

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

HELOISA AMANCIO

**EFEITOS DE POLUENTES ORGÂNICOS EM CULTURAS 3D DE CÉLULAS DE
CÂNCER DE MAMA**

CURITIBA

2024

HELOISA AMANCIO

**EFEITOS DE POLUENTES ORGÂNICOS EM CULTURAS 3D DE CÉLULAS DE
CÂNCER DE MAMA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso Graduação em Biomedicina, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de bacharel em Biomedicina.

Orientador: Prof. Dr. Francisco Filipak Neto

Coorientadora: Dra. Camila Confortin.

CURITIBA

2024

RESUMO

O câncer de mama, a neoplasia mais diagnosticada globalmente em 2020, permanece como um grande desafio à saúde pública, exigindo inovações para compreender melhor seus mecanismos e tratamentos. Os modelos bidimensionais, amplamente utilizados, apresentam limitações em reproduzir o microambiente tumoral de forma realista, o que torna o cultivo tridimensional (3D) de esferoides uma alternativa promissora por simular condições mais próximas das observadas *in vivo*. Este estudo adaptou um protocolo para a formação de esferoides utilizando as linhagens tumorais MCF-7 e MDA-MB-231. Para a formação dos esferoides, as células foram subcultivadas para microplacas de 96 poços com fundo não aderente. O primeiro passo deste trabalho foi testar várias densidades celulares para determinar a quantidade ideal, sendo selecionada a densidade de 1×10^3 células por esferoide. Os esferoides formados foram expostos por 15 dias aos contaminantes químicos metoxicloro, 2,4-dihidroxibenzofenona (BP-1), bisfenol-A (BPA) e ácido perfluorooctanóico (PFOA). A viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio do metabolismo do Resazurin, conduzido em quatro experimentos independentes. Os resultados mostram que, enquanto os esferoides da linhagem MCF-7 apresentaram comportamento semelhante ao controle, os da linhagem MDA-MB-231 exibiram aumento significativo na metabolização do corante, com variações nos tempos 24 (180%) e 48 horas (170%) para o composto PFOA. Para o BPA, o aumento ocorreu somente em 24 horas (280%). O composto BP-1 teve alterações nos tempos 24 (150%) e 48 horas (140%). Na avaliação do tamanho dos esferoides, não houve diferenças significativas com relação a área para ambas as linhagens celulares. Com isso, o protocolo proposto mostrou-se eficiente na formação de esferoides e destaca o potencial do modelo 3D para investigações relacionadas à exposição a contaminantes químicos.

Palavras-chave: Poluentes ambientais, câncer de mama, MCF-7, MDA-MB-231, esferoides, cultivo 3D.

ABSTRACT

Breast cancer, the most diagnosed neoplasm globally in 2020, remains a major public health challenge, requiring innovations to better understand its mechanisms and treatments. Widely used two-dimensional models have limitations in reproducing the tumor microenvironment in a realistic way, which makes three-dimensional (3D) spheroid culture a promising alternative because it simulates conditions closer to those observed in vivo. This study adapted a protocol for spheroid formation using the MCF-7 and MDA-MB-231 tumor cell lines. For spheroid formation, the cells were subcultured into 96-well microplates with non-adherent bottoms. The first step of this work was to test several cell densities to determine the ideal amount, with the density of 1×10^3 cells per spheroid being selected. The spheroids formed were exposed for 15 days to the chemical contaminants methoxychlor, 2,4-dihydroxybenzophenone (BP-1), bisphenol-A (BPA) and perfluorooctanoic acid (PFOA). Cell viability was evaluated by the Resazurin metabolism assay, conducted in four independent experiments. The results show that, while the spheroids of the MCF-7 cell line presented similar behavior to the control, those of the MDA-MB-231 cell line exhibited a significant increase in the metabolization of the dye, with variations at times 24 (180%) and 48 hours (170%) for the PFOA compound. For BPA, the increase occurred only at 24 hours (280%). The BP-1 compound showed changes at times 24 (150%) and 48 hours (140%). In the evaluation of the size of the spheroids, there were no significant differences regarding the area for both cell lines. Thus, the proposed protocol proved to be efficient in the formation of spheroids and highlights the potential of the 3D model for investigations related to exposure to chemical contaminants.

Keywords: Environmental contaminants, breast cancer, MCF-7, MDA-MB-231, spheroids, 3D culture.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	6
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	7
2.1. O CÂNCER DE MAMA	7
2.2. CULTIVO TRIDIMENSIONAL DE CÉLULAS	8
2.2.1. ESFEROIDES CELULARES	8
2.3. LINHAGEM CELULARES	9
2.3.1. MDA-MB-231	9
2.3.2. MCF-7	9
2.4. CONTAMINANTES QUÍMICOS	10
3. HIPÓTESE	12
4. JUSTIFICATIVA	12
5. OBJETIVO GERAL	14
6. METODOLOGIA	14
6.1. CULTIVO CELULAR	14
6.2. SENSIBILIZAÇÃO DAS PLACAS	15
6.3. CULTIVO TRIDIMENSIONAL	15
6.4. EXPOSIÇÃO AOS CONTAMINANTES	15
6.5. VIABILIDADE CELULAR	16
6.6. TAMANHO DOS ESFEROIDES	16
6.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA	16
7. RESULTADOS	16
7.1. TESTES DE CONCENTRAÇÃO	16
7.1.1. LINHAGEM MCF7	16
7.1.2. LINHAGEM MDA-MB-231	17
7.2. TAMANHO DOS ESFERÓIDES	18
7.2.1. LINHAGEM MCF-7	18
7.2.2. LINHAGEM MDA-MB-231	19
7.3. VIABILIDADE CELULAR	20
7.3.1. LINHAGEM MCF-7	20
7.3.2. LINHAGEM MDA-MB-231	21
8. DISCUSSÃO	22
9. CONCLUSÃO	23
7. REFERÊNCIAS	24

1. INTRODUÇÃO

O câncer de mama é o tipo de câncer mais comum entre as mulheres em todo o mundo, representando cerca de 25% de todos os casos, sendo uma das principais causas de morbidade, incapacidade e mortalidade (SIEGEL, 2021), o que destaca a necessidade de compreender e combater essa doença. Com isso, é necessário investigar diferentes modelos de estudo, considerando os aspectos biológicos intrínsecos ao câncer de mama.

O modelo tradicional em monocamada de cultivo 2D de células mamárias, embora amplamente utilizado em estudos iniciais, apresenta limitações específicas na simulação do microambiente tumoral *in vivo* (CHEN; LIU; YAN, 2022). Devido ao fato que estas culturas 2D formam uma monocamada, a falta de tridimensionalidade nessas culturas pode subestimar a complexidade das interações celulares, não refletindo completamente a heterogeneidade presente nos tecidos (RUSSO; CEJAS; PITINGOLO, 2022). Além disso, o uso de animais na ciência continua a gerar preocupações éticas e metodológicas importantes, reforçando a importância de alternativas e padronização de outros modelos para a pesquisa (AKKAYA e GÜNGÖR, 2022). Com isso, o cultivo 3D de esferoides surge como uma abordagem inovadora e mais representativa. Os esferoides têm a capacidade de mimetizar as condições tridimensionais do ambiente tumoral, fornecendo uma perspectiva mais fiel das interações celulares e do comportamento do câncer de mama (HOLUB et al., 2020).

