

CARACTERIZAÇÃO CLONAL DE LINHAGENS CELULARES DE CÂNCER DE
MAMA E SUA IMPLICAÇÃO EM MODELOS EXPERIMENTAIS PARA ESTUDOS
IN VITRO

BRASÍLIA, 2020

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

GUILHERME GUIMARÃES DA SILVA

CARACTERIZAÇÃO CLONAL DE LINHAGENS CELULARES DE CÂNCER DE
MAMA E SUA IMPLICAÇÃO EM MODELOS EXPERIMENTAIS PARA ESTUDOS
IN VITRO

Dissertação apresentada como requisito parcial
para a obtenção do título de Mestre em Ciências da
Saúde pelo Programa de Pós-Graduação em
Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

Orientador: Prof. Dr. Diêgo Madureira de
Oliveira

BRASÍLIA, 2020

À minha
família, o bem mais precioso que um
ser humano pode ter nesta Terra.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador e amigo, Prof. Dr. Diêgo Madureira, que abriu as portas do mundo da ciência para mim desde os meus primeiros passos na graduação, e que tem me ensinado pacientemente no decorrer destes anos, afinal “sem paciência não se faz ciência”.

A minha mãe, Eunice, a mulher que sempre tem me ajudado de todas as formas possíveis e que sempre me incentivou a crescer na vida. Sou muito grato pela educação e pelo amor que você me deu e tem dado, e pelo exemplo de força e honestidade que você transmite a mim.

Aos meus irmãos, Gabriel e Gabriela, pelo sentimento de fraternidade e pelo companheirismo muito necessário nas horas de labor e penúria, e muito obrigado por me aturar nos momentos de estresse quando meu humor não estava nada agradável.

Ao meu cunhado, Richard Bruno, e aos meus sobrinhos Anna Kelly, Allana Kelma, Pedro Matheus e João Miguel por completarem meu núcleo familiar e por estarem trazendo grande regozijo para todos nós.

A minha namorada, Léa Melo, pelo companheirismo expressado em suas várias atitudes, e pelo amor que tem me feito sentir desde o momento em que entrou na minha vida.

Aos meus amigos Victor Ribas, Samara Betina, Weverson Alves, Jennyfer Ribeiro, Ana Lídia, Daniel Silva, Ivan Prado, Mirian July, Ana Krause, Stefany Ingrid, Júnior Oliveira, Jéssica Carvalho, Lara Oliveira, Luciana Novaes, Ísis Oliveira, Morgana Carrijo, e Eduardo Bezerra.

Aos meus companheiros do grupo “Fut Clubokic” que me fazem dar risadas diárias fazendo brincadeiras das mais diversas situações.

À melhor equipe de pesquisa do mundo, composta por alunos de iniciação científica, mestrado e doutorado orientada pelo Prof. Diêgo, eu sou grato pelos momentos de diversão e pelas várias trocas de conhecimento que vivenciamos.

Ao meu amigo Daniel Arcanjo, pela parceria formada desde os tempos de iniciação científica que seu consolidou no passar dos anos.

Aos meus colegas de pesquisa e amigos Tales Henrique e Ana Flavia, esse projeto não sairia sem a cooperação de vocês, sou muito grato pela ajuda que vocês deram para mim nestes dois anos de mestrado.

A minha amiga e colega de pesquisa Katherine Rodrigues, muito obrigado pelos conselhos de vida que você me deu enquanto esperava a PCR rodar no termociclador.

À equipe de segurança da Faculdade de Ceilândia, Vilene, Helena, Mesaque e João, e à equipe técnica dos laboratórios da FCE, especialmente a Nara Rodrigues e a Laureane, eu sou grato pelas mais diversas formas de auxílio.

Aos professores Rodrigo Haddad, Alex Leite, Doralina Rabello, e Felipe Saldanha, por terem me auxiliado nos momentos em que eu precisava de equipamentos e reagentes faltantes.

Aos doutorandos Thiago David, por ter me ajudado com a imunocitoquímica, e Amandda, por ter me ajudado com a citometria de fluxo e com a qPCR.

À Fundação de Apoio à Pesquisa do Distrito Federal (FAPDF) pelo financiamento do projeto, e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pela bolsa que me ofereceu, sendo essa um fator determinante para a finalização deste trabalho.

A Deus, o criador dos céus e da terra, eu agradeço pelo dom da vida e por sua infinita misericórdia, revelada a nós através da encarnação e sacrifício na cruz de seu Filho, Jesus Cristo.

RESUMO

O câncer é denominado como um conjunto amplo de doenças que tem características em comum, como a desdiferenciação celular, a capacidade de secreção de fatores que provocam angiogênese, a presença de imortalização celular, e a capacidade de invasão e metástase. Os cânceres são compostos por populações clonais com variações fenotípicas, o que faz com que estas patologias sejam extremamente heterogêneas. O câncer de mama é o tipo de câncer que mais acomete mulheres ao redor do mundo, e tem números de incidência muito expressivos no Brasil. A MDA-MB-231 e a MCF-7 são duas linhagens celulares de câncer mamário muito utilizadas no meio científico. Desta forma, estudar as subpopulações destas linhagens e os fatores ambientais usados na rotina do cultivo celular que podem interferir na composição destas subpopulações é de muita relevância para o meio científico. Este estudo expôs as linhagens de adenocarcinoma mamário MDA-MB-231 e MCF-7 à técnica de seleção clonal, com o intuito de isolar linhagens monoclonais vindas delas e fazer comparações para entender qual a dinâmica biológica destas linhagens monoclonais, além de fazer comparações destes clones com as linhagens originárias, e entender como intervenções laboratoriais rotineiras podem mudar a composição fenotípica de linhagens usadas em cultivo celular. A MCF-7 não demonstrou resposta à técnica de seleção clonal, entretanto, foi útil ao estudo, pois juntamente com testes feitos com a MDA-MB-231 foi evidenciado que o tempo de cultivo é um fator de mudança fenotípica em linhagens policlonais. Os clones vindos de MDA-MB-231 mostraram características particulares, além de demonstrarem que até em linhagens monoclonais o tempo de cultivo contribui para a geração de subpopulações, e que a resposta à quimioterapia convencional pode variar e depender da linhagem clonal, o que traz à tona a questão de que as respostas aos fármacos quimioterápicos podem variar até dentro de uma mesma linhagem celular. O fenômeno de mudança fenotípica é constante em linhagens celulares quando cultivadas em laboratório, sendo este fenômeno influenciado pelo tempo de cultivo e por outras interferências laboratoriais rotineiras.

Palavras-chave: câncer de mama; heterogeneidade tumoral; fenótipo celular.

ABSTRACT

Cancer is called a broad set of diseases that have characteristics in common, such as cell de-differentiation, the ability to secrete factors that cause angiogenesis, the presence of cell immortalization, and the capacity for invasion and metastasis. Cancers are composed of clonal populations with phenotypic variations, which makes these pathologies extremely heterogeneous. Breast cancer is the type of cancer that most affects women around the world, and it has very significant incidence numbers in Brazil. MDA-MB-231 and MCF-7 are two breast cancer cell lines that are widely used in the scientific community, thus studying the subpopulations of these strains, and the environmental factors used in the cell culture routine that can interfere in the composition of these subpopulations is very relevant to the scientific environment. This study exposed the MDA-MB-231 and MCF-7 strains to the clonal selection technique, in order to isolate monoclonal strains from them and make comparisons to understand the biological dynamics of these monoclonal strains, in addition to making comparisons of these clones with the native strains, and understand how routine laboratory interventions can change the phenotypic composition of strains used in cell culture. The MCF-7 did not demonstrate sensitivity to the clonal selection technique, however, it was useful to the study, because together with tests done with the MDA-MB-231 it was evidenced that the cultivation time is a factor of phenotypic change in polyclonal strains. The clones coming from MDA-MB-231 showed particular characteristics, in addition to demonstrating that even in monoclonal lines the cultivation time contributes to the generation of subpopulations, and that the response to conventional chemotherapy can vary depending on the clonal line, which brings the question that responses to chemotherapy drugs may vary even within the same cell line. The phenotypic change phenomenon is constant in cell lines when grown in the laboratory, and this phenomenon is influenced by the time of cultivation and other routine laboratory interferences.

Keywords: breast cancer; breast cancer; tumor heterogeneity; cell phenotype.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Efeitos do tempo cultivo no padrão de crescimento da MDA-MB-231

Figura 2 – Efeitos do tempo cultivo no cariótipo da MDA-MB-231 e da MCF-7

Figura 3 - Quantificação dos dados de cariotipagem da MDA-MB-231 e da MCF-7

Figura 4 – Representação da sensibilidade da MDA-MB-231 e da MCF-7 à técnica de seleção clonal

Figura 5 – Morfologia e padrão de crescimento da MDA-MB-231 e seus clones

Figura 6 – Cariótipos das linhagens monoclonais de MDA-MB-231

Figura 7 – Porcentagem de cariótipos com fusão cromossômica

Figura 8 – Resultado de imunocitoquímica da MDA-MB-231 e seus clones

Figura 9 – Resultado de imunocitoquímica (Ki67) da MDA-MB-231 e seus clones

Figura 10 – Curvas de tempo de duplicação da MDA-MB-231 e seus clones

Figura 11 – Análise morfológica por citometria de fluxo da MDA-MB-231 e suas linhagens monoclonais

Figura 12 – Análise dos parâmetros de FSC-H e SSC-H de forma separada na linhagem MDA-MB-231 e seus clones

Figura 13 – Análise de autofluorescência da MDA-MB-231 e seus clones.

Figura 14 – Análise de autofluorescência da MDA-MB-231 e seu clone C5

Figura 15 – Análise de autofluorescência da MDA-MB-231, seu clone C9, e subpopulação C9 (R2)

Figura 16 – Sensibilidade ao paclitaxel

Figura 17 – Demonstração de resistência ao congelamento dos clones de MDA-MB-231

Figura 18 – Resumo esquemático do modelo proposto

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Distinções biológicas entre neoplasias benignas e malignas

Quadro 2 – Valores de TD da linhagem MDA-MB-231 e de suas linhagens monoclonais

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C	Graus Celsius
µL	Microlitro
µM	Micromolar
B10	Linhagem monoclonal B10
BRCA	Grupo de genes supressores tumorais
C5	Linhagem monoclonal C5
C9	Linhagem monoclonal C9
D9	Linhagem monoclonal D9
DMEM	Meio de cultivo Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
FCE	Faculdade de Ceilândia
FL1- H	Detector de fluorescência 1
FL2-H	Detector de fluorescência 2
FL3-H	Detector de fluorescência 3
FL4	Detector de fluorescência 4
FS	Faculdade de Ciências da Saúde
FSC-H	Forward scatter height
HER-2	Receptor de crescimento epidérmico tipo 2
IC50	Concentração inibitória de 50% do crescimento
INCA	Instituto Nacional de Câncer
KCl	Cloreto de potássio
Ki67	Proteína marcadora de proliferação
LTMAC	Laboratório de tecnologia de medicamentos, alimentos, e cosméticos
MCF-7	Linhagem celular de adenocarcinoma mamário
MDA-MB-231	Linhagem celular de adenocarcinoma mamário
mL	Microlitro
MTT	[3(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio brometo]
PBS	Tampão fosfato-salino

RE	Receptor de estrogênio
RP	Receptor de progesterona
SFB	Soro Feral Bovino
SSC-H	Side Scatter Pulse Height
TD	Tempo de duplicação
TNM	Sistema de classificação de neoplasias malignas segundo o estadiamento
UED	Unidade de Ensino e Docência
UnB	Universidade de Brasília

SUMÁRIO

1. Introdução e revisão bibliográfica	12
1.1. O câncer e a carcinogênese	12
1.2. Classificação.....	13
1.3. Câncer de mama.....	14
1.4. Cancerologia experimental.....	17
1.5. As linhagens MDA-MB-231 e MCF7	18
2. Objetivos	20
2.1. Objetivos gerais.....	20
2.2. Objetivos específicos.....	20
3. Metodologia	21
3.1. Cultivo celular.....	21
3.2. Seleção clonal.....	22
3.3. Análise morfológica por microscopia de contraste de fase.....	23
3.4. Cariotipagem.....	23
3.5. Imunocitoquímica.....	24
3.6. Tempo de duplicação.....	25
3.7. Citometria de fluxo.....	26
3.8. Teste de resistência ao congelamento das linhagens monoclonais.....	26
3.9. Teste de resposta à ação quimioterápica utilizando o ensaio do MTT	26
3.10. Análise estatística.....	26
4. Resultados e discussão	27
4.1. Composição heterogênea das linhagens.....	27
4.2. Padrão de crescimento.....	36
4.3. Sensibilidade à fármacos.....	43
5. Conclusão	49
Referências bibliográficas.....	50

1. Introdução e revisão bibliográfica

1.1 O câncer e a carcinogênese

As neoplasias malignas podem ser brevemente definidas como sendo um conjunto amplo de doenças que têm em comum algumas características provenientes de uma variedade de mutações sofridas, como células que proliferam de forma rápida e desregulada (HYNDMAN, 2016), capacidade de expressão do fenótipo de imortalização celular, aptidão para promover angiogênese, capacidade de transdiferenciação ou indiferenciação celular, possibilidade de promoção de invasão tecidual e metástase (FERNANDES e MELLO, 2008), entre outras.

Em adendo as características citadas, um conjunto cada vez maior de cientistas tem considerado algumas condições como marcadores relevantes para a progressão de uma parte dos cânceres, e talvez até de todos, sendo tais características: a faculdade em reprogramar o metabolismo celular para facilitar a proliferação ilimitada e desregulada, a vocação das células cancerosas de escaparem da ação do sistema imunológico, a instabilidade genômica que confere as células um alto grau de mutabilidade e a presença de processo inflamatório que tenha como consequência a promoção tumoral (HANAHAN e WEINBERG, 2011).

As qualidades tumorais mencionadas são todas resultados do processo de carcinogênese, de forma que em condições sadias as células presentes em um tecido têm seus ciclos celulares controlados por diversos elementos, e as células neoplásicas adquirem a habilidade de driblar tais elementos de controle proliferativo (DARLING *et al.*, 2017). Tal habilidade é adquirida através de mutações que atingem genes importantes na regulação do ciclo celular, onde é importante mencionar as mutações em genes supressores de tumor e em proto-oncogenes, podendo levar esses últimos ao patamar de oncogenes (LAHOUEL *et al.*, 2020).

Um passo importante da progressão tumoral é a perda da inibição por contato que em um estado fisiológico acontece entre células saudáveis, de forma que células sadias não proliferam desordenadamente quando mantêm contato com células adjacentes e as células que compõem uma neoplasia, seja ela maligna ou benigna,

perdem tal regulação durante o processo de mudança de fenótipo. Já é sabido que durante a tumorigênese há secreção de fatores de crescimento provindos do contato celular (CHENG *et al.*, 2008).

Em um estado saudável as células têm a capacidade de disparar a cadeia apoptótica quando há dano ao DNA que não pôde ser reparado, de tal forma que, na gênese cancerosa um passo importante é a quebra deste mecanismo homeostático, onde componentes celulares de um câncer obtêm a capacidade de inibição apoptótica em situações em que fisiologicamente o ideal seria iniciar o processo de morte celular programada (ADAMS e CORY, 2007).

Durante o processo de desenvolvimento tumoral até processos como a autofagia disparada pela ação de genes supressores de tumor tende a falhar devido à mutações sofridas pelos mesmos, e a presença de processo inflamatória que originariamente seria benéfico para o tecido pode facilitar a progressão tumoral, na medida em que, a inflamação pode proporcionar o surgimento de novos vasos sanguíneos, que podem nutrir as células componentes da neoplasia, e a liberação de fatores de crescimento, que podem estimular o crescimento proliferativo (MORAIS, 2016).

1.2 Classificação

Primariamente, a terminologia utilizada para classificar a patologia em voga pode ser dada de acordo com o órgão de gênese da doença ou de acordo com o tipo tecidual onde o processo de tumorigênese teve início, sendo necessário mencionar que as alterações fenotípicas ocorrentes na carcinogênese seguem um fluxo geral, onde um tecido normal perde características de controle de ciclo celular e gera uma hiperplasia (aumento tecidual devido a multiplicação das células). Após isso, a hiperplasia se indiferencia gerando uma displasia (neste estágio as células componentes de um tecido se tornam morfológicamente anormais). Por fim, a displasia pode evoluir para o câncer (neoplasia com caráter invasivo). Lembrando que é importante salientar que nem sempre uma hiperplasia ou uma displasia vão evoluir para um câncer (NCI, 2020).

As categorizações mais empregadas para distinguir as neoplasias (massas de tecidos anormais com crescimento deliberado e descontrolado) são empregadas de acordo os tipos teciduais onde estas foram originadas, daí por exemplo vem a distinção entre carcinomas e sarcomas, e também de acordo com o comportamento biológico

das mesmas, sendo distinguidas segundo esse critério entre benignas ou malignas (câncer). Na hipótese da não possibilidade de fazer tal distinção adotam-se os termos *bordeline* ou tumores limítrofes (INCA, 2008). A classificação segundo o comportamento biológico pode ser melhor observada no Quadro 1.

