

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS

LARISSA SATIKO ALCÂNTARA SEKIMOTO

Avaliação da terapia fotodinâmica em cultivo celular tridimensional de melanoma humano

São Carlos
2016

LARISSA SATIKO ALCÂNTARA SEKIMOTO

Avaliação da terapia fotodinâmica em cultivo celular tridimensional de melanoma humano

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação do Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestra em Ciências.

Área de Concentração: Física Aplicada
Opção: Física Biomolecular
Orientadora: Prof^ª Dra. Cristina Kurachi

Versão corrigida
(Versão original disponível na Unidade que aloja o Programa)

São Carlos
2016

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Ficha catalográfica revisada pelo Serviço de Biblioteca e Informação do IFSC,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Sekimoto, Larissa Satiko Alcântara
Avaliação da terapia fotodinâmica em cultivo celular tridimensional de melanoma humano / Larissa Satiko Alcântara Sekimoto; orientadora Cristina Kurachi - versão corrigida -- São Carlos, 2016.
103 p.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Física Biomolecular) -- Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2016.

1. Terapia fotodinâmica. 2. Cultivo tridimensional. 3. Melanoma humano. I. Kurachi, Cristina, orient. II. Título.

Dedico este trabalho aos meus pais, Robilson e Célia, em quem me espelho em todas as decisões e dos quais recebo amor incondicional. Ao meu irmão Yuri, sobretudo companheiro de todas as horas e, ao meu noivo Bruno, por estar presente em todos os momentos e sempre me incentivar a dar o meu melhor.

AGRADECIMENTOS

À Deus, minha origem de fé, pela minha vida e por me auxiliar a trilhar o caminho do bem e da caridade.

Aos meus pais, Robilson e Célia, meus exemplos de vida, por todos os ensinamentos e conselhos que moldaram meu caráter. Amo muito vocês e agradeço por todo o apoio que vocês sempre me dão, em todas as situações. Ao meu irmão Yuri, que além de irmão é um amigo, por compartilhar todas as alegrias e por todo o carinho.

Ao meu noivo Bruno, que sempre me ajudou em qualquer situação, compartilhando todas as frustrações, alegrias e aspirações para o futuro, te respeito e admiro muito.

À minha família, que além de grande é muito unida, por todas as conquistas festejadas, pela confiança que vocês depositam em mim, por todas as experiências de vida compartilhadas, adoro vocês. Em especial ao meu padrinho, tio Zé, que Deus precisou levar pra junto dele com o propósito de compartilhar sua alegria com todos no céu, seu exemplo de humildade e perseverança nunca será esquecido por mim e todos que lhe são queridos.

À minha orientadora, Prof. Dra. Cristina Kurachi, por toda orientação durante o mestrado, atenção e contribuição para a minha formação profissional. Ao Prof. Dr. Vanderlei Salvador Bagnato pelas valiosas discussões neste trabalho.

A todos os colegas do Laboratório de Biofotônica, pelos momentos de descontração e por estarem sempre dispostos a ajudar em todas as dificuldades, em especial a Layla, Gustavo, Sebastião, Natália e Priscila.

Ao pessoal do Laboratório de Apoio Técnico (LAT), pelo auxílio com a instrumentação utilizada neste trabalho.

A todos os meus amigos, especialmente, Thamyris, Juliana, Gabriele, William, Juliete, Erica, Amanda e Raphael, que sempre torceram por mim mesmo de longe. Muito obrigada.

À CAPES pelo apoio financeiro ao projeto.

“Os homens semeiam na terra o que colherão na sua vida espiritual: os frutos da sua
coragem ou da sua fraqueza”

Allan Kardec

RESUMO

SEKIMOTO, L. S. A. **Avaliação da terapia fotodinâmica em cultivo celular tridimensional de melanoma humano.** 2016. 103 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2016.

O melanoma representa 4% dos tipos de neoplasias cutâneas e causa 79% de morte por doenças de pele no mundo. Um dos grandes problemas relacionados ao tratamento de melanoma advém da sua resistência às terapias convencionais e, assim, a terapia fotodinâmica surgiu como uma alternativa terapêutica promissora, devido ao seu papel no tratamento de diversos tipos de câncer, além de outras doenças de pele. Ela é baseada no acúmulo seletivo de uma molécula fotoativa no tecido alvo, seguida da iluminação por uma fonte de luz, cujo comprimento de onda é específico para a excitação dessa molécula, ocasionando no dano celular. Neste estudo, foram realizados experimentos *in vitro* investigando a resposta fotodinâmica em melanoma humano, através de um modelo de tumor tridimensional por levitação magnética. Inicialmente, um protocolo de obtenção dos tumores de melanoma foi desenvolvido para avaliação da terapia em diferentes doses de luz e concentrações de fotossensibilizador. Em seguida, ensaios de cinética e quantificação intracelular com dois fotossensibilizadores, Photogem[®] e Photodithazine[®], também foram feitos com o intuito de averiguar a sua distribuição, bem como tempo de internalização nos tumores. Tendo estabelecido que a incubação por 16 horas com Photodithazine[®] foi o parâmetro experimental mais adequado, a terapia fotodinâmica foi realizada, em sessão única, com irradiação em 660 nm em tumores de duas diferentes espessuras. Logo, testes de citotoxicidade foram utilizados para comparar os resultados de ambas as condições, onde se notou que o aumento na espessura atenuou o dano oxidativo decorrente da terapia. Além disso, foi observado que o acréscimo na dose de luz não acarretou em mudanças muito significativas na morte celular. No entanto, o maior dano celular, de aproximadamente 90% de morte, foi obtido com 100 µg/mL de Photodithazine[®] e iluminação com 60 J/cm², resultando na desagregação dos tumores, efeitos promissores da terapia no melanoma. Uma possível alternativa sugerida para aprimorar a eficiência fotodinâmica, seria a aplicação de mais sessões de terapia fotodinâmica, uma vez que os experimentos realizados nesse trabalho foram com uma sessão e, esse procedimento, poderia ocasionar em maior morte celular.

Palavras chaves: Terapia fotodinâmica. Cultivo tridimensional. Melanoma humano.

ABSTRACT

SEKIMOTO, L. S. A. **Evaluation of photodynamic therapy in three-dimensional culture of human melanoma cells.** 2016. 103 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2016.

Melanoma accounts for 4% of skin cancers and causes 79% of death from skin diseases worldwide. A major problem associated with melanoma treatment is due to its increasingly resistance to conventional therapies. Thus, photodynamic therapy has emerged as a promising alternative modality to several types of cancer and other skin disorders. It generally involves the selective accumulation of a photoactive molecule in target tissue, followed by illumination with light source of an appropriate wavelength, to excite this molecule, resulting in cell damage. This study sought to investigate the photodynamic response in human melanoma, through a three dimensional tumor model by magnetic levitation. Initially, a protocol to obtain melanoma tumors was developed, to evaluate the therapy at different doses of light and photosensitizer concentrations. Posteriorly, kinetic assays and intracellular quantification with two photosensitizers, Photogem[®] and Photodithazine[®], were also carried out in order to ascertain its distribution, as well as time internalization in tumors. Having established that incubation for 16 hours with Photodithazine[®] was the most suitable experimental parameter, photodynamic therapy was performed in a single session, with irradiation of 660 nm in two tumors, different in thicknesses. Therefore, cytotoxicity tests were used to compare the results of both conditions, where it was noted that the increased tumor depth may attenuate oxidative damage, induced by the therapy. Furthermore, it was observed that the increase in light dose did not result in significant changes in cell death. Nevertheless, the greater cell damage, approximately 90% kill was obtained with 100 ug/mL Photodithazine[®] and illumination with 60 J / cm², causing tumor breakdown, which is a promising effect in melanoma therapy. An alternative suggested to enhance the photodynamic efficiency, would be to apply more sessions of photodynamic therapy, so this procedure could result in increased cell death.

Keywords: Photodynamic therapy. Three-dimensional cell culture. Human melanoma.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Representação morfológica dos diferentes tipos de melanoma cutâneo. 26
- Figura 2 – Esquema dos estágios do melanoma cutâneo. Inicialmente há grande proliferação celular dos melanócitos devido a alterações genéticas frequentemente oriundas de exposição intermitente à radiação ultravioleta. Esse crescimento celular anormal é acentuado na epiderme (in situ), sofrendo aumento de tamanho radial e, por fim, vertical até atingir camadas inferiores da pele. Assim, o câncer encontra a corrente sanguínea, o sistema linfático e tecidos vizinhos e se espalha por outras partes do corpo. 27
- Figura 3 – Diagrama de Jablonski para ilustrar os mecanismos de excitação da molécula de FS. O FS absorve energia da luz passando para seu estado excitado singleto e, por relaxação, para o tripleto. No estado tripleto, o FS excitado pode transferir energia para o oxigênio molecular, formando o oxigênio singleto reativo, ou reagir diretamente com biomoléculas formando radicais livres que, ao interagir com oxigênio, resultam em EROs. Essas moléculas resultantes (EROs e 1O_2) desencadeiam reações responsáveis pela morte celular. 30
- Figura 4 – Espectro de absorção da água, hemoglobina (Hb), hemoglobina oxigenada (HbO₂) e melanina, componentes do tecido biológico. A interseção dos espectros que corresponde à baixa absorção dessas moléculas receptoras é chamado de janela óptica. 32
- Figura 5 – Modelos de cultura 3D. a) Cultura organotípica: Pedacos de órgãos dissecados (explantes) são cultivados em membranas porosas suportadas por grade de metal. Esses explantes preservam a arquitetura do tecido original. b) Esferoides celulares: Sistemas simples que exemplificam a tendência das células agregarem. (1) Os esferoides são formados pela técnica de “hanging – drop”, que se baseia no uso de uma gota de líquido (como plasma ou meio de cultura) a partir do qual as células se multiplicarão, suspensa em vidro de relógio invertido. A suspensão celular é pipetada dentro da tampa do frasco de cultura e a tampa é invertida. Assim, a gota é suspensa pela gravidade e tensão superficial, permitindo que as células decantem e se agreguem formando uma estrutura densa, esferoide. (2) Os esferoides são produzidos por rotação da suspensão celular, inicialmente devagar (~15 rpm) e, conforme os agregados se formam, a rotação aumenta (~25 rpm), mantendo-os em suspensão. A agregação celular ocorre por ação da gravidade, com as células se aproximando nas paredes do rotor. c) Cultura de células epiteliais polarizadas: Células crescem em membranas porosas formando camadas polarizadas ou dentro de géis hidratados de colágeno, resultando em monocamadas esféricas. d) Pele artificial: Fibroblastos são cultivados em placas Petri e semeadas sobre malha de fibra. Após semanas de cultura, queratinócitos são colocados no novo tecido, formando uma camada de epiderme. e) Materiais microescalados (microcarrier): Grânulos de dextran, glicosaminoglicanos e outros polímeros porosos são usados como suporte para ancoragem de linhagens celulares. 35

Figura 6 – Cultura celular por levitação magnética. a) Células são cultivadas em monocamada até atingir confluência e são incubadas com nanopartículas ferromagnéticas. b) Depois de um tempo de incubação (usualmente overnight) as células são removidas e transferidas para placas de Petri (ou placa multipoços). c) O dispositivo magnético, com o ímã, é colocado nesse esquema sobre a placa. d) Depois de alguns minutos as células levitam na interface ar-meio e depois de um tempo adequado para cada tipo celular, formam configuração tridimensional. e) Cultura de células de glioblastoma forma um agregado e levita na primeira figura e, com remoção do dispositivo magnético, decaem. f) Dispositivos magnéticos para placas multipoços de diferentes tamanhos.....	36
Figura 7 – Detecção por imunofluorescência de N-caderina (vermelho) e núcleo celular (azul) em implantes de tumor em camundongo, cultura 3D com 48h de levitação e cultura em monocamada de glioblastoma humano. Comparações demonstram similaridades morfológicas entre o tumor em modelo xenográfico e 3D in vitro por levitação magnética. Escala: 1mm.	37
Figura 8 – Imagem de microscopia óptica da linhagem de melanoma humano G361, em aumento de 10X e 200 µm de escala.	41
Figura 9 – Teste de exclusão do corante trypan blue. a) Representação da Câmara de Neubauer na qual alíquota da suspensão de células coradas é colocada. b) No centro da câmara há linhas perpendiculares com marcações em três diferentes tipos de quadrantes. A escolha da contagem das células em cada tipo ocorre de acordo com o tamanho das células utilizadas. Considerando que as células de mamíferos como as de melanoma são grandes, os quadrantes usados são os marcados em azul. Assim, as células são contadas nos quatro quadrantes em azul e o valor final é média dessas medidas.	43
Figura 10 – Representação esquemática do Método de levitação magnética. a) Nanopartículas ferromagnéticas (NS) são adicionadas em garrafas de 25cm ² com células de melanoma em 80% de confluência e incubadas overnight (16 horas). No dia seguinte, as células são desprendidas com tripsina e ressuspensas em meio de cultura McCoy, resultando em 400 µL por poço, para o caso de placas de 24 poços. As células então levitam na interface ar – meio ao se colocar ímã de neodímio sobre a placa multipoços. b) Células de melanoma (G361) antes e após incubação com NS. Há permanência da morfologia celular aderente mesmo com adição de nanopartículas. Escala 200µm. c) Esquema de uma placa de Petri com ímã e visão de um tumor de melanoma.	45
Figura 11 – Montagem do sistema de levitação magnética em placas de 6 poços. a) A suspensão de células magnetizadas é colocada em placas multipoços. b) O processo de levitação ocorre com posicionamento do arranjo de magnetos sobre a placa. c) As células podem se agregar e formar a cultura 3D.	46
Figura 12 – Montagem do sistema de levitação magnética em placas de 24 poços. a) As células contendo nanopartículas ferromagnéticas são transferidas na placa multipoços. b) Tampa de	

