



ANÁLISE COMPARATIVA DA EXPRESSÃO DOS GENES RELACIONADOS À METÁSTASE NA LINHAGEM CELULAR A549 (CARCINOMA PULMONAR) EM MOLDES 2D E 3D

Guilherme S. Soares¹; Michel L. Leite²; Octávio L. Franco³

¹Medicina/Pós-graduação em Ciências Genômicas e Biotecnologia – Universidade Católica de Brasília;

²S-Inova/Pós-graduação em Biotecnologia – Universidade Católica de Brasília;

³S-Inova/Pós-graduação em Biotecnologia – Universidade Católica de Brasília.

E-mail: guilherme.ssoares@a.uceb.br; michelleitte@gmail.com; ocfranco@gmail.com

RESUMO

O câncer de pulmão é uma doença altamente letal, o que justifica a busca constante por modelos de pesquisa *in vitro* capazes de compreender melhor seu comportamento. Dessa forma, o presente estudo teve como objetivo estabelecer e comparar a morfologia da linhagem tumoral A549, um adenocarcinoma pulmonar, em sistemas de cultivo bidimensionais (2D) e tridimensionais (3D). Em micropocos de agarose, estruturou-se o modelo 3D para a formação de esferoides, que foram submetidos a ensaios de disseminação celular e a análises histológicas detalhadas. Os resultados evidenciaram que os esferoides alcançaram uma rápida estabilidade de compactação, demonstrando também a formação de prováveis zonas de necrose central e um expressivo potencial migratório quando reinseridos em superfícies planas. Conclui-se que o modelo 3D mimetiza fielmente o microambiente tumoral *in vivo*, viabilizando futuras análises moleculares voltadas aos mecanismos de metástase.

Palavras-chave: Câncer de Pulmão. Linhagem A549. Cultivo Celular 3D.

INTRODUÇÃO

O câncer de pulmão é uma das principais causas de mortalidade no mundo, o que exige o aprimoramento dos modelos de pesquisa *in vitro* para compreender melhor os mecanismos biológicos da doença e, consequentemente, auxiliar no desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas (Schwartz, 2024). O adenocarcinoma, que é um tumor de células não pequenas, é o subtipo mais comum, do qual deriva a linhagem celular A549, originada de pneumócitos do tipo II (Alduais *et al.*, 2023). Historicamente, a ciência oncológica alcançou vários progressos utilizando o cultivo celular 2D; entretanto, esse sistema apresenta diversas limitações, visto que o crescimento em monocamada impede a reprodução da arquitetura tridimensional do tumor, o que priva as células de estabelecer interações tanto entre si (célula-célula) quanto com a matriz extracelular circundante (célula-matriz) (Habbanjar *et al.*, 2021).

Para superar essas limitações, o modelo 3D tem sido amplamente utilizado em laboratórios, pois possibilita a formação de estruturas esferoidais que mimetizam fielmente o ambiente microtumoral presente no organismo real (Gunti *et al.*, 2021). Dessa forma, utilizar esse modelo de cultivo é essencial para compreender os genes relacionados à adesão celular e ao processo metastático, a exemplo do gene *CDH1*, que codifica a proteína E-caderina (Corso *et al.*, 2020), e do gene *COL1A1*, que codifica o colágeno tipo I, componente estrutural do suporte (Li *et al.*, 2022).

OBJETIVO



Analisar e comparar a expressão de genes relacionados à metástase (*COL1A1* e *CDH1*) na linhagem de carcinoma pulmonar A549 cultivada em modelos 2D e 3D, além de caracterizar e comparar a morfologia celular e o mimetismo tumoral desses sistemas de cultivo.