Critérios	Neoplasias benignas	Neoplasias malignas
Encapsulação	Formação de uma pseudocápsula fibrosa	Não é encapsulado
Crescimento	Lento	Rápido
Morfologia	Se assemelha ao tecido originário	Bem diferente do tecido originário
Mitoses	Figuras de mitose raras e com aspecto típico	Figuras de mitose mais presentes e aspecto atípico
Antigenicidade	Ausente a capacidade de produzir antígenos	Ocorre, mas habitualmente é fraca
Metástases	Ausentes	Frequentes

Quadro 1- Distinções biológicas entre neoplasias benignas e malignas (Fonte: Adaptado de INCA (10))

Definir o estadiamento dos cânceres na prática clínica é muito importante, neste sentido nasceu o sistema de classificação TNM, sendo esse um método de classificação relevante para o delineamento da terapia que o paciente irá receber e para mensuração do prognóstico. As siglas que nomeiam o sistema de classificação querem dizer: T- diz respeito à extensividade do tumor primário; N- refere-se à existência ou não de metástases em linfonodos regionais, além da extensão das possíveis metástases, M- diz respeito ao aspecto de existirem ou não metástases a distância (INCA, 2004).

Em conjunto com as letras classificatórias do sistema TNM são adicionados números com o intuito de explicitar a ausência ou presença, e a extensão dos fenômenos, desta forma temos: T0, T1, T2, T3, T4, N0, N1, N2, N3, M0 e M1 (11). Em adendo, ao sistema numérico também podem ser usadas as letras A e B para subclassificar os estádios dos grupos com o intuito de revelar a evolução da doença (INCA, 2020).

1.3 Câncer de mama

As mamas são glândulas apócrinas (MONTANARI, 2016) presentes em homens e mulheres, no entanto, nos homens são mais rústicas e nas mulheres mais desenvolvidas, sendo que o desenvolvimento e a diferenciação das mamas nas mulheres se dá a partir da puberdade, atingindo seu maior desenvolvimento nas fases de gravidez e lactação. As glândulas mamárias são componentes anexos à pele com especialidade de produzir leite, sendo que o tecido glandular é integrado por 63% de células produtoras de leite, e este está em sua maior parte situado a mais ou menos 3 centímetros da base do mamilo. As glândulas mamárias possuem tecido adiposo subcutâneo localizado em seus interiores e nas partes posteriores do tecido glandular, adiante ao músculo peitoral. As mamas estão entre a superfície e a profundidade da pele, e localizam-se em uma região que fica entre a segunda e a sexta costela do osso esterno à linha axilar média (ÓRFÃO e GOUVEIA, 2009).

O câncer de mama se apresenta com aspectos morfológicos nodulares (ALMEIDA, *et al.*, 2015), sendo que a minoria dos casos de neoplasias mamárias malignas são originárias do epitélio lobular das mamas e a maioria (mais de 80% dos casos) são originárias do epitélio ductal (SILVA, 2014). A maioria dos cânceres de mama são carcinomas, sendo estes heterogêneos e podendo ser divididos em vários grupos com eminentes diferenças teciduais, além de terem respostas clínicas distintas às variadas modalidades terapêuticas (VIEIRA, 2008).

No que se refere ao aspecto social do câncer de mama, a literatura demonstra que após o recebimento de diagnóstico de neoplasia maligna mamária as inquietações preponderantes entre os familiares e as pacientes são principalmente relativas à sobrevivência das mesmas, visto que o estigma social do câncer como doença quase incurável é muito grande, aos danos e eficácia do tratamento, e aos danos estéticos provocados por uma possível mastectomia, tendo em vista que as mamas são partes importantíssimas na identidade feminina (SILVA, 2008). Além disso, o mundo apresenta um aumento significativo de casos registrados (FERLAY, 2010), o que faz do câncer de mama uma patologia que merece atenção na conjuntura social.

No Brasil estimou-se que no biênio 2018-2019 o cancro de mama seria o tipo de câncer mais frequente na população feminina brasileira, se não levados em consideração os tumores de pele não melanoma. O número de casos novos previstos era de 59.700 com um risco estimado de 56,33 casos para cada 100.000 mulheres (INCA, 2020). Não distante desta realidade, a literatura mostra que ao redor do mundo

o câncer de mama é muito incidente em mulheres, sendo responsável por 27% dos novos casos de câncer neste grupo (VICH *et al.*, 2014).

As mulheres compõem o grupo de risco mais vulnerável em relação à enfermidade tratada neste (BATISTON *et al.*, 2011), e os homens constituem um grupo de risco que é dificilmente atingido (SENGER, ADAMS e KANTHAN, 2017). Em adendo a distinção de grupos de risco por sexo, percebe-se que o câncer de mama afeta tanto mulheres mais jovens, quanto mulheres de mais idade (FREEDMAN e PARTRIDGE, 2017), no entanto, a literatura demonstra que mulheres mais jovens têm um prognóstico mais ruim (VILLARREAL-GARZA *et al.*, 2016).

No que tange ao desenvolvimento do câncer mamário, existem vários fatores de risco a serem avaliados, e um deles, por exemplo, é a predisposição genética ao cancro mamário, sendo que, pacientes que têm histórico familiar da referida enfermidade têm uma chance maior de desenvolvê-la (BREWE *et al.*, 2017). Desta forma, as mesmas devem ter um acompanhamento preventivo iniciado em idade menos avançada. É importante mencionar a demonstração dos estudos no que tange à mutações disfuncionais em genes BRCA (trata-se de uma classe de genes supressores de tumor), sendo tais mutações muito proeminentes na influência do surgimento de cânceres mamários, ou seja, mulheres que herdaram ou obtêm mutações disfuncionais em genes BRCA possuem maior chance de desenvolver neoplasia mamária maligna (HORST, *et al.*, 2016).

A nuliparidade (condição da mulher que nunca pariu) e a primeira gestação após os 30 anos de idade também constituem fatores de risco notáveis, sendo que a chance de desenvolver câncer mamário de uma mulher que tem filho após os 30 anos é o dobro da chance quando feita comparação com uma mulher que tem filho antes dos 20 anos de idade. Somados a estes, uma história menstrual longa (menarca precoce e menopausa tardia), e a presença de hiperplasia epitelial atípica nas mamas também representam fatores de risco já demonstrados em estudos, sendo que, os achados mostram que mulheres com hiperplasia epitelial atípica severa nas glândulas mamárias são entre 4 e 5 vezes mais propensas a desenvolverem câncer de mama, se comparadas a mulheres que não têm nenhum tipo de anomalia proliferativa mamária (MCPHERSON, STEEL e DIXON, 2000).

Ao contrário dos fatores de risco já citados, a literatura mostra que há fatores de proteção, ou seja, as pesquisas mostram que existem elementos que quando praticados representam uma diminuição na probabilidade de desenvolvimento de

câncer mamário, como exemplo podem ser mencionadas a prática de atividade física e a lactação (INUMARU, SILVEIRA e NAVES, 2011).

No que se refere à prevenção, a mamografia tem sido um exame muito quisto na comunidade de saúde, sendo a mesma muito eficaz na descoberta de neoplasias mamárias precoces, pois tal exame consegue identificar a presença de tumores ainda não palpáveis e com isso o mesmo é muito útil na detecção de cânceres de mama em estágio inicial, o que melhora o prognóstico da paciente (SCLOWITZ *et al.*, 2005). Somado à mamografia, o exame clínico de mamas também faz parte do grupo de exames preventivos e deve ser incluído no exame físico e ginecológico de todas as pacientes, independente da idade, sendo que este serve de subsídio para a realização de exames complementares (SILVA, RIUL, 2011).

1.4 Cancerologia experimental

A oncologia, também chamada de cancerologia, é uma linha incluída dentro do campo das ciências médicas que tem como objeto de estudo as neoplasias, sendo que o foco da cancerologia é entender como funciona a dinâmica biológica das neoplasias com o objetivo de delinear tratamentos mais efetivos para os pacientes que desenvolvem tais patologias (ONCOGUIA, 2020). São várias as ramificações dentro da cancerologia, onde destacam-se, por exemplo, a oncologia pediátrica (PARO, PARO e FERREIRA, 2005), a cancerologia experimental (MACHADO e MELO-JUNIOR, 2009), a oncologia ginecológica (GORAYEB *et al.*, 2012), a oncologia clínica (de uma forma geral, é considerada uma grande área que engloba todas as áreas que lê dão diretamente com o paciente) (FRIGATO e HOGA, 2003), a cancerologia cirúrgica (TIEZI, 2007), a rádio oncologia (GÉRARD, 2006), dentre outras ramificações.

Como já mencionado, a oncologia experimental é uma ramificação da cancerologia, sendo que, esta área tem foco na utilização padrões experimentais com o intuito de pesquisar sobre os mecanismos de progressão das neoplasias, além de também usar estes modelos experimentais para tentativa de delineamentos de tratamentos. Sendo assim, a cancerologia experimental é de suma relevância no tratamento do câncer, visto que, a mesma tem a prospecção de novos fármacos antineoplásicos como um de seus eixos (COSTA-LOTUFO, 2010).

A quantidade de novos casos de câncer tem aumentado no mundo nos últimos

anos (FERLAY *et al.*, 2015), de maneira que, a busca por novos princípios ativos que combatam tal enfermidade tem sido enorme. Muitos antineoplásicos usados hoje na quimioterapia foram obtidos por meio da alteração de moléculas obtidas na natureza, ou através da síntese de novos compostos (MA e WANG, 2009).

As pesquisas buscam antineoplásicos que sejam pouco citotóxicos para as células saudáveis e eficazes para matar células neoplásicas, nesta perspectiva surgiram os testes de citotoxicidade, que são uma vertente da oncologia experimental de muita relevância, sendo que estes são etapa necessária na triagem de princípios ativos com caráter antineoplásico (ROSAS *et al.*, 2013).

São vários os princípios ativos já comercializados para a quimioterapia do câncer, sendo que alguns exemplos são: docetaxel, paclitaxel, vincristina, vimblastina (MA e WANG, 2009), metotrexato, cisplatina, ciclofosfamida, 5-Fluorouracil (SAWADA *et al.*, 2009), clorambucila, tamoxifeno, carboplatina, oxaliplatina, azacitidina (MARTINS e ROSA, 2004), entre outros. Tendo em vista o arsenal de substâncias demonstrado, é lícito pensar que a cancerologia experimental desenvolve grande contributo para a oncologia.

Os modelos experimentais usados para descrever fenômenos e delinear novos princípios ativos podem ser divididos em dois grupos, que são: modelos *in vitro* (SAIDIEL, 2016) e modelos *in vivo* (BASTOS, 2014). Os modelos *in vitro* são performados antes dos modelos *in vivo* na sequência de testes científicos, sendo que os testes *in vitro* constituem ensaios que imitam os microambientes dos sistemas biológicos, mas são realizados fora dos organismos vivos, enquanto os testes *in vivo* são constituídos de ensaios performados em organismos vivos.

No que se refere aos organismos utilizados no modelo *in vivo*, destaca-se o uso de camundongos (CASTELLÓ, 2017) e ratos (LOPES, 2014; MICHAJLOWSKY *et al.*, 2003), sendo o uso destes muito difundido no meio científico, e como representação dos modelos utilizados *in vitro*, a cultura de células tem sido um método muito utilizado (ROSAS *et al.*, 2013).

1.5 As linhagens MDA-MB-231 e MCF7

A MDA-MB-231 e a MCF-7 são as duas linhagens de câncer de mama mais utilizadas em estudos experimentais, sendo que ao fazer uma busca na plataforma do Pubmed com o descritor “MDA-MB-231” foram encontrados 14.263 resultados, e ao

fazer a mesma busca com o descritor “MCF-7” foram encontrados 38.281 resultados. Um número muito grande de resultados também é obtido ao se fazer o mesmo tipo de pesquisa na plataforma Google Acadêmico, onde a busca com o descritor “MDA-MB-231” resultou em aproximadamente 269.000 resultados e a busca com o descritor “MCF-7” resultou em 727.000 resultados .

A MDA-MB-231 é uma linhagem humana de adenocarcinoma mamário, extraída de uma paciente caucasiana de 51 anos de idade, e que apresenta alterações numéricas em seu cariótipo (ATCC, 2020). A referida linhagem foi estabilizada em laboratório a partir de uma única amostra obtida em 17 de outubro de 1973, vinda de uma paciente que havia passado por uma mastectomia radical na mama direita (CAILLEAU *et al.*, 1974), sendo que até hoje a linhagem em voga é utilizada no meio científico. Além disso, outra característica importante é que a MDA-MB-231 é tida como triplo-negativa no que tange à expressão dos receptores RE (receptor de estrôgeno, RP (receptor de progesterona), e Her-2 (PINHO, 2014), sendo estes marcadores importantes para a clínica, pois são alvos terapêuticos e dizem muito sobre a agressividade da neoplasia mamária, onde cânceres de mama triplo-negativos são conhecidos por serem bastante agressivos.

A MCF7 é uma linhagem celular humana de adenocarcinoma mamário, obtida de uma mulher caucasiana de 69 anos de idade, e que assim como a MDA-MB-231, apresenta cariótipo com alterações numéricas (ATCC, 2020). A MCF7 foi derivada de uma linhagem chamada 734B, onde a 734B foi obtida a partir de um derrame pleural de uma paciente com câncer de mama metastático e mantida em cultura, sendo que, a MCF7 foi obtida e estabilizada a partir de um grupo de células flutuantes da cultura primária de 734B. Uma característica importante da MCF7 é que a mesma apresenta receptores de estrôgeno (receptor que pode servir como alvo terapêutico na prática clínica), além de ser uma das linhagens celulares de câncer de mama mais usadas atualmente (SOULE, *et al.*, 1973).

O processo de carcinogênese envolve alterações de natureza genômica, epigenômica, transcriptômica e proteômica, sendo que a soma destes eventos ocorrendo em variadas células contribui para a formação de subpopulações intratumorais, fazendo com que os cânceres sejam heterogêneos e as linhagens derivadas destes também, como é o caso da MDA-MB-231 e da MCF-7 (CAMPOY *et al.*, 2019).

Desta forma, é relevante entender a composição clonal destas linhagens e como as diferentes intervenções experimentais podem interferir nesta composição, além de mensurar o significado destas interferências e refletir no que as mesmas podem impactar em termos da qualidade dos achados gerados em estudos que usaram a MDA-MB-231 e a MCF7.

2. Objetivos

2.1 Objetivo geral

Entender o impacto da heterogeneidade tumoral de linhagens celulares cancerosas nos trabalhos *in vitro*.

2.2 Objetivos específicos

- a) Verificar a resposta das linhagens MDA-MB-231 e MCF7 à técnica de seleção clonal;
- b) Verificar a heterogeneidade das linhagens MDA-MB-231 e MCF7 quando submetidas à microscopia ótica;
- c) Analisar se o tempo de cultivo pode ser fator influenciador na mudança do padrão de crescimento e perfil cariotípico das linhagens MDA-MB-231 e MCF7;
- d) Avaliar se o índice mitótico e a percentagem de cariótipos em estágio de fusão cromossômica sofrem mudanças a depender do tempo de cultivo das linhagens MDA-MB-231 e MCF-7;
- e) Verificar a presença de diferenças morfológicas entre as linhagens monoclonais geradas, e entre as linhagens monoclonais geradas e suas linhagens policlonais, sob a averiguação por microscopia de contraste de fase;
- f) Verificar a presença de diferenças entre os padrões de crescimento das linhagens monoclonais geradas, e entre as linhagens monoclonais geradas e suas linhagens policlonais;
- g) Averiguar a existência de padrões cariotípicos distintos entre as linhagens monoclonais geradas, e entre as linhagens monoclonais geradas e suas linhagens policlonais;

- h) Verificar se a linhagem MDA-MB-231 e as linhagens monoclonais geradas a partir dela apresentam fenótipo triplo-negativo para expressão dos receptores HER-2, RE e RP;
- i) Verificar a expressão do receptor proliferativo Ki67 na linhagem MDA-MB-231 e nas linhagens monoclonais geradas a partir desta, bem como comparar tais expressões;
- j) Obter o tempo de duplicação da linhagem MDA-MB-231 e das linhagens monoclonais obtidas através da mesma, bem como comparar tais dados obtidos;
- k) Realizar análise morfológica e de autofluorescência da linhagem MDA-MB-231 e das linhagens monoclonais obtidas através da mesma, utilizando-se da técnica de citometria de fluxo;
- l) Submeter a linhagem MDA-MB-231 e as linhagens monoclonais vindas a partir desta ao teste de resistência à ação do fármaco paclitaxel, utilizando-se da metodologia do MTT;
- m) Submeter a linhagem MDA-MB-231 e as linhagens monoclonais vindas a partir desta ao teste de resistência ao congelamento;

3. Metodologia

Os experimentos presentes neste trabalho foram desenvolvidos em sua maioria nos laboratórios multidisciplinares 1A e 2A, localizados na Unidade de Ensino e Docência (UED) da Universidade de Brasília (UnB) /Faculdade de Ceilândia (FCE), no laboratório de tecnologia de medicamentos, alimentos, e cosméticos (LTMAC), localizado na Faculdade de Saúde (FS) do Campus Darcy Ribeiro da UnB, no laboratório de Patologia Molecular do Câncer (Cancer Lab), localizado na Faculdade de Saúde (FS) do Campus Darcy Ribeiro da UnB, e no Laboratório Diagnose.

