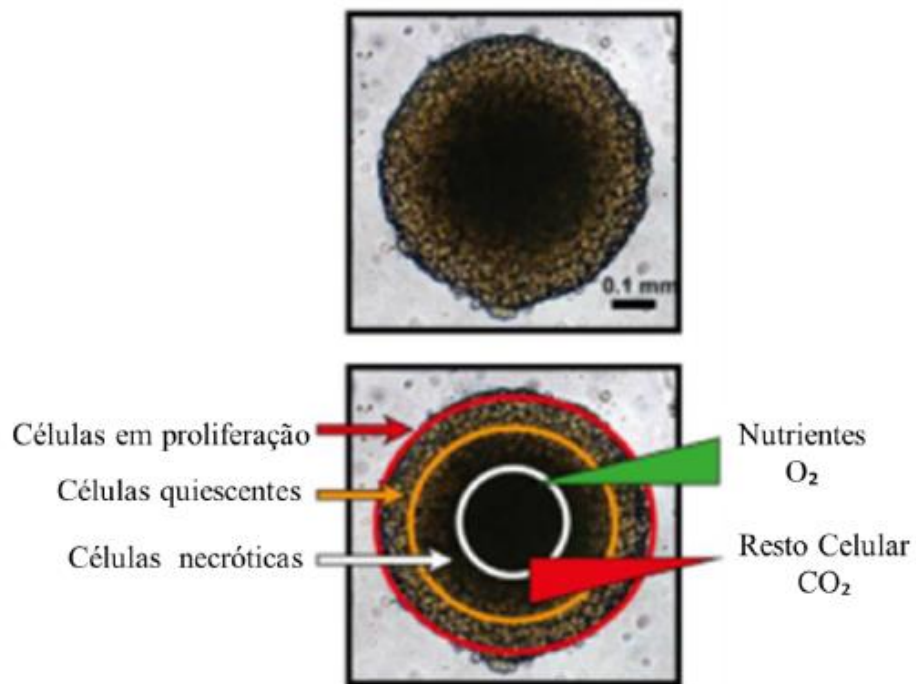
Apesar do grande conhecimento atual sobre o câncer de pulmão, os mecanismos moleculares envolvidos na fisiopatologia e progressão da doença, bem como no desenvolvimento de resistência a quimioterápicos ainda não estão bem elucidados. Ademais, modelos experimentais são imprescindíveis para a investigação e avaliação da efetividade de novos fármacos e/ou novas terapias. Assim, no estudo do câncer, linhagens celulares têm sido amplamente utilizadas como modelos para a avaliação rápida de um grande número de compostos com predita capacidade antitumoral (Prestwich 2008).

### 1.3 Cultivo celular tridimensional

O modelo de cultura de células é de grande valor para as descobertas científicas, pois permite a utilização de células humanas no estudo de processos moleculares, minimizando o uso de animais em pesquisas (Prestwich, 2008). Assim, existe um grande interesse no desenvolvimento de culturas celulares, que reproduzem com mais precisão características fisiopatológicas encontradas *in vivo*, permitindo a triagem de um grande número de drogas anticâncer no comportamento das células tumorais. A cultura celular em monocamada (2D), é um modelo bastante utilizado. Mas este tipo de cultivo celular não reproduz as mesmas características *in vivo*, pois adere à superfície em que estão inseridas, assim as células tumorais são diretamente expostas a um composto em uma superfície planar, sem que haja interação célula-microambiente tumoral (Talukdar *et al.*, 2011; Prestwich, 2008). Dessa maneira, as culturas tridimensionais (3D; ou também chamadas de esferóides) vêm ganhando espaço como importantes ferramentas de pesquisa em pesquisa básica e aplicada. No câncer, essa cultura tem sido amplamente utilizada para testar a eficácia dos medicamentos (Luca *et al.*, 2013; Wenzel *et al.*, 2014), principalmente porque as células estão dispostas em várias camadas, formando uma barreira biológica à difusão dos medicamentos, muito semelhante ao ambiente *in vivo* (Prestwich, 2008). Nos tumores, os esferóides multicelulares apresentam similaridades na heterogeneidade celular, morfologia e características funcionais, mimetizando o microambiente tumoral. As células dos esferóides são expostas a um gradiente de suprimento de oxigênio e nutrientes, as células da periferia representam a situação das células tumorais próximas aos vasos sanguíneos, que são totalmente ativas, enquanto as células encontradas nas camadas mais internas se tornam quiescentes, e logo na região mais central, formam um núcleo hipóxico e morrem por apoptose ou necrose (**Figura 5**) (Phung *et al.*, 2011). Essa técnica 3D de cultura é usada uma vez que é fácil de manusear e possui grande reprodutibilidade (Wenzel *et al.*, 2014)

**Figura 5:** Micrografia representando as regiões de um esferóide, mimetizando as situações encontradas *in vivo*. Na região periférica, encontram-se as células que estão em constante proliferação, mimetizando aquelas próximas a vasos sanguíneos. Logo em seguida está a região marcada pelas células quiescentes. Na região interna localizam-se as células necróticas, que formam um núcleo hipóxico. Fonte: adaptado de Zaroni et al. (2016).





O cultivo tridimensional tem sido bastante aplicado no estudo de novos fármacos terapêuticos, pois representa de maneira mais fiel as condições encontradas no microambiente tumoral *in situ* (Goers *et al.*, 2014). Portanto, o uso deste modelo para avaliação de novos compostos com potenciais antitumorais se faz de extrema importância

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

- O objetivo deste estudo foi desenvolver um modelo *in vitro* de cultura celular tridimensional (3D) em linhagem humana de adenocarcinoma pulmonar.

### **2.2 Objetivos Específicos**

- Comparar protocolos disponíveis na literatura para geração de esferóides celulares.
- Estabelecer as melhores condições de cultivo tridimensional, e avaliar os esferóides em relação ao tamanho e concentração celular inicial.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Cultivo Celular

Para os ensaios realizados, foi utilizada a linhagem de adenocarcinoma de pulmão humano A549 (CLL 185) obtida da *American Tissue Culture Collection* (ATCC™, Rockville, MD). As células foram cultivadas exponencialmente em meio *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI) 1640 (Gibco®) suplementado com soro fetal bovino na concentração de 10% (Gibco®), penicilina (100 UI/mL), estreptomicina (100µg/ mL) e anfotericina B (0,25µg / mL) (Sigma Aldrich™) e mantidas em incubadora com condições de armazenamento controladas, como atmosfera umidificada a 37°C contendo 5% de CO<sub>2</sub>. Todo o manuseio das células foi realizado em capela de fluxo laminar, os materiais de trabalho foram submetidos à esterilização por luz UV para evitar contaminações. A manutenção das células foi realizada a cada quatro dias, ou sempre que necessário para a realização dos experimentos.

#### 3.2 Formação dos esferóides

Para o estabelecimento da cultura de esferóides foram testados diferentes protocolos, conforme descritos detalhadamente a seguir. Os métodos foram divididos no uso de Matrigel®, ou gel de agarose.

##### 3.2.1 Matrigel®

Na geração dos esferóides com o uso de Matrigel®, o protocolo escolhido foi baseado em Da Motta, 2016, com algumas adaptações. Nestes ensaios diferentes condições foram testadas (concentração inicial de células, adição do Matrigel®, sem Matrigel®, e desaceleração da centrífuga) com o propósito de avaliar a eficiência do protocolo e eliminar qualquer fator que possa estar envolvido de forma negativa na formação dos esferóides. As células foram cultivadas em placas de fundo redondo de 96 poços, não aderente (Corning, Corning, NY, EUA). A adição do Matrigel® foi dividida em dois métodos: Protocolo Matrigel®: 1 (**Figura 6**) e Protocolo Matrigel®: 2 (**Figura 7**).

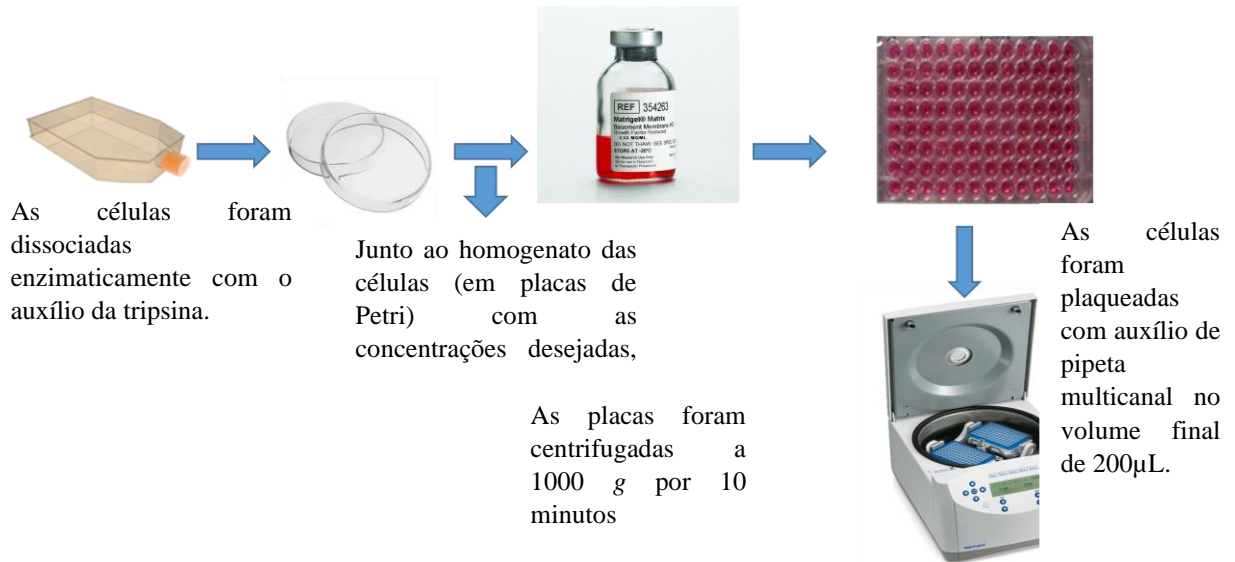
**Protocolo Matrigel® 1:** Nessa etapa, primeiramente as células foram dissociadas com o auxílio de tripsina, e adicionadas às placas no volume final de 200 µL nas seguintes densidades iniciais: 1000, 2000 e 5000 células por poço. Após esse processo, o Matrigel® (sempre mantido no gelo) foi adicionado separadamente em cada poço na concentração final de 1:20 e homogeneizado com o auxílio da pipeta. E finalmente, as placas foram centrifugadas a 1000 g por 10 minutos, e mantidas imóveis na incubadora a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> por diferentes períodos (24 e 48h; 5 e 7 dias) para o estabelecimento dos esferóides. E no **Protocolo Matrigel® 2:** As células foram dissociadas com o auxílio de tripsina,

homogeneizadas em meio RPMI. O Matrigel® foi adicionado ao homogenato de células na concentração final de 1:20, e então as células foram adicionadas às placas nas densidades de 1000, 2000 e 5000 células por poço no volume final de 200  $\mu$ L. Após as placas foram centrifugadas a 1000 g por 10 minutos, e mantidas imóveis na incubadora a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> por diferentes períodos (24 e 48h; 5 e 7 dias) para o estabelecimento dos esferóides