Neste contexto, é importante compreender não apenas as características intrínsecas do câncer de mama, mas também como contaminantes químicos presentes no ambiente podem influenciar o desenvolvimento e a progressão da doença. Assim, o presente estudo teve como objetivo padronizar um protocolo para a formação de esferoides utilizando as linhagens de câncer de mama humano MCF-7 (hormônio-responsiva) e MDA-MB-231 (triplo-negativa), bem como investigar os efeitos dos contaminantes químicos metoxicloro (MTX), benzofenona-1 (BP-1), bisfenol-A (BPA) e ácido perfluorooctanóico (PFOA), nesse modelo tridimensional após exposição crônica (15 dias) a concentrações encontradas em amostras biológicas humanas.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. O CÂNCER DE MAMA

Desde 1990, o câncer tornou-se uma das três principais causas de mortalidade no mundo (BRAY et al., 2018). A piora da doença ocorre quando células malignas deixam o tumor primário e são capazes de completar uma série de etapas do processo conhecido como metástase, que é responsável por mais de 90% das mortes relacionadas ao câncer (LAMBERT; PATTABIRAMAN; WEINBERG, 2016).

Desde o ano de 2000, houve um aumento significativo no número de pessoas diagnosticadas com câncer, passando de cerca de 10 milhões em 2000 para 19,3 milhões em 2020 (WHO, 2021). Neste período, também houve um aumento no número de mortes por câncer, de 6,2 milhões em 2000 para quase 10 milhões em 2020 (WHO, 2021). Vários fatores de risco estão associados ao câncer de mama, incluindo idade avançada, histórico familiar, obesidade, alimentação, consumo de álcool e exposição a estrogênios exógenos (DUMITRESCU, 2007).

Em 2020, o carcinoma de mama tornou-se a neoplasia mais diagnosticada, superando o câncer de pulmão pela primeira vez na história (WHO, 2021). Essa patologia é uma das principais causas de morbidade e mortalidade em mulheres, correspondendo a 25% dos casos de câncer de mama globalmente nas mulheres (SIEGEL, 2021).

O estudo do câncer de mama envolve diversas abordagens, incluindo a pesquisa em culturas celulares. No cultivo 2D de células mamárias, as células são cultivadas em superfícies planas e em monocamada. Esse método fornece um ambiente bidimensional que facilita a observação e manipulação das células, sendo amplamente utilizado em estudos iniciais para compreender os processos celulares básicos, como o crescimento celular (CHEN; LIU; YAN, 2022). No entanto, é importante notar que as culturas 2D podem não refletir completamente a complexidade do ambiente tridimensional presente no tecido mamário *in vivo*, o que levou ao desenvolvimento de métodos mais avançados (CHEN; LIU; YAN, 2022).

2.2. CULTIVO TRIDIMENSIONAL DE CÉLULAS

O cultivo 3D de células de mama surge como uma abordagem mais sofisticada, buscando mimetizar as condições tridimensionais encontradas no organismo. Nesse método, as células são cultivadas em matrizes tridimensionais, proporcionando um ambiente mais próximo do que ocorre no tecido mamário real (XIAO et al., 2023). Isso permite uma interação celular de maneira mais natural, sendo crucial para compreender melhor a fisiologia celular e as interações que ocorrem no contexto do câncer de mama (XIAO et al., 2023).

Existem vários métodos para cultivar células em 3D, e um dos modelos mais comuns é o de esferoides. Os esferoides são aglomerados tridimensionais de células que se assemelham a pequenas esferas. Eles podem ser formados a partir de uma variedade de tipos celulares e são cultivados em condições que permitem a formação dessas estruturas tridimensionais (COELHO et al., 2021).

2.2.1. ESFEROIDES CELULARES

Os esferoides tumorais oferecem uma recriação *in vitro* de características tumorais, incluindo a heterogeneidade celular e a capacidade metastática (COELHO et al., 2021). A formação de esferoides é mediada pela interação célula-célula e célula-matriz extracelular (MEC), regulada por mecanismos como a ligação mediada por integrinas e caderinas. Essas interações estruturam os esferoides em três zonas distintas: zona externa (com proliferação celular ativa), zona intermediária (células quiescentes) e núcleo central (células necróticas) (PAOLILLO et al., 2019).

A principal vantagem do cultivo 3D em relação ao 2D é a criação de microambientes fisiologicamente relevantes, permitindo uma avaliação mais precisa de interações celulares e respostas a tratamentos (PULZE et al., 2020). Modelos de esferoides são ferramentas robustas para estudar a eficácia de terapias antitumorais (COELHO et al., 2021). Além disso, os sistemas 3D possibilitam coculturas multicelulares, como a combinação de células tumorais com células do sistema imunológico, para investigar o microambiente tumoral e terapias alternativas (SARAIVA et al. 2020). Essas culturas recriam interações fisiológicas, incluindo gradientes nutricionais e núcleos necróticos, fundamentais para estudar a progressão tumoral e a eficácia de medicamentos (BOO et al., 2016).

O cultivo de esferoides celulares representa um avanço significativo na modelagem tumoral, combinando relevância fisiológica com versatilidade experimental. A escolha da técnica deve ser guiada pelos objetivos específicos da pesquisa, considerando as vantagens e limitações de cada abordagem. Ao proporcionar microambientes mais próximos da realidade *in vivo*, os esferoides continuam a ser uma plataforma essencial para o estudo da biologia tumoral e o desenvolvimento de terapias inovadoras (PULZE et al., 2020).

2.3. LINHAGEM CELULARES

2.3.1. MDA-MB-231

A linhagem celular de câncer de mama MDA-MB-231 é comumente usada em pesquisas. A MDA-MB-231 é uma linhagem que apresenta formato fusiforme, sendo considerada um adenocarcinoma epitelial. Essa linhagem foi estabelecida em 1973, no *M.D. Anderson Cancer Center*, a partir de uma amostra de derrame pleural de uma paciente com carcinoma invasivo (WELSH, 2013).

Essa é uma linhagem triplo-negativa, ou seja, não expressa o receptor de estrogênio (ER), receptor de progesterona (PR) e receptor 2 do fator de crescimento epidérmico humano (HER2) (ZHAOMING; PANPAN; JIANHUI, 2020). Possui características associadas à transição epitélio-mesenquimal (TEM), que está ligada à formação de metástases. Além disso, essa linhagem tem uma alta capacidade migratória e maior resistência a compostos antitumorais (YING, et al., 2020).

2.3.2. MCF-7

A linhagem celular MCF-7 é uma das linhagens celulares mais utilizadas em pesquisas sobre câncer de mama (COMSA et al., 2015). Essa linhagem foi estabelecida a partir de uma biópsia de um tumor de mama humano em 1970 e é considerada uma linhagem celular de adenocarcinoma de mama (SOULE et al., 1973). Desde então, a linhagem MCF-7 tem sido amplamente utilizada como um modelo *in vitro* para estudos sobre câncer de mama (SOULE et al., 1973). Essa linhagem celular é ER-positiva e PR-positiva, caracterizando-se como pouco agressiva e não invasiva (COMSA et al. 2015). Essa característica de responsividade a hormônios é fundamental, uma vez que a maioria dos casos de

câncer de mama é influenciada por hormônios, especialmente o estrogênio. Quando as células MCF-7 são classificadas como ER-positivas, isso indica que elas possuem receptores de estrogênio na sua superfície celular. Esses receptores de estrogênio permitem que as células respondam aos sinais hormonais do estrogênio, promovendo seu crescimento e proliferação (SWEENEY et al., 2012).

2.4. CONTAMINANTES QUÍMICOS

Os contaminantes químicos são substâncias com potencial tóxico que podem ser encontradas no ar, água e solo, causando efeitos adversos e prejudiciais, principalmente no meio ambiente e na saúde humana. Podem ser encontrados na natureza, mas em sua grande maioria são liberados pela atividade humana, como atividade industrial (THOMPSON, 2019).

Além disso, os contaminantes podem funcionar como desreguladores endócrinos, que são compostos químicos que interferem no sistema endócrino humano, afetando a regulação hormonal (YAZAR, 2022). Esses contaminantes estão presentes em produtos como plásticos, cosméticos e produtos de limpeza. A exposição a esses compostos pode levar a problemas de saúde reprodutiva, incluindo infertilidade e câncer de mama, útero, ovários e próstata (BALABANIČ e KLEMENČIČ, 2018). Algumas dessas substâncias são conhecidas como sensibilizadores celulares, podendo afetar mecanismos envolvidos em processos celulares, como a proliferação e migração, promovendo e aumentando características tumorais (STEIL, 2022). Por isso, estudos que analisem as respostas celulares em relação à exposição a contaminantes são de grande importância.