3.1 Cultivo Celular

As linhagens de câncer mamário MDA-MB-231 e MCF7, usadas durante este trabalho, foram cultivadas em placas plásticas de 3.5, 10, e 50 centímetros de

diâmetro, sendo as mesmas apropriadas para o cultivo de linhagens celulares aderentes, a uma temperatura de 37 °C, em meio de cultivo DMEM, com suplemento de 10 % (v/v) de soro fetal bovino (SFB), estreptomicina (100 µg/mL), e penicilina (100 UI/mL), em estufa com atmosfera úmida e com 5% de CO₂.

3.2 Seleção Clonal

As linhagens de câncer de mama MDA-MB-231 e MCF7 foram cultivadas em placas de 10 cm de diâmetro até atingirem uma confluência de aproximadamente 80%, de forma que ao chegarem neste estágio, o meio de cultivo foi retirado e as placas lavadas com 2 mL de PBS (sigla em inglês para tampão fosfato-salino), após isso as culturas foram incubadas com 2 mL de tripsina suína 0,25% (1x) (protease usada em cultura celular para clivar proteínas de adesão que as células usam para aglutinarem na superfície da placa) e acondicionadas na estufa por 5 minutos, depois ocorreu o processo de homogeneização e ressuspensão em meio DMEM (4 mL foram usados para cada placa), e em seguida as células foram transferidas para tubos cônicos tipo falcon de 15 mL e centrifugadas por 3 minutos à 1500 rpm (rotação por minuto), por fim, o sobrenadante dos tubos foi descartado e as células ressuspensas em meio de cultivo (entre 1 e 10 mL a depender do tamanho do pellet).

Um volume de 36 µL foi retirado de cada tubo e homogeneizado com 4 µL de azul de trypan (corante com afinidade por células inviáveis), em seguida 10 µL do líquido foi posto na câmara de Neubauer (acoplamento feito por baixo de uma lamínula) e a mesma levada ao microscópio para contabilização do número de células viáveis. Feita a contabilização por quadrantes na câmara de Neubauer, foi tirada uma média entre os achados e o valor foi multiplicado por 10.000, o que trouxe a noção da quantidade de células presentes em 1 mL do ressuspensão, e a partir daí foi feito um cálculo para encontrar os valores de diluição com o intuito de alcançar uma concentração de 10 células/mL, sendo que após feitos os cálculos e executada a diluição, foram lançados 100 µL da diluição em cada poço da placa de 96 poços.

Passadas duas horas do horário de lançamento, foi realizada uma varredura nas placas com a intenção de segregar os poços que nesta primeira leitura tinham uma única célula (poços com duas células muito distantes também eram separados neste primeiro momento), sendo que os referidos poços tiveram acompanhamento diário, e

as linhagens monoclonais que cresceram em um tempo de aproximadamente um mês foram tripsinizadas e utilizadas para os demais testes.

3.3 Análise morfológica por microscopia de contraste de fase

O acompanhamento da morfologia das células em cultura aconteceu com o amparo de microscópio de contraste de fase e obtenção de micrografias (com aumento de 100x e 40x) com o uso de máquina fotográfica digital acoplada ao microscópio e interligada a um computador portador do programa de edição específico.

3.4 Cariotipagem

A cariotipagem foi dividida em duas linhas experimentais, sendo que a primeira linha tinha por objetivo fazer a comparação do perfil do cariótipo entre a linhagem MDA-MB-231 e as linhagens monoclonais que foram geradas a partir da mesma, e a segunda linha experimental tinha como objetivo comparar as linhagens MDA-MB-231 e MCF7 e verificar se o tempo de cultivo celular implica em mudança de perfil do cariótipo nessas linhagens.

Para avaliação do cariótipo, as células eram tripsinizadas, contabilizadas utilizando a câmara de Neubauer e o corante azul de trypan para separar as viáveis das inviáveis, e lançadas em placas de 3,5 cm de diâmetro, sendo que para a primeira linha experimental foram lançadas 300.000 células de todas as linhagens (MDA-MB-231 e suas linhagens monoclonais, e MCF7) que foram incubadas na estufa de um dia para outro, quando foram submetidas à técnica, e para a segunda linha experimental, além das 300.000 células de MDA-MB-231 e MCF7 também foram lançadas células com 30.000 células, sendo que essas foram acompanhadas até alcançarem confluência de aproximadamente 40% para realização da técnica.

As lâminas utilizadas para a técnica tiveram tratamento especial, onde as mesmas ficaram imersas em álcool absoluto por 30 minutos, depois foram lavadas com detergente líquido e esfregadas com algodão, logo após foram mergulhadas em água ultrapura por 5 minutos e para finalizar secadas com papel toalha.

Para observação do cariótipo as células foram incubadas com colchicina 0,05% por 2 horas (70 µL a cada mL de meio de cultivo), sendo que ao findar o referido

período as células foram tripsinizadas e submetidas ao processo de centrifugação à 1500 rpm por 3 minutos. Concluída a centrifugação, o sobrenadante foi desprezado e as células foram ressuspensas em 3 mL de tampão hipotônico de KCl (0,075 M) e incubadas a 37° C por 40 minutos em ambiente úmido com 5% de CO₂, seguida de outra fase de centrifugação (nessa centrifugação o tempo usado era de 6 minutos e a velocidade de 1.000 rpm).

Concluídas as etapas anteriores, o sobrenadante foi descartado e o pellet formado foi ressuspendido em 500 µL de fixador (metanol/ ácido acético 3/1 v/v) e conduzido para uma outra centrifugação, desta vez à 4000 rpm por 6 minutos, sendo que ao final, o fixador foi retirado e substituído por novos 500 µL de fixador (não houve ressuspensão nesta etapa) e as células submetidas à outra centrifugação nas mesmas condições da anterior. Finalizadas as centrifugações, as células eram ressuspensas em 200 µL de fixador, sendo que após isso uma gota de cada amostra foi pingada de cada lâmina, onde no outro dia, realizou-se a coração das lâminas com corante Giemsa 5% por aproximadamente 5 minutos.

As lâminas foram analisadas com auxílio de microscópio óptico e os cariótipos foram fotografados para posterior análise.

3.5 Imunocitoquímica

A avaliação de imunocitoquímica teve como intuito verificar se a MDA-MB-231 e suas linhagens monoclonais eram triplo-negativas para a expressão dos receptores de estrógeno (RE), receptores de progesterona (RP) e receptores HER-2, além de verificar a quantidade da proteína de marcação de proliferação celular Ki67.

Para a avaliação em voga, as células foram cultivadas em placas de 10 cm de diâmetro e quando atingiram entre 90% e 100% de confluência foram tripsinizadas (foram utilizadas duas placas cheias para cada amostra), ressuspensas em 50 µL de PBS, pingadas em papéis filtro, que após isso foram dobrados e armazenados em cassetes, seguido do encubamento em frascos contendo formalina tamponada.

As células seguiram armazenadas em formalina tamponada da FCE até o laboratório de Patologia da Clínica Diagnose, sendo que, ao chegar lá, as mesmas foram emblocadas em parafina, os blocos cortados por micrótomo, e após isso as células foram coradas com hematoxilina e eosina.

Feito os processos acima, os blocos de parafina foram arquivados, depois desarquivados e utilizados para os testes envolvendo anticorpos, sendo que o laboratório já tinha arquivado também os blocos parafinados dos controles utilizados na imunocitoquímica.

Seguindo a explanação da técnica, primeiramente foram cortados em micrótomo os blocos parafinados das amostras (MDA-MB-231 e seus clones) e os controles (para expressão de HER-2 e RP foi usado um controle de carcinoma triplo-negativo, para expressão de ER foi usado um controle de mama normal e para expressão de Ki67 foi usado um controle do centro germinativo da amígdala).

Feitos os cortes, eles foram postos em lâminas e encubados em estufa à 85 °C por 30 minutos, após isso, as lâminas foram levadas para tanques onde havia tampão de recuperação à 65°C, sendo que os tanques onde ficaram o tampão recuperação aqueceram até alcançar uma temperatura de 97 °C (temperatura de exposição de 30 minutos) e depois a temperatura foi abaixada para 65°C novamente.

Feito o processo acima, deu-se início à corrida de imunocitoquímica, onde as lâminas foram expostas aos anticorpos, o reagente diaminobenzidina (DAB), polímero cromogênico e hematoxilina, sendo que a corrida demorou cerca de 3 horas.

Após isto, as lâminas foram lavadas com água deionizada e desidratadas com álcool/xilol e montadas com lamínulas.

3.6 Tempo de Duplicação

Os achados de tempo de duplicação (TD) foram obtidos por meio de avaliação da viabilidade celular em culturas de baixa confluência por 12 dias. Para a referida avaliação, as células foram semeadas em placas de 96 poços a uma baixa densidade (10.000 células / mL, sendo que foram semeados 100 µL por poço), sendo que a aferição da viabilidade celular foi feita diariamente após o semeio e repetida em séries de 8 poços diariamente através do ensaio de MTT [3(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio brometo].

Para demonstração dos resultados foi criada curva com os achados de absorbância relativa, que foi usada para aferir a taxa de crescimento na fase log (tempo de duplicação), com o auxílio do programa Grand Prism 5.

3.7 Citometria de Fluxo

A técnica de citometria de fluxo foi utilizada no estudo com o intuito de verificar a complexidade, o tamanho e os perfis de autofluorescência das linhagens, sendo que, para isso as células foram tripsinizadas, contadas em câmara de Neubauer, e coradas com azul de trypan para separar as células viáveis das inviáveis, sendo que após a contabilização uma quantidade de 100.000 células por linhagem (a MDA-MB-231 policlonal e seus clones) foi ressuspensa em 500 μ L de PBS e submetida ao procedimento, sendo que, os testes foram feitos em triplicata, o controle usado foi o PBS, o equipamento utilizado foi o FACS Calibur, foram feitas aquisições de 10.000 eventos, e o programa utilizado para analisar os dados obtidos foi o Flowing Software 2.

3.8 Teste de resistência ao congelamento das linhagens monoclonais

Com o intuito de aferir à resistência das linhagens monoclonais geradas a partir da MDA-MB-231 ao processo de congelamento em freezer -80° C, as placas foram tripsinizadas e contabilizadas em câmara de Neubauer com auxílio da metodologia de azul de trypan (para discernir as células viáveis das não-viáveis), após isto 3.000.000 de células de cada clone foram ressuspensas em meio de congelamento, (composto de 90% (v/v) de SFB e 10% (v/v) de dimetilsulfóxido (DMSO)), e congeladas em freezer -80° C.

Passadas 925 horas do ato de congelamento, as linhagens monoclonais foram descongeladas em placas de 10 cm de diâmetro e colocadas na estufa, sendo que, após 24h do horário de descongelamento, o sobrenadante das placas foi retirado, e contabilizado em câmara de Neubauer, utilizando azul de trypan para separar as células viáveis das inviáveis.

3.9 Teste de resposta à ação quimioterápica utilizando o ensaio do MTT

Para o referido teste, as células (MDA-MB-231 e suas linhagens monoclonais) foram plaqueadas em placa de 96 poços e a viabilidade foi aferida pelo ensaio do

MTT, sendo que para isso, após 24h de semeio as células foram encubadas com concentrações do fármaco paclitaxel, e após 48h do momento de início da exposição, as células foram submetidas à ação do MTT, de forma que passadas duas horas, o MTT foi retirado, as células expostas à DMSO 100% (agente lisante) e depois foi a leitura utilizando a espectrofotometria à um comprimento de onda de 450 nm.

3.10. Análise estatística

A escolha dos testes estatísticos se deu de acordo com a distribuição dos dados obtidos, sendo que para analisar os parâmetros de FSC-H e SSC-H foi usado o teste ANOVA com pós-teste de Dunnett e os valores de p usados foram de 0,05 e 0,01, e para aferir a sensibilidade da MDA-MB-231 e seus clones à ação do paclitaxel foi utilizado o teste Kruskal Wallis e pós-teste de Dunn.

4. Resultados e discussão

4.1 Composição heterogênea das linhagens

As linhagens de câncer mamário MDA-MB-231 e MCF-7 apresentaram composição morfológica heterogênea aparente no que tange à análise microscópica, sendo esta verificação de diferenças de perfis morfológicos dentro de uma mesma linhagem tumoral já difundida no meio científico (MOREIRA et al., 2019), e um dos pilares do estudo *in vitro* na cancerologia.

Conforme o dado apresentado acima, é possível conjecturar que o fato das linhagens celulares MDA-MB-231 e MCF-7 serem policlonais (composta de subpopulações clonais diferentes) implica em formação de culturas com perfis diferentes quando tais linhagens são submetidas a um longo período de cultivo em laboratório, sendo que a figura 1 pode exemplificar tal afirmação, na medida em que, como é demonstrado nesta figura, células de MDA-MB-231 lançadas a uma alta densidade (300.000 células) e fotomicrografadas 24 h após o semeio apresentaram padrões de crescimento diferentes quando comparadas a células da mesma linhagem lançadas a uma baixa densidade (30.000 células) e fotomicrografadas 130 h após o semeio (as culturas foram fotomicrografadas quando atingiram confluências parecidas

de aproximadamente 40%), de forma que, as células que ficaram por mais tempo em cultura apresentaram um padrão de crescimento mais radial.

Complementando a ideia acima, outras alterações fenotípicas podem ser observadas durante o processo de cultivo em laboratório, o que é demonstrado na figura 2, onde as células MCF-7 e MDA-MB-231 apresentaram certa mudança no cariótipo a depender do tempo em que foram cultivadas. A análise em questão mostrou que a linhagem MDA-MB-231 apresentou, após 130h de cultivo, cromossomos com perfis distintos quando comparados aos cromossomos verificados após 24h de cultivo, sendo esses com perfil mais próximo de cromossomos metafásicos, em contradição, a análise da linhagem MCF-7 evidenciou comportamento contrário neste quesito, sendo que o cariótipo aferido depois de 231 h de cultivo mostrou cromossomos com aparência próxima de figura metafásica ideal,

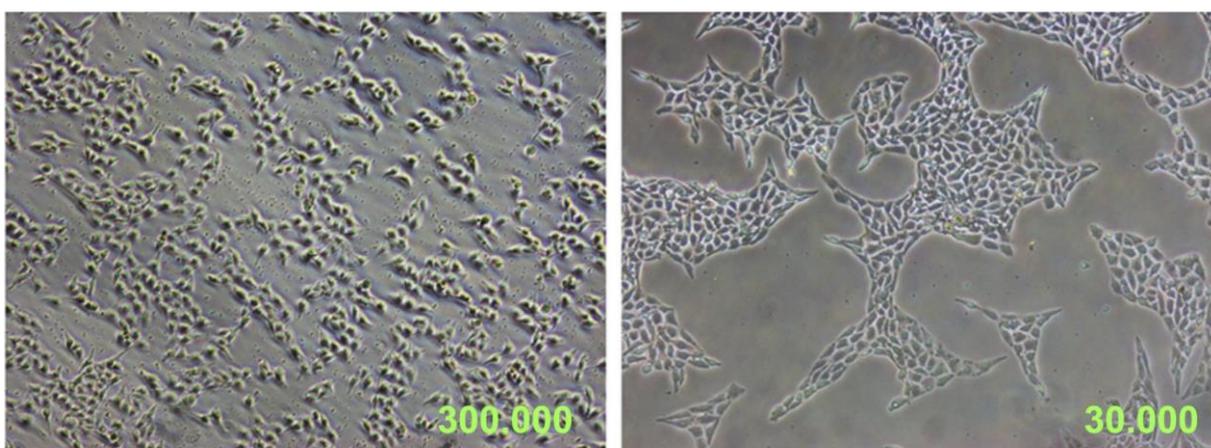


Figura 1 – Efeitos do tempo cultivo no padrão de crescimento da MDA-MB-231. Fotomicrografias representando a linhagem MDA-MB-231, sendo a primeira fotomicrografia (à esquerda) tirada 24h após o lançamento de 300.000 células e a segunda (à direita) tirada 130 h após o lançamento de 30.000 células. As duas fotomicrografias aparentam uma confluência parecida (aproximadamente 40%) e pode ser observada uma diferença nos perfis de crescimento, de forma que as células da esquerda (semeadas em baixa densidade) crescem de maneira mais agrupada e radial se comparadas as da direita (semeadas em alta densidade). Imagens feitas a partir de microscopia de contraste de fase (aumento de 40x).

e o cariótipo aferido depois de 24h de cultivo expôs cromossomos mais distantes da figura metafásica ideal, o que deixa claro que esta mudança de perfil cariotípico relacionado com o tempo de cultivo varia entre as linhagens.

Adicionando elementos à ideia acima, o índice mitótico e a porcentagem de cariótipos em estágio de fusão cromossômica foram parâmetros que sofreram mudança em relação ao tempo de cultivo das linhagens em questão, sendo que, a porcentagem de cariótipos em estágio de fusão cromossômica diminuiu pela metade, se comparados os valores analisados em 24 h após o semeio (encontrou-se 10% de cariótipos com perfil de fusão cromossômica) e 130h após o semeio (encontrou-se 5%

de cariótipos com perfil de fusão cromossômica), já os testes de cariotipagem com a MCF-7 não mostraram mudança no percentual de cariótipos com fusões cromossômicas no decorrer do tempo. No que concerne ao índice mitótico, os valores diminuíram conforme o tempo de cultivo, tanto na MDA-MB-231, quanto na MCF-7, sendo que os referidos resultados podem significar que a condição de proliferação das culturas no momento em que atingiram confluência ideal para submissão à cariotipagem foram alteradas, ou seja, o fator “tempo de cultivo” parece ter diminuído a proporção de células proliferantes neste momento (Figura 3).