**Figura 6.** Protocolo Matrigel®. Esquema do protocolo da tentativa de geração de esferóides.



**Figura 7.** Protocolo Matrigel®: 2. Esquema do protocolo da tentativa de geração de esferóides.



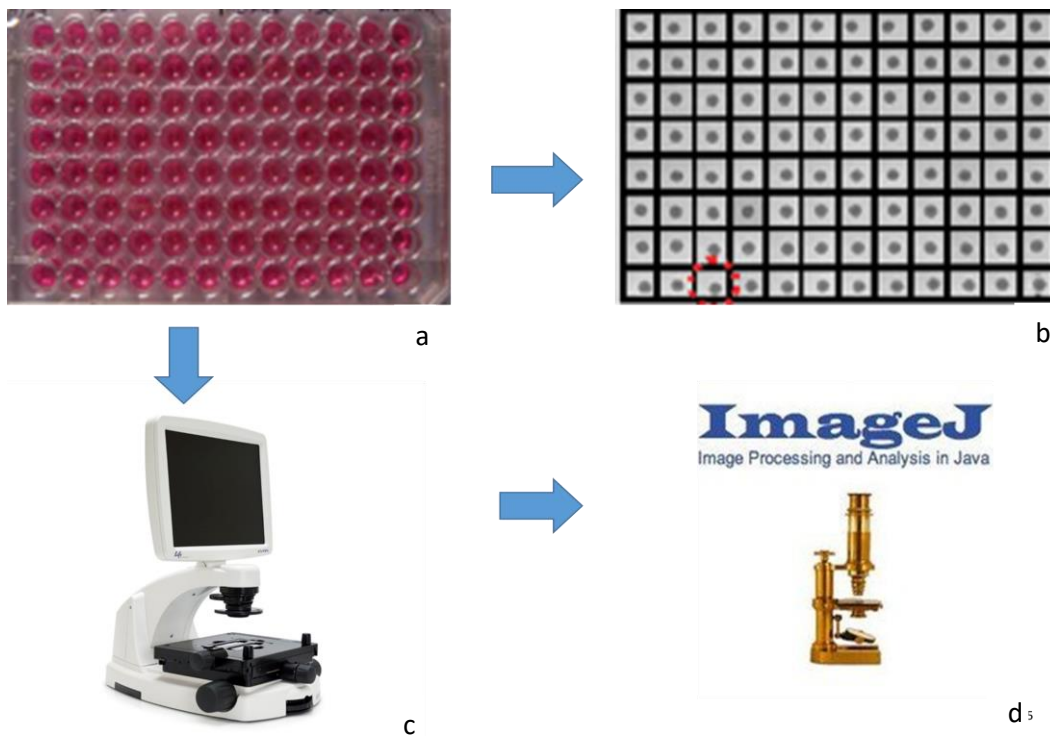
Para o ensaio sem adição de Matrigel®, as células foram dissociadas enzimaticamente com tripsina, 200 $\mu$ L de meio foram adicionados às placas contendo a densidade de 2500 células por poço. As placas foram centrifugadas por 10 minutos a 1000 g, e mantidas imóveis em incubadora a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> por diferentes tempos (24 e 48h; 5 e 7 dias) para o estabelecimento inicial de esferóides.

### 3.2.2 Gel de agarose

Para estes experimentos, a geração de esferóides foi baseada no trabalho Friedrich *et al.*, 2009 com algumas modificações. Esferóides foram gerados em placas de 96 poços com uma superfície plana (TPP). Primeiro, foi adicionado em cada poço 50 $\mu$ L de agarose diluída em PBS 1x (1,5%) e autoclavada por 20 minutos. A adição da agarose possibilita a formação de uma superfície côncava, para que as células não possam se aderir na superfície da placa. Posteriormente, as placas contendo o gel de agarose foram esterilizadas por radiação UV durante 30 minutos.

Então, a dissociação enzimática da cultura de monocamada A549 com tripsina, 200 $\mu$ L do meio foram adicionados às placas, nas densidades de 500, 1000, 2000, 4000, 6000 e 8000 células por poço, e centrifugadas por 10 minutos a 1000 g. As placas foram mantidas imóveis em incubadora a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> por quatro dias para o estabelecimento inicial de esferóides. Os esferóides foram mantidos por até 20 dias para realizar a análise morfométrica utilizando o software ImageJ (**Figura 8**).

**Figura 8.** Esquematização da formação de esferóides em placa TPP de fundo plano, revestida de gel de agarose. Obtenção das imagens e quantificação no software. a) placa com as células; b) representação dos esferóides na placa; c) microscópio Evos; d) Slogan do software ImageJ



### 3.3 Aquisição de imagens para determinar a curva de crescimento

As imagens foram adquiridas a cada 4 dias durante 20 dias, ou de acordo com o protocolo utilizado, em um microscópio invertido, com uma ampliação de 40X (EVOS xl Core, AMG, Waltham, MA, EUA) e o crescimento foi monitorado medindo-se as imagens no software ImageJ.

### **3.4 Análise estatística**

Experimentos de cultura de células foram realizados 3 vezes, cada um em triplicata. O número da amostra ( $\eta$ ) é o comumente empregado em tais estudos.

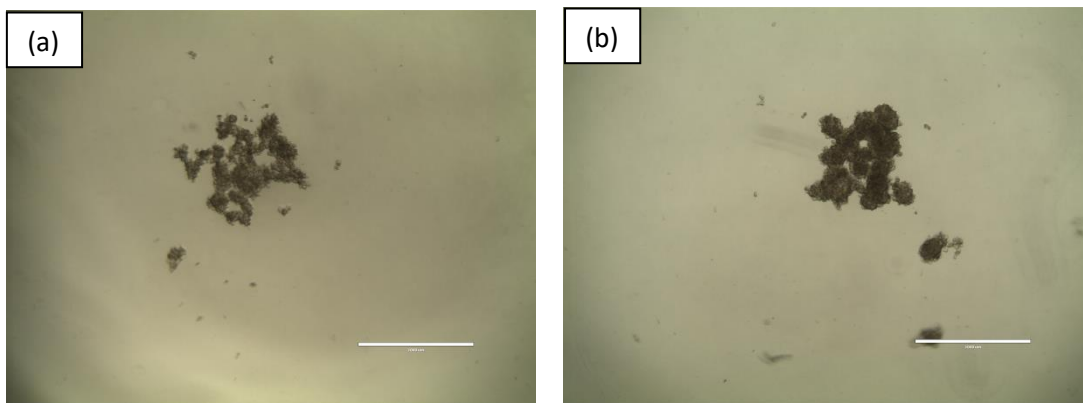
## 4. RESULTADOS

### 4.1 Formação dos esferóides.

#### 4.1.1 Matrigel®

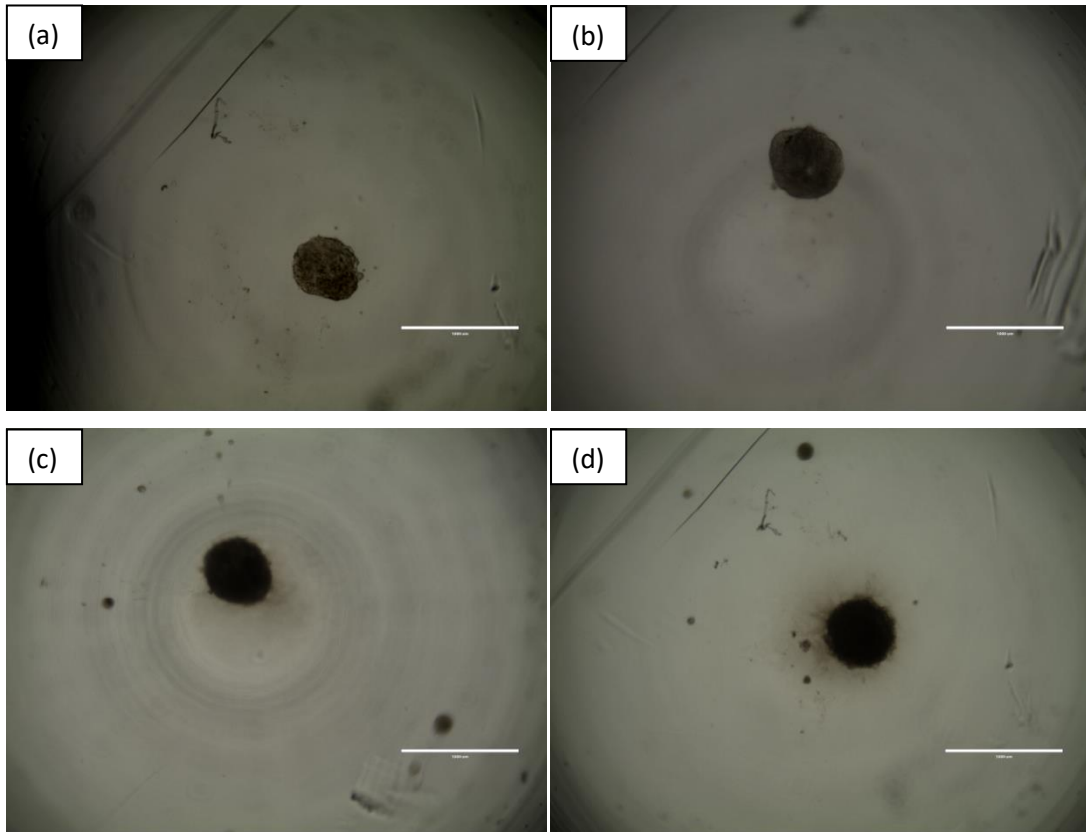
Os ensaios foram iniciados colocando 1000 células por poço, utilizando o Protocolo Matrigel®: 1, a desaceleração mantida em 9. Foi observado que nessas condições, não houve a formação de esferas homogêneas, e únicas por poços. As células foram acompanhadas até o dia 7, porém não houve formação de esferas (**Figura 9**).

**Figura 9.** Tentativa de formação de esferóides multicelulares. (a) 24h (b) 7 dias Densidade inicial: 1000 células. Desaceleração da centrifuga: 9. Com base na escala de 1000µm. Número amostral=3.

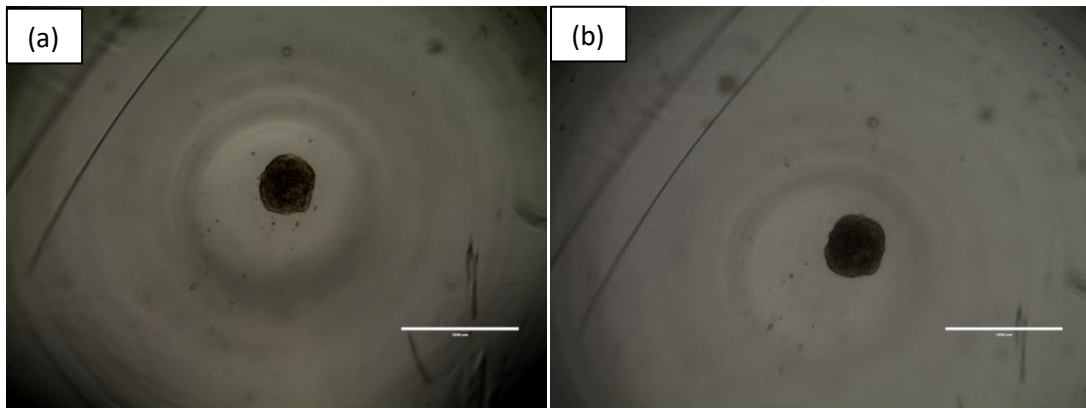


Apesar de não formar esferas na densidade inicial de 1000, é visível que as células estão agrupadas no centro do poço. Assim testamos as mesmas condições mostradas acima, mas em densidades diferentes. As densidades iniciais testadas foram de 2500 células (**Figura 10**) e 5000 células (**Figura 11**). E diferente da condição de 1000 células iniciais, nestas densidades em praticamente todos os poços formaram-se esferas únicas e compactas. Dessa maneira, as esferas foram acompanhadas por 24 e 48h, e 5 e 7 dias

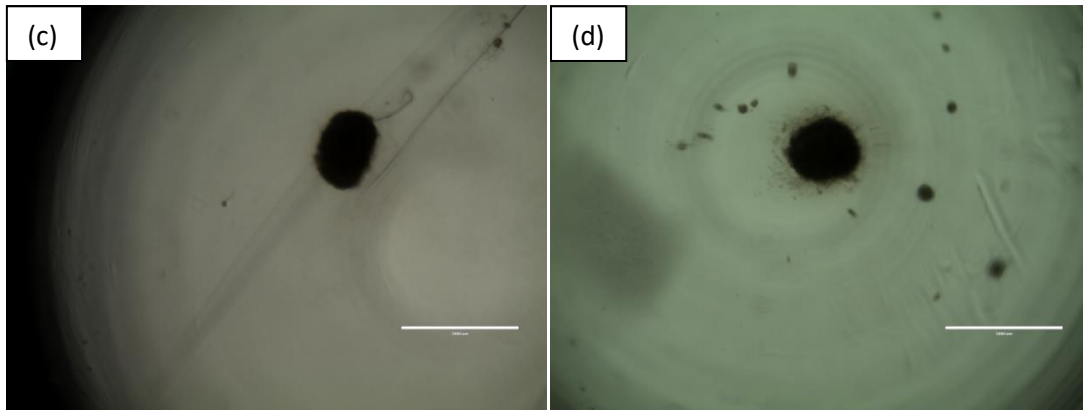
**Figura 10.** Esferóides multicelulares. (a) 24h (b) 48h (c) 5 dias e (d) 7 dias. Densidade inicial: 2500 células. Desaceleração da centrifuga: 9. Com base na escala de 1000µm. Número amostral=3.