2.5. COMPOSTOS QUÍMICOS UTILIZADOS NESTE ESTUDO

O metoxicloro é um inseticida fabricado nos Estados Unidos para o controle de moscas, mosquitos, baratas e uma grande variedade de outros insetos (Figura 1A). O uso do metoxicloro tem sido proibido há mais de quinze anos em diversos países, no entanto, alguns países ainda utilizam o inseticida (ECHA, 2020). No Brasil, o metoxicloro e outros agrotóxicos organoclorados são proibidos desde 1985 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1985). O composto está presente em todo meio ambiente tanto em áreas rurais, como em urbanas, tendo uma meia-vida na água de 208 dias (ECHA et al., 2020). Além disso, o metoxicloro é considerado um desregulador

endócrino capaz de interferir no sistema hormonal de organismos expostos. Estudos em animais demonstraram que a exposição ao metoxicloro pode afetar a produção de hormônios sexuais, incluindo a testosterona e o estradiol (STOKERAB, 1999). Em humanos, a exposição ao metoxicloro tem sido associada a alterações no ciclo menstrual e à diminuição da qualidade do sêmen em homens (HAUSER et al., 2003).

A 2,4-dihidroxibenzofenona, também chamada de benzofenona-1, é um composto bastante utilizado na indústria de cosméticos como filtro solar e absorvedor de luz ultravioleta (PUBCHEM, 2023). Esse composto é um derivado da benzofenona e apresenta dois grupos hidroxila nas posições 2 e 4 da molécula (Figura 1C) (PUBCHEM, 2023).

Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), o uso de benzofenona-1 em cosméticos é permitido em concentrações de até 5%, desde que não cause risco à saúde dos consumidores (ANVISA, 2006). Além disso, a exposição ao benzofenona-1 pode ser prejudicial à saúde humana. Em estudos recentes o BP-1 demonstrou atividade estrogênica ou antiandrogênica *in vitro*, apresentando risco ao meio ambiente e à saúde humana (ZOU et al. 2021).

O bisfenol A (BPA) é um composto químico orgânico amplamente utilizado na produção de plásticos policarbonatos e resinas epóxi (Figura 1B). Ele é comumente encontrado em uma variedade de produtos de uso diário, como garrafas plásticas, recipientes de alimentos, revestimentos de latas e mamadeiras (KORDBACHEH e KARAHALIL, 2023). No entanto, a preocupação com os potenciais efeitos adversos à saúde associados ao BPA tem crescido nos últimos anos. Estudos sugerem que o BPA pode agir como um desregulador endócrino, interferindo no sistema hormonal e contribuindo para problemas de saúde, como distúrbios reprodutivos e desenvolvimento anormal (HAMEED; AKHTAR; SHEIKH, 2023).

O ácido perfluorooctanoico (PFOA) é um composto químico pertencente à classe dos ácidos perfluorados, caracterizados por sua estabilidade térmica e resistência química (Figura 1D). Ele foi amplamente utilizado na produção de revestimentos antiaderentes, como o teflon, e em processos industriais, incluindo a fabricação de produtos químicos e têxteis (IKUO, 2016). No entanto, o PFOA ganhou destaque devido a preocupações ambientais e de saúde pública. Estudos associaram a exposição ao PFOA a diversos problemas de saúde, incluindo

distúrbios endócrinos, problemas no fígado e riscos para o desenvolvimento fetal (CHAPARRO-ORTEGA et al., 2018). Esses impactos negativos levantam uma discussão sobre a necessidade de regulamentação e redução do uso do PFOA em várias partes do mundo.

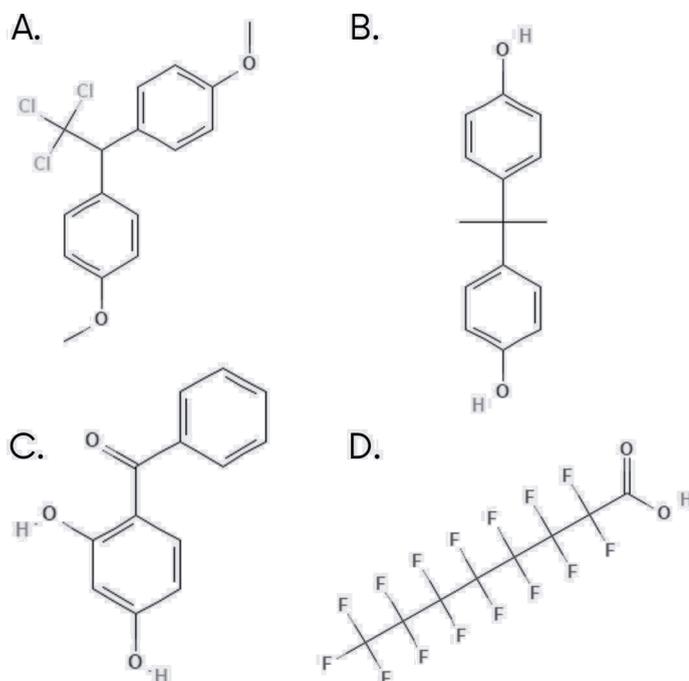


Figura 1. Estruturas dos compostos químicos. A: Metoxicloro (MTX). B: Bisfenol A (BPA). C: Benzofenona-1 (BP-1). D: Ácido Perfluorooctanoico (PFOA). FONTE: Adaptado de PUBCHEM (2024).

3. HIPÓTESE

A hipótese deste estudo é que a implementação de um protocolo padronizado para o cultivo de esferoides das duas linhagens de células tumorais, MCF-7 e MDA-MB-231, permitirá a formação de estruturas tridimensionais mais representativas do microambiente tumoral, nas quais haverá efeitos no tamanho e viabilidade das células após a exposição aos quatro contaminantes químicos selecionados.

4. JUSTIFICATIVA

O estudo de modelos tridimensionais (3D) de cultivo celular, como os esferoides, tem ganhado crescente destaque na pesquisa. Esses modelos oferecem uma representação mais fiel do microambiente tumoral, o que é uma limitação dos

modelos bidimensionais tradicionais (JENSEN e TENG, 2020). Enquanto as culturas em 2D não conseguem replicar de forma adequada as complexas interações entre células tumorais, estroma e componentes da matriz extracelular, os esferoides são capazes de simular melhor a arquitetura e as condições do tumor *in vivo* (JENSEN e TENG, 2020), sendo uma parte fundamental para a compreensão da biologia tumoral, incluindo a proliferação celular, migração, invasão e resistência a terapias, além de permitir a análise da interação entre as células tumorais e o microambiente circundante (JENSEN; TENG, 2020). A implementação de um protocolo para o cultivo de esferoides de células tumorais de câncer de mama pode, portanto, fornecer informações valiosas sobre a resposta dessas células a estímulos externos, como a exposição a poluentes ambientais, um fator importante para a progressão tumoral.

O uso de modelos 3D também contribui para a redução do número de animais utilizados na pesquisa. Com a crescente pressão ética para diminuir a utilização de animais em experimentos, modelos como os esferoides oferecem uma alternativa promissora. Esses sistemas de cultura *in vitro* possibilitam a realização de experimentos que, tradicionalmente, exigiriam o uso de modelos animais (CAMPUZANO; PELLING, 2019).

A exposição da população aos contaminantes ambientais, como compostos químicos, ocorre diariamente, seja pela ingestão de alimentos e água contaminados, pela inalação de ar poluído ou pelo contato com produtos químicos presentes no ambiente de trabalho ou em produtos de consumo (THOMPSON, 2019). Essas substâncias podem afetar negativamente a saúde humana, e, especificamente, estão relacionadas ao aumento da incidência de vários tipos de câncer, incluindo o câncer de mama (BALABANIČ; KLEMENČIČ, 2018).