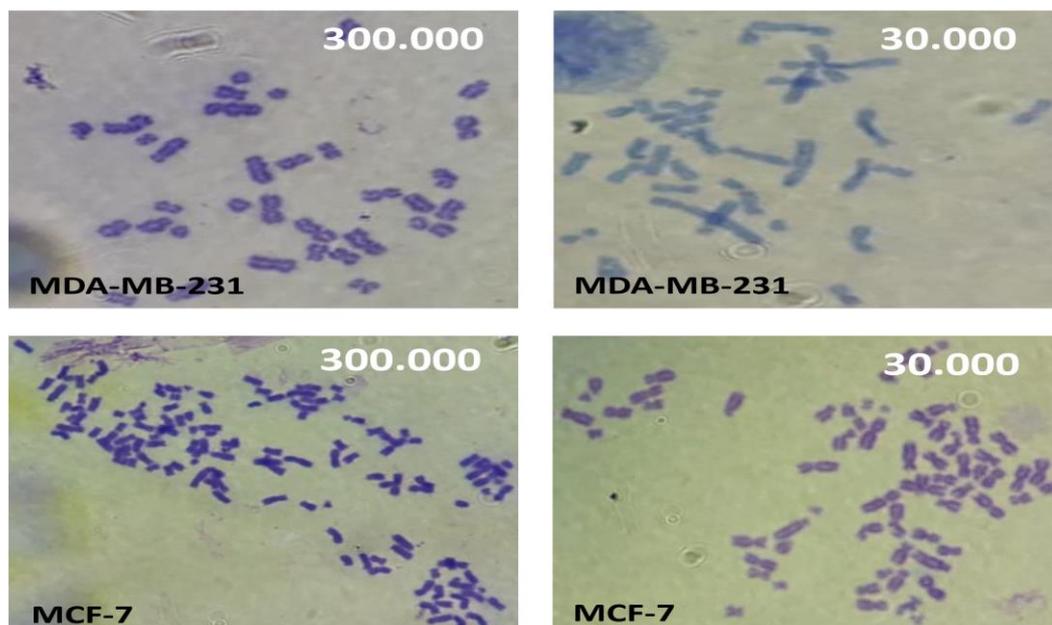


Figura 2- Efeitos do tempo cultivo no cariótipo da MDA-MB-231 e da MCF-7. Cariótipos das linhagens MDA-MB-231 e MCF-7 de acordo com quantidade de células lançadas (30.000 ou 300.000) e tempo de cultivo. As culturas iniciadas com 300.000 células ficaram 24h sendo cultivadas até serem submetidas à técnica de cariotipagem e as culturas iniciadas com 30.000 células ficaram em cultivo por 130h (MDA-MB-231) e 231h (MCF-7). Imagens observadas em microscopia ótica com aumento de 1000x (utilizando óleo de imersão).

As mudanças verificadas tendem a se intensificar a medida em que as culturas são cultivadas em laboratório por mais tempo, sendo que o tempo de cultivo já pode ser visto na literatura como um fator que influencia na descaracterização fenotípica de linhagens celulares (KUNZMANN e HOLZEL, 1987; JASMUND *et al.*, 2007; DEHNE *et al.*, 2010), e isto implica dizer que linhagens utilizadas por muito tempo em ambiente laboratorial podem não mais representar a neoplasia originária, o que pode desvirtuar

os resultados de muitos testes feitos com culturas envelhecidas.

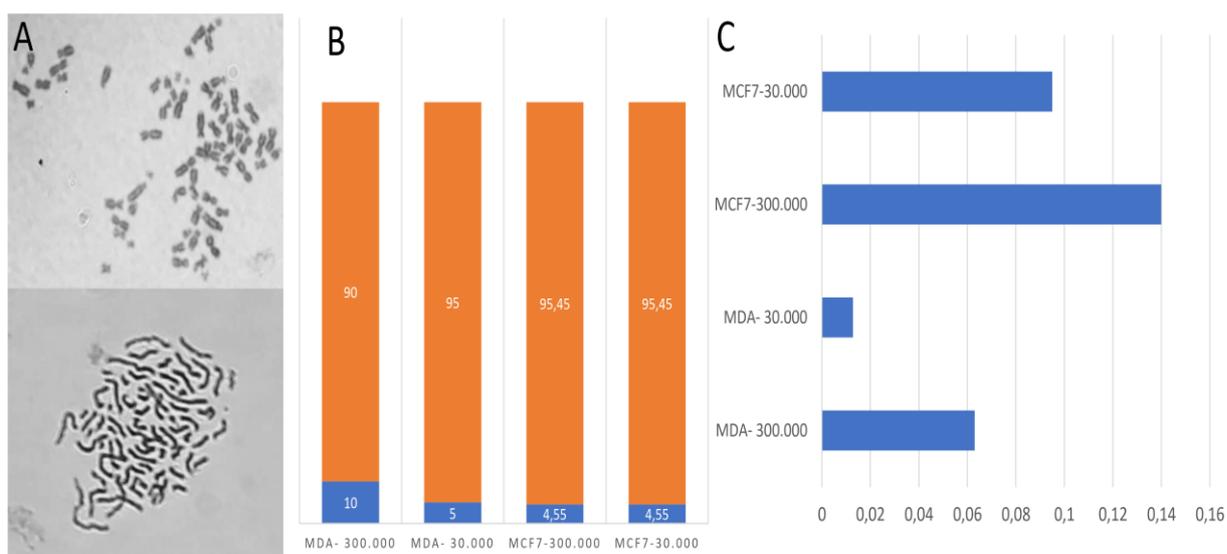


Figura 3 – Quantificação dos dados de cariotipagem da MDA-MB-231 e da MCF-7. A: Exemplos de cariótipo normal (acima) e cariótipo indicativo de fusão cromossômica (abaixo). Imagens observadas em microscopia de contraste de fase com aumento total de 1000x (utilizando óleo de imersão). Os dados relacionados à MDA-MB-231 foram mensurados após 24h do horário de semeio (300.000 células) e 130h depois do horário de semeio (30.000 células), e os dados relacionados à MCF-7 foram mensurados após 24h do horário de semeio (300.000 células) e 231 h depois do horário de semeio (30.000 células) B: Porcentagem de cariótipos que apresentaram fusão cromossômica de acordo com cada linhagem e de acordo com a quantidade de células lançadas (30.000 células ou 300.000 células). Em laranja a porcentagem de cariótipos que não apresentaram fusão cromossômica. Em azul a porcentagem de cariótipos que apresentaram fusão cromossômica. C: Índices mitóticos aferidos nas duas linhagens de mama levando em consideração o número de células lançadas (30.000 células ou 300.000 células).

Na perspectiva de que as linhagens de câncer de mama MDA-MB-231 e MCF-7 são heterogêneas, e portanto, policlonais, gerar linhagens monoclonais vindas destas linhagens com subpopulações clonais diferentes mostrou-se uma estratégia para avaliar o impacto da heterogeneidade de linhagens tumorais em estudos científicos, sendo que estratégias de isolamento de populações clonais vindas de linhagens heterogêneas já são vistas na literatura (SILVA, 2017). A problemática desta abordagem neste estudo, deu-se pelo fato da linhagem MCF-7 não ter sido sensível à técnica de seleção clonal, e portanto, não foi possível isolar linhagens monoclonais vindas da mesma, sendo que o mesmo fenômeno não ocorreu na MDA-MB-231 e foi possível obter 16 linhagens monoclonais para estudo. Desta forma, as únicas

linhagens monoclonais expostas neste estudo foram geradas a partir da MDA-MB-231(Figura 4).

O fato da linhagem MCF-7 não ter sido sensível à técnica de seleção clonal pode ser explicado pelas próprias teorias que explicam a heterogeneidade tumoral

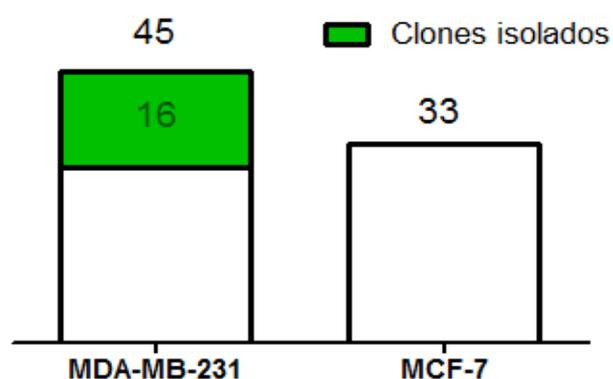


Figura 4 –Representação da sensibilidade das linhagens de câncer mamário MDA-MB-231 e MCF-7 à técnica de seleção clonal. Os números em cima das barras representam a quantidade de poços que apresentaram uma única célula na primeira leitura (2h após o lançamento) e continuaram sendo acompanhados após 72h do momento do lançamento, sendo que este número foi retirado de um universo de 384 tentativas de isolamento de linhagens monoclonais para cada linhagem policlonal. A coloração verde representa a quantidade de linhagens monoclonais geradas ao final do experimento.

(SANTOS, 2015), na medida em que o isolamento de uma única célula por poço não traz consigo a certeza de que os poços que abarcarem uma única célula no momento do semeio estarão englobando células que compõem uma subpopulação tumoral com alta capacidade proliferativa, e que tenham competência de iniciarem uma linhagem monoclonal, onde é possível que as células únicas isoladas nos poços possam pertencer a outras subpopulações tumorais já expostas na literatura, como células especialistas em angiogênese, células com características invasivas, ou células com propriedades metastáticas. (FIDLER, 1999).

O fato das duas linhagens terem proporções de células-tronco tumorais diferentes é um fator importante a ser mencionado no que diz respeito à MCF7 não ter respondido à técnica de seleção clonal e a MDA-MB-231 ter sido responsiva, sendo que, a literatura mostra que a MDA-MB-231 é uma linhagem que expressa muito mais genes relacionados ao fenótipo de célula-tronco tumoral quando comparada à MCF7 (RALPH, 2019). As células-tronco tumorais são capazes de se autorrenovar e gerar subpopulações tumorais diferentes, o que é posto na literatura como sendo a base de

um modelo que explica a carcinogênese (DAWOOD, AUSTIN e CRISTOFANILLI 2014), além de ser importante no entendimento do experimento em voga, pois o fato da MCF7 ter menor presença do fenótipo tronco em sua composição pode sinalizar o motivo da mesma ser menos propensa à geração de linhagens monoclonais.

As células-tronco tumorais podem influenciar várias características dos cânceres, sendo que, tais células podem contribuir para a resistência à radioterapia (ARNOLD, 2020), resistência a quimioterapia (SU *et al.*, 2018), além de contribuírem para a formação de metástases (ÇOBAN e SAHIN, 2018; NANDY e LAKSHMANASWAMY, 2017), e para a recidiva de tumores (LATHIA, LIU e MATEI, 2019). Levando em consideração que a efetividade da técnica de seleção clonal está ligada ao percentual de células com fenótipo tipo tronco que uma linhagem tem, pode-se conjecturar que a referida metodologia é útil para estudar neoplasias agressivas.

Dentre os 16 clones isolados a partir da linhagem MDA-MB-231 apenas 4 foram utilizados neste trabalho, sendo que o critério de escolha de tais linhagens monoclonais se deu unicamente pela capacidade proliferativa, desta forma, os 4 clones usados estavam entre os clones isolados com maior taxa de crescimento, e esse fator se deve ao fato da facilidade de trabalhar com células que crescem mais rápido, pois culturas de crescimento lento em várias ocasiões podem inviabilizar a execução de experimentos pela falta de quantitativo celular suficiente.

O fato de não ter usado todas as linhagens monoclonais geradas a partir da MDA-MB-231 não invalida o estudo, tendo em vista que, células de proliferação lenta podem ter fenótipos muito aberrantes também. Além disso, ter selecionado as linhagens monoclonais com maior taxa de crescimento contribuiu para a avaliação do fator tempo de cultivo “intimamente relacionado com o número de duplicações” como um fator influenciador de mudança fenotípica.

A análise visível da morfologia por microscopia de contraste de fase revelou dissemelhanças entre as linhagens monoclonais, e entre os clones e a MDA-MB-231 policlonal, sendo que tais dissemelhanças puderam também ser vistas com relação aos padrões de crescimento como mostra a Figura 5, onde o clone C9 apresenta células com morfologia mais esticadas quando feita a comparação com o clone C5, que apresenta células com forma menos esticadas, de forma que, a mesma figura também evidencia que o padrão de crescimento do clone C5 se distingue do padrão de crescimento encontrado em D9, onde o clone D9 cresce de forma muito mais espaçada e o clone C5 cresce de forma mais compacta.

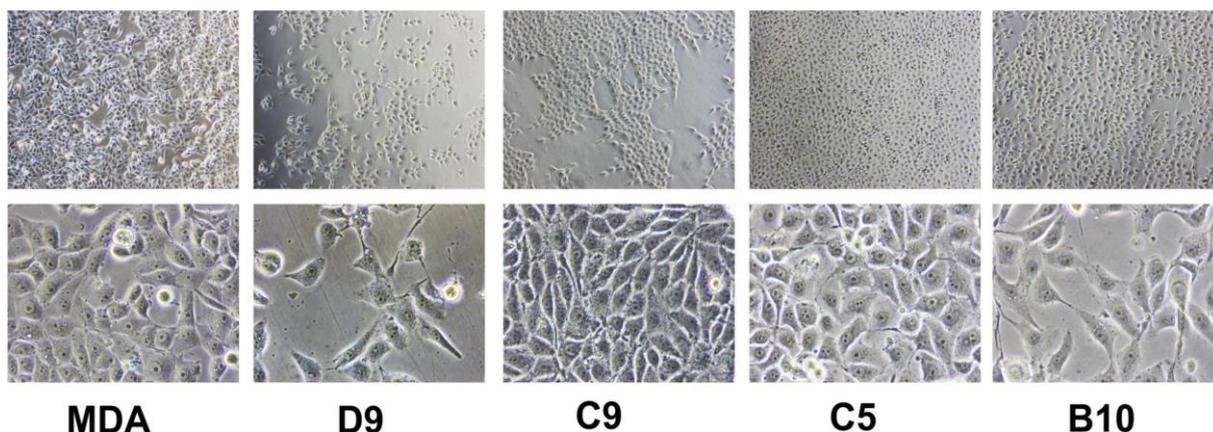


Figura 5 – Morfologia e padrão de crescimento da MDA-MB-231 e seus clones. Fotomicrografias superiores fazem alusão ao perfil de crescimento de crescimento da linhagem MDA-MB-231 e de suas linhagens monoclonais. Fotomicrografias inferiores fazem alusão à morfologia da MDA e de suas linhagens monoclonais. As imagens foram feitas com auxílio de microscópio de contraste de fase, sendo que as imagens superiores foram registradas utilizando lentes objetivas de 4x de aumento, e as imagens inferiores foram registradas usando objetivas de 10x de aumento.

A análise por microscopia de contraste de fase tem suas limitações, na medida em que, este método só permite observar alterações de morfologia e de padrão de crescimento eminentes, sendo que alterações mais detalhistas precisam de ensaios mais robustos para serem avaliados, de maneira que, como exemplo de testes possíveis a literatura aponta, por exemplo, para aferir parâmetros morfológicos o índice de polaridade e a área estimada de adesão (SILVA, 2017) e o teste de migração para avaliar padrões de crescimento (REY, 2018).

O cariótipo é um bom parâmetro de caracterização de linhagens celulares, sendo esse muito utilizado nos mais diversos estudos (VCELAR *et al.*, 2017; DMITRENKO e STEPANENKO, 2015; CHOI *et al.*, 2014), como resultado da exposição das linhagens monoclonais à técnica percebeu-se que os perfis de cariótipo encontrados não foram muito aberrantes, onde a maioria das visualizações não expôs um padrão de anomalias estruturais visíveis à microscopia, no entanto, como mostra a figura 6 é perceptível que entre os clones houve algumas diferenças no retrato dos cromossomos metafásicos, o que pode ser visto, por exemplo, se compararmos a imagem correspondente ao clone D9 (imagem que mais representa um cariótipo típico) com a imagem do clone B10 (representação com o cariótipo mais distante da figura metafásica ideal).