isolamento é encaixada sobre a placa e, em seguida, os 24 ímãs de neodímio. c) Com a ação do campo magnético, a cultura 3D é construída.	48
Figura 13 – Protocolo experimental da viabilidade dos tumores de melanoma. a) Os tumores de melanoma são obtidos em placas de 24 poços e mantidos na estufa ao longo do tempo. Para cada dia de levitação (1 d correspondendo a um dia) há três amostras de tumor (triplicata). Cada amostra é incubada com MTT e os cristais roxos de formazan solubilizados com isopropanol ácido. b) Os 200 µL resultantes de cada poço são repassados para placa de 96 poços para leitura em espectrofotômetro a 570 nm.	49
Figura 14 – Montagem e componentes da impressão magnética. a) Arranjo de 96 magnetos de neodímio em suporte de acrílico. b) Placa de baixa adesão celular, contendo as células com nanopartículas, é colocada sobre o a montagem de ímãs. A distância entre a interface ar-meio e os ímãs é de 4mm, resultando na entrega de campo magnético para as culturas 3D de 120G. c) Os esferoides são formados a partir de 15 minutos de levitação.	49
Figura 15 – Método de impressão celular magnética. Após 24h de levitação, o tumor de melanoma é “quebrado” por dissociação mecânica e centrifugado. Após ressuspensão as células e matriz extracelular são igualmente distribuídas em placas de 96 poços (1×10^5 células por poço). Por fim, o arranjo de ímãs é colocado abaixo da placa e os esferoides são formados com 1 hora de levitação. Escala: 200µm.	50
Figura 16 – Microscópio confocal de fluorescência. a) A amostra fluorescente é iluminada ponto a ponto pelo feixe do laser. b) A fluorescência emitida a partir do ponto de foco é focalizada no orifício confocal e atinge o detector, onde o sinal é interpretado com auxílio de computador e, a imagem processada. c) A luz emitida pela amostra fora do ponto de foco não passa pelo orifício confocal, não atingindo o detector.	52
Figura 17 – Modelo piloto de culturas tridimensionais de melanoma humano em placa de 6 poços. Imagens por microscopia óptica. Escala: 200µm.	53
Figura 18 – Tumor de melanoma após 24 horas de levitação, em placa de 6 poços. Imagens do tumor foram tiradas em trechos, dado o seu grande tamanho. O diâmetro aproximado da cultura formada foi de 4mm.	54
Figura 19 – Culturas tridimensionais de melanoma humano em função do tempo de levitação. Imagens em microscopia dos tumores em placa de 24 poços. Escala: 200 µm.	55
Figura 20 – Viabilidade celular dos tumores de melanoma ao longo dos dias de levitação.	56
Figura 21 – Imagens em microscopia confocal de fluorescência dos tumores de melanoma. a) Os esferoides obtiveram espessura aproximada de 80 µm devido ao arranjo de ímãs abaixo da placa de 96 poços durante a impressão magnética, conferindo um maior “achatamento” do tumor. Os magnetos podem ser retirados após a formação dos esferoides sem perda da estrutura. b) Os tumores em placas de 24 poços adquiriram espessura entre 120 a 130 µm. Isso ocorreu porque o arranjo de ímãs, nesse caso, ficou acima da placa de cultivo,	

permitindo maiores graus de liberdade e interações em diferentes planos das células de melanoma.....	57
Figura 22 – a) Estrutura monomérica do Photogem [®] . Os grupos substituintes R ₁ e R ₂ se ligam aos grupos CH=(OH)CH ₃ , CH=CH ₂ ou a outra molécula do monômero. Já os grupos R ₃ e R ₄ se ligam à molécula de hidrogênio ou ao próprio monômero. b) Espectro de absorvância normalizado do Photogem [®] em PBS pH=7,4. O lado esquerdo representa a banda de Soret, enquanto o lado direito do gráfico as quatro bandas Q.	60
Figura 23 – a) Estrutura química do Photodithazine [®] . b) Espectro de absorvância do Photodithazine [®] . O lado esquerdo do gráfico demonstra a banda de Soret com máximo em 401nm. Por outro lado, o lado direito apresenta os valores das três bandas Q, com máximos em 505nm, 600nm e 655nm.	61
Figura 24 – Protótipos para irradiação de placas multipoços (Biotables). a) Para irradiação em placas de 96 poços a irradiância média é de 20,94 mW/cm ² por poço. b) Nesse caso, para iluminação em placas de 24 poços, há 24 suportes de borracha sobre a Biotable, fornecendo irradiância média de 30 mW/cm ² por poço.	63
Figura 25 – Representação esquemática da disposição dos poços. a) Triplicata das diferentes concentrações (em µg/mL) de PDZ. Há menor número de poços em comparação ao Photogem [®] , pois o PDZ é descrito na literatura que é mais tóxico, logo não havia necessidade de se incubar com concentrações mais altas. b) Concentrações (em µg/mL) de Photogem [®] em triplicata.....	64
Figura 26 – Protocolo experimental da terapia fotodinâmica em tumores sólidos de melanoma. Inicialmente os tumores de diferentes espessuras, previamente obtidos, são incubados com PDZ em diferentes concentrações atóxicas e levados à estufa umidificada por 16 horas (overnight). Após incubação, o fotossensibilizador é retirado dos poços, as amostras lavadas com PBS e, por fim, meio McCoy sem fenol é acrescentado para posterior irradiação. As Biotables (com arranjo para 96 poços e 24 poços) fazem a irradiação a 660 nm dos tumores em diferentes doses de luz. Em seguida, meio é substituído para McCoy com fenol suplementado com 15% de soro fetal bovino e novamente levado à estufa para se avaliar a resposta fotodinâmica após 24 horas do tratamento. Escala: 200 µm.	68
Figura 27 – Sistema para aquisição das imagens dos tumores de melanoma em esferoides a TFD.	71
Figura 28 – Gráficos normalizados de absorvância em função da concentração de fotossensibilizadores. Ambos compostos foram diluídos em meio McCoy sem vermelho de fenol, resultando em diferentes soluções com concentrações variáveis, até 150 µg/mL. a) No máximo de absorção de 660 nm, é possível observar a dependência linear das medidas de absorvância de acordo com o aumento na concentração de Photodithazine [®] . Contudo, nota-se o início de uma saturação desse fotossensibilizador para a maior concentração, o que se infere a possibilidade de agregação para maiores concentrações. b) Novamente no máximo de absorção em 630 nm, percebe-se a linearidade dos dois parâmetros absorvância e	

concentração. No entanto, o efeito do princípio de saturação não é observado para o Photogem®	73
Figura 29 – Gráficos de citotoxicidade no escuro para Photogem® e Photodithazine® pelo teste colorimétrico MTT. Os tumores de melanoma foram dispostos em placas de 96 poços e incubados com os fotossensibilizadores por 16 horas (overnight).	74
Figura 30 – Imagens espectrais, com aumento de 20 vezes, de tumores de melanoma incubados com Photodithazine® e Photogem®, em diferentes tempos. Escala: 1 mm.	76
Figura 31 – Imagens de fluorescência em microscopia confocal de tumores de melanoma imersos em solução de PDZ e Photogem®, ambos na concentração de 50 µg/mL. Destaque para a distribuição homogênea do PDZ nas culturas em detrimento da heterogênea para o Photogem®. As imagens foram obtidas com aumento de 40 vezes e a escala refere-se à 50 µm.....	77
Figura 32 – Curvas de padronização do PDZ e Photogem® a partir das intensidades de fluorescência em 660 nm e 630 nm, respectivamente. A excitação foi de 405 nm e ambos fotossensibilizadores estavam diluídos na solução de lise, contendo DMSO 90% e PBS 10%. Os experimentos foram realizados em triplicata.	79
Figura 33 – Gráfico normalizado dos experimentos de TFD em tumores de 80 µm de espessura (placa de 96 poços) com diferentes doses de irradiação, através do ensaio de MTT. Cada dose de luz define um determinado tempo de iluminação, sendo em ordem crescente 7min e 58 s, 15 min e 55 s, 47 min e 45 s. Os respectivos grupos controle designados por “0”, representam as amostras tumorais não incubadas com Photodithazine®. Os grupos identificados por * se referem aos que apresentaram diferença estatística significativa (p<0,05), com relação aos seus respectivos grupos controle.....	82
Figura 34 – Imagens em microscopia óptica dos tumores de melanoma humano (com 80 µm de espessura) após 24 horas da TFD em 20 J/cm². A letra C representa o grupo controle, enquanto os demais números as concentrações de Photodithazine® utilizadas. Escala: 200 µm.....	84
Figura 35 – Imagens em microscopia confocal da fluorescência natural de tumores de melanoma humano (com 80 µm de espessura) incubados com marcadores, após 24 horas da TFD em 20 J/cm². A emissão de fluorescência em verde representa as células mortas (SYTOX®), enquanto em vermelho as vivas (C ₁₂ -resofurin). A letra C é o controle e, os outros números, as concentrações de Photodithazine®. Escala: 1 mm.	86
Figura 36 – Gráfico normalizado dos experimentos de TFD em tumores de 130 µm de espessura (placa de 24 poços) com diferentes doses de irradiação, pelo ensaio de MTT. Cada dose de luz corresponde a um tempo de iluminação, nesse caso seus valores crescentes são 5 min e 33s, 11 min e 7s. Os grupos controle (sem incubação com Photodithazine®) são designados como zero no gráfico. Os grupos identificados por * se referem aos que apresentaram	

diferença estatística significativa ($p < 0,05$), com relação aos seus respectivos grupos controle.....	88
Figura 37 – Imagens em microscopia óptica, com aumento de 5 vezes, dos tumores de melanoma humano com 130 μm de espessura, após 24 horas da TFD com 20 J/cm^2 . Estão representados os tumores do grupo controle e os demais incubados com Photodithazine [®] , em concentrações crescentes. Escala: 200 μm	89
Figura 38 – Comparativo da resposta fotodinâmica em tumores de diferentes espessuras, para a mesma dose de irradiação (20 J/cm^2) e intervalo de concentrações de Photodithazine [®]	90
Figura 39 – Esferoides em placa de 96 poços após 1 hora de impressão magnética. No lado esquerdo se tem a imagem inicial com ensaio de BioAssay, logo após a TFD com 10 J/cm^2 , enquanto no direito a imagem final 48 horas depois da terapia. Os números indicados na figura representam as concentrações de Photodithazine [®] utilizadas nos experimentos de TFD.....	93
Figura 40 – Esferoides em placa de 96 poços após 1 hora de impressão magnética. Acima está a imagem inicial logo após TFD com 20 J/cm^2 , e abaixo 48 horas depois do tratamento. Para cada concentração de Photodithazine [®] , as amostras tumorais estavam em triplicata.....	93

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Medidas da padronização do método de levitação magnética em diferentes placas multipoços.....	45
Tabela 2 – Parâmetros experimentais de cada placa de 96 poços. Cinco amostras tumorais, por placa, foram incubadas com 200 µL do seu respectivo fotossensibilizador. Cada amostra foi incubada com um tempo diferente para avaliar a difusão de cada fotossensibilizador nos tumores de melanoma.	65
Tabela 3 – Parâmetros experimentais para quantificação de fotossensibilizadores intracelulares em melanoma humano. Cada placa é incubada com um tipo de fotossensibilizador e cada poço corresponde a um tempo de incubação..	67
Tabela 4 – Parâmetros experimentais avaliados nos experimentos de TFD em tumores sólidos de melanoma.....	68
Tabela 5 – Medidas de temperatura de meio McCoy sem fenol em Biotable a 660 nm,.....	72
Tabela 6 – Resultados da quantificação de fotossensibilizadores intracelulares em culturas de melanoma humano em monocamada.....	79
Tabela 7 – Resultados da quantificação de fotossensibilizadores intracelulares em culturas tridimensionais de melanoma humano.....	80

LISTA DE ABREVIACÕES

ATCC [®]	<i>American type culture collection</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FS	Fotossensibilizador
LAT	Laboratório de apoio técnico
LED	Diodos emissores de luz
MES	Melanoma expansivo superficial
MLA	Melanoma lentiginoso acral
MLM	Método de levitação magnética
MN	Melanoma nodular
MTT	Brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difenil tetrazólio
NS	NanoShuttle [™]
PBS	Tampão fosfato salino
PDZ	Photodithazine [®]
SFB	Soro fetal bovino
TPP [®]	<i>Techno Plastic Products</i>
TFD	Terapia fotodinâmica
2D	Bidimensional
3D	Tridimensional