MÉTODO

As células da linhagem A549 foram cultivadas em modelo 2D em garrafas de cultivo celular do tipo T25, nas quais o suporte nutricional foi assegurado pela adição do meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino, 1 mM de piruvato de sódio, 4 mM/L de glutamina e glicose a 4500 mg/L. Essas culturas foram mantidas em uma estufa umidificada a 37°C, sob uma atmosfera com 5% de CO₂. Para o estabelecimento do cultivo 3D, foi utilizada a técnica de sobreposição celular em micropoços de agarose a 1,5%, moldados a partir de matrizes de silicone flexível (PDMS) que utilizaram retrorrefletores de bicicleta e placas comerciais do tipo *AggreWell* como base estrutural. Foi utilizada uma bomba a vácuo para a confecção dos moldes, livre de bolhas.

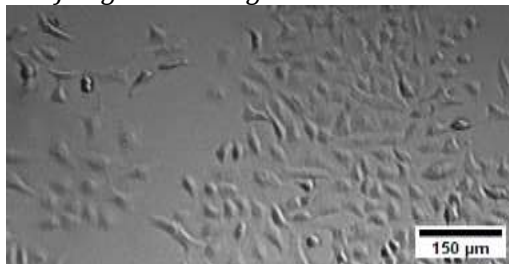
Para analisar o potencial invasivo e metastático da linhagem, realizou-se um ensaio de disseminação, com a transferência de esferoides íntegros de volta à superfície plana da garrafa de cultivo (T25). Além disso, para a avaliação da arquitetura do modelo 3D, os esferoides foram submersos em resina O.C.T., congelados em criomoldes e submetidos a cortes no criostato, gerando lâminas que foram fixadas com albumina e coradas com Hematoxilina e Eosina (H&E). O diâmetro de compactação dos esferoides e a distância de migração celular foram medidos no software ImageJ a partir de registros fotográficos. Devido à indisponibilidade do equipamento de RT-qPCR no laboratório, a etapa de extração de RNA para a avaliação da expressão gênica não foi concluída.

RESULTADOS

No cultivo 2D, a linhagem A549 manteve sua morfologia poligonal aderente típica, livre de contaminação microbiana (Figura 1). No sistema 3D, as células formaram esferoides íntegros e compactos a partir do quinto dia (Figura 2).

Figura 1

Morfologia da linhagem A549 em cultivo bidimensional (2D).

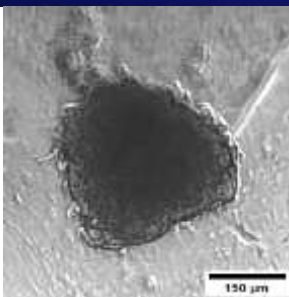


Nota. Observa-se a adesão eficiente à superfície da garrafa e a morfologia celular poligonal típica da linhagem. Objetiva de 4x. Barra de escala = 150 μm.

Fonte: Dados da pesquisa (2026).

Figura 2

Estrutura tridimensional do esferoide da linhagem A549.



Nota. Formação celular esférica e íntegra. Objetiva de 4x. Barra de escala = 150 µm.

Fonte: Dados da pesquisa (2026).

A análise morfométrica evidenciou que essas microestruturas alcançaram rapidamente estabilidade, mantendo os diâmetros analisados constantes ao longo de todo o período de observação, conforme os dados da Tabela 1.

Tabela 1

Análise morfométrica de esferoides 3D da linhagem A549.

Tempo de Cultivo (Dias)	Diâmetro Estrutural (µm)
5	366,55
7	320,40
12	304,26
14	334,16

Nota: Evidencia-se a manutenção do platô de compactação celular.

Fonte: Dados da pesquisa (2026).

No ensaio de disseminação, a linhagem demonstrou notório potencial invasivo ao ser realocada em ambiente bidimensional. A evolução diária da migração celular pode ser observada na Tabela 2, que ilustra o avanço progressivo do raio de disseminação até o momento em que a estrutura esferoidal se dissipa.

Tabela 2

Progressão da disseminação celular da linhagem A549.