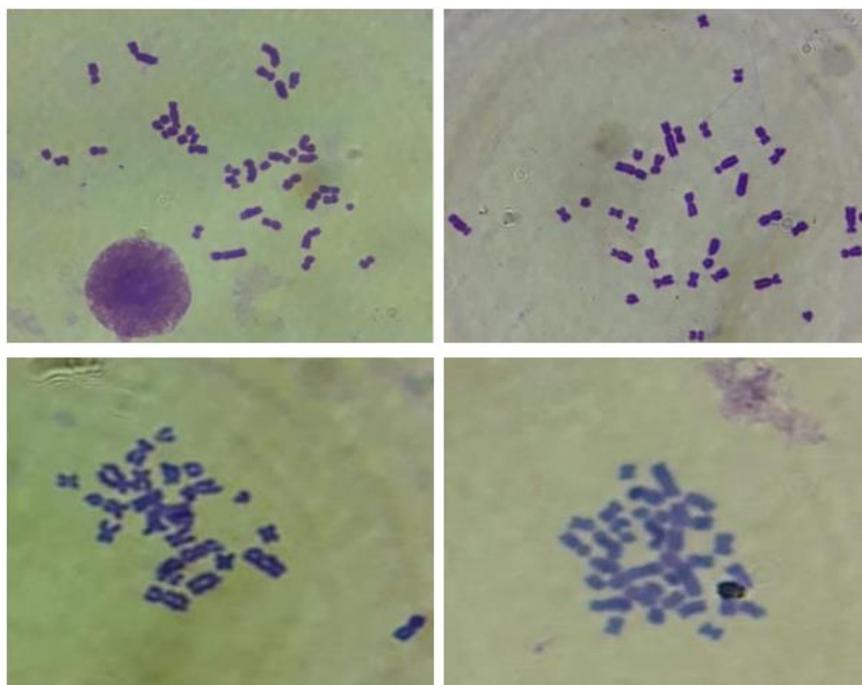


Figura 6 - Cariótipos das linhagens monoclonais de MDA-MB-231. Clone C9 (superior à esquerda), clone C5 (superior à direita), clone D9 (inferior à esquerda), e clone B10 (inferior à direita). Imagens observadas em microscopia ótica com aumento de 100x nas lentes objetivas (utilizando óleo de imersão)(fotos inferiores) e com aumento de 40x nas lentes objetivas (fotos superiores). O padrão não-aberrante dos cariótipos (como os perfis demonstrados na figura) foi maioria nas linhagens policlonais e monoclonais.

No geral, os cariótipos encontrados nas linhagens monoclonais não foram aberrantes, no entanto, tanto na linhagem policlonal (MDA-MB-231) quanto nos clones gerados houve presença de fusões cromossômicas (com exceção das linhagens monoclonais D9 e C5), sendo que tais alterações foram quantificadas e transformadas em percentual, o que possibilitou verificar que entre as linhagens monoclonais que apresentam as referidas anomalias houve diferença, pois o clone C9 (9,52 % dos cariótipos avaliados foram típicos de fusão cromossômica) teve mais que o dobro de percentagem de cariótipos com fusão cromossômica se comparado ao clone B10 (4,55 % dos cariótipos avaliados foram típicos de fusão cromossômica). A mesma comparação pode ser feita entre os clones e a linhagem MDA-MB-231 (10% dos cariótipos avaliados foram típicos de fusão cromossômica) , onde a diferença só pode ser vista em relação ao clone B10 (Figura 7).

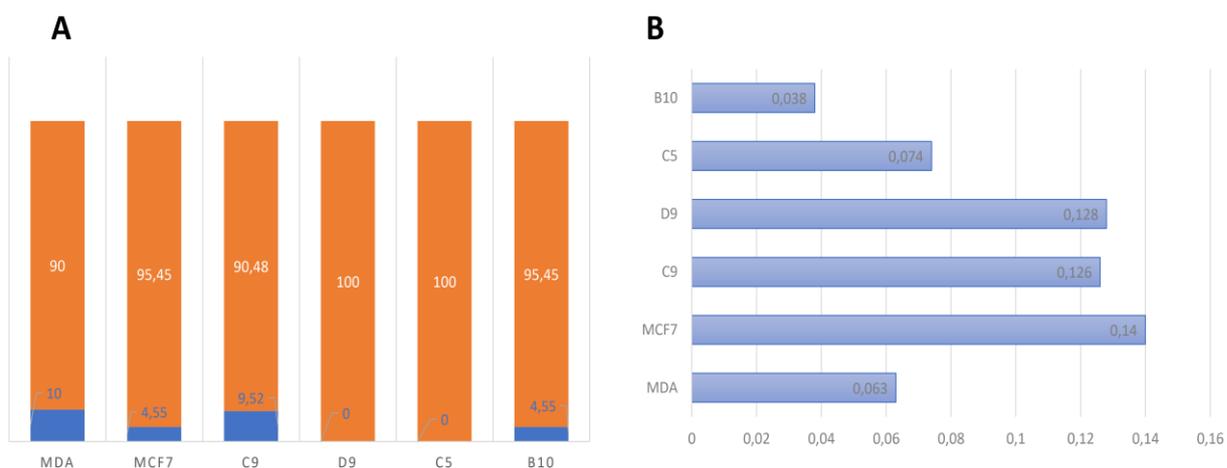


Figura 7 – Porcentagem de cariótipos com fusão cromossômica. A: Porcentagem de cariótipos que apresentaram fusão cromossômica em cada linhagem policlonal e monoclonal. Em laranja, a porcentagem de cariótipos típicos das linhagens e em azul a porcentagem de cariótipos que apresentaram fusão cromossômica em cada linhagem. B: Índices mitóticos aferidos em cada linhagem.

Outro parâmetro obtido com a técnica de cariotipagem e que pode ser usado para efeitos de caracterização, é o índice mitótico, sendo que os índices demonstrados foram de: 0,038 para B10 - 0,074 para C5 - 0,128 para D9 - 0,126 para C9 – 0,14 para MCF-7 – 0,063 para MDA-MB-231.

Observando os valores acima, e como pode ser demonstrado visualmente na figura 7, os índice mitóticos das linhagens monoclonais foram bem diferentes, com exceção dos índices dos clones D9 e C9, que ficaram bastante próximos. Com relação à comparação dos valores de índices mitóticos das linhagens monoclonais com a MDA policlonal, é perceptível que os clones D9 e C9 foram os que mais se afastaram do padrão encontrado na MDA-MB-231.

O fato da MDA-MB-231 ser uma linhagem de adenocarcinoma mamário triplo-negativa para expressão dos receptores HER-2, RE e RP (ATCC, 2020) torna a verificação deste perfil importante na identificação das linhagens monoclonais, sendo que os resultados encontrados mostram que tanto a linhagem heterogênea, quanto suas linhagens monoclonais apresentaram o fenótipo triplo-negativo (figura 8).

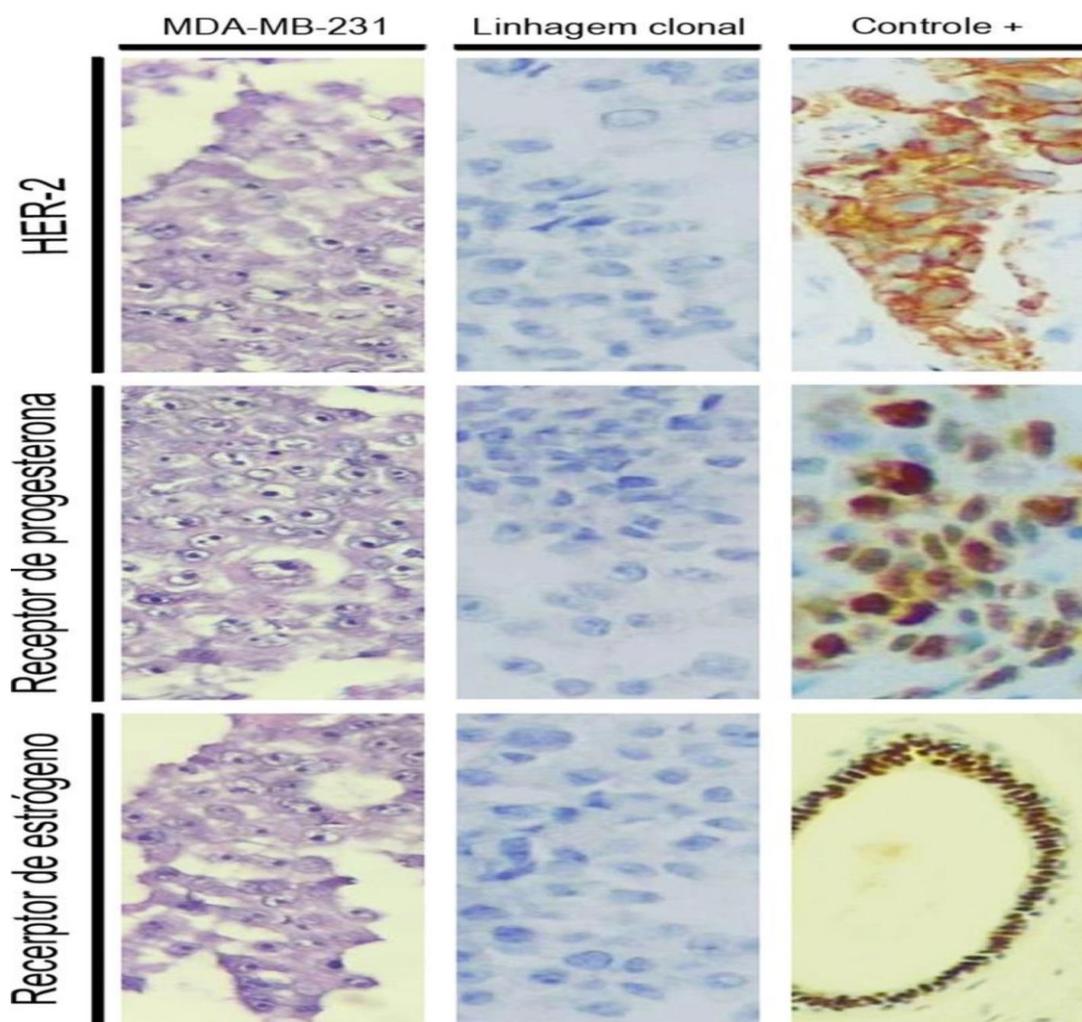


Figura 8 – Resultado de imunocitoquímica da MDA-MB-231 e seus clones. Demonstração que a MDA-MB-231 e suas linhagens clonais (imagem representa o ocorrido em todos os clones) são triplo-negativas para a expressão dos receptores HER-2, RP (receptor de progesterona), e RE (receptor de estrogênio), o que pode ser observado pelo fato das imagens presentes nas colunas localizadas do lado esquerdo e no meio não terem a coloração tom meio amarelo ou marrom (tom que sinaliza a presença destes receptores), e terem apenas a coloração provida da técnica de HE (hematoxilina-eosina). Os controles positivos representam tecidos que sabidamente expressam os respectivos receptores.

4.2 Padrão de crescimento

Como mostra a literatura, a MDA-MB-231 é uma linhagem heterogênea que abriga subpopulações clonais com níveis proliferativos bem variados (SILVA, 2017), sendo assim a comparação das taxas proliferativas das linhagens monoclonais produzidas neste estudo é essencial, de maneira que é válida a comparação entre as linhagens

monoclonais e a comparação de cada linhagem monoclonal com a MDA-MB-231 heterogênea.

O perfil de expressão do antígeno ki67 encontrado nos clones e na linhagem MDA-MB-231 policlonal foi bem parecido (figura 9), visto que todos apresentaram alta expressão de ki67, sendo que a linhagem heterogênea e os clones C9 e C5 tiveram

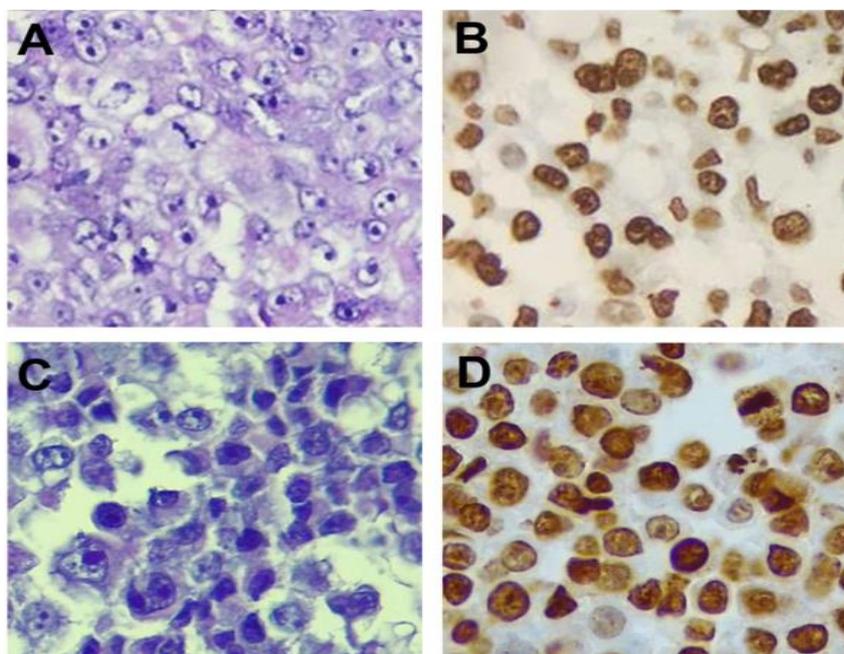


Figura 9- Resultado de imunocitoquímica (Ki67) da MDA-MB-231 e seus clones. Demonstração de que a MDA- MB-231 e suas linhagens monoclonais têm alta expressão do antígeno Ki67. A) Coloração por HE da linhagem policlonal. B) Linhagem policlonal com marcadores de ki67. C)Coloração por HE de cultura monoclonal (imagem representa o ocorrido em todos os clones). D) Linhagem monoclonal com marcadores de ki67.

95% de suas células expressando o marcador, e os clones D9 e B10 tiveram 90% de suas células expressando o marcador, o que indica que tanto a linhagem policlonal, quanto as linhagens monoclonais relatadas possuem alto nível proliferativo.

No que se refere ao TD, a MDA policlonal e as suas sublinhagens se mostraram sensíveis à técnica, na medida em que, foi possível observar a fase de crescimento das mesmas e calcular o TD de cada uma, sendo que a linhagem monoclonal C9 foi a que apresentou o padrão de crescimento mais distinto, o que acabou refletindo no seu TD (o clone em questão teve um valor de TD mais alto que os demais, ou seja, dentro do grupo analisado é o que cresce mais lentamente) (Figura 10). Os valores que cada TD e a faixa de valores do intervalo de confiança podem ser vistos no Quadro 2.

Os valores parecidos de TD encontrados entre as linhagens monoclonais e a linhagem policlonal casam com a simetria encontrada nos resultados de expressão de

antígeno Ki67, com uma leve discrepância para o valor de TD do clone C9 que foi mais alto. Essa simetria de resultados torna o achado mais robusto e minimiza a ideia de diferentes taxas proliferativas indicadas pela variedade de índices mitóticos mostrados na figura 7, sendo que os testes de TD e de expressão de antígeno Ki67 são bem mais quistos para evidenciar níveis proliferativos se comparados ao simples indicador de índice mitótico resultante da cariotipagem.

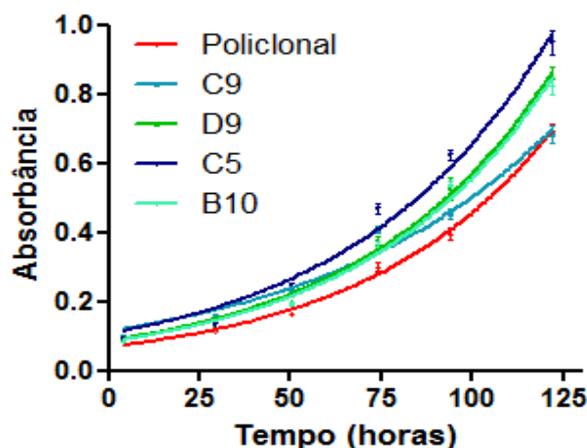


Figura 10 –Curvas de tempo de duplicação da MDA-MB-231 e seus clones. Figura mostra a tendência de crescimento da MDA-MB-231 e suas respectivas linhagens monoclonais. C9 é a única a apresentar um padrão de inclinação da curva diferente o que reflete em seu tempo de duplicação.

Linhagem	TD (h)	Faixa de valores do intervalo de confiança (h)
MDA policlonal	36,42	34,58 – 38,47
C9	46,61	43,28 – 50,50
D9	36,74	34,34 – 39,49
C5	38,33	35,70 – 41,37
B10	36,42	34,46 – 38,60

Quadro 2- Valores de TD da linhagem MDA-MB-231 e de suas linhagens monoclonais

O presente achado de padrão de crescimento das linhagens (policlonal e monoclonais), pode ser contrariado por achados na literatura que utilizaram da mesma técnica de seleção clonal em linhagens MDA-MB-231 e encontraram clones com diferentes taxas proliferativas (SILVA, 2017), todavia é lícito conjecturar que a técnica de seleção clonal não consegue por si só separar todas as subpopulações proliferativas presentes na linhagem, desta forma, dados divergentes podem ser encontrados nesta perspectiva.

A mensuração da capacidade proliferativa em um trabalho que envolve subpopulações clonais é importante, visto que ao analisar o cultivo celular sob a perspectiva da capacidade proliferativa, é legítimo refletir que existe a possibilidade de que populações com maior capacidade de replicação, se tornem proporcionalmente mais presentes na culturas a medida em que estas culturas vão sendo cultivadas por um longo tempo no laboratório.