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	25
1.1	MELANOMA	25
1.2	TERAPIA FOTODINÂMICA	28
1.3	MODELOS DE TECIDO <i>IN VITRO</i> – MÉTODO DE LEVITAÇÃO MAGNÉTICA	33
2	OBJETIVOS	39
2.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	39
3	PADRONIZAÇÃO DE TUMOR DE MELANOMA PELO MÉTODO DE LEVITAÇÃO MAGNÉTICA	41
3.1	MATERIAIS E MÉTODOS	41
3.1.1	<i>Linhagem celular</i>	41
3.1.1	<i>Cultura celular</i>	41
3.1.2	<i>Método de levitação magnética – Obtenção dos tumores de melanoma</i>	43
3.1.3	<i>Método de levitação magnética em placa de 6 poços</i>	46
3.1.4	<i>Método de levitação magnética em placa de 24 poços e viabilidade dos tumores pelo ensaio de MTT</i>	47
3.1.5	<i>Método de impressão celular em placa de 96 poços</i>	49
3.1.6	<i>Caracterização e medição da espessura dos tumores de melanoma – Microscopia Confocal</i>	51
3.2	RESULTADOS E DISCUSSÃO	52
3.2.1	<i>Padronização dos tumores de melanoma – Modelo Piloto</i>	52
3.2.2	<i>Avaliação da viabilidade e espessura dos tumores de melanoma</i>	54
4	TERAPIA FOTODINÂMICA EM TUMORES DE MELANOMA <i>IN VITRO</i>	59
4.1	MATERIAIS E MÉTODOS	59
4.1.1	<i>Fotossensibilizadores – Photogem[®] e Photodithazine[®]</i>	59
4.1.2	<i>Sistema de irradiação: Biotable[®]</i>	62
4.1.3	<i>Variação de temperatura em função do tempo de irradiação</i>	63
4.1.4	<i>Citotoxicidade no escuro dos fotossensibilizadores por MTT</i>	63
4.1.5	<i>Cinética de difusão dos fotossensibilizadores nos tumores de melanoma por microscopia confocal</i>	65
4.1.6	<i>Quantificação de fotossensibilizadores intracelulares (uptake) em culturas 2D e 3D de melanoma humano – Teste piloto</i>	66
4.1.7	<i>Terapia fotodinâmica em placa de 24 e 96 poços</i>	67
4.1.8	<i>Avaliação da resposta fotodinâmica por microscopia óptica e MTT</i>	69
4.1.9	<i>Ensaio da viabilidade celular com marcadores fluorescentes SYTOX[®] e C₁₂-resazurin</i>	69
4.1.10	<i>BioAssay</i>	70
4.1.11	<i>Análise estatística dos dados experimentais</i>	71
4.2	RESULTADOS E DISCUSSÃO	72
4.2.1	<i>Determinação da temperatura de amostras com Biotable em 660 nm</i>	72

4.2.2	<i>Investigação da agregação e citotoxicidade no escuro do Photogem® e Photodithazine®</i>	72
4.2.3	<i>Cinética em microscopia confocal</i>	75
4.2.4	<i>Quantificação de Photogem® e Photodithazine® intracelular e modelos 2D e 3D de melanoma humano</i>	78
4.2.5	<i>Resposta fotodinâmica de tumores em diferentes espessuras com Photodithazine®</i>	82
4.2.6	<i>BioAssay</i>	91
5	CONCLUSÃO	95
	REFERÊNCIAS	97

1 INTRODUÇÃO

1.1 MELANOMA

O melanoma é um tipo de tumor maligno que consiste na multiplicação anormal dos melanócitos, células produtoras de melanina, pigmento responsável pela cor da pele. Normalmente envolve a pele (nesse caso chamado de melanoma cutâneo), contudo, também pode estar presente nos olhos, meninges ou várias outras mucosas do corpo.¹ O melanoma cutâneo pode se originar da pele normal sadia ou de lesões pigmentadas pré-existentes. De modo geral, representa 4% dos tipos de neoplasias cutâneas e causa 79% de morte por doenças de pele, sendo sua alta taxa de mortalidade atribuída à capacidade de sofrer metástase, o que desfavorece seu prognóstico.

Desde a década de 1970 a incidência de melanoma maligno vem crescendo de forma significativa, aproximadamente 4% ano nos Estados Unidos e, no Brasil, estima-se que cerca de 6000 novos casos sejam diagnosticados por ano. Nessa conjuntura, o Brasil ocupa a 15ª posição quanto à incidência do melanoma no mundo e a maior presença da doença em homens e mulheres ocorre na região Sul do país.²

A manifestação da doença é decorrente de fatores de risco que se relacionam a características cutâneas, como pele clara, presença de nevos atípicos, sardas, incapacidade de bronzeamento, alguns fatores ambientais, como exposição intermitente à radiação ultravioleta de fontes naturais (ocasionando queimaduras solares graves que podem futuramente se tornar tumores), além do histórico familiar, idade, histórico prévio de melanoma e sistema imune enfraquecido devido a outras doenças ou administração de fármacos.³ Essas características definem os diferentes tipos de melanoma cutâneo, como também exemplificado na Figura 1:¹

- **Melanoma expansivo superficial (MES):** Corresponde a 70% dos casos de melanoma e aparece preferencialmente nos troncos de homens e membros inferiores de mulheres, sendo então associado à exposição solar. Origina-se a partir de um nevo pré-existente e inicia uma fase de crescimento horizontal ou radial que evolui lentamente para invasão da derme;⁴⁻⁵
- **Melanoma nodular (MN):** Segundo tipo mais comum, correspondendo entre 10 a 25% dos casos de melanoma. Aparece mais frequentemente em homens do que em mulheres (proporção 2:1). Apresenta-se como uma lesão nodular de cor castanha ou negra, com presença de ulcerações e sangramentos. Possui uma fase de crescimento

horizontal curto ou ausente, porém, um crescimento vertical agressivo com metástases precoces;⁴⁻⁵

- **Melanoma lentigo maligno:** Pouco frequente (5% dos casos) e mais comum em idosos. Apresenta mancha enegrecida de bordas nítidas e irregulares, preferencialmente na face (em torno de 90%), mãos e membros inferiores (10%);⁴⁻⁵
- **Melanoma lentiginoso acral (MLA):** É o tipo de melanoma mais agressivo e representa menos de 5% dos casos de melanoma, se localizando nas extremidades digitais, nas regiões palmoplantares, mucosas e semimucosas. Aparece igualmente tanto em homens quanto em mulheres. Na sua fase intraepidérmica inicial, possui pigmentação irregular, posteriormente refletindo um padrão de crescimento invasivo com região nodular.⁴⁻⁵

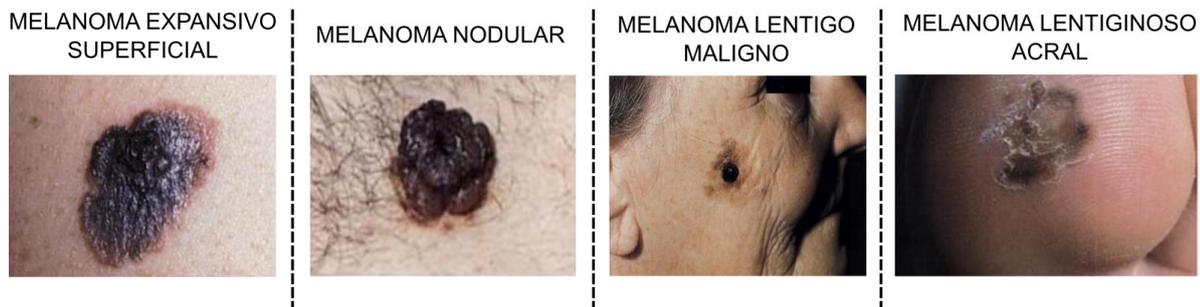


Figura 1 – Representação morfológica dos diferentes tipos de melanoma cutâneo.

Fonte: Adaptada de MACKIE.⁶

Para se identificar e diagnosticar um caso de melanoma, inicialmente se faz um exame das marcas de nascença e nevos com bordas irregulares que estejam acompanhados de alterações na coloração, tamanho, forma e superfície ou que tenham ulcerações. Se o médico suspeitar de uma mancha de pele, o diagnóstico se baseia na biópsia, ou seja, remoção total ou parcial (caso a amostra seja muito grande) do tecido anormal, para posterior checagem da presença de células cancerígenas com auxílio de microscópio.⁷ Uma vez que o melanoma seja comprovado, se faz necessário saber a extensão ou o estágio da doença para que seja possível o tratamento do mesmo. Assim, ocorre o processo de estadiamento, que corresponde a uma avaliação da espessura do tumor, sua extensão nas camadas da pele e se prossegue invasão em gânglios linfáticos vizinhos ou outras partes do organismo.⁸

O termo melanoma foi empregado inicialmente por Robert Carswell para descrever lesões malignas da pele. No entanto, foi em 1969, que Clark e colaboradores desenvolveram o sistema de estadiamento para classificar os níveis de invasão do tumor nas camadas da pele.⁹

Em seguida (1970), Breslow aprimorou a classificação, avaliando a espessura do melanoma através da profundidade do tumor em milímetros,¹⁰ culminando por fim, em 1992 com Morton¹¹ introduzindo o conceito de rastreamento linfático pré-operatório e linfadenectomia seletiva dos linfonodos marcados, permitindo a excisão dos linfonodos relacionados às cadeias de drenagem da área acometida pelo tumor, uma vez que estágios avançados do melanoma desenvolvem metástase para os linfonodos.* De acordo com o estadiamento, os tumores de melanoma são classificados em diferentes estágios, conforme demonstrado na Figura 2.¹²

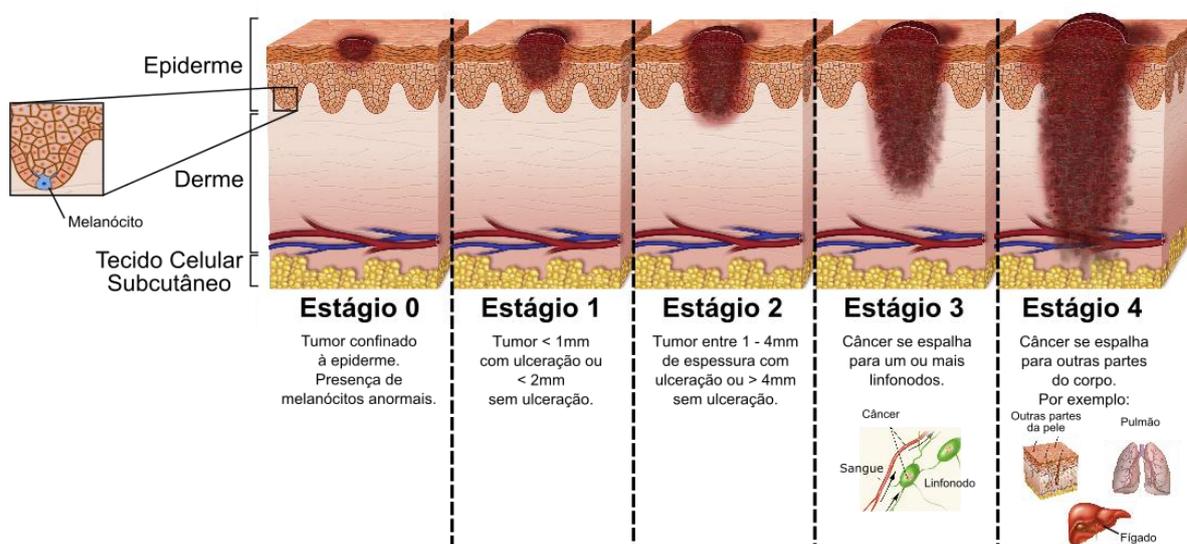


Figura 2 – Esquema dos estágios do melanoma cutâneo. Inicialmente há grande proliferação celular dos melanócitos devido a alterações genéticas frequentemente oriundas de exposição intermitente à radiação ultravioleta. Esse crescimento celular anormal é acentuado na epiderme (*in situ*), sofrendo aumento de tamanho radial e, por fim, vertical até atingir camadas inferiores da pele. Assim, o câncer encontra a corrente sanguínea, o sistema linfático e tecidos vizinhos e se espalha por outras partes do corpo.

Fonte: Adaptada de HEALTHY...¹³

Quando o diagnóstico é precoce, o melanoma possui uma chance efetiva de cura de 80%, porém, uma vez que se ocorra metástase, o melanoma é reconhecidamente uma doença resistente às terapias existentes. A média de pacientes que sobrevivem dez anos após o diagnóstico da doença é de 24% no estágio quatro do melanoma, em detrimento aos estágios iniciais nos quais a média é de 95%.¹⁴⁻¹⁵

* O procedimento de linfadenectomia seletiva se baseia na injeção de substância radioativa ou de um corante azul (corante azul patente) perto do tumor. A substância ou o pigmento flui através dos ductos linfáticos até os linfonodos sentinelas, que são os primeiros linfonodos e mais prováveis de contê-los. O cirurgião remove somente os linfonodos com o marcador e, posteriormente outros que tiverem células cancerígenas.

De modo geral, os tratamentos convencionais acompanham o agravamento do tumor, sendo a excisão cirúrgica a principal, seguido da quimioterapia e radioterapia, que promovem grandes efeitos colaterais. A remoção cirúrgica do tumor é realizada em todas as fases do melanoma, com uma excisão local e de algum tecido normal em torno da neoplasia. Um enxerto de pele substitui a que foi removida durante o procedimento. Embora frequentemente utilizada, a cirurgia é raramente curativa porque o melanoma metastático ocorre com facilidade em muitos casos, o que a torna não indicada, dada a recorrência da doença. Já a quimioterapia é um tratamento que usa fármacos para parar o crescimento das células cancerígenas, seja danificando-as ou impedindo sua divisão. Seus efeitos colaterais no trato gastrointestinal e na medula óssea são fortemente relatados, o que corrobora na eficácia limitada de seu uso. Além disso, quando o paciente já possui tumor em metástase, a neoplasia é praticamente incurável e o tratamento ocorre para aliviar sintomas e melhorar a qualidade de vida do paciente.

Considerando os fatos anteriormente elucidados, estudos em terapias alternativas para melanoma são fortemente indicados e favoráveis, dada a gravidade da doença além da baixa eficácia dos tratamentos convencionais.