**Figura 11.** Esferóides multicelulares. (a) 24h (b) 48h (c) 5 dias e (d) 7 dias. Densidade inicial: 5000 células. Desaceleração da centrifuga: 9. . Com base na escala de 1000 $\mu$ m. Número amostral=3.

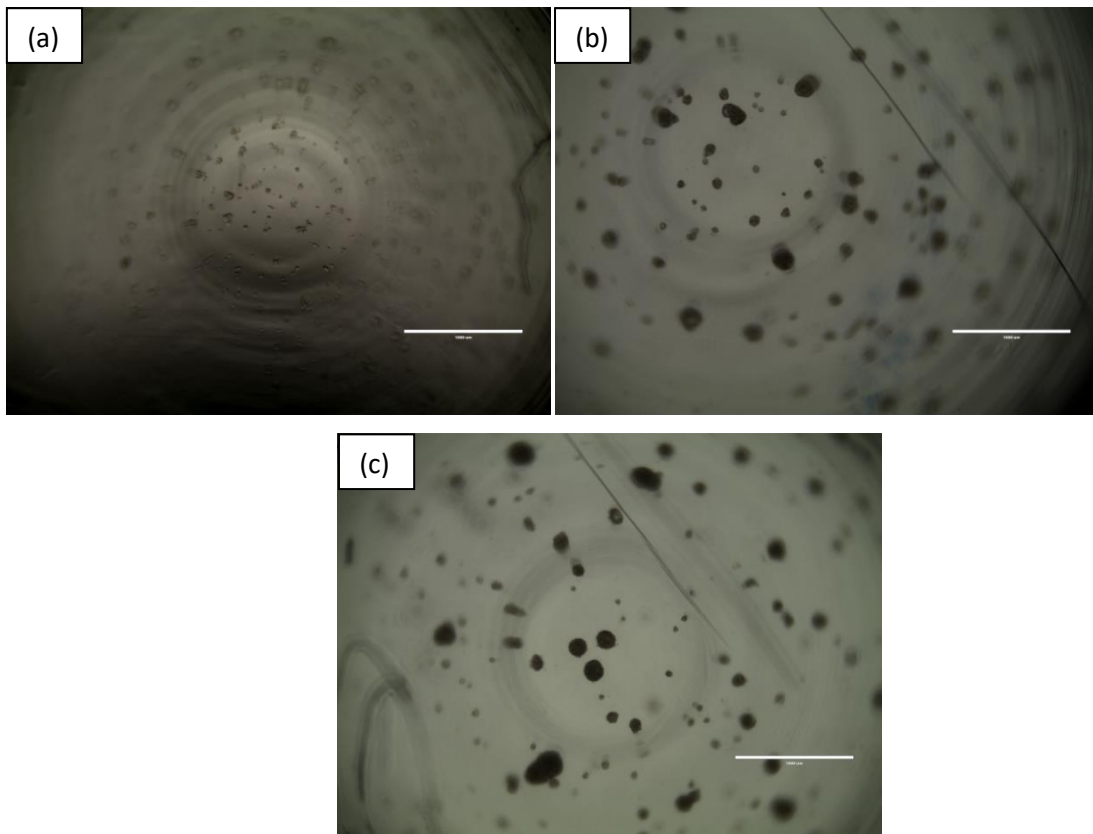






O próximo passo foi avaliar se a forma como o Matrigel<sup>®</sup> é adicionado nas células influencia na formação dos esferóides, foi testado então o Protocolo Matrigel<sup>®</sup>: 2 (**Figura 12**). Neste ensaio as células não se agruparam, em nenhuma das densidades testadas, mantendo a morfologia similar a cultura em monocamada.

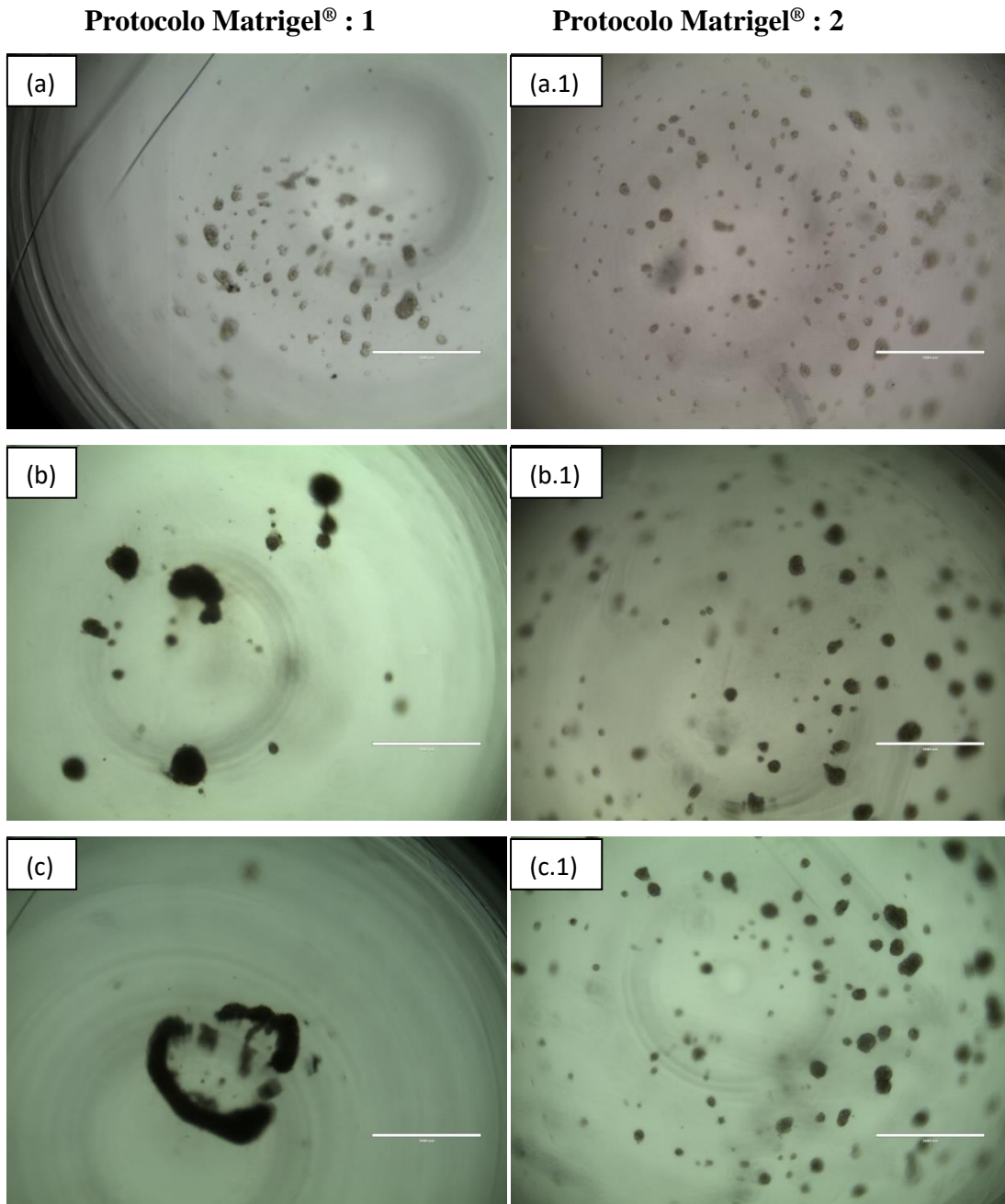
**Figura 12.** Tentativa de formação de esferóides multicelulares. Densidade inicial: (a)1000 células, (b) 2500 células e (c) 5000 células. Desaceleração da centrifuga: 9. Com base na escala de 1000 $\mu$ m. Número amostral=3.



Outra variável que foi considerada durante a execução deste trabalho, foi se a desaceleração da centrifuga influenciava de alguma maneira. Então os mesmos passos que foram realizados até aqui, foram novamente aplicados, mas agora, a desaceleração da centrifuga foi mantida

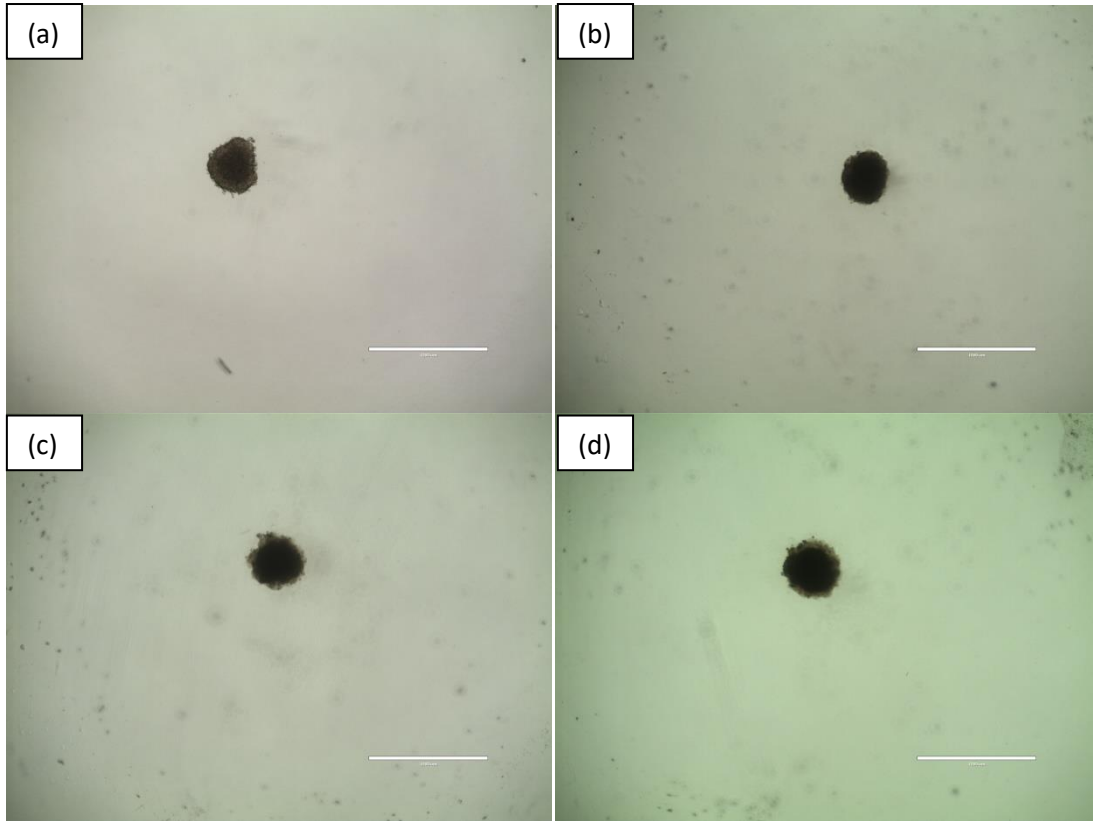
em 0. Com a utilização deste método, não foi possível a formação de esferóides em nenhuma condição e/ou densidade testada, com ausência da compactação (**Figura 13**).

**Figura 13.** Tentativa de formação de esferóides multicelulares. Densidade inicial: 1000 células (a) e (a.1), 2500 células (b) e (b.1) e 5000 células (c) e (c.1). Desaceleração da centrifuga: 0. . Com base na escala de 1000 $\mu$ m. Número amostral=3.



Com interesse de verificar, se a placa não aderente forma esferóides sem o uso de Matrigel®, as células foram plaqueadas na densidade inicial de 2500 células, e acompanhadas por 24h, 48h, 5 e 7 dias (**Figura 14**). Utilizando esse método, foi possível observar que houve um alto rendimento na formação de esferas, alcançando a totalidade dos poços.

