Determinação do perfil fenotípico baseado em imagem desencadeado por compostos que induzem apoptose ou necrose em células de câncer de mama da linhagem MCF-7

Palavras-Chave: 1. perfil fenotípico; 2. apoptose; 3. necrose.

Autores(as):

1. **LUISA PEREIRA CARDOSO, FCF - UNICAMP**
2. **THAÍS DE MORAES LACERDA, IB - UNICAMP**
3. **PROF. DR. MARCELO BISPO DE JESUS (orientador), IB - UNICAMP**

1. INTRODUÇÃO

O câncer de mama é a neoplasia mais diagnosticada entre as mulheres em todo o mundo, sendo a causa de aproximadamente 666.000 mortes anualmente (Bray et al., 2024; Kim et al., 2025). Sua elevada letalidade está associada não apenas ao potencial metastático, mas ainda à crescente capacidade das células tumorais em evadirem os mecanismos fisiológicos de morte celular, o que compromete a eficácia dos tratamentos convencionais (Chaudhry et al., 2022). A complexidade biológica desses tumores, aliada à heterogeneidade da doença, configura-se como um desafio clínico e experimental, evidenciando a necessidade de estratégias que permitam investigar de forma mais precisa as vias envolvidas na progressão da doença e na resposta das células neoplásicas aos agentes citotóxicos.

Nesse contexto, o ensaio *Live Cell Painting*, desenvolvido pelo nosso grupo de pesquisa, surge como uma abordagem inovadora e adaptável para a caracterização fenotípica celular. Essa metodologia utiliza o corante metacromático Laranja de Acridina (AO, do inglês *acridine orange*), o qual emite fluorescência verde na forma monomérica, ao marcar DNA e RNA, e fluorescência vermelha na forma dimérica, ao colorir vesículas ácidas (Stockert; Blázquez-Castro, 2023). Assim, com apenas dois canais de imagem, já é possível obter um perfil celular morfológico e funcional complexo (Garcia-Fóssa et al., 2025). Recentemente, nosso grupo adaptou o protocolo com a adição de Hoechst, um fluoróforo que se liga nas regiões de pares de bases A-T do DNA, viabilizando um terceiro canal de imagem, específico para a marcação do núcleo. Desse modo, a extração automatizada de *features* a partir dessas imagens de fluorescência permite a geração de perfis fenotípicos muito úteis para diferenciar estados celulares frente a variados estímulos (Garcia-Fóssa et al., 2025; Goodman; Carpenter, 2016).

A determinação desses perfis fenotípicos é particularmente relevante para a identificação de respostas celulares a diferentes tipos de morte, como apoptose e necrose. A apoptose é um tipo de morte celular regulada por caspases, de caráter não inflamatório, porquanto é tipificada por uma sequência de eventos morfológicos coordenados que culminam em fragmentação do DNA e retração celular (Vitale et al., 2023); enquanto a necrose pode ser assinalada pelo aumento do volume da célula e perda da integridade da membrana plasmática, o que desencadeia em ruptura celular e inflamação local (Ye; Chen; Xu; 2023). Diferenciar essas vias por meio de assinaturas fenotípicas permite não só a compreensão dos

efeitos induzidos por compostos bioativos, mas também a identificação de potenciais marcadores de citotoxicidade (Liao, 2022).

Diante do exposto, o presente projeto propôs a aplicação do método *Live Cell Painting* em células da linhagem MCF-7 tratadas com compostos que provocam apoptose ou necrose, com o objetivo de construir perfis fenotípicos distintos para cada tipo de morte celular. A geração das imagens de fluorescência das células tratadas contribuiu para a elucidação dos mecanismos de ação dos medicamentos envolvidos, e a captação de métricas dessas imagens por meio de programas de *software* poderá oferecer subsídios para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas no contexto do câncer de mama, especialmente frente à resistência das células tumorais aos tratamentos convencionais.