1.2 TERAPIA FOTODINÂMICA

Há muitos anos a luz vem sendo utilizada como terapia. Na Grécia antiga os benefícios da luz solar foram documentados, quando Herodotus no século VI a.C. relatou indícios de crescimento ósseo com ação da radiação solar e Hipócrates definiu a helioterapia para tratamento de diversas patologias. Já a terapia fotodinâmica (TFD) teve início com os egípcios, por meio da ingestão de plantas e exposição à luz do sol para tratar doenças como o vitiligo.¹⁶ Entretanto, o emprego da técnica com sistemática científica começou mais recentemente. Em 1900, um estudante médico alemão, Oscar Raab, descreveu a morte do organismo *Paramecia* sob a ação do corante laranja de acridina e luz solar, enquanto em 1966, estudos de Richard Lipson e colaboradores observaram a fluorescência de lesões neoplásicas mediante injeções de solução pura de hematoporfirina na parede torácica de paciente com câncer de mama, durante uma cirurgia.¹⁷

No Brasil, a aplicação clínica da TFD é resultado de uma colaboração entre o Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo (USP), a Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (USP) e o Hospital do Câncer Amaral Carvalho na cidade de Jaú, São Paulo. Este trabalho teve início em 1997 com o primeiro paciente tratado em 1999. Até final de 2003 esta colaboração rendeu o tratamento de mais de 300 pacientes, sendo a maioria com câncer

de pele não melanoma (na cabeça e pescoço), mas também em lesões no esôfago, bexiga, câncer de mama, entre outras doenças.¹⁸

A TFD consiste na interação de três componentes: fotossensibilizador (FS), uma molécula fotossensível que se concentra preferencialmente nas células (neoplásicas) que se reproduzem rapidamente ou tecido alvo, luz de comprimento de onda específico para ativação dessa molécula e oxigênio molecular presente no tecido a ser tratado.¹⁹ O fundamento do seu mecanismo de ação se baseia em etapas de transferência e absorção de energia. Inicialmente, a molécula fotossensibilizadora absorve energia (fótons) proveniente da fonte de luz e pode sofrer uma transição eletrônica do seu estado fundamental singleto (S_0), com elétrons de spins pareados em orbitais de menor energia, para um estado mais energético (S_n) também singleto, pois o spin do elétron no orbital excitado mantém sua orientação original. Considerando que essa última configuração é instável, há a possibilidade de decaimento até o menor nível vibracional (S_1) e por fim, para o estado fundamental por liberação de energia não radiativa ou fluorescência, isto é, emissão de um fóton cujo comprimento de onda seja a diferença de energia entre os dois estados S_1 e S_0 . Por outro lado, quando a absorção de fótons (da luz na região do UV-visível) promove uma inversão na orientação do elétron no orbital mais energético, ocorre um cruzamento intersistema, no qual o FS vai para um estado tripleto excitado (T_1).²⁰ Nesse estado também instável, pode ocorrer um decaimento para o estado fundamental emitindo fosforescência, ou seja, radiação eletromagnética com maior tempo de vida, ou interação com biomoléculas adjacentes como o oxigênio molecular, levando aos efeitos citotóxicos desejados da TFD. A interação do FS no estado tripleto com moléculas do ambiente se dá por duas principais formas:²¹

- **Mecanismo tipo I:** Envolve produção de formas radicais do substrato ou FS através da transferência de elétron ou abstração de um átomo de hidrogênio. Esses intermediários podem reagir com oxigênio e formar espécies reativas de oxigênio (EROs), como peróxidos, íons superóxido e radicais hidroxila, que oxidam diversas biomoléculas;
- **Mecanismo tipo II:** Principal mecanismo e mediado pelo processo de transferência de energia do FS no estado tripleto para o oxigênio molecular fundamental, favorecendo conversão de seu spin e formando uma espécie altamente reativa, o oxigênio singleto (1O_2). O oxigênio singleto é o principal desencadeador da citotoxicidade fotodinâmica, devido à alta eficiência da sua interação com diferentes biomoléculas, como por exemplo, lipídeos insaturados e proteínas, que são constituintes de membranas

celulares, promovendo alterações na permeabilidade celular e levando à morte do tecido alvo.²²

Essas duas reações ocorrem simultaneamente, e a razão entre esses processos depende do tipo de fotossensibilizador utilizado, bem como concentração de substrato e oxigênio, e afinidade do FS ao substrato.²³ Além disso, ambos mecanismos geram espécies citotóxicas que oxidam diversas biomoléculas essenciais, levando à lise ou inviabilidade celular e induzindo apoptose ou dano direto por necrose. Por isso, a TFD tem sido utilizada como tratamento alternativo para várias doenças. Todos esses processos estão ilustrados na Figura 3, pelo diagrama de Jablonski.

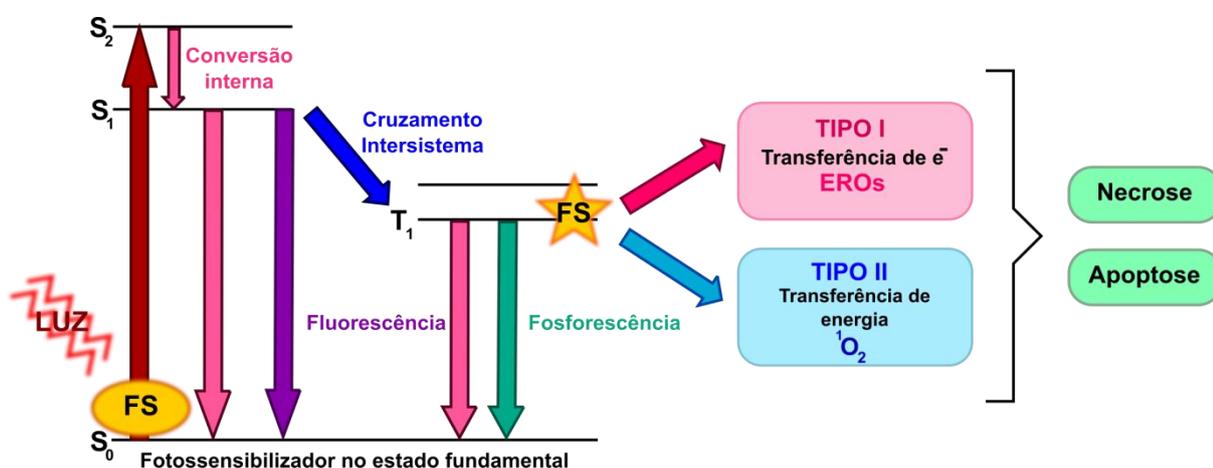


Figura 3 – Diagrama de Jablonski para ilustrar os mecanismos de excitação da molécula de FS. O FS absorve energia da luz passando para seu estado excitado singleto e, por relaxação, para o tripleto. No estado tripleto, o FS excitado pode transferir energia para o oxigênio molecular, formando o oxigênio singleto reativo, ou reagir diretamente com biomoléculas formando radicais livres que, ao interagir com oxigênio, resultam em EROs. Essas moléculas resultantes (EROs e 1O_2) desencadeiam reações responsáveis pela morte celular.

Fonte: Elaborada pela autora.

A TFD apresenta vantagens em relação a outros tratamentos. Possui certo grau de especificidade baseado no acúmulo do FS no alvo terapêutico, devido a diferenças entre o tumor e tecido sadio como fisiologia, rede de irrigação e taxa de proliferação celular, seletividade pelo baixo tempo de vida do oxigênio singleto que tem um raio de ação de poucos nanômetros (aproximadamente 20nm) do sítio alvo, apresenta ausência de toxicidade do FS, tem a habilidade de irradiar apenas o tumor e de tratar diversas lesões simultaneamente e, também gera poucos efeitos colaterais (como fotossensibilidade temporária que pode ser atenuada através da rápida eliminação do organismo), além de ser pouco invasiva.²⁴ Essas características são positivas quando comparadas com os métodos convencionais de terapia para câncer, como quimioterapia, radioterapia e remoção cirúrgica. Contudo, ela tem

limitações, relacionadas à quantificação da dose e distribuição de luz, concentração do fotossensibilizador e disponibilidade de oxigênio nos tecidos. Dessa forma, o aperfeiçoamento desses fatores é fundamental e confere o sucesso da técnica.

Os fotossensibilizadores são definidos como entidades químicas, comumente moléculas heterocíclicas, que mediante absorção de luz induzem alteração química ou física a outra entidade. Eles precisam apresentar certas propriedades específicas tais como: ser solúvel e estável a pH fisiológico dado que os FS são distribuídos através da corrente sanguínea até o tecido alvo; ser seletivo a células cancerígenas, sendo essa seletividade devido a diferenças entre tecido tumoral e normal; ter tempo de incubação (intervalo entre administração e iluminação) pequeno; ter alvo intracelular conhecido; não ser tóxico no escuro e ter alta absorvidade molar na região entre 600 a 850 nm, conhecida como janela terapêutica. Essa janela terapêutica, ilustrada na Figura 4, é uma representação gráfica do intervalo de comprimento de onda adequado para que a irradiação atinja o alvo terapêutico, ou seja, reflete a capacidade de penetração da luz em tecidos biológicos. Isso ocorre porque cromóforos presentes no tecido apresentam absorção conhecida em determinados comprimentos de onda, como a hemoglobina que possui alta absorção em intervalos inferiores a 600 nm e a água cuja absorção é acentuada acima de 1150 nm. Logo, para desconsiderar os efeitos dessas moléculas fotorreceptoras na TFD deve-se utilizar uma fonte de luz cujo comprimento de onda esteja no intervalo de baixa absorção dessas moléculas, entre 600 nm a 1200 nm. Contudo, é importante lembrar que apenas até 800 nm há produção de oxigênio singlete, visto que valores mais altos possuem energia insuficiente para iniciar uma reação fotodinâmica, o que corrobora no intervalo conhecido da janela terapêutica de 600 a 850 nm.²⁵ Desse modo, para neoplasias que se localizam ou que atinjam até camadas mais profundas da pele, como acontece com o melanoma em estágios mais avançados, é interessante se utilizar uma fonte de luz, que opere em comprimentos de onda (λ) mais elevados, próximo ao infravermelho, pois quanto maior λ , maior a penetração no tecido.²⁶⁻²⁷

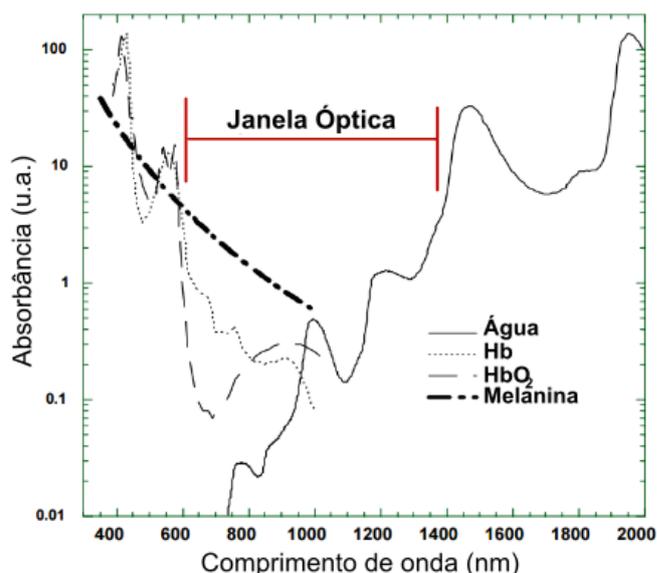


Figura 4 – Espectro de absorção da água, hemoglobina (Hb), hemoglobina oxigenada (HbO₂) e melanina, componentes do tecido biológico. A interseção dos espectros que corresponde à baixa absorção dessas moléculas receptoras é chamado de janela óptica.

Fonte: Adaptada de HAMBLIN et. al.²⁷

Pesquisas de TFD em melanoma demonstraram que há experiências limitadas tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Um exemplo de aplicação da TFD em melanoma seria da injeção intravenosa de clorina e₆ na concentração de 5 mg/kg em pacientes e irradiação a 660nm, que demonstrou resultados toleráveis de regressão tumoral em melanoma metastático.²⁸ No entanto, a maioria dos estudos apresentou recorrência de melanoma pós TFD e a administração sistêmica de FS culminou em fotossensibilização pouco seletiva, tanto do tecido tumoral quanto sadio de animais. Um possível limitante na utilização da TFD em melanoma seria a presença de melanina intracelular, que torna as células de melanoma menos suscetíveis à morte. Isso ocorre, porque o pigmento tem a habilidade de agir como um antioxidante intracelular, neutralizando espécies reativas de oxigênio e, também de competir pela absorção dos fótons, minimizando a taxa de excitação do fotossensibilizador.²⁹ Portanto, a diminuição dos níveis de melanina na pele ou aplicação de FS que absorva em comprimentos de onda próximos ao infravermelho, mostram resultados promissores para TFD. Além disso, outro fator bastante importante que limita a resposta fotodinâmica no melanoma é a alta absorção óptica na região do visível impossibilitando uma alta penetração da luz no tumor. Assim, estudos extensivos em TFD para melanoma ainda são necessários para que a TFD seja reconhecida como uma terapia efetiva para melanomas cutâneos, especialmente avançados.