**Figura 14.** Tentativa de formação de esferóides multicelulares, sem o uso de matrigel em placa não aderente. Densidade inicial 2500 células. 24h (a) 48h (b) 5 dias (c) e 7 dias (d). Desaceleração da centrifuga: 9. Com base na escala de 1000 $\mu$ m. Número amostral=3



#### 4.1.2 Gel de agarose

Como foi mostrado até aqui, para que haja a formação de esferóides, é necessário impedir que haja aderência das células à placa. Outro método para a formação de esferóides utiliza gel de agarose no fundo do poço. Nessa técnica, é sugerida a geração dos esferóides em placas com o fundo coberto com gel de agarose, a fim de que essa substância forme uma concavidade e, aproveitando-se da força gravitacional, o esferóide seja estabelecido através da sedimentação das células nessa concavidade. (Friedrich *et al.*, 2009; Weiswald, 2015).

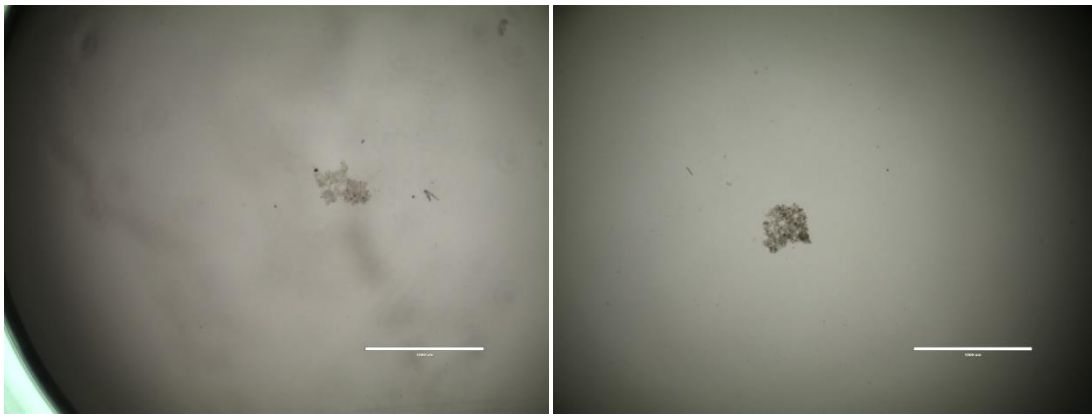
Para a realização desta técnica iniciou-se uma curva de densidade para determinar qual a concentração de células iniciais é a mais eficiente. Observou-se que em baixas densidades de 500 e 1000 células, as células se agregaram no meio do poço (**Figura 15**). Porém não houve a compactação, e quando houve tentativa de trocar o meio em que estavam sendo cultivadas, essas células se desintegraram.

Mas em maiores densidade de células, com: 2000 4000, 6000 e 8000, foi possível observar que as células se uniram, formando agregados multicelulares. Porém, com exceção

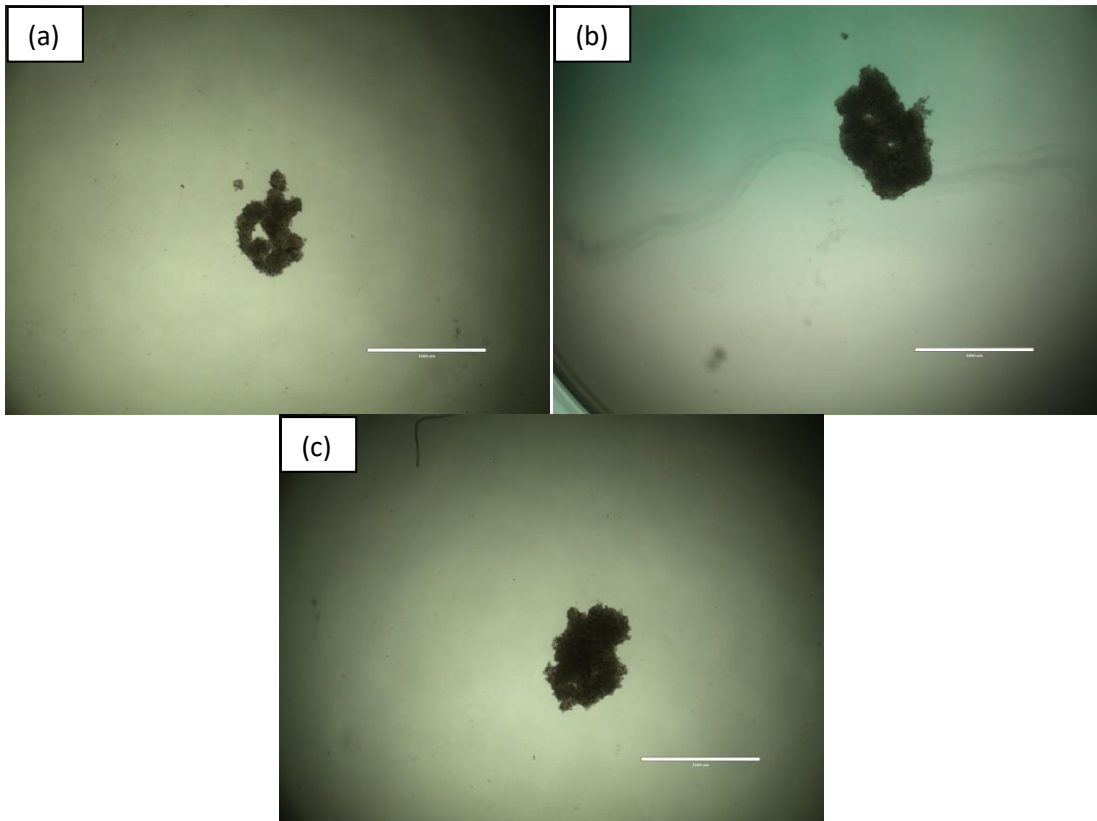
da densidade de 2000, esses agregados eram muito irregulares, e formavam mais de um por poço. E na maioria dos poços, as células se mantinham suspensas e desagregadas (**Figura 16**).

Como citado acima, na concentração de células iniciais de 2000 células/poço (**Figura 17**) com o uso de placa revestida de agarose, a eficiência deste protocolo foi bastante alta. Portanto, os demais ensaios de acompanhamento de crescimento, e de viabilidade após o tratamento com alguns compostos organocalcogênicos selecionados, foram baseados neste experimento. Os dados referentes estão descritos como artigo científico submetido à revista científica *Tumor Biology*.

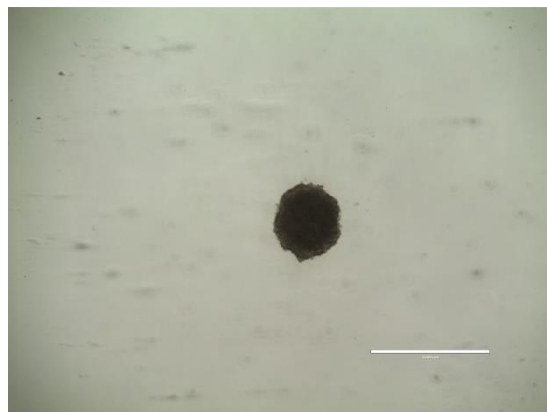
**Figura 15.** Tentativa de formação de esferóides multicelulares, em placa de fundo plano forrada com gel de agarose. Densidade inicial: 500 células (a) e (b)1000 células. Desaceleração da centrífuga: 9. . Com base na escala de 1000 $\mu$ m. Número amostral=3.



**Figura 16.** Tentativa de formação de esferóides multicelulares, em placa de fundo plano forrada com gel de agarose. Densidade inicial: 4000 células (a), 6000 células (b) e 8000(c). Desaceleração da centrífuga: 9. . Com base na escala de 1000 $\mu$ m. Número amostral=3.



**Figura 17.** Tentativa de formação de esferóides multicelulares, em placa de fundo plano forrada com gel de agarose. Densidade inicial: 2000 células. Desaceleração da centrifuga: 9. Com base na escala de 1000 $\mu$ m. Número amostral=3.



## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ❖ Abbott A. (2003) Biology 's new dimension. *Nature. News Feature.* 424: 870–872.
- ❖ Almendro V, Marusyk A, Polyak K. (2013) Cellular heterogeneity and molecular evolution in cancer. *Annu Rev Pathol-Mech,* 28: 277–302.
- ❖ Astashkina A, Mann B, Grainger DW. (2012) A critical evaluation of in vitro cell culture models for high-throughput drug screening and toxicity. *Pharmacology and Therapeutics.* 134: 82–106.
- ❖ Brody H. *Cancer.* (2014) *Nature,* 509: 49
- ❖ Chang CJ, Ashendel CL, Chan TC, Chou KM, Chang JY (2007). D-501036, a novel selenophene-based triheterocycle derivative, exhibits potent in vitro and in vivo antitumoral activity which involves DNA damage and ataxia telangiectasia-mutated nuclear protein kinase activation. *Molecular Cancer Therapeutics.* 6:1
- ❖ Da Motta LL, Ledaki I, Purshouse K, Haider S, De Bastiani MA, Baban D, Morotti M, Steers G, Wigfield S, Bridges E, Li JL, Knapp S, Ebner D, Klamt F, Harris AL, e McIntyre A. (2016) The BET inhibitor JQ1 selectively impairs tumour response to hypoxia and downregulates CA9 and angiogenesis in triple negative breast cancer. *Oncogene* 1-11..
- ❖ Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser J , Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D and Bray F. (2014) Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *International journal of cancer.* 136: 359–86.
- ❖ Friedrich J, Seidel C, Reinhard Ebner e Leoni AK-S. (2009) Spheroid-based drug screen: considerations and practical approach. *Nature Protocol.* 4: 309-324.
- ❖ Goers L, Freemont P, Polizzi KM. (2014) Co-culture systems and technologies: taking synthetic biology to the next level. *Journal of the Royal Society Interface.* 11: 1–13.
- ❖ Greaves M, Maley CC. (2012) Clonal evolution in cancer. *Nature Review* 481: 306-313 .
- ❖ Hanahan, D, Weinberg RA. (2011) Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell* 144: 646–674.
- ❖ Hirschhaeuser F, Menne H, Dittfeld C, West J, Mueller-Klieser W, Kunz-Schughart LA (2010) Multicellular tumor spheroids : An underestimated tool is catching up again. *Journal of Biotechnology* 148: 3–15.
- ❖ Instituto Nacional do Cancer. Disponível em: <[http:// https://www.inca.gov.br/numeros-de-cancer](http://https://www.inca.gov.br/numeros-de-cancer)> Acesso em 12 de Julho de 2019.
- ❖ Instituto Nacional do Cancer (b). Disponível em: <[http:// https://www.inca.gov.br/numeros-de-cancer](http://https://www.inca.gov.br/numeros-de-cancer)> Acesso em 15 de Julho de 2019.
- ❖ Jamnik S, et al. (2008) Estudo Comparativo de Fatores Prognósticos em Portadores de Carcinoma Não-Pequenas Células de Pulmão: Sobrevida Superior a Cinco Anos e Inferior a Um Ano. *Revista Brasileira de Cancerologia,* 2008, v.55 p. 5-10