2. METODOLOGIA

2.1 Cultura de células MCF-7

A linhagem de células de câncer de mama MCF-7 foi cultivada em meio RPMI 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e 1% de antibióticos (Penicilina/Estreptomicina) a 37ºC e 5% de CO_2 em incubadora Panasonic. A passagem dessas células foi realizada semanalmente, a cada dois dias. Para isso, elas foram desprendidas da superfície do frasco de cultura de 25 cm^2 com o auxílio de 1 mL de tripsina 0,1%. Em seguida, a enzima foi inativada com a adição de 4 mL de meio RPMI 1640 suplementado e 2 mL da suspensão celular foram adicionados a um novo frasco contendo 3 mL de meio de cultura suplementado, de modo que o volume final foi de 5 mL. Além disso, a cada descongelamento, após um período de três dias sem antibióticos, verificava-se a presença de micoplasma nas células pelo método de coloração direta de DNA (com Hoechst 33342) e inspeção por microscopia de fluorescência. Dessa maneira, asseguramos que apenas as culturas celulares livres de micoplasma foram utilizadas nos experimentos.

2.2 Ensaio de MTT e Determinação de IC_{50}

A partir de uma revisão da literatura em bases de dados científicos, selecionou-se a Colchicina e o Paclitaxel como os medicamentos de escolha para a geração do morfotipo apoptótico, e, para estimar as concentrações dos compostos nas quais a viabilidade celular é reduzida em 50% (IC_{50}), usufruímos do ensaio colorimétrico de redução do MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio). O MTT é um sal de tetrazólio amarelo cujo anel é clivado por enzimas oxirredutases dependentes de NAD(P)H - que estão presentes em mitocôndrias de células metabolicamente ativas -, resultando na formação de formazan roxo insolúvel (Ghasemi et al., 2021; Mosmann, 1983). Desse modo, ao medir a conversão desse corante nos cristais de cor púrpura, este ensaio reflete a atividade metabólica e a viabilidade celular e, por consequência, configura-se como uma ferramenta útil ao indicar a citotoxicidade dos compostos em teste. Neste experimento, as células MCF-7 foram cultivadas em placas de 96 poços, em meio RPMI 1640 suplementado, e incubadas em estufa a 37°C e 5% de CO_2. Após 24 horas, as células foram tratadas com uma série de concentrações dos indutores de morte celular, por 24 horas. As concentrações dos tratamentos para determinar o IC_{50} da Colchicina foram: 1mM; 100 μM; 10 μM; 1 μM; 100 nM; 10 nM e 1 nM. Para o Paclitaxel, as concentrações escolhidas foram: 500 μM; 50 μM; 5 μM; 500 nM; 50 nM; 5 nM e 0,5 nM. Depois, os tratamentos foram removidos e as células foram submetidas a uma incubação com 100 μL de solução de MTT (0,5 mg/mL em meio de cultura suplementado com 10% de soro fetal bovino), por 3 horas. Passado esse período, retirou-se a solução de MTT e os cristais de formazan foram solubilizados pela adição de 100 μL de DMSO Synth em cada um dos poços. A placa foi agitada durante 15 minutos e a absorbância correspondente a cada poço foi lida em um leitor de microplacas a λ = 570 nm, comprimento de onda que é mais absorvido pelo formazan (Ghasemi et al., 2021). As células submetidas aos tratamentos foram normalizadas com o grupo controle negativo (células não tratadas) e os resultados foram expressos em porcentagem de células viáveis. Para estimar o IC_{50}, a viabilidade celular foi avaliada usando o software GraphPad PRISM (versão 8.0), de maneira que aplicou-se um modelo de regressão não linear com "log(inibidor) vs. resposta - inclinação variável

(quatro parâmetros)”.

2.3 *Live Cell Painting*

As células MCF-7 foram plaqueadas a uma densidade de 1,0 × 10^3 células por poço em placas de 96 poços, cultivadas em meio RPMI 1640 suplementado e incubadas em estufa a 37°C e 5% de CO_2. Após 24 horas, as células foram tratadas com os compostos indutores de morte por períodos de tempo variáveis, que foram ajustados conforme a necessidade. Depois, o tratamento foi removido e as células foram submetidas a uma incubação com 100 µL de laranja de acridina (AO, sigla do inglês *acridine orange*) (10 µM) diluídos em meio suplementado apenas com 10% de soro fetal bovino (SFB), sem antibiótico. Assim, após 10 minutos de incubação a 37°C e 5% de CO_2, a solução de AO em cada um dos poços foi substituída por 100 µL de FluoroBrite DMEM, ao qual adicionou-se também Hoechst, um corante permeável a membrana que emite fluorescência azul quando ligado ao DNA, na proporção de 1 µL do fluoróforo a cada 1000 µL de FluoroBrite (1:1000). As células foram incubadas novamente, por 15 minutos, e a placa foi lida pelo leitor multidetector híbrido Cytation 5, utilizando os filtros DAPI (excitação/emissão = 358 nm/461 nm), GFP (excitação/emissão = 469/525 nm) e PI (excitação/emissão = 531/647 nm), de modo a obter as imagens de fluorescência.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Ensaio de MTT e Determinação de IC_{50}