1.3 MODELOS DE TECIDO *IN VITRO* – MÉTODO DE LEVITAÇÃO MAGNÉTICA

A disponibilidade de ensaios *in vitro* que mimetizem o comportamento celular dos tecidos em um organismo é um importante desafio para o desenvolvimento da indústria farmacêutica. As células cultivadas em monocamada (cultura bidimensional – 2D) são rotineiramente usadas como modelo de triagem convencional que antecede estudos em animais e testes clínicos em humanos, para avaliar a eficácia e segurança de diversas moléculas com potencial terapêutico. Contudo, a maior parte dessas moléculas (em torno de 90%) não avança para as próximas etapas do desenvolvimento clínico, devido à, principalmente, falta de eficácia ou toxicidade do composto estudado.³⁰ Em função do alto custo para aprovação das novas moléculas terapêuticas é imperativo que substâncias potencialmente ineficazes sejam eliminadas em etapas prévias, idealmente durante os testes de cultura *in vitro*.

Dessa forma, embora a cultura 2D tenha sido utilizada na biologia celular por décadas, com populações de células homogêneas dispersas em frascos ou garrafas de cultura, ela não recria o ambiente natural das células em tecidos. As limitações presentes no cultivo 2D incluem a falta de sinalização célula – célula e célula com matriz extracelular, sendo que esses sinais são essenciais para a diferenciação e proliferação celular, além de outras funções celulares.³¹⁻³² Essas interações intercelulares e célula com matriz estabelecem uma rede que mantém a homeostase e especificidade dos tecidos. Como resultado, há um crescente interesse no desenvolvimento de técnicas de cultura que se assemelham mais com o tecido natural, para prever eventos *in vivo*. Assim, o uso de culturas tridimensionais (3D) *in vitro* tem sido sugerido como uma ponte entre as culturas em monocamada e modelos animais.³³

Atualmente, diferentes tipos de cultura 3D são desenvolvidos, como, por exemplo, modelos em esferoides, arcabouços de polímeros sintéticos e substratos de géis proteicos. Os diferentes modelos de cultura 3D estão demonstrados na Figura 5.³⁴⁻³⁵ No entanto, esses métodos possuem alto custo, alguns envolvem uma prévia fabricação do material suporte para o crescimento celular, que podem usar componentes e biomoléculas não-humanas e, outros consomem um grande tempo de análise, como o método de esferoide que necessita de três a quatro dias para formação do modelo. Com isso, o método de levitação magnética (MLM) foi desenvolvido como uma metodologia relativamente econômica e simples, por manter as células em suspensão, permitindo crescimento celular espacial irrestrito e transferência de nutrientes, ser compatível com cultura bidimensional convencional, conferindo as análises usuais de células *in vitro*, formar a cultura 3D em poucas horas (aproximadamente 16 h) e ser

capaz de sintetizar matriz extracelular durante sua formação, como demonstrado através do acompanhamento na produção de proteínas como colágeno, fibronectina e laminina.³⁶⁻³⁷

O método de levitação magnética (Figura 6) consiste na produção de culturas 3D ou tecido *in vitro* mediante a incubação da linhagem celular em monocamada (2D) com nanopartículas ferromagnéticas, constituídas de nanopartículas de ouro, óxido de ferro (magnetita ferromagnética, Fe_3O_4) e poli - L - lisina. A mistura resultante (NanoShuttleTM, cujo refil contém 600 μL da solução de nanopartículas), com diâmetro aproximado de 50 nm, interage eletrostaticamente com a membrana celular e, após oito dias, é liberada e permeia a matriz extracelular. Essa solução não tóxica é biocompatível, não afeta a proliferação, viabilidade ou mesmo fenótipo das células e não se liga a receptores específicos, de modo que pode interagir com todos os tipos celulares.^{36,38-39} Após a incubação, as células com nanopartículas cultivadas em frascos de cultura são ressuspendidas e semeadas em placas de Petri ou placas multipoços. Assim, a suspensão celular é manipulada com auxílio de campo magnético externo, por intermédio de magnetos de neodímio, permitindo que as células se elevem à superfície da placa e aglutinem adjacentes à interface ar - meio de cultura, onde rapidamente desenvolvem construções multicelulares 3D, ou tecido *in vitro*. A levitação magnética se refere ao crescimento da cultura na junção ar - meio e ocorre quando as forças gravitacionais são balanceadas com a força magnética proveniente do ímã. Geralmente a força magnética requerida é em torno de 30 pN, sendo forte o suficiente para facilitar a agregação das células sem danificá-las.⁴⁰

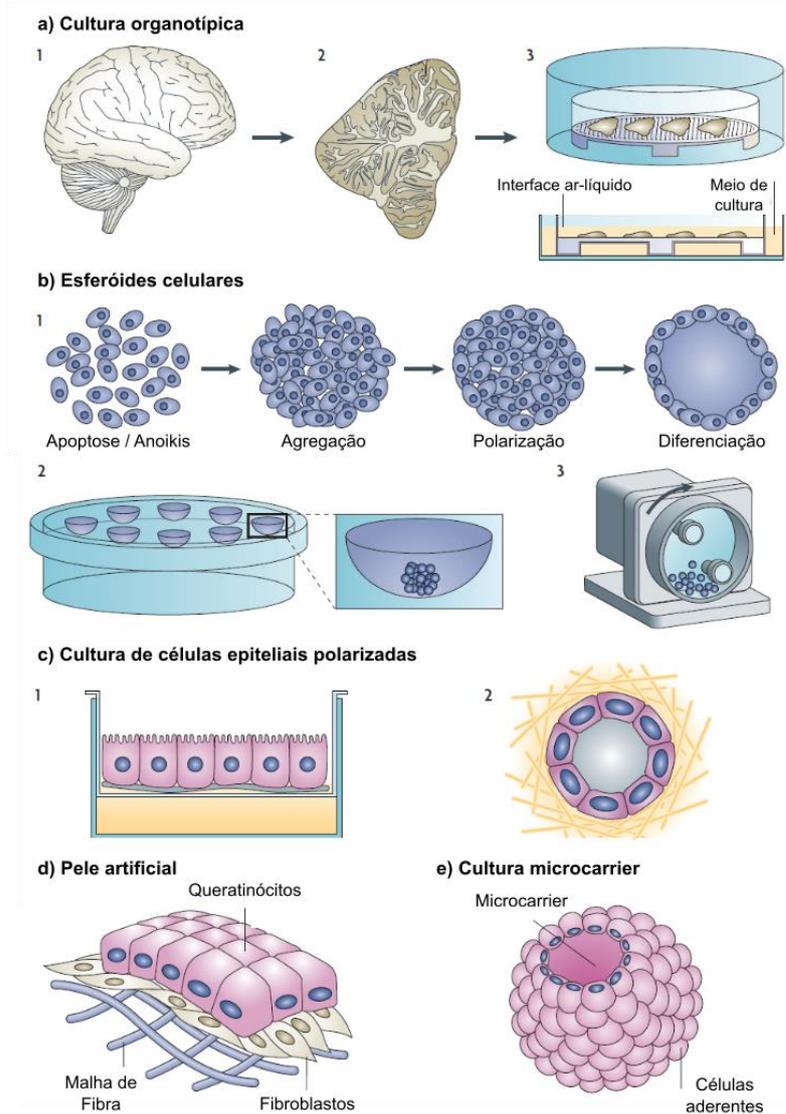


Figura 5 – Modelos de cultura 3D. a) Cultura organotípica: Pedacos de órgãos dissecados (explantes) são cultivados em membranas porosas suportadas por grade de metal. Esses explantes preservam a arquitetura do tecido original. b) Esferóides celulares: Sistemas simples que exemplificam a tendência das células agregarem. (1) Os esferóides são formados pela técnica de “*hanging – drop*”, que se baseia no uso de uma gota de líquido (como plasma ou meio de cultura) a partir do qual as células se multiplicarão, suspensa em vidro de relógio invertido. A suspensão celular é pipetada dentro da tampa do frasco de cultura e a tampa é invertida. Assim, a gota é suspensa pela gravidade e tensão superficial, permitindo que as células decantem e se agreguem formando uma estrutura densa, esferóide. (2) Os esferóides são produzidos por rotação da suspensão celular, inicialmente devagar (~15 rpm) e, conforme os agregados se formam, a rotação aumenta (~25 rpm), mantendo-os em suspensão. A agregação celular ocorre por ação da gravidade, com as células se aproximando nas paredes do rotor. c) Cultura de células epiteliais polarizadas: Células crescem em membranas porosas formando camadas polarizadas ou dentro de géis hidratados de colágeno, resultando em monocamadas esféricas. d) Pele artificial: Fibroblastos são cultivados em placas Petri e semeadas sobre malha de fibra. Após semanas de cultura, queratinócitos são colocados no novo tecido, formando uma camada de epiderme. e) Materiais microescalados (*microcarrier*): Grânulos de dextran, glicosaminoglicanos e outros polímeros porosos são usados como suporte para ancoragem de linhagens celulares.

Fonte: Adaptada de PAMPALONI et. al. ³⁴

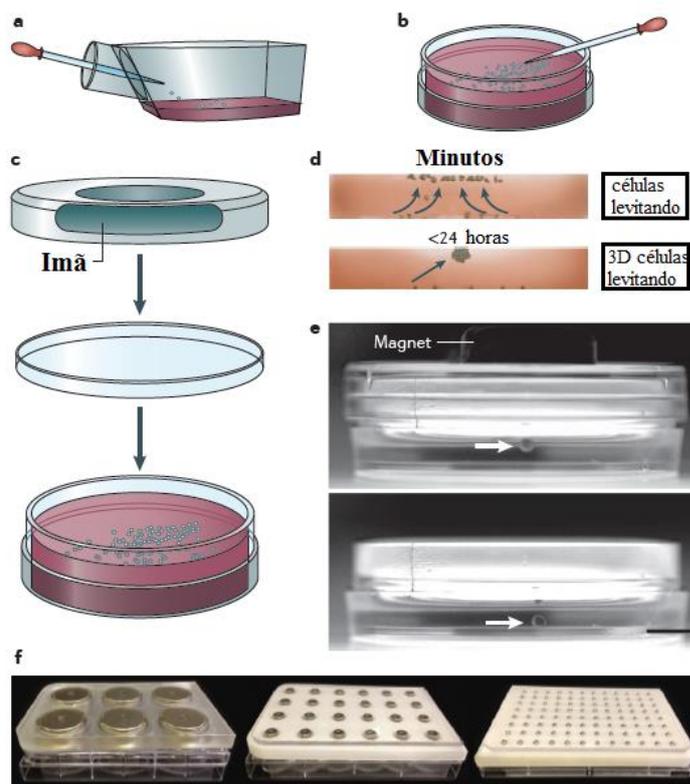


Figura 6 – Cultura celular por levitação magnética. a) Células são cultivadas em monocamada até atingir confluência e são incubadas com nanopartículas ferromagnéticas. b) Depois de um tempo de incubação (usualmente *overnight*) as células são removidas e transferidas para placas de Petri (ou placa multipoços). c) O dispositivo magnético, com o ímã, é colocado nesse esquema sobre a placa. d) Depois de alguns minutos as células levitam na interface ar-meio e depois de um tempo adequado para cada tipo celular, formam configuração tridimensional. e) Cultura de células de glioblastoma forma um agregado e levita na primeira figura e, com remoção do dispositivo magnético, decaem. f) Dispositivos magnéticos para placas multipoços de diferentes tamanhos.

Fonte: Adaptada de BECKER et. al.²³

Os agregados multicelulares exibem organização celular fiel a modelos xenográficos e suportam co-cultura de diferentes linhagens, como reportado por Souza e colaboradores com o crescimento celular de glioblastoma humano. Nesse caso, análises de similaridades moleculares e morfológicas entre culturas 3D de glioblastoma, implantes xenográficos do tumor em camundongo e cultivo em monocamada da linhagem correspondente à neoplasia foram avaliadas, por meio da fluorescência do marcador N-caderina, proteína transmembrana que media interação célula-célula. Comparações na expressão de N-caderina apresentaram a proteína espalhada no citoplasma e núcleo de cultura 2D, enquanto no modelo 3D e xenográfico houve presença na membrana, citoplasma e junções celulares, confirmando as semelhanças entre essas últimas culturas, como exemplificado na Figura 7.³⁶ Portanto, a utilização do MLM para obtenção de tumores mais fidedignos aos encontrados no organismo,

como a formação de tumores *in vitro* de melanoma, cuja estrutura é o alvo biológico para a aplicação da TFD nesse trabalho, é promissora e incentiva a avaliação de diversos tratamentos em etapas prévias de análises clínicas, sem o uso de animais, porém, com a segurança de prever comportamentos esperados *in vivo*.