Estudar os efeitos desses contaminantes na progressão tumoral é importante para entender como esses agentes contribuem para a progressão tumoral e para identificar os mecanismos biológicos envolvidos. Além disso, ao compreender os impactos dessas substâncias no ambiente tumoral, podemos gerar dados científicos importantes para a formulação de regulamentações mais eficazes e políticas públicas que visem a redução da exposição a esses poluentes, promovendo a

prevenção e melhorando o tratamento de doenças relacionadas à exposição ambiental.

5. OBJETIVO GERAL

Padronizar e implementar um protocolo eficiente para o cultivo de células de câncer de mama humano MDA-MB-231 e MCF-7 na forma de esferoides visando a aplicação do modelo para avaliação do efeito de contaminantes químicos sobre as células tumorais.

5.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estabelecer condições adequadas de cultivo tridimensional para as duas linhagens de células tumorais;
- Padronizar o protocolo para garantir a formação consistente e reprodutível de esferoides;
- Testar o modelo através da exposição aos contaminantes ambientais;
- Verificar o tamanho dos esferoides e a viabilidade celular após a exposição.

6. METODOLOGIA

6.1. CULTIVO CELULAR

As células da linhagem MCF-7 foram cultivadas em meio RPMI 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino, 40 mg/mL de gentamicina e 0,01 mg/mL de insulina humana. As células MDA-MB-231 foram cultivadas em meio RPMI 1640, suplementado com 10% de soro fetal bovino e 40 mg/mL de gentamicina. As células foram mantidas em uma incubadora a 37°C e com 5% de CO₂.

6.2. SENSIBILIZAÇÃO DAS PLACAS

Uma solução de agarose a 2% foi preparada em água ultrapura e foi realizado ciclos de aquecimento em micro-ondas, com intervalos de 2 min, até completa dissolução. Antes da utilização, a solução foi reaquecida no micro-ondas até atingir o estado líquido. Posteriormente, 80 µL da solução de agarose foram distribuídos em cada poço de uma placa de 96 poços com fundo chato utilizando uma pipeta multicanal. Para evitar a formação de bolhas, foi empregada a técnica de pipetagem reversa. A placa preparada foi submetida à exposição à luz ultravioleta (UV) por 30 min para esterilização.

6.3. CULTIVO TRIDIMENSIONAL

As células foram plaqueadas em placas previamente sensibilizadas com ágar (matriz de baixa adesão) em 200 µL de meio, e movimentos circulares manuais foram realizados para concentrar as células no centro dos poços. As placas foram incubadas a 37°C, com 5% de CO₂. A manutenção do cultivo foi realizada com trocas de meio a cada 2 ou 3 dias. Para isso, 100 µL do meio foram cuidadosamente removidos de cada poço, evitando o contato com os esferoides. A remoção foi feita com a ponta da pipeta inclinada em 45° para aspirar suavemente do topo dos poços. Em seguida, 100 µL de meio suplementado fresco foram adicionados. Após cada troca de meio, as placas foram incubadas nas mesmas condições de temperatura e pCO₂.

6.4. EXPOSIÇÃO AOS CONTAMINANTES

Foram primeiramente preparadas soluções-estoque concentradas dos contaminantes em dimetilsulfóxido (DMSO) e estocadas a -20°C.

As células foram cultivadas e plaqueadas 1x10³ por poço em microplacas de 96 poços já sensibilizadas com agarose, após 2 dias de formação dos esferoides, foram expostas aos contaminantes (MTX, BPA e PFOA: 1 µM; BP-1: 10 µM; DMSO; 0,05%.) em meio de cultura com suplementações por 15 dias, com passagens a cada 2-3 dias.

Foram realizados quatro experimentos independentes e as médias das replicatas de cada experimento independente foram calculadas e utilizadas para comparar os contaminantes testados com o controle.

6.5. VIABILIDADE CELULAR

O ensaio de Resazurin é baseado na capacidade das células viáveis de reduzir o corante resazurina em resorufina, um composto fluorescente, refletindo a atividade metabólica celular. No experimento, o meio de cultura foi substituído por meio contendo 20 µg/mL do corante Resazurin. Como controle positivo, foi adicionado 10% de saponina. A quantificação da absorbância foi realizada no Leitor de Microplacas Multimodal Varioskan LUX, utilizando o comprimento de onda de 540 nm, nos intervalos de 0, 24, 48, 72 e 96 h.

6.6. TAMANHO DOS ESFEROIDES

Após o cultivo, imagens dos esferoides foram capturadas utilizando um microscópio invertido (Leica Microsystems, modelo DMIL LED, Wetzlar, HE, Alemanha) e as áreas dos esferoides foram medidas utilizando o programa Fiji ImageJ.

6.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foram realizados 4 experimentos independentes para cada teste. Posteriormente as médias das replicatas de cada experimento independente foram calculadas. A normalidade dos resíduos e a homogeneidade das variâncias foram verificadas por meio dos testes de Shapiro-Wilk e Brown-Forsythe, respectivamente. Os dados foram analisados utilizando ANOVA, seguido pelo teste de Dunnett, e apresentados como média. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

7. RESULTADOS

7.1 TESTES DE CONCENTRAÇÃO

7.1.1. LINHAGEM MCF7

Os esferoides foram cultivados em diferentes densidades iniciais de células (250, 500, 1000, 1500 e 2000 células/esferoide) e monitorados ao longo de 7 dias.

Observa-se a evolução do tamanho e compactação dos esferoides com o aumento da densidade inicial e formação de um núcleo necrótico (Figura 2).

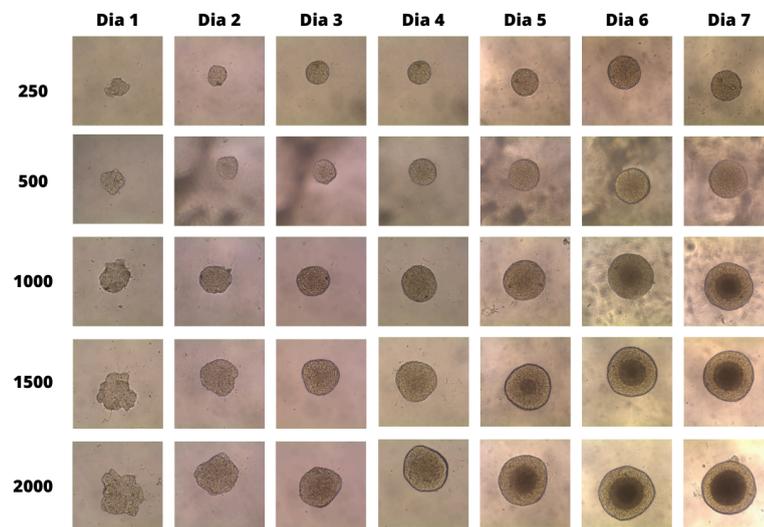


Figura 2: Formação e crescimento de esferoides de células de câncer de mama da linhagem MCF-7. FONTE: A autora (2024).

7.1.2. LINHAGEM MDA-MB-231

Os esferoides foram cultivados em diferentes densidades iniciais de células (250, 500, 1000, 1500 e 2000 células/esferoide) e monitorados ao longo de 7 dias. Diferentemente da linhagem MCF7, os esferoides MDA-MB-231 apresentaram uma estrutura menos compacta e esferoidal, e com sinais de desagregação ao longo do tempo (Figura 3).