Com o intuito de determinar as concentrações dos fármacos a serem utilizadas nos experimentos de *Live Cell Painting* subsequentes, realizamos ensaios de viabilidade celular empregando o teste de MTT. Os resultados desse teste para a Colchicina e o Paclitaxel estão expressos em gráficos representados na **Figura 1.A** e **Figura 1.B**, respectivamente. A curva dose-resposta da colchicina exibe um perfil de redução progressiva da viabilidade celular conforme a concentração do fármaco aumenta. Existe um declínio ao longo de toda a faixa de concentrações testadas, o que sugere que a colchicina gera um efeito citotóxico mesmo em concentrações menores. Já na curva do paclitaxel, observa-se que, embora ocorra um declínio mais acentuado em concentrações maiores, a citotoxicidade é pronunciada mesmo na menor concentração avaliada, onde há uma diminuição de aproximadamente 20% na viabilidade celular. A amplitude das barras de erro indica variabilidade nas réplicas experimentais, especialmente nas concentrações intermediárias.

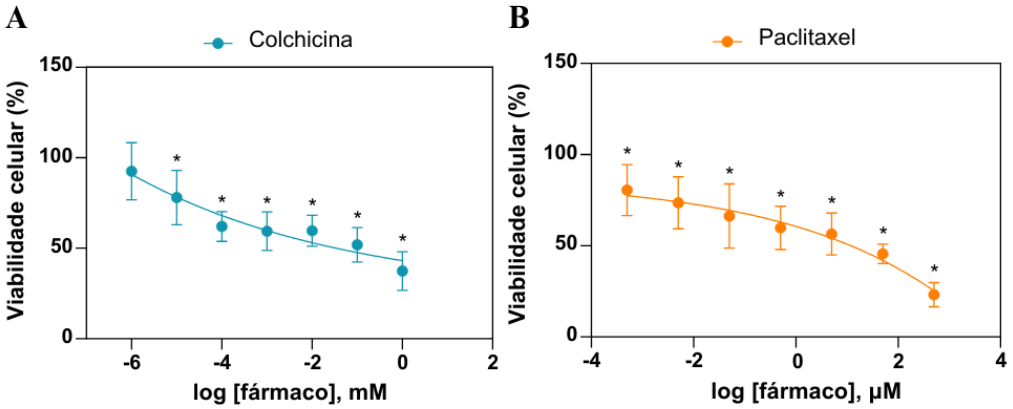

Figura 1. Gráficos de regressão não linear da Colchicina **(A)** e do Paclitaxel **(B)**. As células foram expostas a concentrações crescentes dos indutores de apoptose durante um período de 24 h. Em **(A)**, as concentrações testadas foram 1 nM; 10 nM; 100 nM; 1 µM; 10 µM; 100 µM e 1 mM. Em **(B)**, testou-se: 0,5 nM; 5 nM; 50 nM; 500 nM; 5 µM; 50 µM e 500 µM. A viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio de MTT e seus valores são expressos como percentual em relação ao controle. As concentrações dos fármacos estão representadas em escala logarítmica. Os gráficos foram gerados no GraphPad Prism pela equação "log(inibidor) vs. resposta - inclinação variável (quatro parâmetros)”. Os símbolos (*) indicam uma diferença significativa entre os tratamentos e os controles dentro do mesmo grupo. A análise estatística dos grupos de tratamento foi realizada usando ANOVA One-Way, com comparações múltiplas pelo Teste de Dunnett. O nível de significância foi de $p < 0,05$.

Os valores de IC_{50} calculados para esses compostos, mostrados na **Tabela 1**, apresentaram discrepâncias significativas em relação aos valores esperados, sendo consideravelmente inferiores para a colchicina e superiores para o paclitaxel. Diante da possibilidade de erros experimentais ou inconsistências na análise dos dados, não usufruímos desses valores para os ensaios de *Live Cell Painting*. Como alternativa, definimos concentrações subletais a serem utilizadas para cada composto, sendo que consideramos como concentração subletal aquela que, embora cause alterações celulares detectáveis, permite a análise dos efeitos biológicos sem comprometer drasticamente a integridade das células. Assim, estabelecemos: 100 µM para a colchicina (2ª maior concentração testada) e 5 µM para o paclitaxel (3ª maior concentração testada).