- ❖ Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Murray T, Thun MJ. (2008) Cancer statistics. *CA Cancer J. Clin.* 58: 71–96.
- ❖ Kleppe M, Levine RL. (2014) Tumor heterogeneity confounds and illuminates: assessing the implications. *Nature Medicine* 4: 342–344.
- ❖ Lee GY, Kenny PA, Lee EH, Bissell MJ. (2007) Three-dimensional culture models of normal and malignant breast epithelial cells. *Nature Protocols.* 4: 359–104.
- ❖ Leonard, F, Collnot E, Lehr, CA. (2010) Three-Dimensional Coculture of Enterocytes , Monocytes and Dendritic Cells To Model Inflamed Intestinal Mucosa in Vitro. *Molecular Pharmaceutics.* 7:2103–2119.
- ❖ Luca A, Mersch R, Schmidt S, Messner I, Schafer L, Baldus SE, Huckenceck W, Piekorz R, Knoefel W, Krieg A. e Stoecklein N. (2013) Impact of the 3D microenvironment on phenotype, gene expression, and EGFR inhibition of colorectal cancer cell lines. *PloS one* 8: 59-69
- ❖ Marusyk A, Almendro V, Polyak K. (2012) Intra-tumour heterogeneity: a looking glass for cancer? *Nature Review Cancer.*12: 323–334.
- ❖ Meacham CE, Morrison SJ (2013) Tumour heterogeneity and cancer cell plasticity. *Nature.* 501: 328–337.
- ❖ Nelson CM, Bissell MJ. (2013) Modeling dynamic reciprocity: Engineering three-dimensional culture models of breast architecture, function, and neoplastic transformation. *Seminars in Cancer Biology.* 15: 342–352.
- ❖ Organização Mundial da Saúde. Disponível em: <<https://www.who.int/eportuguese/countries/bra/pt/>>. Acesso em 12 de Julho de 2019 ..
- ❖ Polyak K. (2014) Tumor heterogeneity confounds and illuminates: a case for Darwinian tumor evolution. *Nat Med* 20: 344–346.
- ❖ Prestwich GD. (2008) Evaluating drug efficacy and toxicology in three dimensions: using synthetic extracellular matrices in drug discovery. *Accounts of chemical research.* 41: 139–148.
- ❖ Phung YT, Barbone D, Broaddus VC, Ho M. (2011) Rapid generation of in vitro multicellular spheroids for the study of monoclonal antibody therapy. *J Cancer.* 2: 507–514.
- ❖ Sharma SV, Settleman J. (2009) ErbBs in lung cancer. *Exp Cell Res.* 31: 557-571.
- ❖ Talukdar S, Mandal M, Hutmacher DW, Russell PJ, Soekmadji C, Kundu SC. (2011) Engineered silk fibroin protein 3D matrices for in vitro tumor model. *Biomaterials.* 32: 2149–2159.
- ❖ Wenzel C, Riefke B, Gründemann S, Krebs A, Christian S, Prinz F, Osterland M, Golfier S, Råse S, Ansari N, Esner M, Bickle M, Pampaloni F, Mattheyer C, Stelzer E, Parczyk K, Pechtl S e Steigemann P. (2014) 3D high-content screening for the identification of compounds that target cells in dormant tumor spheroid regions. *Experimental cell research.* 323: 131–143.

- ❖ Zanoni M, Piccinini F, Arienti C, Zamagni A, Santi S, Polico R, Bevilacqua A e Tesei A. (2016). 3D tumor spheroid models for in vitro therapeutic screening : a systematic approach to enhance the biological relevance of data obtained. *Nature Scientific Reports*. 6: 1–11.
- ❖ Zietarska M, Maugard CM, Filali-Mouhim A, Alam-Fahmy M, Tonin PN, Provencher DM, Mes-Masson AM. (2007) Molecular Description of a 3D In Vitro Model for the Study of Epithelial Ovarian Cancer (EOC). *Molecular Carcinogenesis*. 46: 72–88



## ARTIGO SUBMETIDO À REVISTA CHEMICO-BIOLOGICAL INTERACTIONS.



Fábio Klamt &lt;klamtf@gmail.com&gt;

---

**Successfully received: submission SCREENING OF SYNTHETIC  
ORGANOCHALCOGEN COMPOUNDS WITH ANTITUMORAL ACTIVITY USING  
HUMAN LUNG ADENOCARCINOMA SPHEROIDS for Chemico-Biological  
Interactions**

1 mensagem

---

Chemico-Biological Interactions <EvisSupport@elsevier.com>  
Responder a: cbi@elsevier.com  
Para: klamtf@gmail.com

16 de dezembro de 2019 15:32

*This message was sent automatically.*

Ref: CHEMBIOINT\_2019\_1933

Title: SCREENING OF SYNTHETIC ORGANOCHALCOGEN COMPOUNDS WITH ANTITUMORAL ACTIVITY  
USING HUMAN LUNG ADENOCARCINOMA SPHEROIDS

Journal: Chemico-Biological Interactions

Dear Dr. Klamt,

Thank you for submitting your manuscript for consideration for publication in Chemico-Biological Interactions. Your submission was received in good order.

To track the status of your manuscript, please log into EVISE® at: [http://www.evise.com/evise/faces/pages/navigation/NavController.jspx?JRNL\\_ACR=CHEMBIOINT](http://www.evise.com/evise/faces/pages/navigation/NavController.jspx?JRNL_ACR=CHEMBIOINT) and locate your submission under the header 'My Submissions with Journal' on your 'My Author Tasks' view.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Chemico-Biological Interactions

**Have questions or need assistance?**

For further assistance, please visit our [Customer Support](#) site. Here you can search for solutions on a range of topics, find answers to frequently asked questions, and learn more about EVISE® via interactive tutorials. You can also talk 24/5 to our customer support team by phone and 24/7 by live chat and email.

---

Copyright © 2018 Elsevier B.V. | [Privacy Policy](#)

Elsevier B.V., Radarweg 29, 1043 NX Amsterdam, The Netherlands, Reg. No. 33156677.

Title:

SCREENING OF SYNTHETIC ORGANOCHALCOGEN COMPOUNDS WITH  
ANTITUMORAL ACTIVITY USING HUMAN LUNG ADENOCARCINOMA  
SPHEROIDS

Authors:

Jéssica Eduarda dos Santos Batista<sup>1,2,3</sup>; Mariele Borkowski Rodrigues<sup>4</sup>; Ivi Juliana Bristot<sup>2,3</sup>; Silvia Bernardy<sup>4</sup>; Oscar Endrigo Dorneles Rodrigues<sup>4</sup>; Luciano Dornelles<sup>4</sup>; Fábio Klamt<sup>2,3\*</sup> and Félix Alexandre Antunes Soares<sup>1</sup>

Affiliations:

<sup>1</sup>Department of Biochemistry and Molecular Biology, Federal University of Santa Maria (UFSM), Santa Maria (RS), 97105-900, Brazil;

<sup>2</sup>Laboratory of Cellular Biochemistry, Department of Biochemistry, Institute of Basic Health Sciences (ICBS), Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre (RS), 90035-003, Brazil;

<sup>3</sup>National Institutes of Science and Technology–Translational Medicine (INCT-TM) Brazil;

<sup>4</sup>Department of Chemistry, Federal University of Santa Maria (UFSM), Santa Maria (RS), 97105-900, Brazil.

\*Corresponding author:

Prof. Fábio Klamt, PhD, Laboratory of Cellular Biochemistry, Department of Biochemistry, Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), 2600 Ramiro Barcelos St, Porto Alegre (RS) Brazil 90035-003. Phone: +55 51 3308-5556; Fax: +55 51 3308-5535; e-mail: [fabio.klamt@ufrgs.br](mailto:fabio.klamt@ufrgs.br)

## Abstract

Lung adenocarcinoma is the major cause of cancer-related deaths worldwide, and existing therapies remains unsatisfactory. Since high levels of oxidative markers are related to cancer

aggressiveness (multidrug resistance and metastatic potential), and can predict poor outcome of lung adenocarcinoma patients, any compounds or drugs that interfere with their aberrant redox biology should be rationally explored as novel interventional regimens. This study was designed to screen potential anticancer activities in nine new synthetic organochalcogen compounds – molecules with oxygen (O), sulfur (S), or selenium (Se) elements in their structure with antioxidant activity – and compared their performance with cisplatin, the therapeutic foundation of lung adenocarcinoma patients. We first determined the best condition to establish single tumor spheroids using A549 human lung adenocarcinoma cell line. Four days *in vitro* (DIV) was an initiation interval for spheroid formation. These single spheroids were able to growth during 20 DIV, and toxic dose response curves were obtained for each compound for 24 and 48 h of incubation. We demonstrate that at least two of the synthetic organochalcogen compounds tested presented anticancer activity with better performance (*i.e.* lower LD<sub>50</sub>, higher activity area and maximum amplitude of effect) as compared to cisplatin, and are promising for futures studies in the treatment of lung adenocarcinomas.

*Key-words:* tumor spheroids; anticancer agents; organochalcogen; drug screening; lung adenocarcinoma.

## **1. Introduction**

Lung adenocarcinomas are the major cause of cancer-related deaths in the world (1). Since most of the cases are diagnosed with advanced pathologic (p)-stages of disease, curative pulmonary resection is no longer a therapeutic option and multimodality treatment became the

indicative management of the disease. However, the effect of current therapies in improving patients survival remains far from satisfactory and reflects the poor prognosis, with a 5-year survival of 49% for early stages and less than 2% for advanced stages (2). Therefore, there is an urgent need for more effective therapies, drugs, or treatments that could help increase the overall survival of lung cancer patients. Indeed, compounds or drugs that interfere with any aberrant pathways or pathophysiological processes known to be altered in lung adenocarcinomas should be rationally explored in order to identify potential adjuvant strategies or novel interventional regimens.

In many malignancies, footprints of oxidative damage, the markers of the imbalance between oxidants and antioxidants, act as endogenous drivers of the oncogenic phenotype, by the modulation of cellular proliferation, migration, survival, and multidrug resistance (3). The presence of oxidative stress in lung adenocarcinomas has received increasing attention, specifically because these types of cancers are able to grow in a highly oxidative environment derived from the combination of atmospheric oxygen pressure and cigarette smoke / air pollutants, in combination with the bulk amount of reactive species generated by pro-inflammatory cells in the pulmonary circulation (4–7). All of which are believed to contribute to tumor progression and metastasis (3). Moreover, clinical data have shown that lung cancer patients have increased oxidative stress markers in the blood (8), epithelium lining fluid, breath condensate and tumor biopsies (9–11), and the inadequate ingest of antioxidants constitutes a risk factor for lung cancer development (12). More important, an imbalance in antioxidant mechanisms plays a significant role in the pathogenesis of lung adenocarcinomas, where high levels of oxidative markers are related to tumor aggressiveness (multidrug resistance and metastatic potential) and can predict poor outcome of early-stage lung adenocarcinoma patients (13).

Several strategies have been proposed to use the presence of oxidative stress in cancer cells to selectively target tumors without damaging healthy tissue; nonetheless, it is surprising that no antioxidant drug or intervention has been successfully translated to the oncologic clinical setting yet (3). While several proposed antioxidants target reactive oxygen species (ROS) levels in cells indiscriminately, various compounds have been developed that are able to modulate the existing intracellular redox balance via catalysis. A catalytic process combines high efficiency with selectivity, because it requires not only a suitable catalyst but also the presence of an appropriate substrate(s) (14). Several reports have confirmed the notion of redox catalysts as effective (and selective) agents able to kill cancer cells (15). One example of these molecules are synthetic organochalcogen compounds. This class of molecules is known as Glutathione peroxidase (GPx) mimetics, which target redox sensitive thiol proteins and enzymes. In the presence of elevated levels of ROS, these chalcogen-based catalysts turn toxic against a range of tumoral cells *in vitro* (16,17). This study was designed to screen *in vitro* between new synthetic organochalcogens compounds to select the most eligible ones for further anticancer therapies. For this purpose, we used single A549 human lung adenocarcinoma spheroids as *in vitro* model, and utilized cisplatin-treated spheroids as cytotoxic parameter. Our data demonstrate that at least two different organochalcogen tested (compound #3 and #9) (Fig. 1) present a better anticancer activity as compared to cisplatin (*i.e.* lower LD<sub>50</sub>, higher activity area and maximum amplitude of effect), and are promising candidates for further investigations for lung adenocarcinoma therapeutic management.

## **2. Methods**

### **2.1 Cell culture**

The A549 human lung adenocarcinoma cell line (CLL 185) was obtained from the American Tissue Culture Collection (ATCC™, Rockville, MD). Exponentially growing cells were

cultured using RPMI 1640 medium (Gibco®), supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (Gibco®), penicillin (100 IU/mL), streptomycin (100 µg/mL) and amphotericin B (0.25 µg/mL) (Sigma Aldrich™), and maintained in a humidified atmosphere at 37°C containing 5% CO<sub>2</sub>.

## **2.2 Single tumoral spheroids formation**

Single lung adenocarcinoma spheroids were generated in 96-well plates with a flat surface, as described (18). Briefly, 50 µL of sterile agarose solution (1,5% of agarose diluted in 1X PBS, pH 7.4, and autoclaved for 20 minutes) was added to each well to form a concave surface. After enzymatic dissociation of A549 cells cultured in monolayer with trypsin, 200 µL of the medium was added to each 96-wells, with a density of 2,000 cells/well, and centrifuged for 10 minutes at 1,000g(18). Plates were kept in incubators at 37°C and 5% CO<sub>2</sub> for 4 days for the initial establishment of single spheroid per 96-well. Then spheroids were maintained for 20 days to perform the morphometric analysis and viability assay.