Tempo de Cultivo (Dias)	Distância de Migração Máxima (µm)
1	346,25
2	354,66
3	701,20
4	829,81
9	> 2019,33

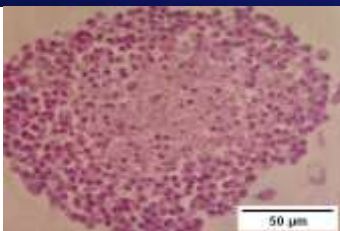
Nota: O limite > 2019,33 µm indica o momento em que a dispersão celular ultrapassou os limites do campo de visão do microscópio.

Fonte: Dados da pesquisa (2026).

Ademais, a análise histológica das lâminas do modelo 3D coradas em H&E (Figura 3) revelou uma coroa externa proliferativa basofílica, de cor roxa-escura, que circunda um núcleo denso eosinofílico de cor rosa-clara.

Figura 3

Corte histológico de um esferoide tumoral.



Nota: Corte histológico de esferoide da linhagem A549 corado em H&E, apresentando diâmetro seccional de 172,23 μm . Fica evidente a distinção entre a coroa celular externa e o núcleo central. Objetiva de 40x. Barra de escala = 50 μm .
Fonte: Dados da pesquisa (2026).

CONCLUSÃO

Dessa forma, conclui-se que o sistema de micropoços de agarose atua como uma plataforma *in vitro* altamente eficaz para a geração de microtumores. A partir dos cortes histológicos, foi possível identificar a formação de prováveis zonas de necrose central que contrastam de forma evidente com as bordas celulares proliferativas, o que é um resultado direto da limitação da difusão de nutrientes no interior do esferoide. Além disso, a avaliação morfométrica validou a compactação estrutural dos esferoides e o ensaio de disseminação evidenciou o alto potencial de migração e invasão celular da linhagem A549, observado quando as estruturas são reintroduzidas no modelo bidimensional. Em conjunto, todos esses achados práticos demonstram que o modelo 3D reflete, de forma eficaz, a morfologia e o perfil invasivo dos tumores pulmonares. Portanto, entende-se que a estruturação morfológica foi concluída e que as atividades futuras consistirão na execução de ensaios de biologia molecular por RT-qPCR para quantificar a expressão dos genes *COL1A1* e *CDH1*, visando à compreensão aprofundada dos mecanismos de metástase.

REFERÊNCIAS

- Alduais, Y., Zhang, H., Fan, F., Chen, J., & Chen, B. (2023). Non-small cell lung cancer (NSCLC): A review of risk factors, diagnosis, and treatment. *Medicine*, 102(8), e32899. <https://doi.org/10.1097/md.00000000000032899>
- Corso, G., Figueiredo, J., De Angelis, S. P., Corso, F., Girardi, A., Pereira, J., Seruca, R., Bonanni, B., Carneiro, P., Pravettoni, G., Guerini Rocco, E., Veronesi, P., Montagna, G., Sacchini, V., & Gandini, S. (2020). E-cadherin deregulation in breast cancer. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 24(11), 5930–5936. <https://doi.org/10.1111/jcmm.15140>
- Gunti, S., Hoke, A. T. K., Vu, K. P., & London, N. R. (2021). Organoid and spheroid tumor models: Techniques and applications. *Cancers*, 13(4), 874. <https://doi.org/10.3390/cancers13040874>
- Habanjar, O., Diab-Assaf, M., Caldefie-Chezet, F., & Delort, L. (2021). 3D cell culture systems: Tumor application, advantages, and disadvantages. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(22), 12200. <https://doi.org/10.3390/ijms222212200>
- Li, X., Sun, X., Kan, C., Chen, B., Qu, N., Hou, N., Liu, Y., & Han, F. (2022). COL1A1: A novel oncogenic gene and therapeutic target in malignancies. *Pathology - Research and Practice*, 236, 154013. <https://doi.org/10.1016/j.prp.2022.154013>
- Schwartz, S. M. (2024). Epidemiology of cancer. *Clinical Chemistry*, 70(1), 140–149.

Financiamento: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.