Indutores de morte celular	**IC_{50}**
Colchicina	$\sim 4{,}800 \times 10^{-33}$ mM
Paclitaxel	$\sim 9{,}925 \times 10^{17}$ µM

Tabela 1. Valores de IC_{50} da Colchicina e do Paclitaxel determinados por ensaio de MTT.

3.2 *Live Cell Painting*

Com as concentrações subletais estabelecidas para a Colchicina e o Paclitaxel, realizamos os ensaios de *Live Cell Painting*. De início, as células foram tratadas com os compostos por um período de 24 horas. Todavia, nesta condição experimental, constatamos um elevado número de células mortas no sobrenadante, o que dificultou significativamente o ajuste do foco e a aquisição das imagens de fluorescência. Diante desse obstáculo, adotamos uma nova abordagem e reduzimos o tempo de tratamento para 6 horas. Entretanto, nesse cenário, as células tratadas apresentaram um morfotipo semelhante ao das células do controle negativo (não tratadas), sem alterações morfológicas perceptíveis. Considerando essa limitação, optamos por estender o tratamento para 10 horas, o que se mostrou a condição mais adequada, pois permitiu a observação simultânea de células viáveis, com morfologia semelhante à do controle, e de células com morfologia visualmente distinguível do controle, com um padrão de fragmentação do material genético, o que sugere a ocorrência de morte por apoptose. Dessa maneira, o ajuste de tempo possibilitou a obtenção de imagens nítidas de ambos grupos sem comprometimento do foco. As imagens de fluorescência das células MCF-7 tratadas nessa última circunstância estão representadas na **Figura 2**.

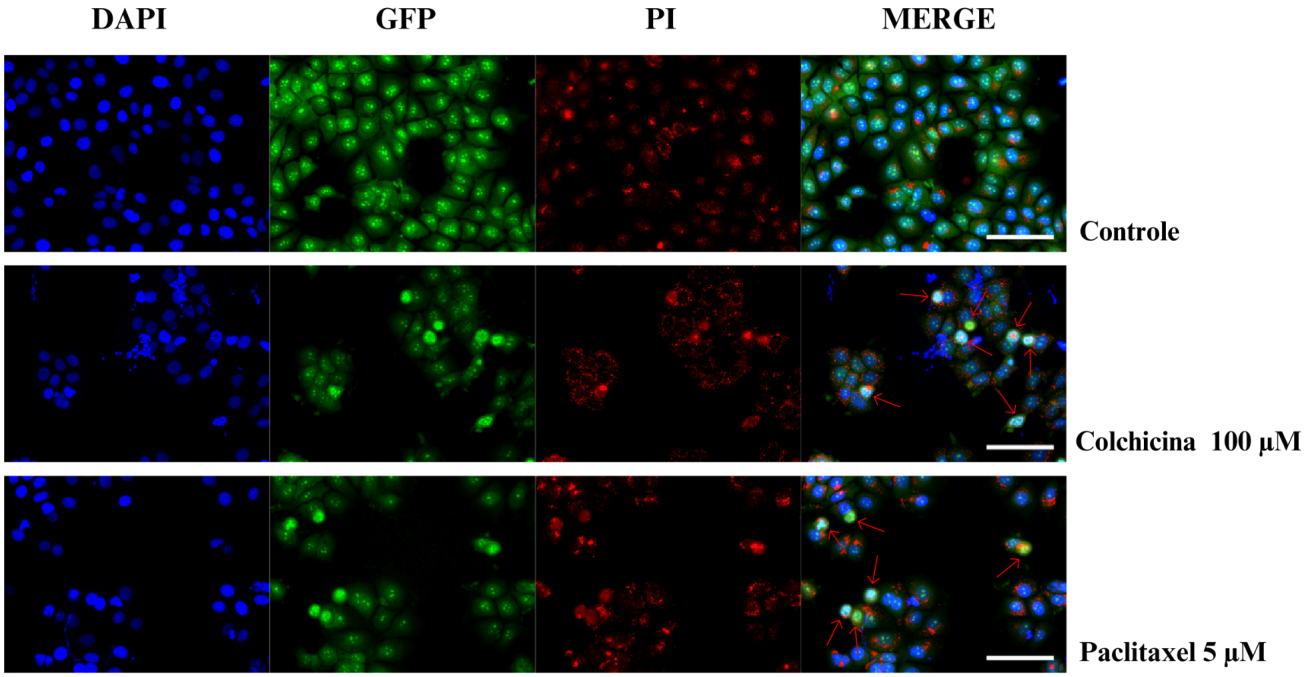

Figura 2. Imagens de fluorescência de células MCF-7 marcadas com Hoechst e Acridine Orange (AO) nos canais DAPI, GFP e PI, respectivamente. O Merge é a junção dos três canais de imagem. A primeira linha representa o grupo