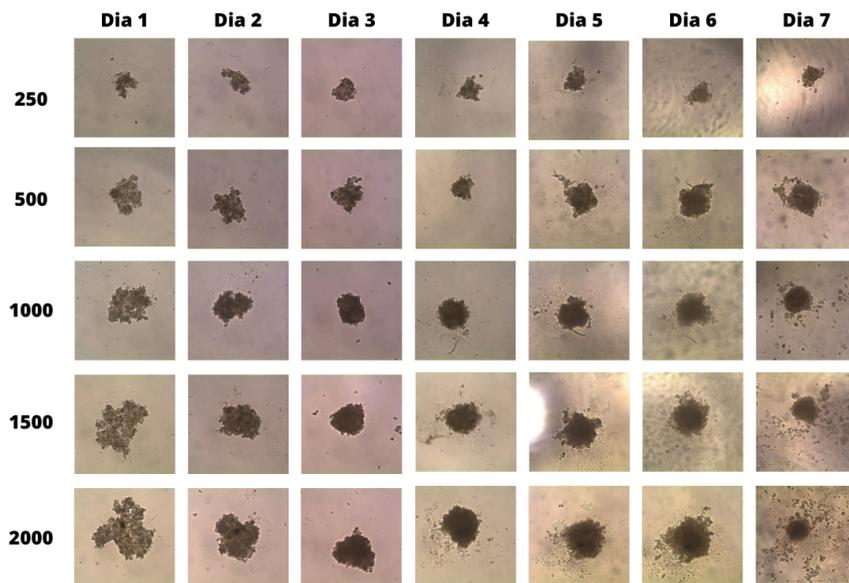


Figura 3. Formação e crescimento de esferoides de células de câncer de mama da linhagem MDA-MB-231. FONTE: A autora (2024).

7.2 TAMANHO DOS ESFERÓIDES

7.2.1. LINHAGEM MCF-7

Na linhagem MCF-7, os esferoides formados utilizando 1000 células/esferoides, foram expostos a quatro diferentes contaminantes químicos por um período de 15 dias. A análise dos resultados demonstrou que não houve diferença significativa no tamanho médio dos esferoides em comparação ao controle (Figura 4).

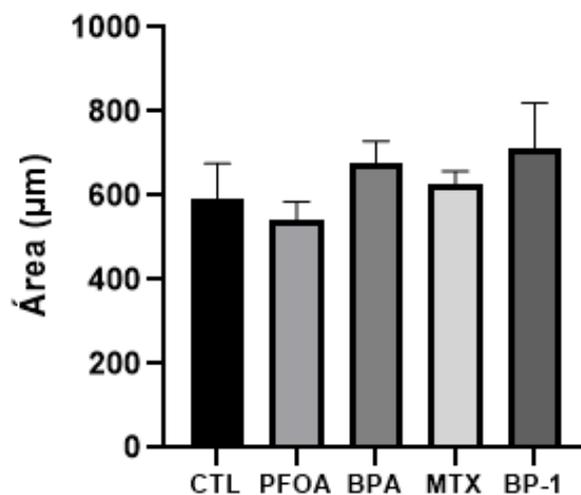


Figura 4. Tamanho médio dos esferoides formados pela linhagem MCF-7 após exposição aos contaminantes químicos por 15 dias. Barra horizontal: média e SD; três experimentos independentes. ANOVA + teste de Dunnett. FONTE: A autora (2024).

7.2.2. LINHAGEM MDA-MB-231

Os esferoides formados pela linhagem MDA-MB-231, também utilizando 1000 células/esferoides, foram expostos aos contaminantes químicos por 15 dias. Assim como para as células MCF-7, não houve diferença significativa no tamanho médio dos esferoides em relação ao controle (Figura 5).

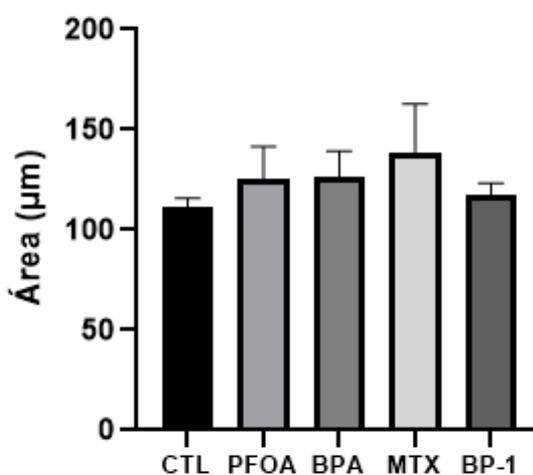


Figura 4. Tamanho médio dos esferoides formados pela linhagem MDA-MB-231 após exposição aos contaminantes químicos por 15 dias. Barra horizontal: média e SD; três experimentos independentes. ANOVA + teste de Dunnett. FONTE: A autora (2024).

7.3. VIABILIDADE CELULAR

7.3.1. LINHAGEM MCF-7

Para a linhagem MCF-7, às células expostas aos contaminantes não apresentaram alterações significativas na viabilidade celular quando comparadas ao grupo controle (Figura 6).

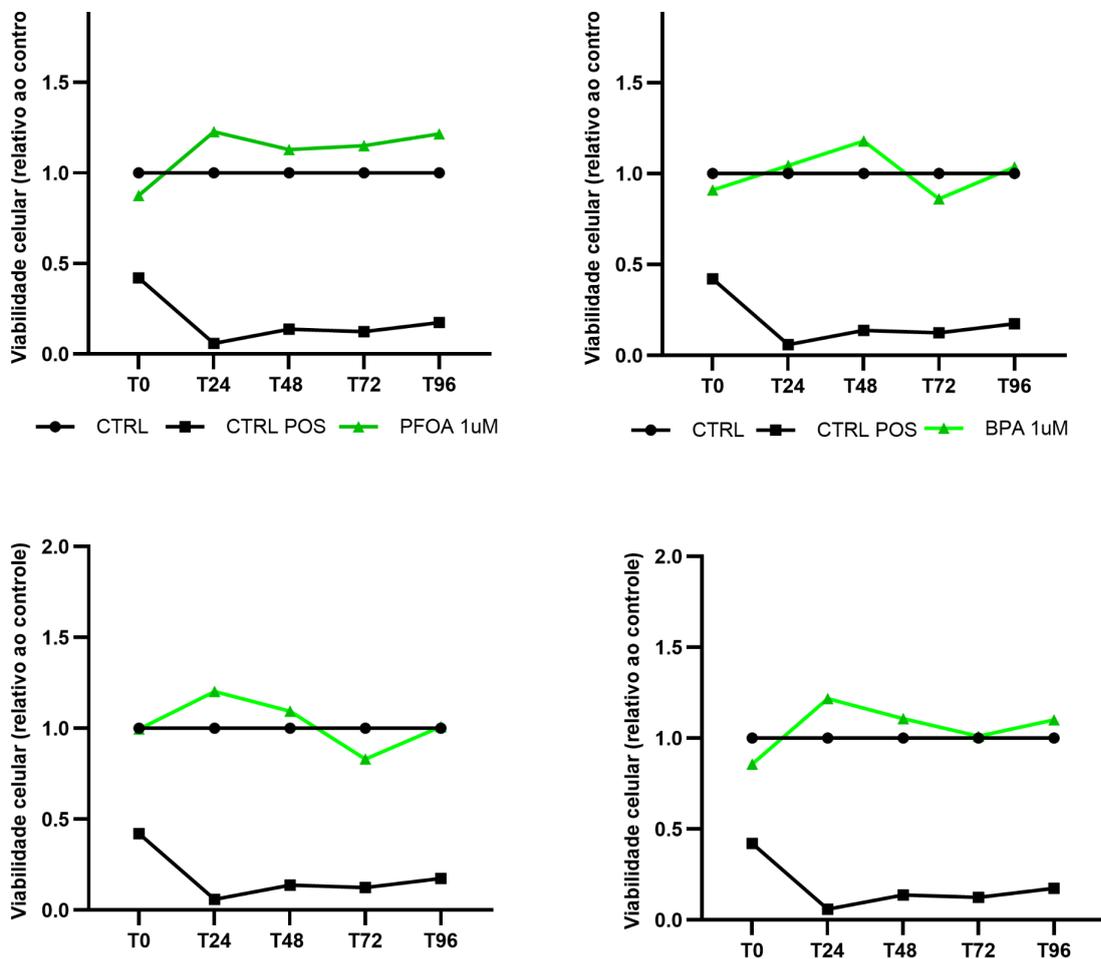


Figura 6. Ensaio de viabilidade celular da linhagem MCF7. Células expostas ao PFOA (A), BPA (B), MTX (C) e BP-1 (D). Controle, círculos pretos; Controle positivo, quadrado preto; tratado, triângulo verde. Barra horizontal: média e SD (ou CI 95%). Quatro experimentos independentes. ANOVA + teste de Dunnett ou Kruskal-Wallis + teste de Dunn. FONTE: A autora (2024).