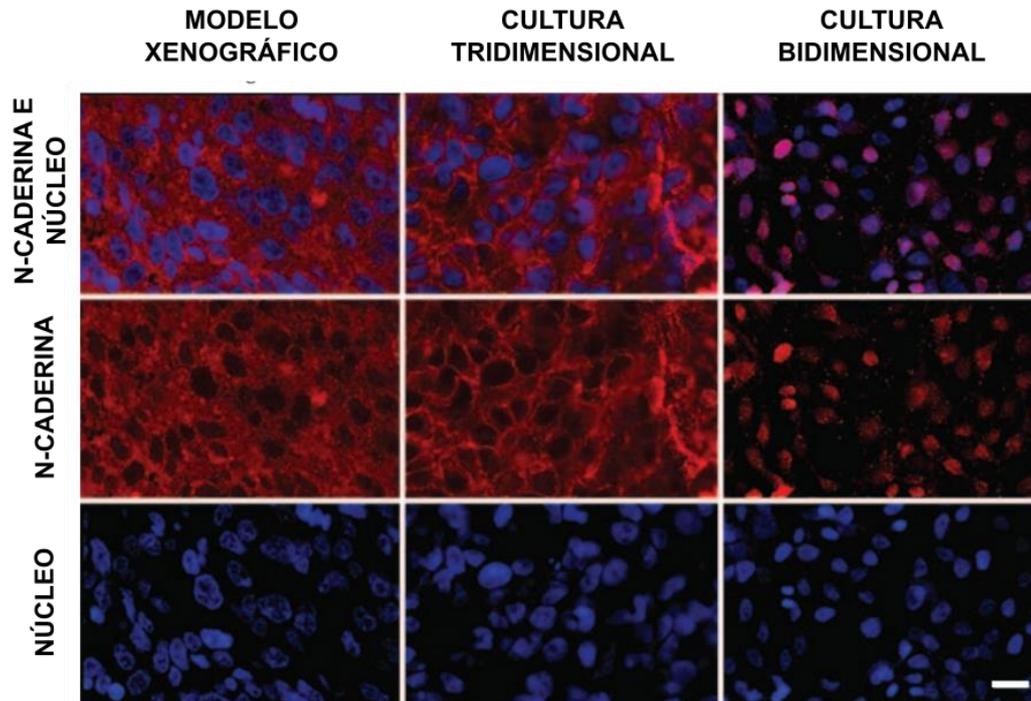


Figura 7 – Detecção por imunofluorescência de N-caderina (vermelho) e núcleo celular (azul) em implantes de tumor em camundongo, cultura 3D com 48h de levitação e cultura em monocamada de glioblastoma humano. Comparações demonstram similaridades morfológicas entre o tumor em modelo xenográfico e 3D *in vitro* por levitação magnética. Escala: 1mm.

Fonte: Adaptada de SOUZA et. al.³⁶

2 OBJETIVOS

O objetivo do presente estudo foi de avaliar, com experimentos *in vitro*, a eficácia da terapia fotodinâmica em tumores de melanoma humano, obtidos pelo método de levitação magnética.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Padronizar modelo de cultura tridimensional em células de melanoma humano G361 por MLM para estudos em TFD;
- Avaliar a cinética de incorporação e distribuição de dois diferentes fotossensibilizadores (Photogem[®] e Photodithazine[®]) no tumor de melanoma *in vitro* previamente formado;
- Determinar parâmetros experimentais como concentração de FS e dose de luz para futuro protocolo de TFD em melanoma;
- Avaliar a resposta fotodinâmica em função da espessura em tumores sólidos.

3 PADRONIZAÇÃO DE TUMOR DE MELANOMA PELO MÉTODO DE LEVITAÇÃO MAGNÉTICA

3.1 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1.1 Linhagem celular

A linhagem de células aderentes de melanoma humano G361, como representada na Figura 8, foi obtida através da *American Type Culture Collection* (ATCC[®], EUA) e utilizada para construção do modelo de tumor de melanoma. Ela é oriunda da pele de homem caucasiano e expressa melanina sendo, portanto, uma lesão pigmentada. A linhagem na concentração de 10^7 células/mL se encontrava estocada a -80°C e congelada em criotubos contendo 1mL de solução com soro fetal bovino (SFB) e 10% de dimetilsulfóxido (DMSO) como agente de criopreservação.

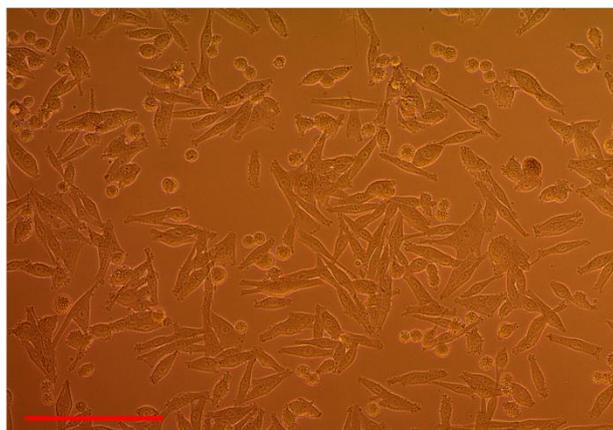


Figura 8 – Imagem de microscopia óptica da linhagem de melanoma humano G361, em aumento de 10X e 200 μm de escala.

Fonte: Elaborada pela autora.

3.1.1 Cultura celular

As células de melanoma foram mantidas em frascos de poliestireno contendo meio de cultura *McCoy's 5A Medium Modified* (McCoy), suplementado com 15% de SFB, 1% de L-glutamina (200mM) e 0,1% dos antibióticos Penicilina (10000 UI/mL) e Estreptomicina (10mg/mL). Todos os experimentos envolvendo culturas celulares foram realizados

asépticamente em fluxo laminar e os frascos com células, mantidos em estufa incubadora umidificada a 37°C e 5% de CO₂.

O subcultivo celular foi realizado a cada três dias, período no qual a confluência celular foi atingida (ou aproximadamente 80% da área coberta por células nos frascos de cultura), retirando o meio de cultura das garrafas de células e adicionando 3 mL de solução diluída de tripsina EDTA 0,05% em tampão fosfato salino (do inglês *phosphate buffered saline*, PBS), na proporção 1:1. Após cinco minutos, tempo necessário para quebra das ligações intercelulares, igual volume de meio McCoy foi acrescentado e o conteúdo celular final, transferido para tubos cônicos, para posterior centrifugação a 1400 rpm durante cinco minutos. Assim, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* (células decantadas) ressuspenso em volume conhecido de meio de cultura para contagem do número de células em hemocímetro, através do teste de exclusão do corante *trypan blue* (SIGMA – Aldrich Brasil, Ltda, São Paulo, SP).

O *trypan blue* é um corante que se incorpora nas células mortas cuja membrana celular foi danificada, logo, tingindo de azul as células mortas e mantendo as vivas incolores. Dessa forma, além de permitir a contagem do número de células, essa técnica permite avaliar a viabilidade celular. Para a contagem, uma alíquota da suspensão de celular (50µL), foi colocada em um microtubo contendo 450µL de meio McCoy, gerando uma diluição de 1:10. Após homogeneização, 50µL dessa nova suspensão foi acrescentada a 50µL do corante *trypan*, totalizando nova diluição de 1:1. Desse modo, o fator de diluição final foi de 20. Por fim, 10µL da solução final foi colocado na Câmara de Neubauer (hemocitometro), no qual as células viáveis (incolores) são contadas em cada um dos quadrantes externos, como indicado na Figura 9.

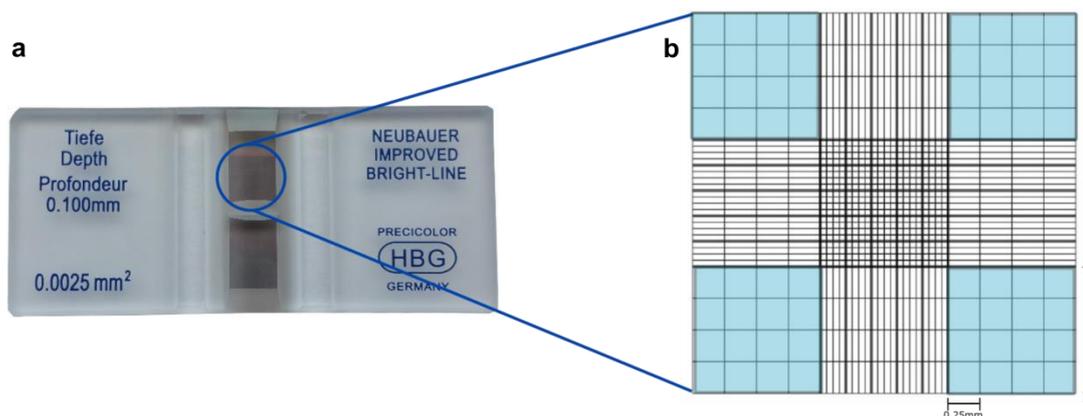


Figura 9 – Teste de exclusão do corante trypan blue. a) Representação da Câmara de Neubauer na qual alíquota da suspensão de células coradas é colocada. b) No centro da câmara há linhas perpendiculares com marcações em três diferentes tipos de quadrantes. A escolha da contagem das células em cada tipo ocorre de acordo com o tamanho das células utilizadas. Considerando que as células de mamíferos como as de melanoma são grandes, os quadrantes usados são os marcados em azul. Assim, as células são contadas nos quatro quadrantes em azul e o valor final é média dessas medidas.

Fonte: Elaborada pela autora.

Após a contagem, o número de células da suspensão celular original por mililitro foi calculado de acordo com a equação abaixo, onde 10^4 representa o fator de correção da Câmara de Neubauer:

$$\frac{\text{Número de células}}{\text{mL}} = \frac{\text{Número de células viáveis contadas}}{\text{Número de quadrantes}} \times 10^4 \times \text{Fator de diluição} \quad (1)$$

3.1.2 Método de levitação magnética – Obtenção dos tumores de melanoma

O método de levitação magnética (MLM) consiste na utilização de nanopartículas ferromagnéticas (NanoShuttleTM, Nano3D Biosciences, Inc. – cujos constituintes são nanopartículas de ouro, óxido de ferro e poli-L-lisina) que interagem eletrostaticamente com a membrana das células a serem estudadas, nesse trabalho de melanoma humano. Em seguida, um ímã de neodímio é colocado sobre a placa de multipoços que contém a suspensão de células, permitindo a entrega de um campo magnético externo capaz de proporcionar a agregação celular, produção de matriz extracelular e a formação de uma cultura celular tridimensional, ou com o uso da linhagem de melanoma, um modelo de tumor *in vitro*.⁴⁰

Os experimentos em MLM se iniciaram com o cultivo em monocamada das células de melanoma até confluência aproximada de 80%, correspondendo a 4×10^6 células/mL. Posteriormente, as garrafas de cultura foram tratadas com a solução de nanopartículas

ferromagnéticas (abreviada do inglês NanoShuttle™ como NS) na proporção de 1 µL para cada 10⁴ células, totalizando 400 µL em garrafas de 25 cm² de área total (concentração de 50 pg/célula), sendo que o tempo de incubação foi de 16 horas (*overnight*). As células magnetizadas apresentaram coloração escura (pontos escuros ao longo da cultura) como apresentado na Figura 9, devido à adesão das nanopartículas na membrana celular.

Após o período de incubação, as culturas foram lavadas com 5 mL de tampão PBS e, em seguida, iniciou-se o procedimento de subcultivo celular como apresentado na seção de cultura celular, com adição de 3 mL de tripsina-EDTA 0,05% diluída, centrifugação a 1400 rpm por 5 minutos e ressuspensão do *pellet* com meio de cultura McCoy, para posterior contagem do número de células em Câmara de Neubauer e transferência de quantidade de células de valor conhecido para placas multipoços. Por fim, ímãs de neodímio foram colocados em cada poço para induzir a formação dos tumores de melanoma *in vitro*. A Figura 10 apresenta uma representação esquemática do método de levitação magnética utilizado para os experimentos desse trabalho. É importante lembrar que os ímãs possuem um furo que permite a passagem da luz pelo microscópio óptico, tornando possível o acompanhamento das estruturas tridimensionais formadas ao longo do tempo de levitação.

No entanto, os volumes de meio de cultura a serem utilizados durante o procedimento de levitação, a concentração de células em suspensão e a intensidade do campo magnético, variam conforme a quantidade de poços, ou seja, o tamanho da placa multipoços. Dessa forma, a Tabela 1 apresenta esses parâmetros padronizados para os experimentos desse trabalho de acordo com as placas de 6, 24 e 96 poços.⁴¹⁻⁴² Apesar dessa variação de parâmetros, a formação do tumor de melanoma é a mesma e só se difere no tamanho conforme a placa e o ímã utilizados.