controle, isto é, as células tratadas apenas com meio suplementado com SFB 10%. Na segunda linha estão retratadas as células submetidas ao tratamento com Colchicina na concentração de 100 µM, por 10 horas. Já na terceira linha são mostradas as células tratadas com Paclitaxel na concentração de 5 µM, também por 10 horas. As setas em vermelho indicam as células com perfil fenotípico visualmente distinguível do grupo controle, com um padrão de fragmentação do material genético, o que sugere a morte celular por apoptose.

4. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos até o momento estão em consonância com dados da literatura, demonstrando que a Colchicina e o Paclitaxel induzem um morfotipo apoptótico em células MCF-7. De forma ainda mais relevante, os achados reforçam a eficácia do método *Live Cell Painting*, desenvolvido pelo nosso grupo de pesquisa, na identificação de alterações morfológicas associadas a perfis fenotípicos distintos em células tratadas, em comparação às células do controle negativo. Até o presente estágio, a caracterização fenotípica foi conduzida por meio de análise qualitativa, baseada na inspeção visual das imagens de fluorescência. Essa abordagem foi adotada devido aos desafios ainda existentes na implementação de um *pipeline* robusto para segmentação e seleção precisa das células apoptóticas, bem como para a extração confiável de *features* morfológicas que as diferenciem das células saudáveis. Como próximos passos, o projeto visa ajustar o tempo de tratamento das células para maximizar a visualização do morfotipo desejado e se direciona à otimização da análise quantitativa dos dados extraídos, com foco na aplicação de algoritmos avançados de processamento de imagens e ferramentas de aprendizado de máquina. Dessa maneira, buscamos aprimorar a identificação de fenótipos associados à morte celular.

5. BIBLIOGRAFIA

BRAY, F. et al. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, p. 1–35, 2024.

CHAUDHRY, G.; AKIM, A. M.; SUNG, Y. Y.; et al, Methods in Molecular Biology. **Cancer and Apoptosis**, [s.l.]: Springer Nature, v. 2543, p. 191–210, 2022.

GARCIA-FOSSA, F. et al. Live Cell Painting: image-based profiling in live cells using Acridine Orange. **Molecular Biology of the Cell**, p. 1–11, 2025.

GHASEMI, M. et al. The MTT assay: Utility, limitations, pitfalls, and interpretation in bulk and single-cell analysis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 23, 2021.

GOODMAN, Allen; CARPENTER, Anne E. High-Throughput, Automated Image Processing for Large-Scale Fluorescence Microscopy Experiments. **Microscopy and Microanalysis**, v. 22, n. S3, p. 538–539, 2016.

KIM, J. et al. Global patterns and trends in breast cancer incidence and mortality across 185 countries. **Nature Medicine**, v. 31, n. 4, p. 1154–1162, 2025.

LIAO, D., Chapter 1 - Apoptosis, Necroptosis and Pyroptosis in Health and disease: an Overview of Molecular mechanisms, Targets for Therapeutic development, and Known Small Molecule and Biologic Modulators. **Mechanisms of Cell Death and Opportunities for Therapeutic Development Perspectives in Translational Cell Biology**, [s.l.]: Academic Press, p. 1–46, 2022.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, 55–63, 1983.

STOCKERT, J. C.; BLÁZQUEZ-CASTRO, A. Updating Ortho- and Metachromatic Acridine Orange Fluorescence in Cytochemical Chromosome Staining: A Proposal for Understanding Its Differential Fluorescence on Double- and Single-Stranded Nucleic Acids Substrates Based on Intercalation. **Chemosensors**, v. 11, n. 10, 2023.

VITALE, I. et al. Apoptotic cell death in disease — Current understanding of the NCCD 2023. **Cell Death & Differentiation**, v. 30, p. 1097-1154, 2023.

YE, K.; CHEN, Z.; XU, Y. The double-edged functions of necroptosis. **Cell Death and Disease**, v. 14, n. 2, 2023.