7.3.2. LINHAGEM MDA-MB-231

Para as células expostas ao PFOA houve um aumento do metabolismo do corante resazurin após 24h (180%) e 48h (170%). Para as células expostas ao BPA houve um aumento após 24h (280%). O composto BP-1 alterou significativamente as células expostas após 48h (150%) e 72h (140%) (Figura 7).

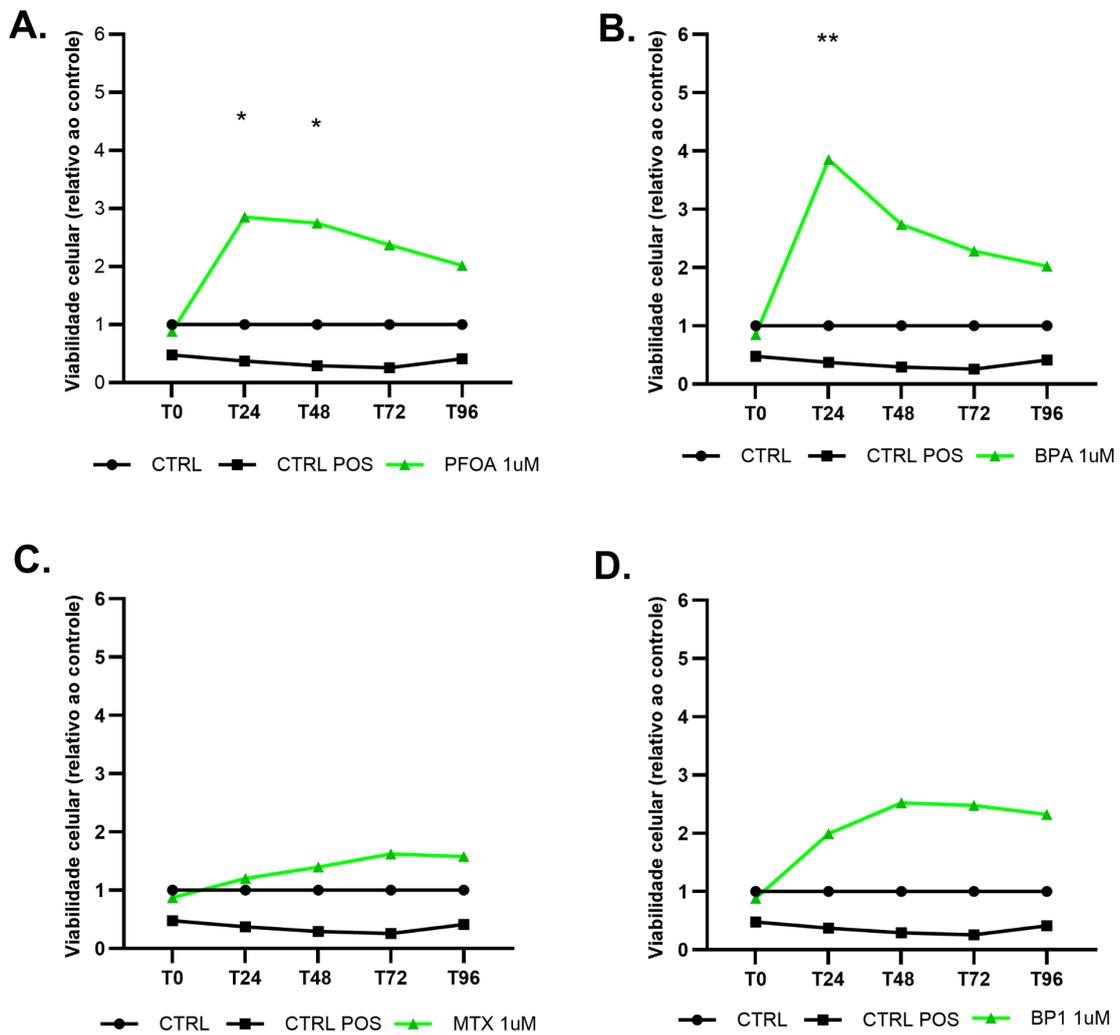


Figura 7. Ensaio de viabilidade celular da linhagem MDA-MB-231. Células expostas ao PFOA (A), BPA (B), MTX (C) e BP-1 (D). Controle, círculos pretos; Controle positivo, quadrado preto; Tratado, triângulo verde. Barra horizontal: média e SD (ou CI 95%); Quatro experimentos independentes. ANOVA + teste de Dunnett ou Kruskal-Wallis + teste de Dunn. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$. FONTE: A autora (2024).

8. DISCUSSÃO

A utilização de esferoides tumorais em cultura 3D tem se destacado por simular melhor o microambiente tumoral *in vivo*. As linhagens MCF-7 e MDA-MB-231 são amplamente utilizadas, apresentando características distintas. Essas características influenciam diretamente o comportamento das células em modelos 3D, destacando a importância desses modelos para estudos de terapias e toxicidade.

Os resultados deste estudo destacam diferenças fundamentais no comportamento das linhagens celulares MCF-7 e MDA-MB-231 na formação e viabilidade de esferoides tumorais, aspectos que refletem suas características biológicas intrínsecas. A linhagem MCF-7 demonstrou maior eficiência na formação de esferoides compactos e bem definidos, mesmo em densidades variadas. Esse comportamento pode ser explicado pela sua natureza epitelial e tendência a formar colônias organizadas (COMSA et al. 2015). Estudos prévios corroboram essas observações, relatando que os esferoides apresentaram proteínas de junção aderente e produziram sua própria matriz extracelular (COELHO et al., 2021). Essas características podem contribuir para o melhor desempenho dos esferoides MCF-7 em experimentos de cultura 3D.

Em contrapartida, os esferoides da linhagem MDA-MB-231 apresentaram menor compactação e maior suscetibilidade à fragmentação, o que está alinhado à sua natureza mesenquimal e altamente invasiva (WELSH, 2013). A elevada expressão de marcadores associados à TEM, como PD-L1 e CD47, bem como a maior resistência a compostos antitumorais, também já foram documentadas para esta linhagem (HUANG et al., 2020; SARAIVA et al., 2020). Esses fatores podem justificar a menor estabilidade dos esferoides observada neste estudo. Além disso, apesar de apresentarem maior capacidade migratória em culturas 2D após transferência, o ambiente tridimensional parece limitar sua proliferação, evidenciando diferenças importantes no comportamento celular entre as condições de cultura 2D e 3D (HUANG et al., 2020).

Quanto à exposição aos contaminantes químicos, ambos os modelos celulares demonstraram menor citotoxicidade em relação a estudos anteriores, o

que corrobora com estudos que mostram que células cultivadas em esferoides podem exibir respostas diferentes às terapias em comparação com culturas bidimensionais, refletindo melhor a resistência observada *in vivo* (XIAO *et al.*, 2023).