## **2.3 Image acquisition and Growth curve**

Images of single spheroids were acquired every 4 days over 20 days *in vitro* (DIV) using an inverted microscope (EVOS xl Core, AMG, Waltham, MA, USA) with a magnification of 40X, and spheroid growth was monitored using a plugin on ImageJ software.

## **2.4 Compounds treatments**

The organochalcogens compounds were synthesized in the Department of Chemistry, Federal University of Santa Maria (UFSM)/Brazil, and available for toxicity assays. Two new series of 1,2,3-triazoles-1,4-disubstituted obtained by the reaction of 1,3-dipolar cycloaddition, were synthesized between the alkaloids derived from benzochalcogenoanilines and the azides of 1,3-chalcogenazoles-2-substituted with the objective of joining three classes of interesting heterocyclic compounds, as previously described (19). The compounds (#1 to 9) (Fig. 1) and

cisplatin (Sigma Aldrich™) were diluted in ultrapure, cell culture grade, DMSO (Sigma Aldrich™) at the concentrations of 6.25  $\mu\text{M}$ ; 12.5  $\mu\text{M}$ ; 25  $\mu\text{M}$  and 50  $\mu\text{M}$ , and single spheroids were treated at 12<sup>th</sup> DIV for further 24h or 48h to obtain dose response curves (Fig. 2). Data of control group was obtained using only the culture medium. The vehicle (DMSO) never exceeded the final concentration of 0.01%, and exhibited no significant difference when compared to the control group (data not shown).

## 2.5 Viability assay

To evaluate cytotoxic dose response curves of compounds against the single spheroids, cellular viability was evaluated by the quantification of 3-(4,

5-dimethylthiazole-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT) reduction to a blue formazan crystals by cellular dehydrogenases (20). Before the addition of MTT solution to determine spheroids' viability, treated spheroids were transferred to a new non-coated 96-wells plate, eliminating the interference of agarose on the spectrophotometric reading. Twenty  $\mu\text{L}$  of 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  MTT solution was added directly the wells and then the plates were incubated for additional 4 hours in an incubator at 37°C and 5%  $\text{CO}_2$ . After that, plates were centrifuged at 1,000g for 5 min, followed by the aspiration of the media (150  $\mu\text{L}$ ) and addition of 100  $\mu\text{L}$  of DMSO in each well. Finally, absorbance was measured at 560 and 630 nm (20) and results are presented as percentage of untreated (control) spheroids.

## 2.6 Statistical analysis

Experiments were performed 3 to 6 times ( $n = 3 - 6$ ), each one in triplicate. Data were expressed as mean  $\pm$  standard deviation (SD). The significant differences were determined by one-way ANOVA (for spheroids growth experiments) or Student's *t* test when comparing

each compound means with cisplatin, and considered significant when  $p < 0.05$ . Statistical analyses were performed using the GraphPad® Prism 6 software.

### 3. Results

#### 3.1 Spheroids formation, Growth curves and Drugs screen

In this work, we first intended to establish a spheroid-based screen with clear pathophysiological gradients at the onset of treatment, and challenge them with different synthetic organochalcogens (compound #1 to 9) (Fig. 1). Four days *in vitro* as an initiation interval for spheroid formation was found to reproducibly create a single spheroid per well of A549 human lung adenocarcinoma cell line, with a success rate of 90 to 100% per experiment (data not show). The obtained single spheroids present an average diameter of 150  $\mu\text{m}$  that were able to growth to 220  $\mu\text{m}$  after 20 DIV (Fig. 2). Since the culture of small spheroids with a size of up to 200  $\mu\text{m}$  is frequently carried out for drug testing and may indeed be sufficient to reflect 3D cell-cell and cell-matrix interactions (21–23), we challenged them at the 12<sup>th</sup> DIV with new synthetic organochalcogens for further 24 or 48 h of incubation to screen for anticancer activity, and compared their performance with cisplatin (Fig. 3).

The dose response curves of synthetic organochalcogen compounds are exhibited in Figure 4, demonstrating that the growth inhibition was carried out in time and concentration-dependent manner. Data of lethal dose 50 ( $\text{LD}_{50}$ ), maximum amplitude of effect ( $A_{\text{max}}$ ), and activity area for each treatment were derived from Figure 4 and presented in Table 1. Bold data represent the better performance of compounds as compared to cisplatin (Table 1). All compounds tested were able to decrease the spheroids viability, even in the lower concentrations, compared to the control group ( $p < 0.05$ ). Cisplatin and all organochalcogen compounds (#1 to 9) depict  $\text{LD}_{50}$  values lower than 20  $\mu\text{M}$  after 48h of treatment against the single A549 human lung adenocarcinoma spheroids.



Our data demonstrate that at least two of the synthetic organochalcogen compounds tested (#3 and 9) presented anticancer activity with better performance (*i.e.* lower LD<sub>50</sub>, higher activity area and maximum amplitude of effect) as compared to cisplatin, and are promising for futures studies in the treatment of lung adenocarcinomas.

#### 4. Discussion

Platinum-based chemotherapy such as cisplatin, carboplatin, or oxaliplatin and usually given in combination with other agents such as paclitaxel and etoposide, is the therapeutic foundation of treatment both in the metastatic and adjuvant setting of lung adenocarcinoma patients (24). DNA double-strand breaks are reported as the main mechanism of action of cisplatin, leading to inhibition of replication and consequent cell death (25). Despite all the advances in chemotherapy, many patients still acquire drug resistance. Although this cancer treatment is effective in some cases, in advanced stages the conventional treatment is ineffective and there is no treatment option currently.

Synthetic organochalcogens have been documented as promising pharmacological agents against a number of diseases associated with oxidative stress(26),and considering their potential pharmaceutical applications, became critical points in tumor prevention and therapeutic studies (27–30). Organochalcogen compounds have been extensively studied and reported as anticancer agents able to inhibit cell proliferation and to induce death of cancer cells (15,36,41). These molecules have several features that support their potential role in the management of cancer cells, such as their low-molecular weight, high antioxidant potential with high availability and hydrophobicity, all qualities that improve its therapeutic potential (33). Even though promising, most of these studies focusing on new anticancer drug screening were performed using two-dimensional (monolayer) cell culture models, although they fail to reproduce physiological characteristics found *in vivo* (34,35).

There is a great interest in the development of cell culture models that more accurately reproduce *in vitro* pathophysiological features found *in vivo*, allowing the study of anticancer drugs on tumor cell behavior. In this context, tridimensional (3D) cell cultures (also known as multicellular tumor spheroids) have attracted attention as an important research tool in basic and applied research. Compared to solid tumors, multicellular spheroids have similarities in cell heterogeneity, morphology and functional characteristics. *In vitro* 3D culture systems show intermediate complexity reflecting particular aspects of tumor tissues, and better simulates pathophysiological milieu in a patient tumor showing similar therapy responses (such as the chemoresistance found in solid tumors). According to Sutherland (1988) (36), multicellular tumor spheroids have an early phase of cell growth, characterized by cell aggregation and proliferation with the formation of desired 3D cell-cell and cell-matrix interactions, followed by a stationary phase, that represents the cell nonproliferation, occurring the formation of a nucleus with necrotic characteristics, as seen in solid tumors. This happens due to the size of the spheroid, once the adequate arrival of nutrients and oxygen to the spheroid nucleus is difficult, affecting the cell viability in the central layers (34,37). The spheroids sizes are directly related to viability, so the establishment of a correct protocol that could reproduce a growth pattern is fundamental for the spheroids. One of the pioneering studies in this area has shown that the tendency of spheroid diameter from tumor lineages tends to increase and may reach 800  $\mu\text{m}$  (38). In our data, the average diameter of the spheroids was approximately 150  $\mu\text{m}$  on the 4<sup>th</sup> DIV, reaching 220  $\mu\text{m}$  on the 20<sup>th</sup> DIV. Using single tumor spheroid model *in vitro* is a better way to easily screen between new compounds with potential *in vivo* application, making this type of cell culture a better tool for evaluating the efficacy of new drugs with possible anticancer properties (39,40). To our best knowledge, this is the first time that synthetic organochalcogen compounds were screened for anticancer activity using single tumor spheroids.

From structure-activity relationship perspective compounds **3** and **9** show two structural differences in the triazole unit: 1) the presence of a thiazole ring at position 1 and a disubstituted amine at position 4; (ii) the presence of a selenazole ring at position 1 and a trisubstituted amine at position 4. These two particulars might play crucial roles for the observed activity differences, that is, the presence of chalcogen (sulfur or selenium) in the heterocycle structure.

Our data demonstrate that the proposed model is effective for drug screening assays, and the compounds used are strong candidates as potential therapeutic agents in the treatment of lung cancer. Thereby, it seems plausible that imbalance in redox metabolism is pivotal to lung adenocarcinoma malignancy, and besides the positive outcome obtained here for compound #3 and 9 when compared to cisplatin, future studies should focus on the specific mechanism of redox imbalances that the synthetic organochalcogens are interfering for the improvement of cancer therapy.

### **Acknowledgments**

This study was supported by the Brazilian funds MCTI/CNPq INCT-TM/CAPES/FAPESP (465458/2014-9), CNPq/MS/SCTIE/DECIT (466989/2014-8), MCTI/CNPQ/CBAB (465113/2014-1), and PRONEX/FAPERGS (16/2551-0000499-4). FK received a fellowship from MCT/CNPq (306439/2014-0). F.A.A.S received a fellowship from CNPq and CNPq/FAPERGS/PRONEM.

### **References**

1. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36

- cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 2018;68(6):394–424.
2. Miller KD, Nogueira L, Mariotto AB, Rowland JH, Yabroff KR, Alfano CM, et al. Cancer treatment and survivorship statistics, 2019. *CA Cancer J Clin.* 2019; 69(5):363–85.
  3. Sotgia F, Martinez-Outschoorn UE, Lisanti MP. Mitochondrial oxidative stress drives tumor progression and metastasis: should we use antioxidants as a key component of cancer treatment and prevention? *BMC Med.* 2011;9:62.
  4. Ho JC, Chan-Yeung M, Ho SP, Mak JC, Ip MS, Ooi GC, et al. Disturbance of systemic antioxidant profile in nonsmall cell lung carcinoma. *Eur Respir J.* 2007; 29(2):273–8.
  5. Melloni B, Lefebvre MA, Bonnaud F, Vergnenègre A, Grossin L, Rigaud M, et al. Antioxidant activity in bronchoalveolar lavage fluid from patients with lung cancer. *Am J Respir Crit Care Med.* 1996; 154 1706–11.
  6. Esme H, Cemek M, Sezer M, Saglam H, Demir A, Melek H, et al. High levels of oxidative stress in patients with advanced lung cancer. *Respirology.* 2008;13(1):112–6.
  7. Chan HP, Tran V, Lewis C, Thomas PS. Elevated levels of oxidative stress markers in exhaled breath condensate. *J Thorac Oncol.* 2009; 4(2):172–8.
  8. Kaynar H, Meral M, Turhan H, Keles M, Celik G, Akcay F. Glutathione peroxidase, glutathione-S-transferase, catalase, xanthine oxidase, Cu-Zn superoxide dismutase activities, total glutathione, nitric oxide, and malondialdehyde levels in erythrocytes of patients with small cell and non-small cell lung cancer. *Cancer Lett.* 2005; 227(2):133–9.
  9. Jaruga P, Zastawny TH, Skokowski J, Dizdaroglu M, Olinski R. Oxidative DNA base damage and antioxidant enzyme activities in human lung cancer. *FEBS Lett.* 1994;