A análise morfológica por citometria de fluxo (analisando parâmetros de FSC-H e SSC-H) mostrou que as linhagens monoclonais vindas de MDA-MB-231 apresentaram diferença morfológica em relação à MDA-MB-231 heterogênea, de forma que, os eventos (a priori, cada evento é tido como uma célula passando em frente ao laser do citômetro de fluxo) demonstrados nos gráficos dos clones apresentaram um número expressivo de perfis que não se encaixavam no padrão contemplado pelos 95% de eventos da MDA-MB-231 heterogênea, sendo que isso pode ser observado pelo aumento de pontos de tonalidade preta nos gráficos dos clones encontrados na figura 11 e melhor detalhado na figura 12.

Além da verificação apontada acima, outro dado importante que pode ser verificado na figura 11, diz respeito à formação de subpopulações com morfologia distinta nas linhagens clonais, posto que a dispersão dos eventos representados nos gráficos destas não ficou concentrada em uma única área, portanto, foram notados valores de SSC-H e FSC-H um pouco diferentes, o que representa níveis de tamanho e complexidade que não são uniformes. A linhagem clonal que mais variou em termos de diferenças nos padrões de FSC-H e SSC-H foi a C9, onde é possível observar uma dispersão maior no gráfico de SSC-H versus FSC-H e verificar até uma subpopulação com alto FSC-H e SSC-H (subpopulação chamada de R2 no gráfico 11).

A mudança de padrões morfológicos já é descrita na literatura como sendo algo presente na carcinogênese (PINTO, 2015), de forma que este princípio se repetiu até

nas linhagens clonais, demonstrando que até as linhagens clonais tendem a continuar o processo de desdiferenciação iniciado na carcinogênese.

O crescimento de subpopulações com fenótipos até nos clones sugere uma possível mudança de perfil de culturas quando cultivadas por muito tempo em laboratório, o que acaba diferenciando estas culturas das originárias e tem uma série

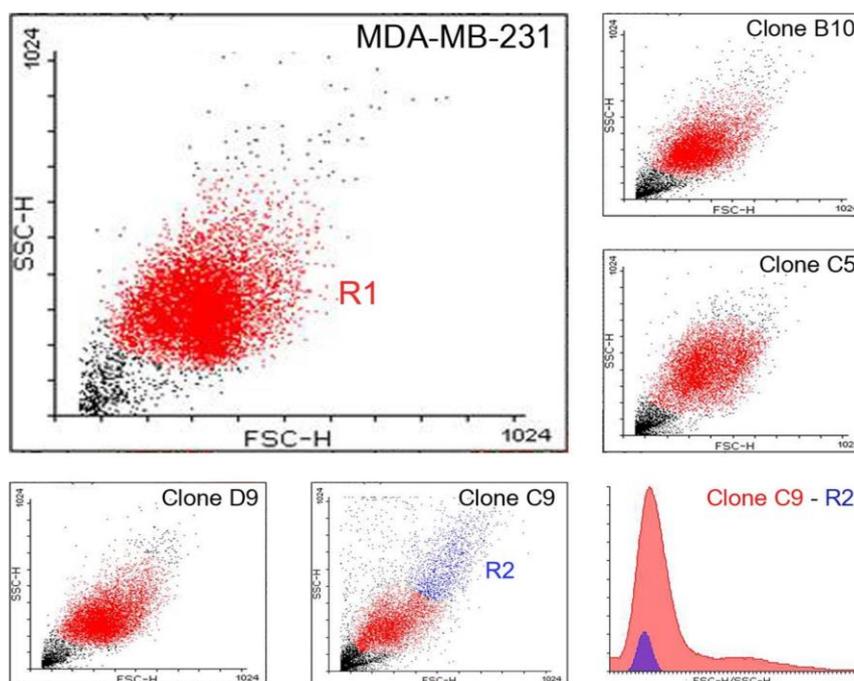


Figura 11 –Análise morfológica por citometria de fluxo da MDA-MB-231 e suas linhagens monoclonais. R1) No gráfico de MDA-MB-231 representa 95% dos eventos totais e nos gráficos dos clones representa os eventos com perfis semelhantes aos de MDA-MB-231. R2) No clone C9 representa uma subpopulação expressiva e diferente da população encontrada em R1. Em preto, eventos captados com baixo FSC-H e baixo SSC-H. Gráfico inferior mais à direita mostra tendência do comportamento de FSC-H/ SSC-H do grupo R2 é igual a tendência de comportamento FSC-H/ SSC-H do clone C9.

de fatores importantes, como por exemplo, culturas com características diferentes podem ter respostas diferentes à determinado teste de um fármaco.

A distinção verificada sob da ótica da citometria de fluxo entre as linhagens monoclonais geradas a partir da MDA-MB-231, e a própria linhagem policlonal, não se deteve apenas no âmbito das diferenças morfológicas, sendo que, pôde ser observado que os clones têm perfis de autofluorescência diferentes entre si e principalmente diferentes em relação à linhagem policlonal, sendo que tais diferenças foram perceptíveis ao analisar os perfis de autofluorescência captados por 4 canais

muito utilizados em citometria de fluxo, que são FL1-H, FL2-H, FL3-H e FLH-4 (Figura 13).

Uma exemplificação mais próxima desta diferença de emissão de autofluorescência entre a MDA-MB-231 e as linhagens clonais pode ser verificada na figura 14, onde a emissão de fluorescência do clone C5 é comparada com a da linhagem policlonal através dos filtros FL1-H e FL2-H, sendo possível verificar uma diferença nos perfis encontrados.

A figura 15 vai além da comparação de autofluorescência entre uma linhagem monoclonal (no caso desta figura, o clone usado foi o C9) e a MDA-MB-231 policlonal, na medida em que, é mostrada também uma subpopulação de C9 (chamada de R2).

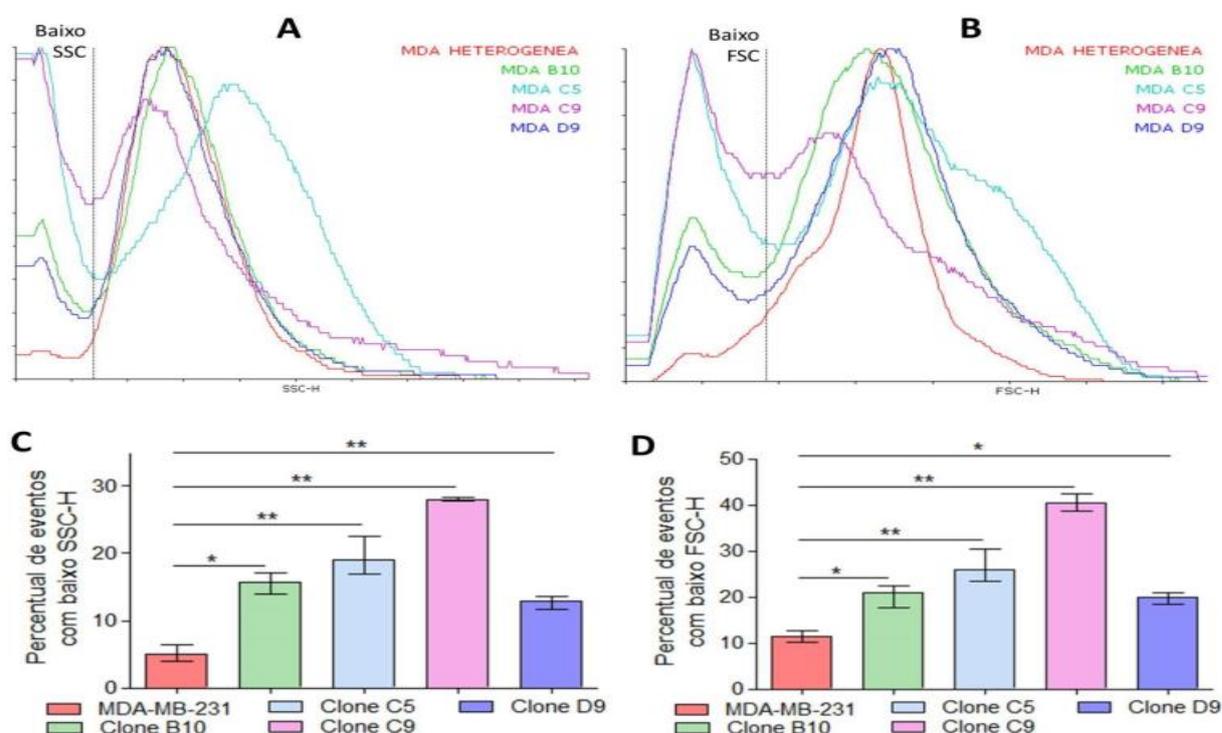


Figura 12 – Análise dos parâmetros de FSC-H e SSC-H de forma separada na linhagem MDA-MB-231 e seus clones. A) Demonstra o comportamento do parâmetro de SSC-H em cada linhagem, sendo que percebe-se que os clones apresentam um número bem maior de eventos com baixo SSC-H quando comparados à linhagem policlonal. B) Demonstra o comportamento do parâmetro de FSC-H em cada linhagem, sendo que percebe-se que os clones apresentam um número bem maior de eventos com baixo FSC-H quando comparados à linhagem policlonal. C) Gráfico demonstra o percentual de eventos com baixo SSC-H nas linhagens, sendo que quando feita a comparação com a linhagem policlonal, todos os clones tiveram diferença estatisticamente significativa. D) Gráfico demonstra o percentual de eventos com baixo FSC-H nas linhagens, sendo que quando feita a comparação com a linhagem policlonal, todos os clones tiveram diferença estatisticamente significativa. Análise estatística feita por ANOVA com pós-teste de Dunnett. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

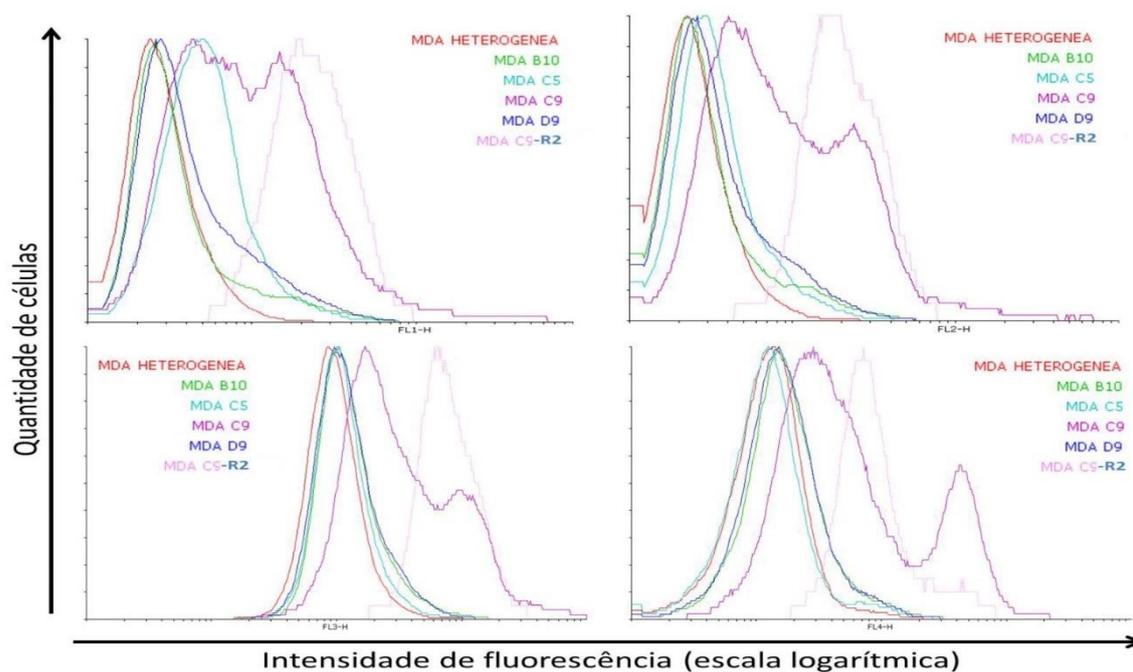


Figura 13 – Análise de autofluorescência da MDA –MB-231 e seus clones. Análise de autofluorescência usando os filtros FL1-H (esquerda superior), FL2-H (direita superior), FL3-H (esquerda inferior) e FL4-H (direita inferior) para a MDA-MB-231 policlonal e suas linhagens monoclonais.

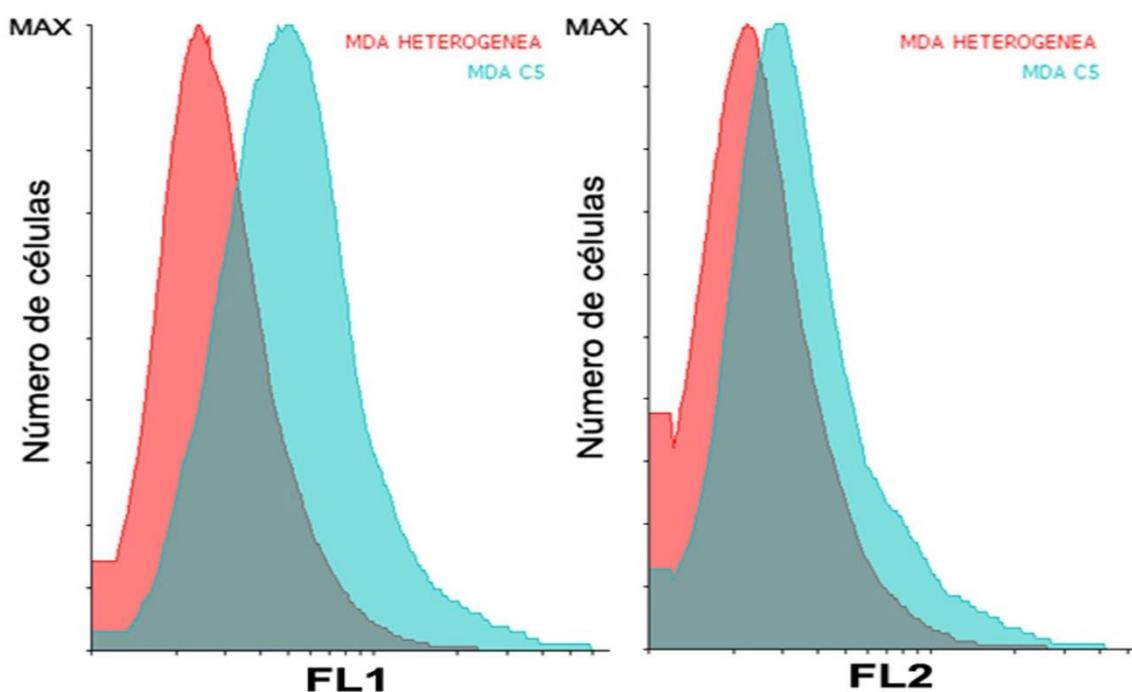


Figura 14 – Análise de autofluorescência da MDA-MB-231 e seu clone C5. Análise de autofluorescência usando os filtros FL1-H (esquerda), FL2-H (direita), com o intuito de comparar a MDA-MB-231 e a linhagem monoclonal C5. O eixo dos gráficos está em escala logarítmica o que deixa os perfis de emissão de fluorescência destas linhagens bem diferentes.

A figura em questão evidencia a diferença que há entre os 3 grupos mencionados no que tange à fluorescência captada pelos filtros FL1-H, FL2-H, FL3-H e FL4-H, sendo que é notório que cada grupo tem um perfil de autofluorescência diferente.

O achado de diversidade no parâmetro de autofluorescência é de suma importância, visto que, experimentos de citometria de fluxo que utilizam emissão de fluorescência são muito difundidos no meio científico (BERGSTEIN, WEISS, BICUDO, 2014; NAKAGE *et al.*, 2005), um exemplo disto, são os experimentos que utilizam anticorpos monoclonais fluorescentes para determinados antígenos celulares e depois fazem a averiguação desta marcação por meio de citometria de fluxo (BACAL *et al.*, 2007). Sendo assim, é lícito pensar que perfis de autofluorescência distintos dentro de uma mesma linhagem pode ser um fator de interferência em ensaios de citometria de fluxo que utilizam este parâmetro, de maneira que, o fato das linhagens serem tão heterogêneas, não garante que o controle de autofluorescência utilizado no início do experimento tenha o mesmo perfil de autofluorescência das células usadas no experimento em si.

4.3 Sensibilidade à fármacos

O teste de sensibilidade ao paclitaxel apontou feições dissemelhantes entre os clones, sendo que, a concentração de 1,5 μM reduziu em mais de 50% a viabilidade celular no clone C5, enquanto que a mesma concentração reduziu algo em torno de 25% no clone C9, outro exemplo pode ser dado se feita a comparação de sensibilidade utilizando a concentração de 25 μM , onde a referida concentração reduziu a viabilidade celular do clone B10 em pouco mais de 50%, enquanto que a mesma concentração reduziu a viabilidade do clone D9 em aproximadamente 75% (Figura 16).

Além das divergências dos padrões de resposta ao paclitaxel entre os clones, também foi possível observar que a linhagem MDA-MB-231 heterogênea também divergiu dos clones, sendo que a resposta mais próxima obtida por um clone foi a do D9, sendo que o padrão de sensibilidade encontrado em todos os outros clones foi diferente do padrão encontrado na MDA policlonal, de forma que, no geral, os clones foram mais resistentes à ação do paclitaxel (Figura 16).