No presente estudo, a linhagem MCF-7 não apresentou alterações significativas na viabilidade celular, já para a linhagem MDA-MB-231 houve aumento expressivo no metabolismo do corante resazurin (alamar blue), especialmente em resposta ao PFOA, BPA e BP-1. Esses dados indicam uma maior atividade metabólica na linhagem após a exposição, sugerindo potencial ativação de mecanismos de adaptação celular.

No entanto, o modelo 3D também apresenta limitações. Apesar de replicar melhor o ambiente tumoral, ele não consegue incorporar todos os aspectos da complexidade *in vivo*, como a vascularização e a resposta imunológica completa, o que pode restringir a predição de alguns comportamentos biológicos (JENSEN; TENG, 2020). Além disso, a formação e manutenção de esferoides exigem condições específicas, que podem variar dependendo da linhagem celular ou do método de cultivo utilizado, o que pode tornar os protocolos mais difíceis de padronizar e reproduzir (JENSEN; TENG, 2020).

Essas diferenças destacam a importância de considerar o contexto biológico das linhagens celulares ao projetar modelos tridimensionais para estudos de toxicidade ou resposta a tratamentos. A linhagem MCF-7, com sua tendência a formar esferoides bem estruturados, pode ser mais adequada para estudar respostas em ambientes tridimensionais organizados, enquanto a MDA-MB-231 é um modelo mais desafiador, porém relevante para explorar aspectos relacionados à invasão e resistência tumoral.

9. CONCLUSÃO

Foi possível padronizar protocolos para a formação de esferoides nas linhagens MCF-7 e MDA-MB-231. A linhagem MCF-7 formou esferoides mais compactos e organizados, refletindo sua menor agressividade, aspecto mais epitelial e maior capacidade de estruturação celular. Além disso, a exposição aos

contaminantes químicos não alterou significativamente a viabilidade ou o tamanho dos esferoides dessa linhagem, sugerindo baixa toxicidade e uma resistência intrínseca ou barreiras estruturais que limitam a interação direta com os compostos testados. Por outro lado, os esferoides de MDA-MB-231 apresentaram maior menor compactação e respostas metabólicas significativas aos contaminantes, com aumentos expressivos na viabilidade celular em resposta ao BPA, PFOA e BP-1, indicando maior plasticidade metabólica e adaptação a condições adversas. Esses resultados reforçam a importância dos esferoides como modelos representativos para estudos de toxicidade, avaliação da modulação do fenótipo celular por contaminantes ambientais e terapias antitumorais.

7. REFERÊNCIAS

ANVISA, RESOLUÇÃO-RDC Nº 47, DE 16 DE MARÇO DE 2006. Regulamenta a lista de filtros ultravioleta permitidos para produtos cosméticos e dá outras providências, 2006. Disponível em: https://www.anvisa.gov.br/documents/10181/2718376/RDC_47_2006.pdf. Acesso em: 21 de abril, 2023.

AKKAYA, Elif; GÜNGÖR, Harun Reşit. O lado negro dos experimentos com animais. *Jt Dis Relat Surg.* , v. 2, pág. 479–483, 6 jul, 2022. DOI: 10.52312/jdrs.2022.719.

BALABANIČ, Damjan; KLEMENČIČ, Aleksandra K. Produtos químicos desreguladores endócrinos e saúde reprodutiva masculina: uma revisão. *ZdravVestn.*, 87(1-2):69-0, 2018. DOI: <https://doi.org/10.6016/ZdravVestn.2456>

BRAY, F. et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 can-cers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians.* Hoboken;68(6):394-424, 2018. DOI: 10.3322/caac.21492.

CAMPUZANO, Santiago; PELLING, Andrew E. Scaffolds para cultura de células 3D e agricultura celular derivada de fontes não animais. *Frontiers in Sustainable Food Systems* , v. 3, 2019. DOI: 10.3389/fsufs.2019.00038.

CHAPARRO-ORTEGA, Andrea; BETANCOURT, Miguel; ROSAS, Patricia; VÁZQUEZ-CUEVAS, Francisco G; CHAVIRA, Roberto; BONILLA, Edmundo; CASAS, Eduardo; DUCOLOMB; Yvonne. Endocrine Disruptor Effect of Perfluorooctane Sulfonic Acid (PFOS) and Perfluorooctanoic Acid (PFOA) on Porcine Ovarian Cell Steroidogenesis. *Toxicology in Vitro*, 2018 Feb;46:86-93. DOI: 10.1016/J.TIV.2017.09.030.

BOO, Lily et al. MiRNA transcriptome profiling of spheroid-enriched cells with cancer stem cell properties in human breast MCF-7 cell line. *International Journal of Biological Sciences*, v. 12, n. 4, p. 427-445, 12 fev, 2016. DOI: 10.7150/ijbs.12777. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4855145/>. Acesso em: 7 out. 2024.

CHEN, G., LIU, W., YAN, B. Breast Cancer MCF-7 Cell Spheroid Culture for Drug Discovery and Development. *Journal of cancer therapy*, 13(3), 117–130, (2022). DOI: <https://doi.org/10.4236/jct.2022.133009>

COELHO, Laura Lacerda et al. Use of Mammary Tumor Spheroids to Study in Vitro Metastatic Potential and Therapeutic Response. Instituto Brasileiro de Informação em Ciência e Tecnologia, 2021. Disponível em: https://www.oasisbr.ibict.br/vufind/Record/CRUZ_3c17a6a14aca07af58209276f301aab3. Acesso em: 8 set. 2024.

COMSA, S., CIMPEAN, A. M.; RAICA, M. The Story of MCF-7 Breast Cancer Cell Line: 40 years of Experience in Research. *Anticancer Res* 35, 3147–3154, (2015).

DUMITRESCU, RG; COTARLA, I. Understanding breast cancer risk – where do we stand in 2005?. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, v. 9, n. 1, p. 208-221, january-march, 2007. DOI: 10.1111/j.1582-4934.2005.tb00350.x.

ECHA (Europe). METHOXYCHLOR: DRAFT RISK PROFILE. Group of the Persistent Organic Pollutants. Review Committee, 2020. Disponível em: <https://echa.europa.eu/documents/10162/b65a738e-b50f-64e5-cbb0-f2711d49c25>. Acesso em: 18 de abril, 2023.

HAMEED, N.; AKHTAR, T.; SHEIKH, N. BPA; An Endocrine Disruptor Induced Biochemical Changes and Histopathological Damage in the Kidneys of Rats (*Rattus Norvegicus*). *Albus Scientia*, v. 2023, n. 1, p. 1–5, 2023. DOI: 10.56512/AS.2023.1.e230628.

HAUSER, R; CHEN, Z; POTHIER, L; RYAN, L; ALTSHUL, L. The relationship between human semen parameters and environmental exposure to polychlorinated biphenyls and p,p'-DDE. *Environ Health Perspect*, v. 111, n. 12, p. 1505-1511, september, 2003. DOI: 10.1289/ehp.6175.

HOLUB, Austin R.; HUO, Anderson; PATEL, Kavil; THAKORE, Vishal; CHHIBBER Pranav; EROGBOGBO Folarin. Assessing Advantages and Drawbacks of Rapidly Generated Ultra-Large 3D Breast Cancer Spheroids: Studies with Chemotherapeutics and Nanoparticles. *International Journal of Molecular Sciences* 21, no. 12: 4413, 2020. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms21124413>.

HORMAN, Shane R.; TO, Jeremy; ORTH, Anthony P.; SLAWNY, Nicky; CUDDIHY, Meghan; CARACINO, Diana. 3D High- Content Analysis of Spheroids. *Genetic Engineering & Biotechnology News* 33:16, 18-19, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1089/gen.33.16.08>

HUANG, Zhaoming et al. Characterization of Triple-Negative Breast Cancer MDA-MB-231 Cell Spheroid Model. *Oncotargets and Therapy*, v. 13, p. 5395-5405, 11 jun, 2020. DOI: 10.2147/OTT.S249756.