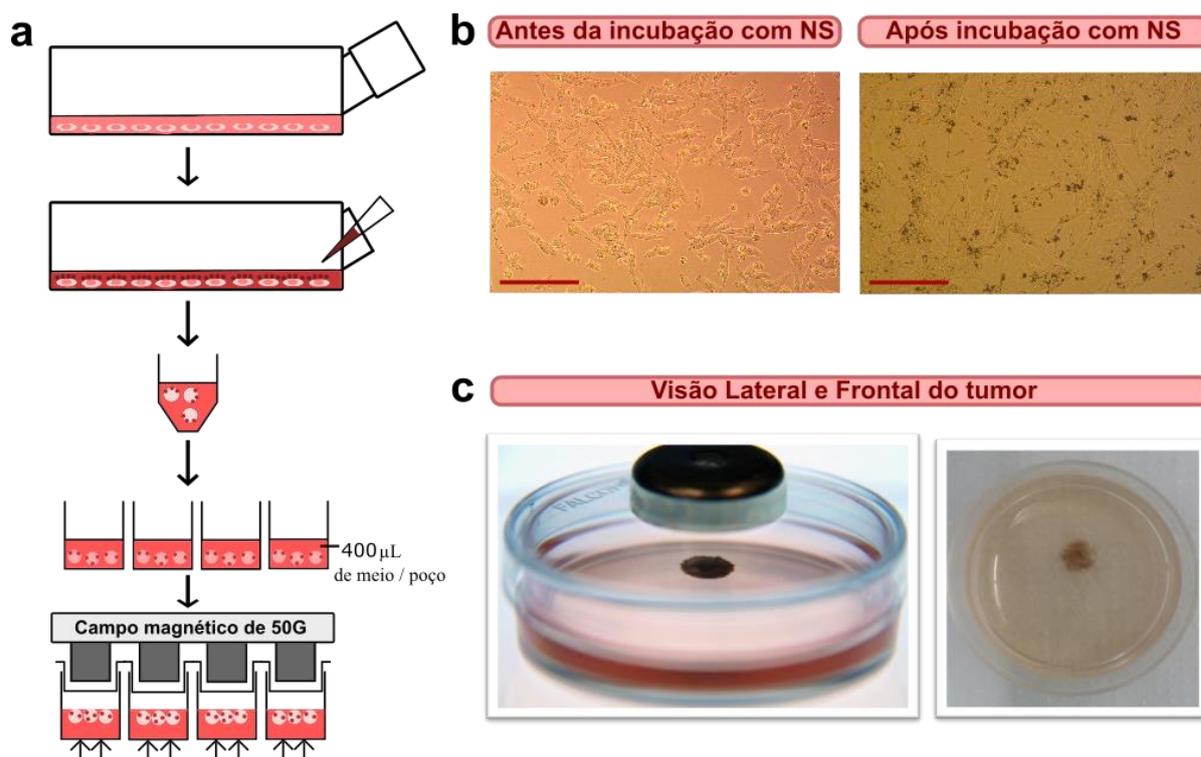


Figura 10 – Representação esquemática do Método de levitação magnética. a) Nanopartículas ferromagnéticas (NS) são adicionadas em garrafas de 25cm² com células de melanoma em 80% de confluência e incubadas *overnight* (16 horas). No dia seguinte, as células são desprendidas com tripsina e ressuspensas em meio de cultura McCoy, resultando em 400 µL por poço, para o caso de placas de 24 poços. As células então levitam na interface ar – meio ao se colocar imã de neodímio sobre a placa multipoços. b) Células de melanoma (G361) antes e após incubação com NS. Há permanência da morfologia celular aderente mesmo com adição de nanopartículas. Escala 200µm. c) Esquema de uma placa de Petri com imã e visão de um tumor de melanoma.

Fonte: Elaborada pela autora.

Tabela 1 – Medidas da padronização do método de levitação magnética em diferentes placas multipoços.

Placa multipoços	Volume de meio de cultura (µL) / poço	Número de células transferidas / poço	Intensidade do campo magnético / poço (G)
6	2000	1×10^6	500
24	400	1×10^5	50
96	200	1×10^5	120*

Fonte: Elaborada pela autora.

* O valor de campo magnético para a placa de 96 poços é maior do que para a de 24 poços, devido às suas menores dimensões (largura e profundidade dos poços) e o fato dos imãs estarem abaixo da placa, considerações que conferem uma maior proximidade da cultura tridimensional formada com os magnetos (aproximadamente 4 mm de distância). Quanto mais distante do imã, menor é o campo magnético.

3.1.3 Método de levitação magnética em placa de 6 poços

O procedimento de levitação magnética, nesse caso, consiste na magnetização prévia das células, como descrito na seção anterior, seguida da aglutinação celular por ação de um arranjo com seis ímãs de neodímio sobre um suporte de acrílico, como mostrado na Figura 11. Nessa construção, as células contendo as nanopartículas ferromagnéticas, estão em placas de 6 poços e a montagem de ímãs posicionados sobre a placa. Cada ímã possui diâmetro de 32 mm e se distancia da interface ar-meio, no qual a cultura 3D se localiza, em aproximadamente 16,35 mm, entregando um campo magnético de 500 G.

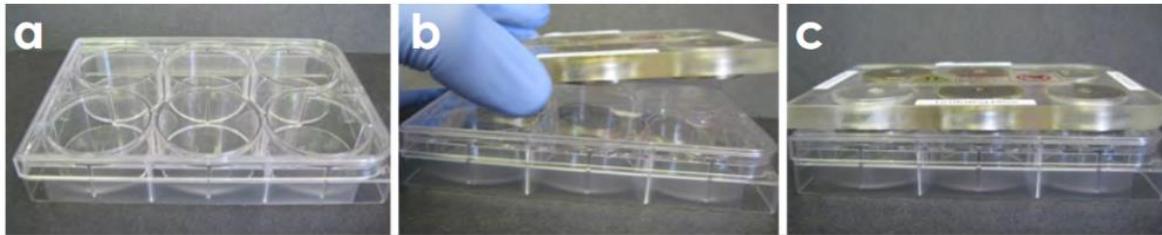


Figura 11 – Montagem do sistema de levitação magnética em placas de 6 poços. a) A suspensão de células magnetizadas é colocada em placas multipoços. b) O processo de levitação ocorre com posicionamento do arranjo de ímãs sobre a placa. c) As células podem se agregar e formar a cultura 3D.

Fonte: n3D Biosciences...⁴³

De modo geral, quanto maior o tamanho do ímã, mais dispersas e porosas são as estruturas multicelulares desenvolvidas. Por conseguinte, a escolha do sistema de levitação deve considerar o objetivo dos experimentos a serem realizados. Essa configuração em placas de 6 poços requer 2 mL de meio de cultura e grandes concentrações celulares (da ordem dos milhões) para rápida formação de conjuntos tridimensionais grandes, de dimensão milimétrica. A rapidez na construção da cultura 3D é atribuída ao alto campo magnético que facilita a agregação celular e resulta no emprego apropriado desse arranjo para casos cuja finalidade seja a rápida obtenção de um único e grande aglomerado 3D, como a padronização de modelos de tecidos *in vitro*. Dessa forma, o método de levitação magnética em placas de 6 poços foi o utilizado para se estabelecer o modelo piloto de obtenção dos tumores de melanoma humano. A sua formação não está descrita na literatura, pois apenas outras linhagens celulares, como de fibroblastos, glioblastoma, câncer de mama e fígado, além de melanoma murino foram relatados.^{36,40,42}

Inicialmente, células de melanoma humano na concentração de 1×10^6 (linhagem G361 com expressão de melanina) foram repassadas à placa multipoços constituída de poliestireno (do inglês *Techno Plastic Products*, TPP[®]), totalizando 2mL de células mais meio de cultura McCoy por poço. Essa placa foi posteriormente substituída por placas de baixa adesão celular (*Ultra-Low Attachment Multiwell Plates*, Corning[®]), como será explicado posteriormente. Após a sobreposição do conjunto de imãs, a placa foi levada à incubadora umidificada (5% CO₂ e 37°C) para permitir o crescimento da cultura 3D. A troca de meio de cultura (2mL por poço), para reposição dos nutrientes necessários à proliferação celular, ocorreu em dias intercalados e, para que as culturas não fossem perdidas durante a pipetagem, o arranjo de magnetos foi colocado na base da placa de cultivo, facilitando a agregação celular no fundo dos poços e permitindo retirada e reposição de soluções. Esse procedimento de realocação dos imãs abaixo da placa foi realizado para todas as montagens em 6, 24 e 96 poços toda vez que houvesse troca de reagentes. Por fim, foi possível o acompanhamento do tumor formado por imagens de microscopia óptica.

3.1.4 Método de levitação magnética em placa de 24 poços e viabilidade dos tumores pelo ensaio de MTT

Com o intuito de se acompanhar a formação e viabilidade de grandes tumores de melanoma ao longo de vários dias, se utilizou o MLM em placas de 24 poços de baixa adesão celular, uma vez que essa configuração permitiu um preparo de maior número de amostras tumorais. O processo de levitação é semelhante ao método em placas de 6 poços, exceto pelo tamanho e intensidade dos imãs de neodímio. Os magnetos são distribuídos espacialmente sobre suporte de acrílico e, cada um, com diâmetro de 6,4 mm, conferindo campo magnético de 50 G.⁴⁴ Assim, considerando as menores dimensões dos 24 imãs, esse método é recomendado para situações em que se queira analisar culturas 3D mais coesas e densas. Por isso, esse procedimento foi o escolhido para obtenção de tumores de melanoma humano mais espessos, futuramente utilizados para aplicação de TFD.

O protocolo testado e estabelecido para esse caso foi do repasse da suspensão celular com nanopartículas (na concentração de 1×10^5 células por poço) em 24 poços de baixa aderência celular, ou seja, que dificultam a adesão das células ao plástico maximizando o número de células em levitação, resultando em volume de meio McCoy mais células de 400 µL. Logo, uma tampa de isolamento foi colocada entre as amostras e os imãs e, acima desse arranjo resultante, a tampa da placa. O conjunto (Figura 12) foi levado à incubadora e

acompanhado até nove dias de levitação por microscopia óptica, com reposição de meio de cultura McCoy (400 μ L por poço) em dias intercalados.



Figura 12 – Montagem do sistema de levitação magnética em placas de 24 poços. a) As células contendo nanopartículas ferromagnéticas são transferidas na placa multipoços. b) Tampa de isolamento é encaixada sobre a placa e, em seguida, os 24 ímãs de neodímio. c) Com a ação do campo magnético, a cultura 3D é construída.

Fonte: n3D Biosciences...⁴³

Para determinar a viabilidade* dos tumores de melanoma ao longo do tempo, a cada dia de levitação, o sobrenadante de cada poço foi retirado, a amostra lavada com 400 μ L de tampão PBS e, após o PBS ser removido, a cultura 3D dissociada por pipetagem com 100 μ L de brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difenil tetrazólio (MTT 0,5 mg/mL, Sigma-Aldrich, EUA). Adiante, a placa de cultivo foi envolta por papel alumínio e levada à estufa por 4 horas. Depois da formação dos cristais formazan, adicionaram-se 100 μ L por poço de solução 0,04 M de HCl em isopropanol e, os 200 μ L finais dos cristais solubilizados, foram repassados para placa de 96 poços. A medida de viabilidade é resultado da leitura da absorbância do formazan em 570nm pelo leitor de placa Multiskan[®] GO (*Thermo Scientific*). O procedimento experimental resumido pode ser observado na Figura 13.

* O MTT é um ensaio colorimétrico utilizado para se medir a taxa metabólica das células. Ele consiste na conversão do MTT, de coloração amarela, a cristais roxos de formazan através de enzimas mitocondriais presentes em células metabolicamente ativas (viáveis). A quantidade de cristais e, por consequência, a intensidade da absorbância lida no espectrofotômetro, é diretamente proporcional ao número de células vivas.⁴⁵

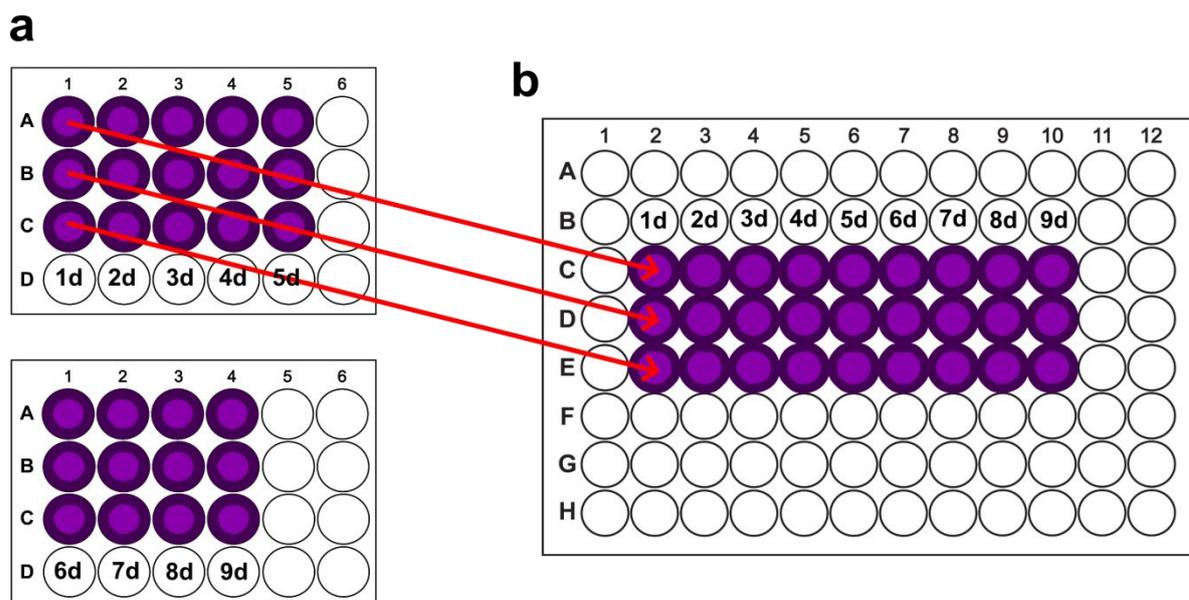


Figura 13 – Protocolo experimental da viabilidade dos tumores de melanoma. a) Os tumores de melanoma são obtidos em placas de 24 poços e mantidos na estufa ao longo do tempo. Para cada dia de levitação (1 d correspondendo a um dia) há três amostras de tumor (triplicata). Cada amostra é incubada com MTT e os cristais roxos de formazan solubilizados com isopropanol ácido. b) Os 200 μL resultantes de cada poço são repassados para placa de 96 poços para leitura em espectrofotômetro a 570 nm.

Fonte: Elaborada pela autora.

3.1.5 Método de impressão celular em placa de 96 poços



Figura 14 – Montagem e componentes da impressão magnética. a) Arranjo de 96 ímãs de neodímio em suporte de acrílico. b) Placa de baixa adesão celular, contendo as células com nanopartículas, é colocada sobre o arranjo de ímãs. A distância entre a interface ar-meio e os ímãs é de 4mm, resultando na entrega de campo magnético para as culturas 3D de 120G. c) Os esferoides são formados a partir de 15 minutos de levitação.