Os dados de sensibilidade à ação do paclitaxel são um representativo muito importante, pois grande parte dos estudos em câncer buscam novos fármacos para ampliação da farmacoterapia já existente (CORONA, *et al.*, 2017), e dentro desta

busca por princípios ativos, as linhagens celulares têm grande relevância, na medida em que, testar *in vitro* as possíveis substâncias antineoplásicas é um passo exigido na triagem pré-clínica.

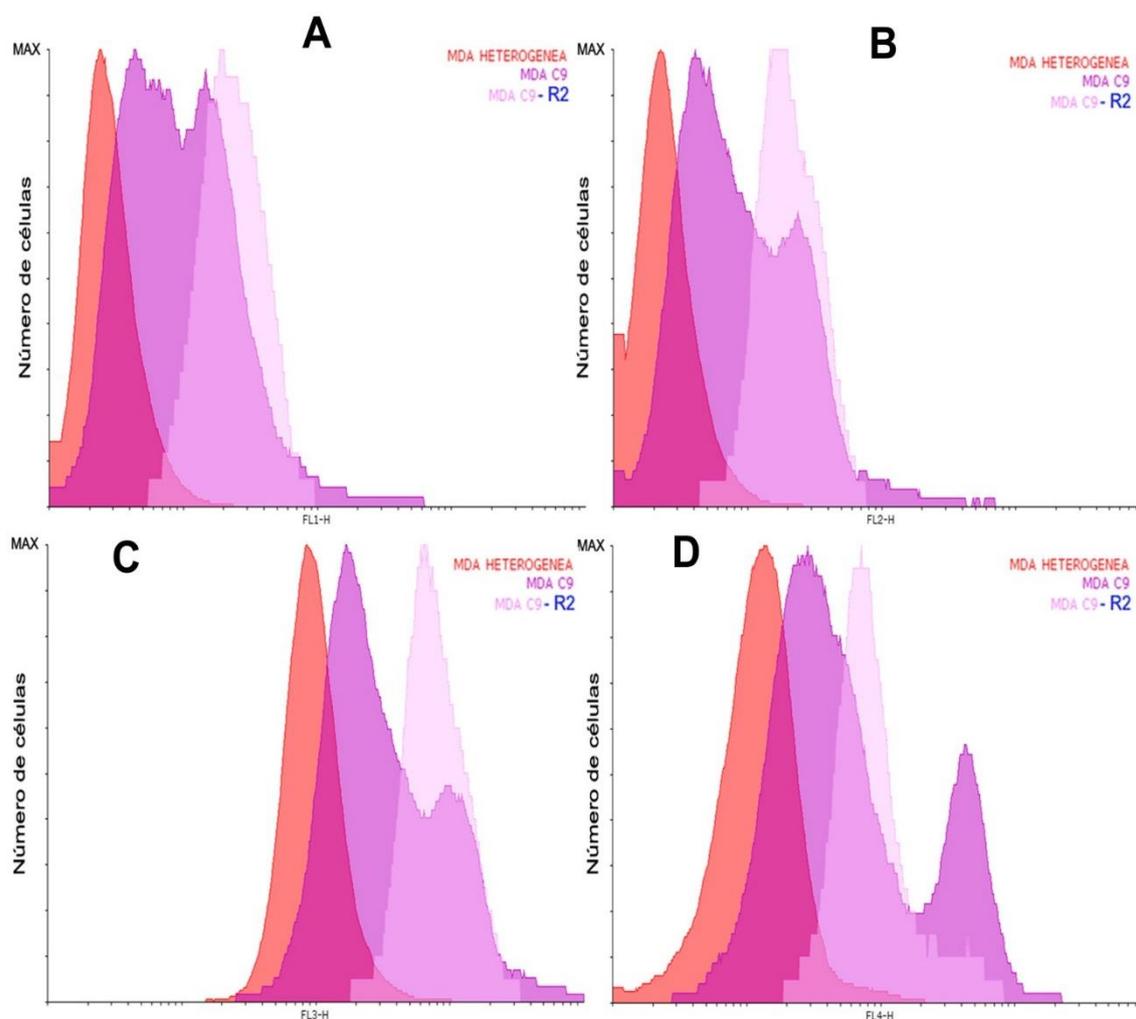


Figura 15 – Análise de autofluorescência da MDA-MB-231, seu clone C9, e subpopulação C9 (R2). Análise de autofluorescência da MDA-MB-231, do clone C9 e da subpopulação R2 presente em C9 usando os filtros FL1-H (esquerda superior), FL2-H (direita superior), FL3-H (esquerda inferior) e FL4-H (direita inferior). No eixo x dos gráficos a escala é logarítmica, deixando a diferença de captação de fluorescência mais diferente entre os grupos comparados.

Dentro da perspectiva mencionada no parágrafo anterior, e tendo em vista que a MDA-MB-231, como demonstrou este trabalho, tem populações clonais distintas, é possível conjecturar que os resultados de testes de princípios ativos obtidos dentro da mesma linhagem possam ser divergentes, sendo que dentro desta mesma perspectiva, o presente trabalho demonstrou que o tempo de cultivo pode contribuir

para mudança fenotípica, tal mudança pode incluir a aquisição de resistência a princípios ativos.

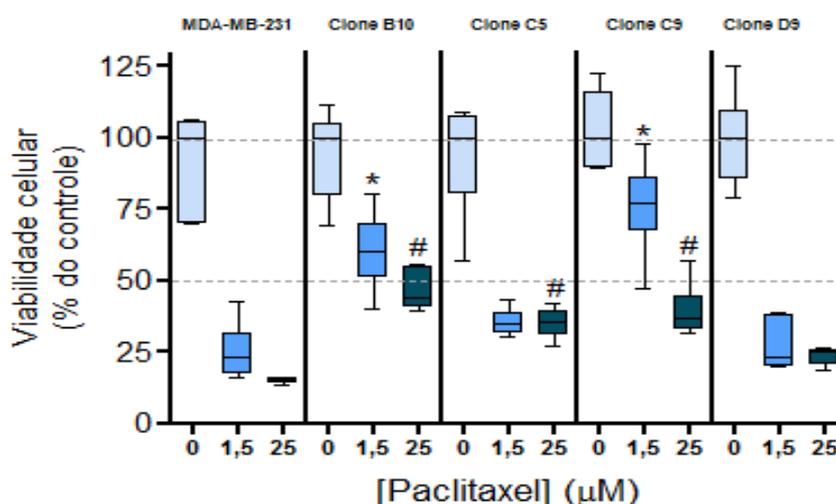


Figura 16 –Sensibilidade ao paclitaxel. Figura mostra padrões de respostas diferentes quanto à exposição à concentrações diferentes de paclitaxel (concentrações de 1,5 e 25 µM). O padrão é diferente entre os clones, e se comparado à linhagem policlonal, o clone que apresenta o padrão de sensibilidade ao fármaco mais próximo dessa é o D9. As células ficaram expostas às concentrações por 48h. Análise estatística feita com Kruskal Wallys e pós teste de Dunn. * $p < 0,05$ = estatisticamente significativo quando comparado ao grupo de concentração 1,5 µM da MDA. # = estatisticamente significativo quando comparado ao grupo de concentração 25 µM da MDA.

A reprodutibilidade experimental é um dos pilares da ciência, desta forma, as conjecturas acima trazem à tona uma problemática para a prática laboratorial, visto que, o fenômeno de mudança fenotípica de uma linhagem dificulta a comparação de dados experimentais entre estudos, e também limita a reprodutibilidade dos experimentos.

Vários são os fatores que podem influenciar na mudança da feição fenotípica, e muitos deles são usados rotineiramente no cultivo celular, sendo que, tais fatores podem agir como agentes seletivos, eliminando subpopulações clonais que são sensíveis à ação dos mesmos e selecionando subpopulações clonais que são resistentes à ação deles. A exemplo dos agentes seletivos em questão é possível citar o próprio cultivo por longo tempo, o uso de antibiótico no meio de cultivo e o processo de tripsinização de culturas aderentes.

Um outro fator ambiental que pode agir selecionando linhagens clonais dentro da cultura heterogênea é ato de congelamento das culturas em freezer de -80°C , sendo que neste processo que visa manter as células conservadas pra um posterior

uso, muitas células se tornam inviáveis, ou seja, dentro da cultura heterogênea existem linhagens monoclonais que são mais sensíveis ao processo de congelamento em quanto outras não são. É importante ressaltar que muitas células se tornam inviáveis durante o método de congelamento tanto pelo processo em si, quanto pela presença de dimetilsulfóxido (DMSO) no meio de congelamento.

A exemplo do agente seletivo mencionado no parágrafo anterior, a figura 17 mostra bem como funciona esta dinâmica de resistência e sensibilidade ao congelamento, sendo que é possível perceber uma diferença nos padrões encontrados, onde os clones B10 e C5 se mostraram mais sensíveis ao congelamento, pois a proporção de células que não aderiram na placa após o descongelamento foi maior (19,5% das células de B10 não aderiram e 20,2% das células de C5 não aderiram) quando comparada aos clones D9 e C9 (7,2% das células de D9 não aderiram e 9,6% das células de C9 não aderiram), e isto soma-se ao fato de 14% do total das células de B10 (aderentes ou não), e 16% das células de C5 (aderentes ou não) terem se mostrado inviáveis, enquanto 8% do total das células de C9 (aderentes ou não), e 6% das células de D9 (aderentes ou não) se mostraram inviáveis.

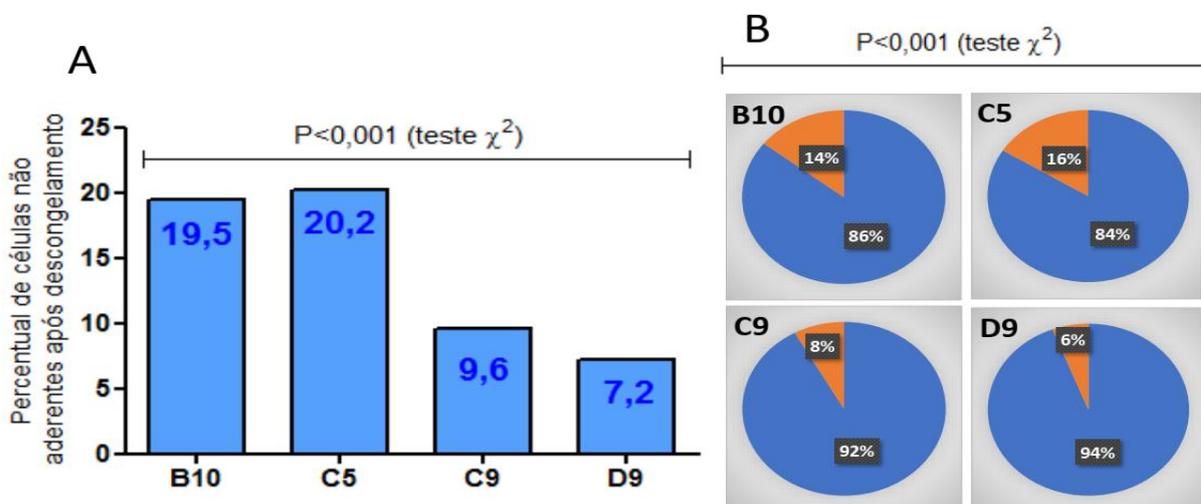


Figura 17– Demonstração de resistência ao congelamento dos clones de MDA-MB-231. A: Análise de aderência após congelamento/descongelamento. B: Relação percentual entre o número total de células congeladas e o número de células inviáveis encontradas no sobrenadante, 24 h após o descongelamento. Células viáveis (aderidas ou não) em azul e inviáveis em laranja.

A figura 18 demonstra de maneira resumida as hipóteses consideradas para o desenvolvimento do trabalho, onde uma linhagem celular pode ter três destinos a depender de características genéticas e epigenéticas, sendo que todas as três ideias

mencionadas são dependentes de um longo período de cultivo destas células. Os três perfis após um longo período de cultivo são:

1) Fenótipo resultante composto quase que prioritariamente por células proliferantes: neste cenário é considerado apenas o aspecto proliferativo das culturas, sendo assim, células com características proliferativas exacerbadas iriam pouco a pouco aumentando proporcionalmente, o que mudaria a feição da linhagem, entretanto esta hipótese é pouco provável de acontecer, visto que temos agentes seletivos;

2) Fenótipo resultante igual ao da linhagem originária: neste cenário além do aspecto proliferativo também são considerados outros fatores de pressão seletiva utilizados rotineiramente no laboratório, como tripsinização, congelamento à -80°C , e também características particulares de algumas subpopulações que podem contribuir para a preservação das mesmas na cultura, como o fato de ter telômeros mais longos. A ideia deste modelo é que vários fatores de pressão seletiva acabariam equilibrando o balanço entre as diferentes subpopulações presentes na cultura.

3) Fenótipo com várias subpopulações novas com influência direta da instabilidade genética presente em linhagens celulares cancerosas: neste modelo são levados em consideração os agentes de pressão seletiva verificados na prática laboratorial, e a instabilidade genética presente em subpopulações presentes na linhagem celular, de forma que, este é um modelo que leva em consideração a geração de subpopulações diferentes a partir de populações clonais já existentes na cultura, o que pode ser exemplificado, por exemplo, pelo que aconteceu com o clone C9 deste trabalho, onde os experimentos de citometria de fluxo revelaram o surgimento de uma nova subpopulação vinda da referida linhagem clonal, no que tange aos aspectos de morfologia e autofluorescência.

Este trabalho vai de encontro principalmente ao modelo 3 e suas implicações, na medida em que, foi apontado através deste que as linhagens MDA-MB-231 e a linhagem MCF-7 sofrem mudanças fenotípicas através da ação do tempo. Além disso, também foi demonstrado que a geração de uma subpopulação vinda de uma linhagem monoclonal de MDA-MB-231.

A amplitude dos resultados encontrados neste trabalho vai longe, de forma que, sua implicação está enraizada no cultivo celular em si, com isso elementos como desdiferenciação celular provocada pelo tempo, e geração de novas subpopulações clonais vão ser tópicos sempre mensurados na prática laboratorial.

A hipótese 3 da figura 18 traz uma noção de que a mudança de perfil das culturas pode implicar no aparecimento de respostas diferentes a testes feitos em laboratório, desta forma, ensaios como os que visam desenvolver novos fármacos antineoplásicos podem estar sendo prejudicados por este tipo de alteração. Além disso, determinados ensaios que usam fatores seletivos intensos, tal como a transfecção, estariam sendo prejudicados, sendo que, quando é usado um agente seletivo muito pesado para alcançar um efeito, acaba-se perdendo a noção de que se o grupo selecionado pode ou não representar o controle.

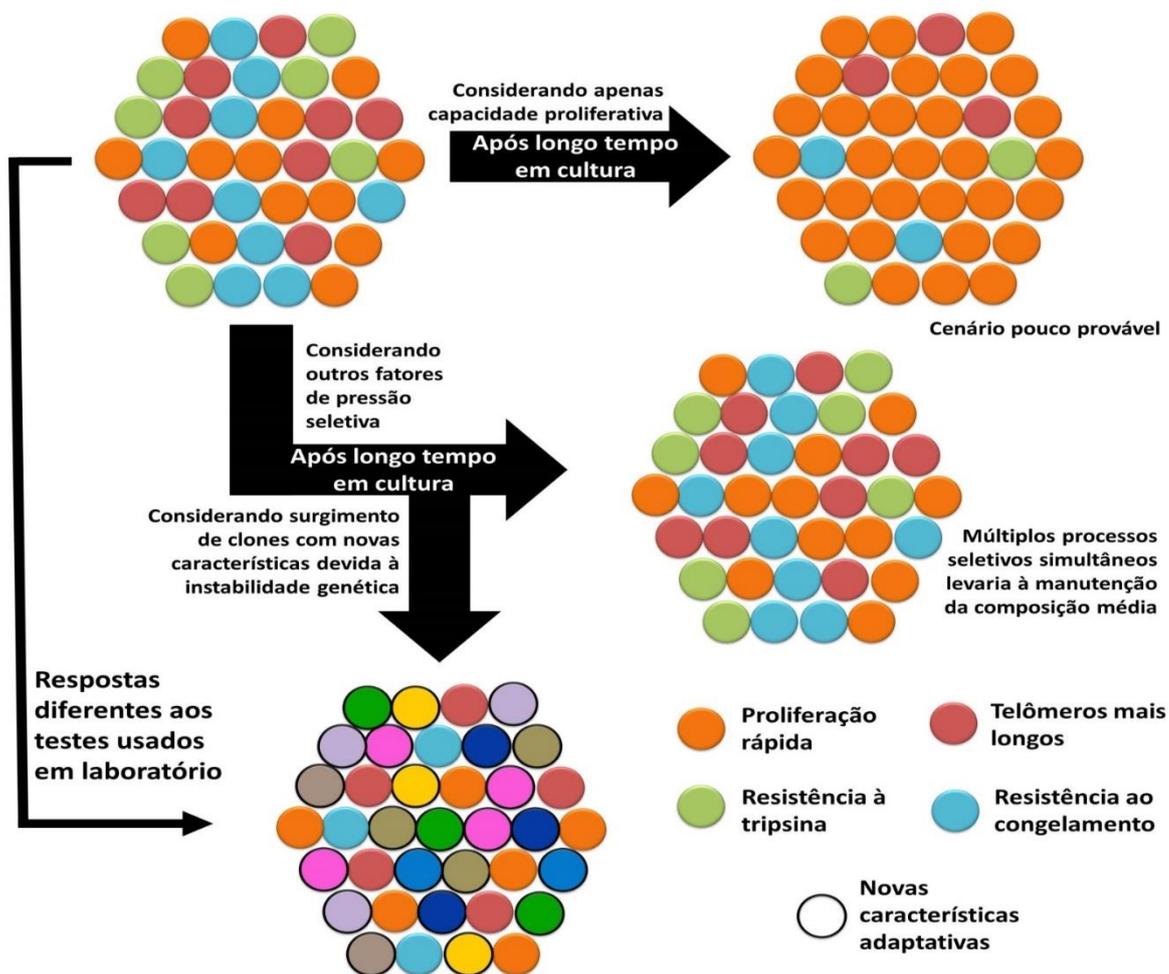


Figura 18- Resumo esquemático do modelo proposto. A instabilidade genética das subpopulações da linhagem pode levar ao surgimento de uma cultura com fenótipo diferente se comparada com a cultura originária, isso após um longo período de cultivo.