- 341(1):59–64.
10. Coursin DB, Cihla HP, Sempf J, Oberley TD, Oberley LW. An immunohistochemical analysis of antioxidant and glutathione S-transferase enzyme levels in normal and neoplastic human lung. *Histol Histopathol.* 1996; 11(4):851–60.
  11. Blair SL, Heerdt P, Sachar S, Abolhoda A, Hochwald S, Cheng H, et al. Glutathione metabolism in patients with non-small cell lung cancers. *Cancer Res.* 1997;57(1):152–5.
  12. Brennan P, Fortes C, Butler J, Agudo A, Benhamou S, Darby S, et al. A multicenter case-control study of diet and lung cancer among non-smokers. *Cancer Causes Control.* 2000;11(1):49–58.
  13. Lisbôa da Motta L, Müller CB, De Bastiani MA, Behr GA, França FS, da Rocha RF, et al. Imbalance in redox status is associated with tumor aggressiveness and poor outcome in lung adenocarcinoma patients. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2014 ;140(3):461–70.
  14. Doering M, Ba LA, Lilienthal N, Nicco C, Scherer C, Abbas M, et al. Synthesis and selective anticancer activity of organochalcogen based redox catalysts. *J Med Chem.* 2010;53(19):6954–63.
  15. Alexandre J, Nicco C, Chéreau C, Laurent A, Weill B, Goldwasser F, et al. Improvement of the therapeutic index of anticancer drugs by the superoxide dismutase mimic mangafodipir. *J Natl Cancer Inst.* 2006 ;98(4):236–44.
  16. Giles GI, Giles NM, Collins CA, Holt K, Fry FH, Lowden PAS, et al. Electrochemical, in vitro and cell culture analysis of integrated redox catalysts: implications for cancer therapy. *Chem Commun (Camb).* 2003;(16):2030–1.
  17. Fry FH, Holme AL, Giles NM, Giles GI, Collins C, Holt K, et al. Multifunctional

- redox catalysts as selective enhancers of oxidative stress. *Org Biomol Chem*. 2005;(14):2579–87.
18. Friedrich J, Seidel C, Ebner R, Kunz-Schughart LA. Spheroid-based drug screen: Considerations and practical approach. *Nat Protoc*. 2009;4(3):309–24.
  19. Rodrigues MB. Síntese e avaliação biológica de 1,2,3-triazóis-1,4 dissubstituídos derivados de benzocalcogenoanilinas e 2-aryl-4-(azidometil)-1,3-calcozenazóis. 2019, p.241 Available from: [https://repositorio.ufsm.br/bitstream/handle/1/18709/TES\\_PPGQUIMICA\\_2019](https://repositorio.ufsm.br/bitstream/handle/1/18709/TES_PPGQUIMICA_2019)
  20. Ho WY, Yeap SK, Ho CL, Rahim RA, Alitheen NB. Development of Multicellular Tumor Spheroid (MCTS) Culture from Breast Cancer Cell and a High Throughput Screening Method Using the MTT Assay. *PLoS One*. 2012;7(9).
  21. Fehlaue F, Muench M, Rades D, Stalpers LJA, Leenstra S, van der Valk P, et al. Effects of irradiation and cisplatin on human glioma spheroids: inhibition of cell proliferation and cell migration. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2005;131(11):723–32.
  22. [Lambert B](#), [De Ridder L](#), [Slegers G](#), [De Gelder V](#), [Dierckx RA](#), [Thierens H](#). Screening for supra-additive effects of cytotoxic drugs and gamma irradiation in an in vitro model for hepatocellular carcinoma. [Can J Physiol Pharmacol](#). 2004; 82(2):146-52
  23. Enmon R, Yang W-H, Ballangrud AM, Solit DB, Heller G, Rosen N, et al. Combination treatment with 17-N-allylamino-17-demethoxy geldanamycin and acute irradiation produces supra-additive growth suppression in human prostate carcinoma spheroids. *Cancer Res*. 2003; 63(23):8393–9.
  24. Molina JR, Yang P, Cassivi SD, Schild SE, Adjei AA. Non-small cell lung cancer: Epidemiology, risk factors, treatment, and survivorship. In: *Mayo Clinic Proceedings*.

- Elsevier, 2008 May;83(5):584-94.
25. Jekimovs C, Bolderson E, Suraweera A, Adams M, O'Byrne KJ, Richard DJ. Chemotherapeutic compounds targeting the DNA double-strand break repair pathways: The good, the bad, and the promising. Vol. 4 APR, *Frontiers in Oncology*. Frontiers Research Foundation; 2014.
  26. Ibrahim M, Prigol M, Hassan W, Nogueira CW, Rocha JBT. Protective effect of binaphthyl diselenide, a synthetic organoselenium compound, on 2-nitropropane-induced hepatotoxicity in rats. *Cell Biochem Funct*. 2010 ;28(4):258–65.
  27. De Souza D, Mariano DOC, Nedel F, Schultze E, Campos VF, Seixas F, et al. New organochalcogen multitarget drug: Synthesis and antioxidant and antitumoral activities of chalcogenozidovudine derivatives. *J Med Chem*. 2015 23;58(8):3329–39.
  28. Díaz M, González R, Plano D, Palop JA, Sanmartín C, Encío I. A diphenyldiselenide derivative induces autophagy via JNK in HTB-54 lung cancer cells. *J Cell Mol Med*. 2018;22(1):289–301.
  29. Yadlapalli RK, Chourasia OP, Vemuri K, Sritharan M, Perali RS. Synthesis and in vitro anticancer and antitubercular activity of diarylpyrazole ligated dihydropyrimidines possessing lipophilic carbamoyl group. *Bioorganic Med Chem Lett*. 2012;22(8):2708–11.
  30. Agbaje OC, Fadeyi OO, Fadeyi SA, Myles LE, Okoro CO. Synthesis and in vitro cytotoxicity evaluation of some fluorinated hexahydropyrimidine derivatives. *Bioorganic Med Chem Lett*. 2011;21(3):989–92.
  31. Cao S, Durrani FA, Rustum YM. Selective modulation of the therapeutic efficacy of anticancer drugs by selenium containing compounds against human tumor xenografts.

- Clin Cancer Res. 2004;10(7):2561–9.
32. Da Rosa RM, Piccoli BC, Da Silva FDA, Dornelles L, Rocha JBT, Sonogo MS, et al. Synthesis, antioxidant and antitumoral activities of 5'-arylchalcogeno-3-aminothymidine (ACAT) derivatives. *Medchemcomm*. 2017;8(2):408–14.
  33. Selamoglu Talas Z, Ozdemir I, Yilmaz I, Gok Y, Orun I. The investigation of the antioxidative properties of the novel synthetic organoselenium compounds in some rat tissues. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2008; 233(5):575–9.
  34. Wenzel C, Riefke B, Gründemann S, Krebs A, Christian S, Prinz F, et al. 3D high-content screening for the identification of compounds that target cells in dormant tumor spheroid regions. *Exp Cell Res*. 2014;323(1):131–43.
  35. Mehta G, Hsiao AY, Ingram M, Luker GD, Takayama S. Opportunities and challenges for use of tumor spheroids as models to test drug delivery and efficacy. *J Control Release*. 2012;164(2):192–204.
  36. Sutherland RM. Cell and environment interactions in tumor microregions: The multicell spheroid model. Vol. 240, *Science*. 1988. 240(4849):177-84
  37. Rama-Esendagli D, Esendagli G, Yilmaz G, Guc D. Spheroid formation and invasion capacity are differentially influenced by co-cultures of fibroblast and macrophage cells in breast cancer. *Mol Biol Rep*. 2014;41(5):2885–92.
  38. Yuhas JM, Li AP, Martinez AO, Ladman AJ. A Simplified Method for Production and Growth of Multicellular Tumor Spheroids. *Cancer Res*. 1977;37(10):3639–43.
  39. Chen W, Wong C, Vosburgh E, Levine AJ, Foran DJ, Xu EY. High-throughput image analysis of tumor spheroids: A user-friendly software application to measure the size of spheroids automatically and accurately. *J Vis Exp*. 2014;(89):1–10.



40. Santini MT, Rainaldi G. Three-dimensional spheroid model in tumor biology. *Pathobiology*;67(3):148–57.

**Figure Legends:**

**Figure 1:** Structure of the synthetic organochalcogens evaluated in this study. They were derived from two new series of 1,2,3-triazoles-1,4-disubstituted obtained by the reaction of 1,3-dipolar cycloaddition, were synthesized between the alkaloids derived from benzocalcogenoanilines and the azides of 1,3-chalcogenazoles-2-substituted.

**Figure 2:** Routine monitoring of single spheroid formation and growth for A549 human lung adenocarcinoma cell line. Exponentially growing cells were dissociated, harvested, counted, and plated on flat, agarose-coated, 96-well plates with a seeding density of  $2 \times 10^3$  cells/well in 200 mL of 10% serum-conditioned RPMI medium. After a 96h initiation interval time for single spheroid formation, they were left to growth until 20 days *in vitro* (DIV). With this cell density, we were able to routinely and reproducibly obtain single spheroids with a diameter of 150 to 220  $\mu\text{m}$ . Insert boxes: Phase-contrast images of single A549 human lung adenocarcinoma spheroid formed after 4 (left) and 20 DIV (right). Original magnification, X40 objective. Size bar: 50  $\mu\text{m}$ .

**Figure 3:** Lethal dose curves after 24 and 48 h of treatment with cisplatin against A549 human lung adenocarcinoma single spheroids, where: (a) model of plot curve and main parameters evaluated; (b) 24 h and (c) 48 h of treatment. Data represent mean  $\pm$  SD of four independent experiments ( $n = 4$ ) performed in triplicates.

**Figure 4:** Lethal dose curves after 24 (top) and 48 h (down) of treatment with organochalcogen compounds against A549 human lung adenocarcinoma single spheroids: (a)

compound 1; (b) compound 2; (c) compound 3; (d) compound 4; (e) compound 5; (f) compound 6; (g) compound 7; (h) compound 8 and (i) compound 9. Data represent mean  $\pm$  SD of four independent experiments (n = 4) performed in triplicates.