IKUO, Yamamoto. Chapter 2:Fluoroalkyl Acrylate Polymers and Their Applications. 32-53, 2016 DOI: 10.1039/9781782629368-00032

JENSEN, Caleb; TENG, Yong. Is it time to start transitioning from 2D to 3D cell culture? *Frontiers in Molecular Biosciences*, v. 7, p. 33, 6 mar. 2020. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmolb.2020.00033>. Acesso em: 25 de nov. 2024.

KORDBACHEH, Hananeh; KARAHALIL, Bensu. Revisão sistemática sobre segurança do bisfenol A: da invenção ao presente. *Eurasian Journal of Toxicology* 5/2 37-43, 2023. DOI: <https://doi.org/10.51262/ejtox.1295682>

LAMBERT, A. W.; PATTABIRAMAN, D. R.; WEINBERG, R. A. Emerging Biological. *Cell*, Feb 9;168(4):670-691, 2017. DOI: 10.1016/j.cell.2016.11.037.

LEE, H.R. et al. Treatment with bisphenol A and methoxychlor results in the growth of human breast cancer cells and alteration of the expression of cell cycle-related genes, cyclin D1 and p21, via an estrogen receptor-dependent signaling pathway. *International Journal of Molecular Medicine*, Volume 29 Issue 5 ISSN: 1107-3756, 2016. DOI: 10.3892/ijmm.2012.903

MINISTÉRIO DA SAÚDE (BR). Portaria nº 329, de 2 de setembro de 1985. Aprova a Política Nacional de Saúde. Brasília: Diário Oficial da União; 3 set 1985. Seção 1:13413. Disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/mapa_gm/1985/prt0329_02_09_1985.html . Acesso em: 26 abr. 2023.

PAOLILLO, M. et al. Células cancerígenas semelhantes a tronco em um sistema de cultura 3D dinâmico: um modelo para estudar adesão celular metastática e medicamentos anticâncer. *Células*, v. 8, n. 11, p. 1434, 2019. DOI: <https://doi.org/10.3390/cells8111434>. Acesso em: 1 out. 2024.

PUBCHEM COMPOUND SUMMARY FOR CID 4115, 2,4-DIHYDROXYBENZOPHENONE. National Center for Biotechnology Information, 2023. Disponível em: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/2_4-Dihydroxybenzophenone. Acesso em: 20 de abril, 2023.

PUBCHEM COMPOUND SUMMARY FOR CID 4115. 2,4-Dihydroxybenzophenone. National Center for Biotechnology Information, 2023. Disponível em: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/2_4-Dihydroxybenzophenone. Acesso em: 20 abr. 2023.

PUBCHEM. Perfluorooctanoic acid. National Center for Biotechnology Information, 2023. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Perfluorooctanoic-acid#section=2D-Structure>. Acesso em: 20 abr. 2023.

PUBCHEM. Bisphenol A. National Center for Biotechnology Information, 2023. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/bisphenol-A>. Acesso em: 20 abr. 2023.

PUBCHEM. Methoxychlor. National Center for Biotechnology Information, 2023. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Methoxychlor>. Acesso em: 20 abr. 2023.

PULZE, Laura et al. MCF7 spheroid development: new insight about spatio/temporal arrangements of TNTs, amyloid fibrils, cell connections, and cellular bridges. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 21, n. 15, p. 5400, 29 jul, 2020. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms21155400>. Acesso em: 8 nov. 2024.

RUSSO M, CEJAS CM, PITINGOLO G. Advances in microfluidic 3D cell culture for preclinical drug development. *Prog Mol Biol Transl Sci*, 2022;187(1):163-204. DOI: 10.1016/bs.pmbts.2021.07.022.

SARAIVA, Diana P. et al. Estabelecimento de uma co-cultura 3D com linhagem de células de câncer de mama MDA-MB-231 e células imunes derivadas de pacientes para aplicação no desenvolvimento de imunoterapias. *Frontiers in Oncology*, v. 10, 2020. Sec. Imunidade e Imunoterapia Contra o Câncer. DOI: <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.01543>. Acesso em: 1 nov. 2024.

SEDETA, Ephrem T., JOBRE Bilain, AVEZBAKIYEV, Boris. Breast cancer: Global patterns of incidence, mortality, and trends.. *Journal of Clinical Oncology*, 2023 DOI: 10.1200/jco.2023.41.16_suppl.10528

SIGIEL, G. J. et al. Polybrominated diphenyl ethers BDE-47 and BDE-99 modulate murine melanoma cell phenotype in vitro. *Environmental Science and Pollution Research*, 17 set, 2021. DOI: 10.1007/s11356-021-16455-0

SOULE HD; VAZGUEZ J; LONG A; ALBERT S; BRENNAN M. 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, november, 1973. DOI: 10.1093/jnci/51.5.1409.

STEIL, Gisleine Jarenko et al. Polybrominated diphenyl ethers BDE-47 and BDE-99 modulate murine melanoma cell phenotype in vitro. *Environmental Science and Pollution Research International*, v. 29, n. 8, p. 11291-11303, 2022. DOI: 10.1007/s11356-021-16455-0.

STOKERAB, TE; ROBINETTR, CL; COOPER, RL. Perinatal exposure to estrogenic compounds and the subsequent effects on the prostate of the adult rat: evaluation of inflammation in the ventral and lateral lobes. *Reproductive Toxicology*, v. 13, n. 6, p. 463-472, november–december, 1999. DOI: 10.1016/s0890-6238(99)00049-0.

SWEENEY, Elizabeth E.; MCDANIEL, Russell E.; MAXIMOV, Philipp Y.; FAN, Ping; JORDAN, V. Craig. Modelos e mecanismos de resistência anti-hormonal adquirida no câncer de mama: progresso clínico significativo apesar das limitações. *Hormone Molecular Biology and Clinical Investigation*, v. 9, n. 2, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1515/hmbci-2011-0004>

THOMPSON, LA; DARWISH, WS. Environmental Chemical Contaminants in Food: Review of a Global Problem. *Journal of Toxicology*, v. 2019, p. 1-14, january, 2019. DOI: 10.1155/2019/2345283

WELSH, JoEllen. Animal Models for Studying Prevention and Treatment of Breast Cancer. In: *Animal Models for the Study of Human Disease*. Elsevier, Pages 997-1018, 2013. DOI: 10.1016/B978-0-12-415894-8.00040-3

World Health Organization. (2021). Breast cancer is now the most common form of cancer: WHO is taking action. Retrieved April 26, 2023, from <https://www.who.int/pt/news/item/03-02-2021-breast-cancer-now-most-common-form-of-cancer-who-taking-action>.

XIAO, Lu N.; XIAOFENG, Liu.; HAO, Zhong., WEI, Zhang.; SHUZHEN, Yu.; RONGFA, Guan. Progress on three-dimensional cell culture technology and their application. *Sheng wu yi xue gong cheng xue za zhi. Journal of biomedical engineering. Shengwu yixue gongchengxue zazhi*, 40 3(3):602-608, (2023). DOI: 10.7507/1001-5515.202204062

YAZAR, Selma. Disruptores endócrinos e infertilidade. A toxicidade dos poluentes ambientais. *IntechOpen*, 2022. DOI: <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.104403>

ZHANG, P.; CAO, M.; ZHANG, Y.; XU, L.; MENG, F.; WU, X.; et al. A novel antisense lncRNA NT5E promotes progression by modulating SYNCRIP expression and predicts poor prognosis in pancreatic cancer. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 2020 Sep; 24(18): 10898–10912. DOI: 10.1111/jcmm.15718.

ZOU, M. et al. Effective degradation of 2,4-dihydroxybenzophenone by zero-valent iron powder (Fe⁰)-activated persulfate in aqueous solution: Kinetic study, product identification and theoretical calculations. *Science of The Total Environment* Volume 771, 1 June 2021, 144743. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2020.144743.