5. Conclusão

O presente trabalho sugere que linhagens celulares cultivadas em laboratório tendem a sofrerem influências do meio que podem causar alterações fenotípicas, sendo que o efeito final pode ser o surgimento de uma cultura que não é mais representativa da cultura originária, ao mesmo tempo é demonstrado que mesmo em culturas monoclonais o fenômeno de surgimento de novas subpopulações se faz presente. Sendo assim, a melhor estratégia para evitar tais problemas seria tentar não trabalhar com culturas muito envelhecidas, e utilizar a estratégia de congelar um grande número de tubos das células que vão ser usadas no estudo e ir descongelando de pouco a pouco a medida em que os experimentos forem acontecendo, sendo que isso é para evitar a longa exposição destas células ao cultivo.

Referências

ADAMS, J. M.; CORY, S. The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy. **Oncogene**, v. 26, n. 9, p. 1324-1337, 2007.

ALMEIDA, T. G., et al. Vivência da mulher jovem com câncer de mama e mastectomizada. **Esc Anna Nery**, v. 19, n. 3, p. 432-438, 2015.

ARNOLD, C. R., et al. The Role of Cancer Stem Cells in Radiation Resistance. **Frontiers in Oncology**, v. 10, n. 164, p. 1-12, 2020.

ATCC. **MCF7 (ATCC® HTB-22™)**. Disponível em: <
<https://www.atcc.org/Products/All/HTB-26.aspx>>, acesso em 08/02/2020.

ATCC. **MDA-MB-231 (ATCC® HTB-26™)**. Disponível em: <
<https://www.atcc.org/en/Products/All/HTB-26.aspx>>, acesso em 08/02/2020.

BACAL, et al. Flow cytometry: immunophenotyping in 48 hairy cell leukemia cases and the relevance of fluorescence intensity in CD5 expression for diagnosis. **Einstein**. v. 5, n. 2, p. 123-128, 2007.

BASTOS, T. S. **Efeito antitumoral induzido por apoptose e avaliação de efeitos toxicológicos do extrato aquoso de punica granatumlinn em modelo murino**. 152 f. Dissertação (Mestrado)- Programa de Pós- Graduação em Saúde e Ambiente, Universidade Tiradentes, 2014.

BATISTON, A. P. et al. Conhecimento e prática sobre os fatores de risco para o câncer de mama entre mulheres de 40 a 69 anos. **Revista Brasileira Saúde Materno Infantil**, v. 11, n. 2, p. 163-171, 2011.

BERGSTEIN, T. G., WEISS, R. R., BICUDO, S. D. Techniques in semen analysis. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v.38, n.4, p.189-194, 2014.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Instituto Nacional do Câncer. TNM: Classificação de tumores malignos. **INCA**, Rio de Janeiro, 6ª edição, 254 p. 2004.

BREWE, H. R. et al. Family history and risk of breast cancer: an analysis accounting for family structure. **Springer**, 2017.

CAILLEAU, R., et al. Breast Tumor Cell Lines from Pleural Effusions. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 53, n. 3, p. 661-674, 1974.

CAMPOY, E. M., et al. Intratumor heterogeneity index of breast carcinomas based on DNA methylation profiles. **BMC Cancer**, v. 9, n.328, p. 2-15, 2019.

CASTELLÓ, C. M. **Ultrassonografia do tumor sólido de ehrlich inoculado em camundongos**. 61 f. Dissertação (Mestrado)- Escola de veterinária e zootecnia, Programa de Pós- Graduação em Saúde Animal, Universidade Federal de Goiás (UFG), 2017.

CHENG, N. et al. TGF- β signaling deficient fibroblasts enhance Hepatocyte Growth Factor signaling in mammary carcinoma cells to promote scattering and invasion. **Mol Cancer Res**, v. 6, n. 10, p. 1521-1533, 2008.

CHOI, et al. Establishment and characterization of a lung cancer cell line, SMC-L001, from a lung adenocarcinoma. **In Vitro Cell.Dev.Biol.-Animal**, 2014.

ÇOBAN, E. A.; SAHIN, F. Cancer Stem Cells in Metastasis Therapy. **Cell Biology and Translational Medicine**. v.2, p. 97-113, 2018.

CORONA, et al. Advances in systemic therapy for metastatic breast cancer: future Perspectives. **Med Oncol**, v. 34, n. 119, p. 3-16, 2017.

COSTA-LOTUFO, L. V. et al. A Contribuição dos Produtos Naturais como Fonte de Novos Fármacos Anticâncer: Estudos no Laboratório Nacional de Oncologia Experimental da Universidade Federal do Ceará. **Revista Virtual de Química**, v. 2, n. 1, p. 47-58, 2010.

DARLING, S. et al. Regulation of the cell cycle and centrosome biology by deubiquitylases. **Biochemical Society Transactions**, v. 45, p. 1125-1136, 2017.

DAWOOD, S.; AUSTIN, L.; CRISTOFANILLI, M. Cancer Stem Cells: Implications for Cancer Therapy. Cancer Network home of the journal Oncology, v. 28, n.12, p. 1-3, 2014.

DEHNE, T., et al. Gene expression profiling of primary human articular chondrocytes in high-density micromasses reveals patterns of recovery, maintenance, re- and dedifferentiation. **Gene**, v. 462, p. 8-17, 2010.

FERLAY, J. et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. **Int J Cancer**, v. 136, n. 5, p. E359-386, 2015.

FERLAY, J. et al. Global Burden of Breast Cancer. In: LI, C. (Ed.). . **Breast Cancer Epidemiology**. New York, NY: Springer New York, 2010. p. 1-19.

FERNANDES, I. C.; MELLO, A. A. Entendendo e combatendo o câncer. **Revista Tem@**, v. 7, n. 10/11, p. 2-11, 2008.

FIDLER, I. J. Critical determinants of cancer metastasis: rationale for therapy. **Cancer Chemother Pharmacol**, v. 43, p.S3-S10, 1999.

FREEDMAN, R. A.; PARTRIDGE, A. H. Emerging Data and Current Challenges for Young, Old, Obese, or Male Patients with Breast Cancer. **Clinical Cancer Research**, v. 23, n. 11, p. 2647–2654, 2017.

FRIGATO, S.; HOGA, L. A. K. Assistência à mulher com câncer de colo uterino: o papel da enfermagem. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 49, n. 4, p. 209–214, 2003.

GÉRARD, J. P. et al. Preoperative radiotherapy with or without concurrent fluorouracil and leucovorin in T3-4 rectal cancers: Results of FFCD 9203. **Journal of Clinical Oncology**, v. 24, n. 28, p. 4620–4625, 2006.

GORAYEB, R. et al. Ansiedade e depressão pré-cirúrgica numa enfermaria de ginecologia oncológica e mastologia. v. 13, n. 2, p. 145–156, 2012.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. **Cell**, v. 144, n. 4, p. 646-674, 2011.

HORST, K. C. et al. Breast Imaging in Women Previously Irradiated for Hodgkin Lymphoma. **Am J Clin Oncol**, v. 39, n. 2, p. 114-119, 2016.

Hyndman, I. J. Review: the Contribution of both Nature and Nurture to Carcinogenesis and Progression in Solid Tumours. **Cancer Microenvironment**, v. 9, p. 63-69, 2016.

INCA. INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. Ações de enfermagem para o controle do câncer: uma proposta de integração ensino-serviço. **INCA**, 3ª edição, Rio de Janeiro, 2008.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. **Estadiamento**. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/estadiamento>, acesso em 08/02/2020.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. **Estimativa 2018**. Disponível em: <http://www1.inca.gov.br/estimativa/2018/sintese-de-resultados-comentarios.asp>, acesso em 08/02/2020.

Instituto Oncoguia. **O que é Oncologia?** Disponível em: <<http://www.oncoguia.org.br/conteudo/o-que-e-oncologia/82/1/>>. Acesso em 08/02/2020.

INUMARU, L. E.; SILVEIRA, E. A. DA; NAVES, M. M. V. Risk and protective factors for breast cancer: a systematic review. **Cadernos de saúde pública**, v. 27, n. 7, p. 1259–70, 2011.

JASMUND, I. et al. The influence of medium composition and matrix on long-term cultivation of primary porcine and human hepatocytes. **Biomolecular Engineering**, v. 24, p. 59-69, 2007.

KUNZMANN, R. HOLZEL, F. Karyotype Alterations in Human Ovarian Carcinoma Cells During Long- Term Cultivation and Nude Mouse Passage. **Cancer Genet Cytogenet**, v. 28, p. 201-212,1987.

LAHOUEL, K. et al. Revisiting the tumorigenesis timeline with a data-driven generative model. **PNAS**, v. 117, n.2, p. 857-864, 2020.

LATHIA, J., LIU, H., MATEI, D. The Clinical Impact of Cancer Stem Cells. **The Oncologist**, v. 25, p. 123-131, 2020.

LOPES, A. I. C. **Avaliação da Termoterapia Focal num Modelo de Oncologia Experimental**. 246 f. Tese (Doutorado)- Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, Programa de Ciências de Saúde, Universidade de Coimbra, 2014.

MA, X.; WANG, Z. Anticancer drug discovery in the future: an evolutionary perspective. **Drug Discovery Today**, v. 14, n. 23–24, p. 1136–1142, 2009.

MACHADO, M. C. F. P.; MELO-JUNIOR, M. R. Avaliação do efeito antitumoral da *Kalanchoe brasiliensis* sobre o sarcoma 180 em camundongos. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 6, n. 1, p. 1–6, 2009.

MARTINS, I.; ROSA, H. V. Considerações Toxicológicas da Exposição Ocupacional aos Fármacos Antineoplásicos. **Revista Brasileira de Medicina do Trabalho**, v. 2, n. 2, p. 118–125, 2004.

MCPHERSON, K.; STEEL, C. M.; DIXON, J. M. ABC of breast diseases: Breast cancer---epidemiology, risk factors, and genetics. **Bmj**, v. 321, n. 7261, p. 624–628, 2000.

MICHAILOWSKY, C. et al. Tumores experimentais do sistema nervoso central: Padronização de modelo em roedores utilizando a linhagem 9L. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v. 61, n. 2 A, p. 234–240, 2003.

MORAIS, K. S. **Avaliação do potencial terapêutico in vitro de inibidor de telomerase mst-312 em linhagens celulares de câncer de mama**. 67 f. Dissertação (Mestrado)- Faculdade de Ciências da Saúde, Programa de Pós- Graduação em Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, 2016.

MOREIRA, M.P., BRAYNER, F.A., ALVES, L.C. et al. **Eur Biophys J**, n. 48, v. 673, 2019.

NAKAGE, A. P. M., et al. Metodologia e aplicação da citometria de fluxo na hematologia veterinária. **Ciência Rural**, v. 35, n. 4, p. 966-973, 2005.

NANDY, S. B., LAKSHMANASWAMY, R. Cancer Stem Cells and Metastasis. **Progress in Molecular Biology ans Translational Science**, p.1-40, 2017.

NATIONAL CANCER INSTITUTE (NCI). **What Is Cancer?**. Disponível em: <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer>, acesso em 08/02/2020.

ÓRFÃO, A.; GOUVEIA, C. Apontamentos de anatomia e fisiologia da lactação. **Rev Port Clin Geral**, v. 25, p. 347-54, 2009.

PARO, D.; PARO, J.; FERREIRA, D. L. O enfermeiro e o cuidar em Oncologia Pediátrica. **Revista Arquivos de Ciências da Saúde**, v. 12, n. 3, p. 151–157, 2005.

PINHO, M. P. **Enriquecimento antigênico de linhagens tumorais: estratégias para abordagens imunoterapêuticas personalizadas**. 128 f. Dissertação (Mestrado)- Programa de Pós- Graduação em Imunologia do Instituto de Ciências Médicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

PINTO, T. M. **Avaliação dos fatores indutores da transição epitélio-mesenquimal (EMT) na biologia das células endoteliais**. Tese de Doutorado- Programa de Pós- Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia. Universidade de São Paulo, 2015.

RALPH, A. C. L. **Análise dos marcadores de células Tronco Tumorais em Linhagens Tumorais Resistentes ao Estresse**. 130 f. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Tecidual) - Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

REY, F. M. Interação de célula tronco mesenquimal com células de linhagem do câncer de mama e avaliação do seu comportamento biológico. Tese (Doutorado)- Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2018.

ROSAS, M. S. L. et al. Incidência do câncer no Brasil e o potencial uso dos derivados de isatinas na cancerologia experimental. **Revista Virtual de Química**, v. 5, n. 2, p. 243–265, 2013.

SAIDIEL, M. E. **Ensaio celulares para a determinação da atividade citotóxica de moléculas antineoplásicas**. 59 f. Dissertação (Mestrado)- Programa de Pós- Graduação do Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2016.

SANTOS, M. T. **Mecanismos de regulação epigenética e heterogeneidade tumoral clonal em melanoma metastático humano envolvendo gene RECK**. Tese (Doutorado)- Programa de Pós-Graduação em Farmácia (Área de Análises Clínicas), Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 2015.

SAWADA, N. O. et al. Avaliação da qualidade de vida de pacientes com câncer submetidos à quimioterapia. **Rev Esc Enferm USP**, v. 43, n. 3, p. 581–587, 2009.

SCLOWITZ, M. L. et al. Condutas na prevenção secundária do câncer de mama e fatores associados. **Revista de Saúde Pública**, v. 39, n. 3, p. 340–349, 2005.

SENGER, J.-L.; ADAMS, S. J.; KANTHAN, R. Invasive lobular carcinoma of the male breast – a systematic review with an illustrative case study. **Breast Cancer: Targets and Therapy**, v. Volume 9, p. 337–345, 2017.

SILVA, C. L. Câncer de mama e sofrimento psicológico: aspectos relacionados ao feminino. **Psicologia em Estudo**, v. 13, n. 2, p. 231-237, 2008.

SILVA, G. G. **Produção de linhagens monoclonais a partir de culturas heterogêneas de células mda-mb-231 de câncer de mama**. 30 f. TCC (Graduação)-Curso de Farmácia- Faculdade de Ceilândia, Universidade de Brasília, 2017.

SILVA, J. M. M. **Avaliação de ovários criopreservados por vitrificação ou congelamento lento após intervalo precoce tardio de catastração em ratas**. 103 f. Tese (Doutorado)- Faculdade de Medicina, Departamento de Cirurgia, Programa de Pós-Graduação em Cirurgia, Universidade Federal do Ceará, 2014

SILVA, P. A., RIUL, S. S. Breast cancer: risk factors and early detection. **Rev Bras Enferm**, v. 64, n. 6, 1016-21, 2011.

SOULE, H. D., et al. A Human Cell Line From a Pleural Effusion Derived From a Breast Carcinoma. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 51, n. 5, p. 1409-1416, 1973.

STEPANENKO, A. A., DMITRENKO, V. V. HEK293 in cell biology and cancer research: phenotype, karyotype, tumorigenicity, and stress-induced genome-phenotype evolution. **Gene**, 2015.

SU, S. et al. CD10+GPR77+ Cancer- Associated Fibroblasts Promote Cancer Formation and Chemoresistance by Sustaining Cancer Stemness. **Cell**, v. 172, p. 841-856, 2018.

TATIANA MONTANARI. **Histologia- Texto, Aulas e Roteiros de Aulas Práticas**. Ed. UFRGS, 3ª edição, 2016.

TIEZI, D. G. Cirurgia conservadora no câncer de mama. **Rev Bras Ginecol Obstet**, v. 29, n. 8, p. 428–434, 2007.

VCELAR, S., et al. Karyotype variation of CHO host cell lines over time in culture characterized by chromosome counting and chromosome painting. **Cellular and Metabolic Engineering**, 2017

VICH, P. et al. Actualización del cáncer de mama en Atención Primaria (I/V). **Semergen**, v. 40, n. 6, p. 326-333, 2014.

VIEIRA, D.S.C., et al. Carcinoma de mama: novos conceitos na classificação. **Rev Bras Ginecol Ostet**, v.30, n. 1, p. 42-47, 2008.

VILLARREAL-GARZA, C. et al. Molecular subtypes and prognosis in young mexican women with breast cancer. **Clinical Breast Cancer**, v. 17, n. 3, p. e95–e102, 2016.