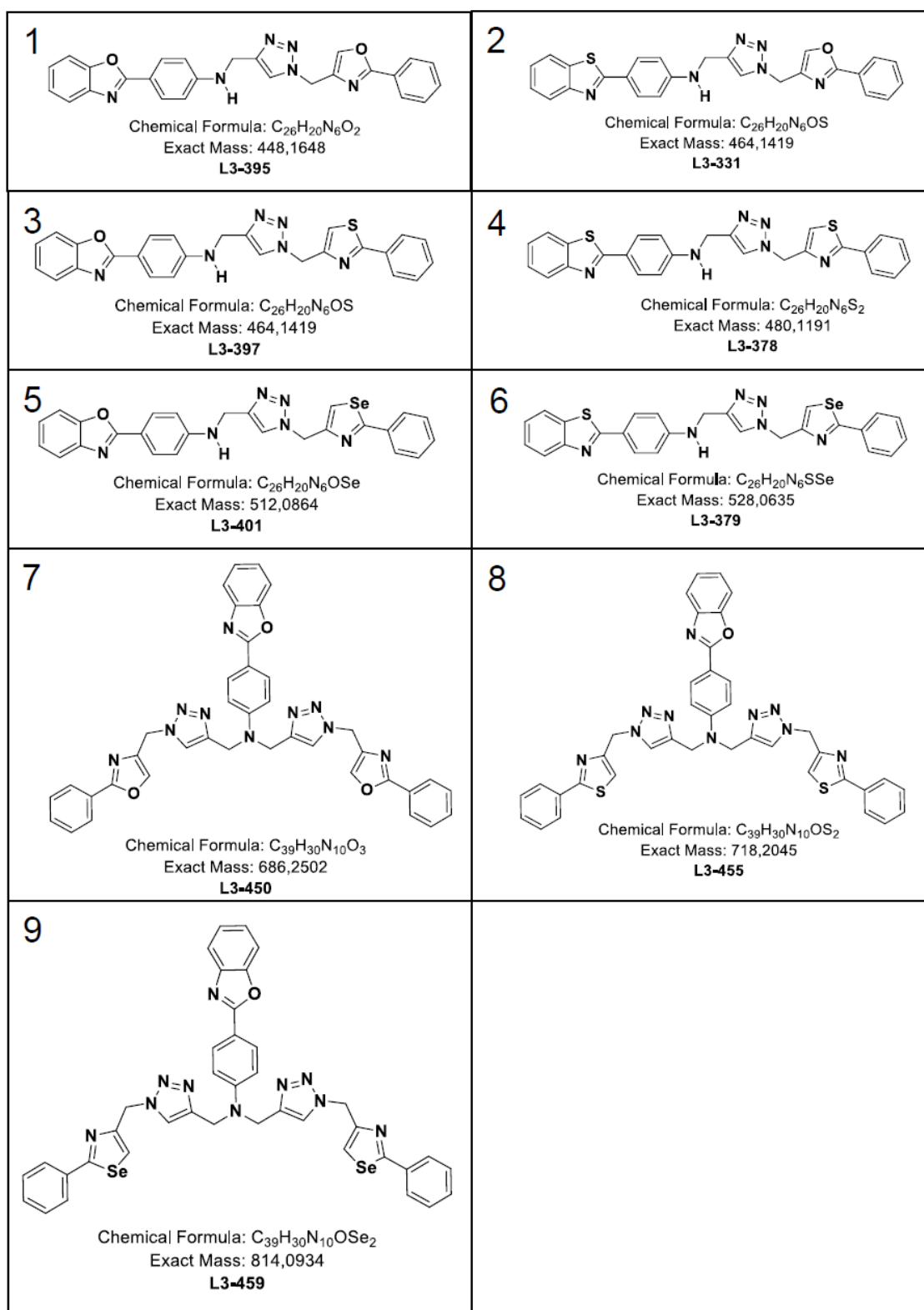


Figure 1

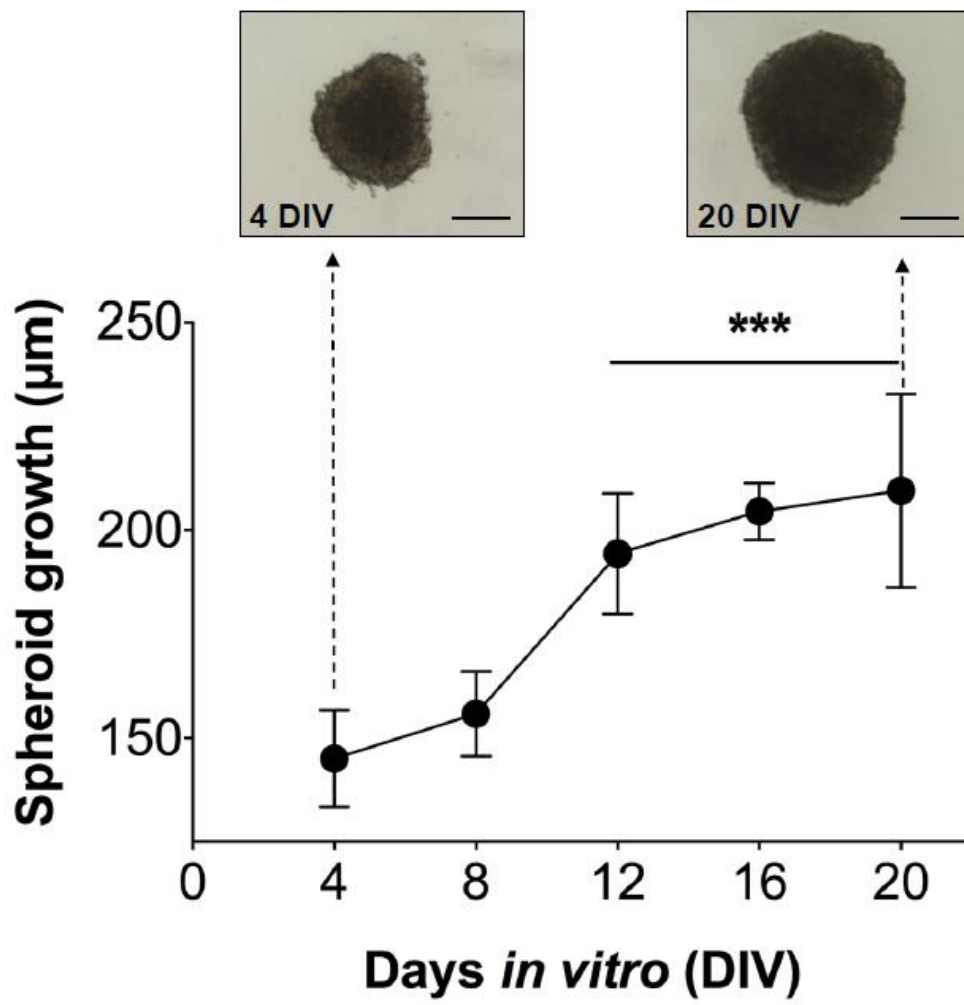


Figure 2

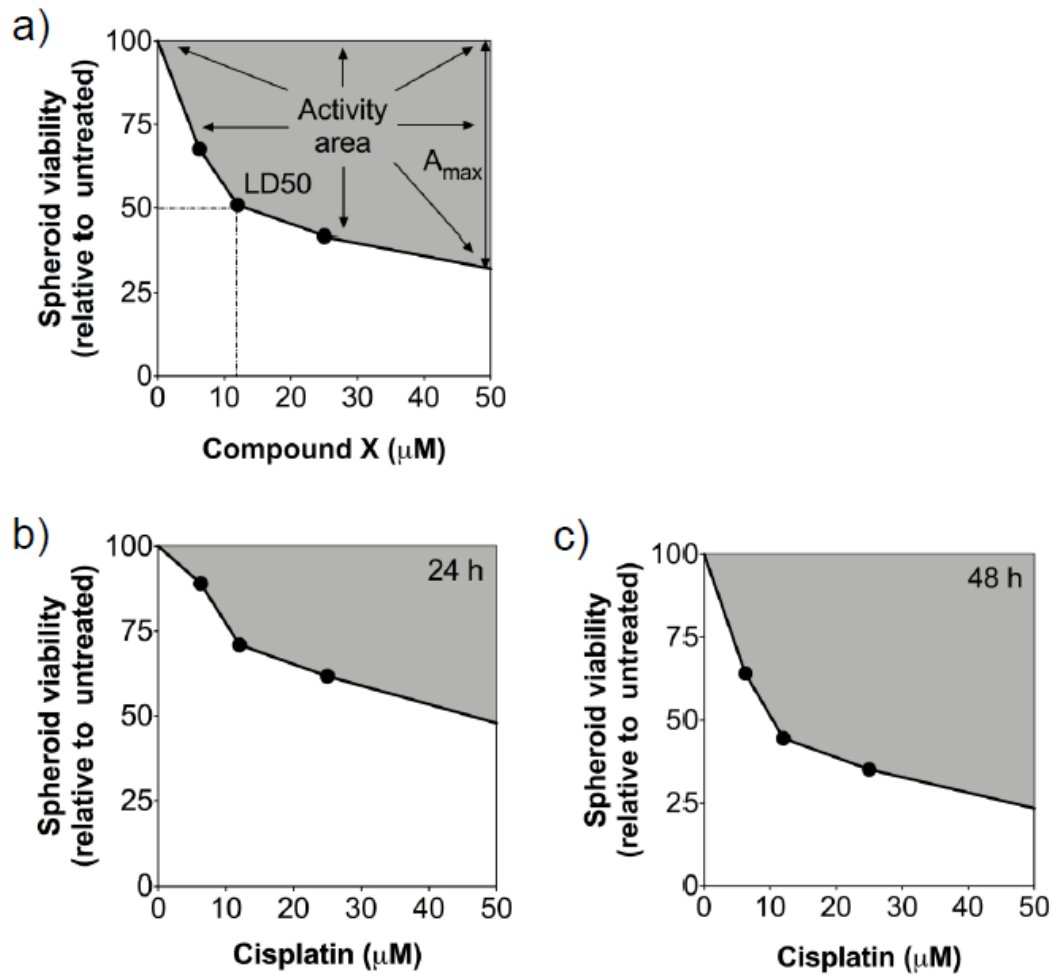


Figure 3

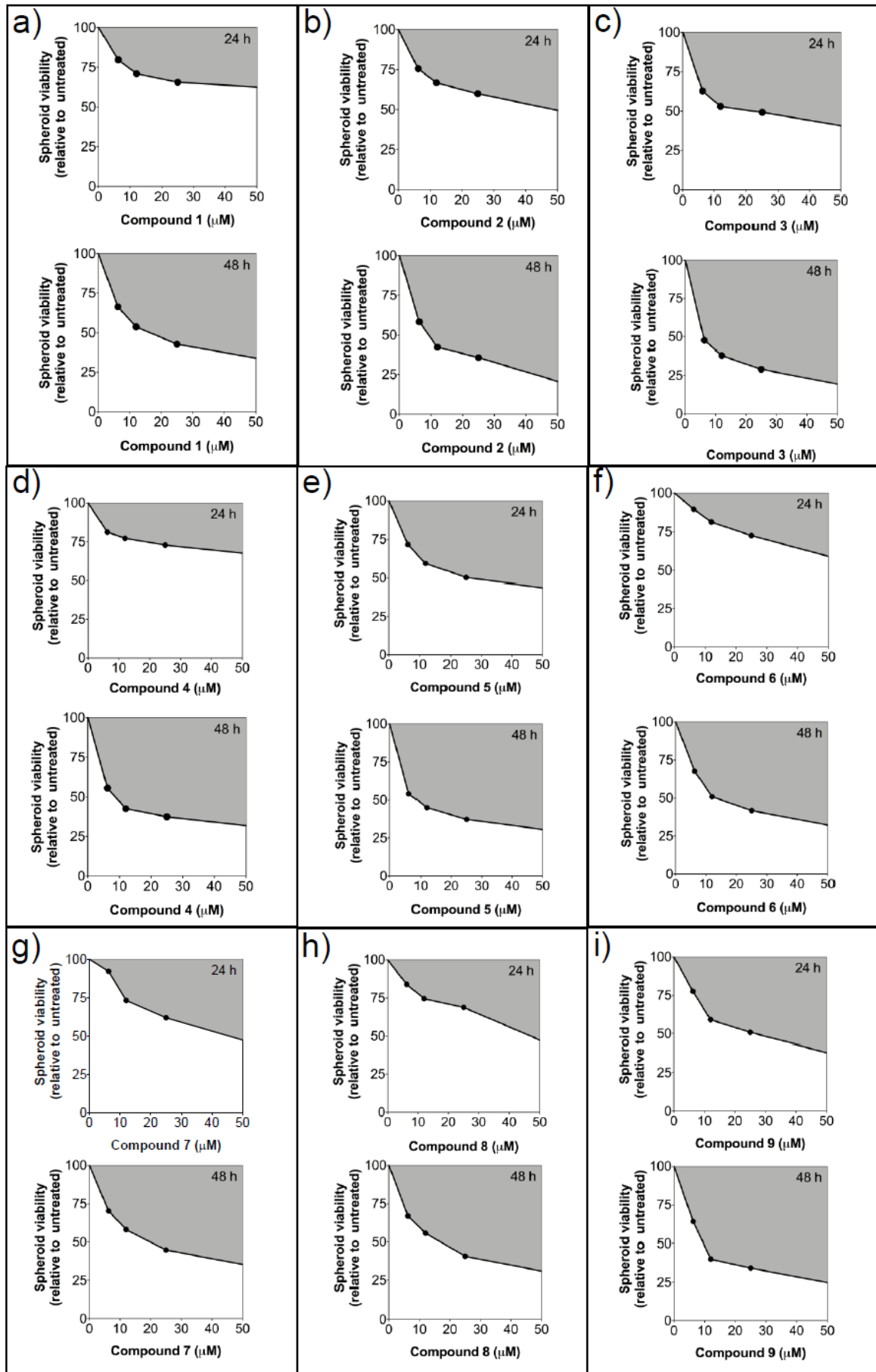


Figure 4

## **5. CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Devido à necessidade de técnicas que possibilitem estudo do comportamento de células em ambiente tumoral, e que ao mesmo tempo sejam reprodutíveis. Este trabalho trouxe a padronização de um modelo celular tridimensional em linhagem humana de adenocarcinoma, permitindo seu uso em estudos de rastreamento de drogas com potencial terapêutico. Para a execução deste estudo, foi selecionado entre uma grande variedade o modelo de esferóide tumoral multicelular utilizando gel de agarose, na densidade inicial de 2000 células por poço. Este modelo foi escolhido por ser reprodutível, rápido e em termos de valores financeiros, ser mais barato do que as técnicas disponíveis na literatura. Como perspectiva para futuros estudos a utilização de mais linhagens celulares, para serem acompanhadas por um tempo maior, juntamente com a utilização de marcadores para proliferação, necrose e hipóxia.