Fonte: n3D Biosciences...⁴³

O método de impressão celular magnética é um ensaio robusto que usa culturas 3D para triagem da toxicidade de diferentes compostos. O princípio dessa técnica é atrair os aglomerados celulares (contendo nanopartículas) das estruturas tridimensionais previamente formadas e que, portanto, já possuem matriz extracelular sintetizada que atribuem as características de tecido, para o fundo dos poços de cultivo pela ação de arranjo com 96 ímãs

de neodímio na base da placa, formando esferoides como na Figura 14. As vantagens desse método remetem à grande quantidade de amostras obtidas, corroborando na reprodutibilidade de testes com várias substâncias em diferentes concentrações (triplicata), facilidade na troca de soluções sem perda de culturas e menor tempo de experimentação.

Os esferoides foram formados, inicialmente, com a prévia levitação em placas de 6 poços, gerando tumores de melanoma com, aproximadamente, 1×10^6 células por poço. Após 24 horas de levitação, tempo necessário para promover interação célula a célula que induz a síntese de matriz extracelular (como reportado por Souza e colaboradores³⁷), as culturas foram dissociadas mecanicamente com auxílio de pipeta. Em seguida, a solução resultante foi centrifugada a 1400 rpm por cinco minutos e, o pellet contendo células e matriz, ressuspensão em meio McCoy. O resultado foram agrupamentos celulares de vários tamanhos para montagem da impressão celular. Logo, alíquotas de 200 μ L, correspondendo a 1×10^5 células, foram acrescentadas em cada poço na placa de 96 poços (*Ultra-Low Attachment Multiwell Plates*, Corning®). Assim, posicionaram-se os magnetos e, a placa, levada à incubadora (37°C e 5% CO_2). Os esferoides foram construídos em 1h de levitação. Essa metodologia é resumida na Figura 15.



Figura 15 – Método de impressão celular magnética. Após 24h de levitação, o tumor de melanoma é “quebrado” por dissociação mecânica e centrifugado. Após ressuspensão as células e matriz extracelular são igualmente distribuídas em placas de 96 poços (1×10^5 células por poço). Por fim, o arranjo de ímãs é colocado abaixo da placa e os esferoides são formados com 1 hora de levitação. Escala: $200\mu\text{m}$.

3.1.6 Caracterização e medição da espessura dos tumores de melanoma – Microscopia Confocal

Considerando que o microscópio óptico invertido convencional permite aquisição de imagens em apenas um plano da amostra, a microscopia confocal foi utilizada para reconstruir imagens tridimensionais, de até 150 μm de profundidade, com maior resolução.

Os microscópios confocais usam laser como fonte de luz. O feixe do laser incide por um orifício no espelho dicróico e passa para uma objetiva, focalizando um ponto de luz sobre um único ponto da amostra de profundidade conhecida (ponto focal). Assim, a luz refletida ou a fluorescência emitida pela amostra atravessa o espelho dicróico e é coletada por um detector. Uma abertura é colocada na frente do detector, para garantir que apenas a luz proveniente da amostra seja captada e não do feixe do laser (Figura 16). Por conseguinte, o microscópio digitaliza a amostra sequencialmente, ponto a ponto, através da sua varredura horizontal (eixos X e Y) e vertical (eixo Z) pelo feixe do laser e, esse sinal é levado a um computador para o processamento da imagem formada.⁴⁶

Para o preparo das amostras, os tumores foram obtidos em duas diferentes construções: em placa de 24 poços após 48 horas de levitação e, em placa de 96 poços com 1 hora de impressão magnética (obtenção de esferoides). Em ambos os casos, os tumores foram lavados com tampão PBS e incubados (*overnight*) com fotossensibilizador Photogem[®] na concentração 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$. A incubação foi realizada para os testes da cinética de difusão dos fotossensibilizadores em tumores de melanoma, como será detalhado posteriormente. No entanto, os tumores foram aproveitados para avaliar a sua espessura em função do tipo de arranjo de ímãs utilizado. Assim, após incubação, as amostras foram novamente lavadas com PBS e colocadas em placas com fundo de lamínula (Corning[®]) com meio McCoy sem fenol. As imagens foram realizadas em microscópio confocal invertido (ZEISS – LSM780), com excitação em 405 nm e aquisição de dados em dois canais, um entre 400 a 600 nm, correspondendo à fluorescência do marcador de núcleo celular (laranja de acridina, emissão em verde) e outro entre 600 a 700 nm (região em vermelho), referente à fluorescência do Photogem[®].

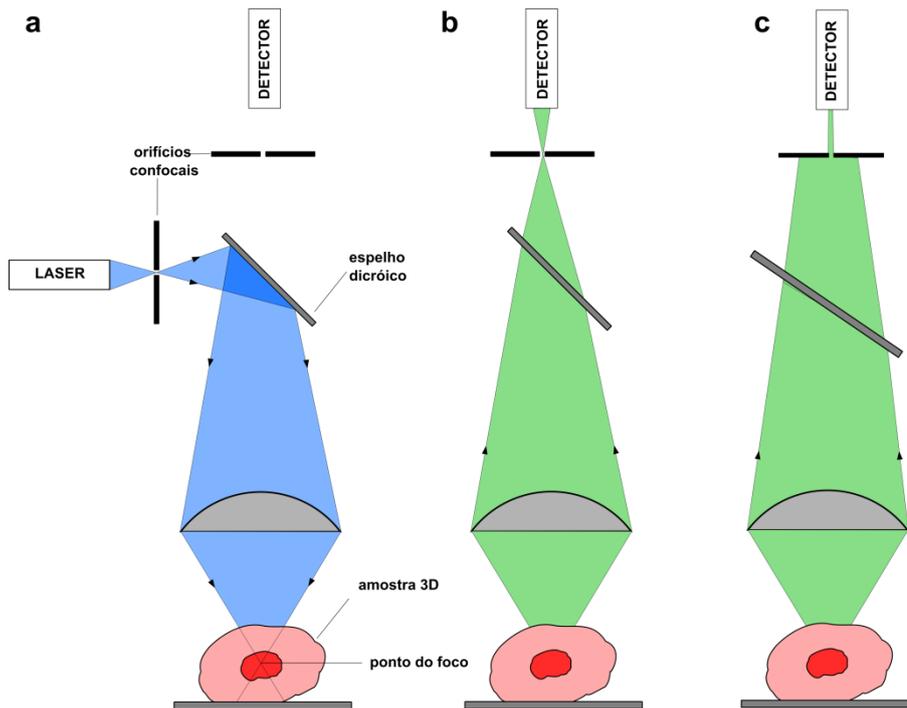


Figura 16 – Microscópio confocal de fluorescência. a) A amostra fluorescente é iluminada ponto a ponto pelo feixe do laser. b) A fluorescência emitida a partir do ponto de foco é focalizada no orifício confocal e atinge o detector, onde o sinal é interpretado com auxílio de computador e, a imagem processada. c) A luz emitida pela amostra fora do ponto de foco não passa pelo orifício confocal, não atingindo o detector.

Fonte: Adaptada de ALBERTS et al.⁴⁶

3.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.2.1 Padronização dos tumores de melanoma – Modelo Piloto

O primeiro teste de obtenção dos tumores de melanoma *in vitro* foi realizado com 1×10^6 por poço de células contendo nanopartículas magnéticas, como descrito anteriormente. Inicialmente, optou-se por utilizar placas de 6 poços (*Techno Plastic Products, TPP*[®]) usuais em cultura celular, tendo em vista que a utilização de células de melanoma humano no método de levitação magnética não foi estabelecida na literatura. Essas placas são compostas de poliestireno, cuja superfície hidrofóbica foi modificada para adquirir caráter hidrofílico. Assim, o plástico resultante carrega uma carga líquida negativa, devido à presença de grupos como hidroxila e carboxila que levam ao aumento de interação e adesão celular.⁴⁷

Mediante o uso dessas placas, é possível observar o comportamento, por microscopia óptica, dos tumores formados em função do tempo de levitação conforme a Figura 17. Pode-se verificar que com 1 hora de levitação, as células estão se juntando devido ao campo magnético acentuado no centro do poço. Contudo, a formação dos aglomerados celulares

característicos da cultura tridimensional ocorreu apenas com 24 horas de levitação, como o esperado dada a síntese de matriz extracelular. Com o passar dos dias, essas estruturas aderiram-se umas às outras formando blocos de células, cujo crescimento se deu em diferentes planos, preenchendo algumas lacunas. As regiões mais escuras a partir de três dias de levitação indicam uma junção de vários componentes: concentração de nanopartículas ferromagnéticas, quantidade de células em outros planos conferindo maior espessura à cultura, cujas imagens não podem ser captadas em microscopia óptica por serem adquiridas em um único plano, além do próprio pigmento melanina presente nessa linhagem celular.

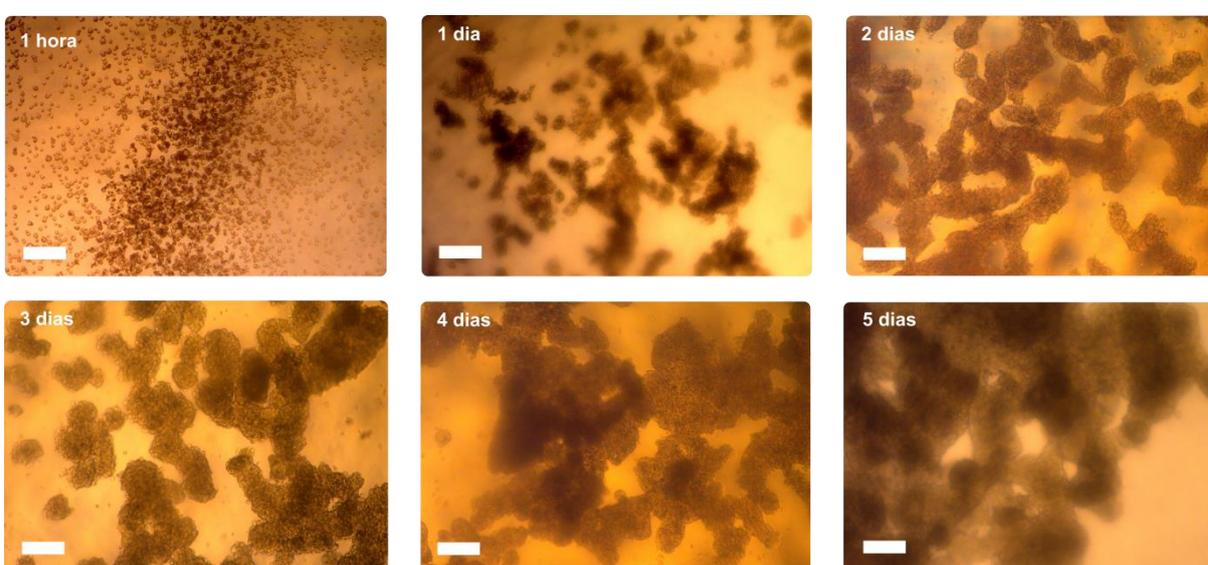


Figura 17 – Modelo piloto de culturas tridimensionais de melanoma humano em placa de 6 poços. Imagens por microscopia óptica. Escala: 200 μ m.

Fonte: Elaborada pela autora.

Embora se tenha obtido com sucesso estruturas tridimensionais de melanoma, o aparecimento de um único tecido, sem lacunas, se iniciou apenas a partir do quinto dia de levitação, mesmo para a grande concentração celular utilizada de 1×10^6 células por poço. Isso indica uma perda de células pela adesão das mesmas no fundo dos poços, devido ao tratamento dado ao material plástico da placa de cultivo (TPP[®]). De fato, imagens dos poços mostraram muitas células aderidas com características de cultura em monocamada, como esquematizado na Figura 8. Vale salientar que para realização da terapia fotodinâmica, é indicado que o tumor gerado seja similar ao que ocorre *in vivo*, isto é, uma estrutura única e sólida, pois isso permitiria inferir respostas fotodinâmicas do tratamento *in vitro* no organismo humano. Logo, para adquirir esse tumor, dois procedimentos poderiam ser feitos: a troca do tipo de placa utilizada ou maior tempo de levitação (maior que nove dias de cultura).

Esse tempo avançado na obtenção de amostras teciduais é comparável com outros métodos de cultivo tridimensionais, como esferoides em duas semanas de cultura, o que não corrobora na vantagem no uso do MLM.⁴⁸ Dessa forma, com intuito de se otimizar a padronização e o tempo da obtenção dos tumores, a troca do tipo de placa foi imprescindível e o método escolhido nesse trabalho.⁴⁰

Portanto, as placas de cultura escolhidas para realização do MLM foram as de baixa adesão celular (*Ultra-Low Attachment Multiwell Plates*, Corning[®]), que possuem um hidrogel não iônico covalentemente ligado ao poliestireno, reduzindo ou eliminando interações iônicas e hidrofóbicas entre as células e a placa. Esse tratamento na superfície do plástico maximiza o número de células em suspensão, o que facilita a formação de tumores de melanoma maiores e mais coesos. Assim, o protocolo experimental otimizado foi de incubação (*overnight*) das nanopartículas na cultura em monocamada de melanoma, seguido da ressuspensão celular e, passagem de 1×10^6 células em 2mL de meio McCoy, contadas pelo teste de exclusão do corante *trypan blue*, para cada poço na placa de baixa aderência. Como resultado, tumores grandes de aproximadamente 4 mm de diâmetro foram obtidos em apenas 24 horas de levitação (Figura 18). Esses tumores padronizados foram os utilizados para posterior formação de esferoides.

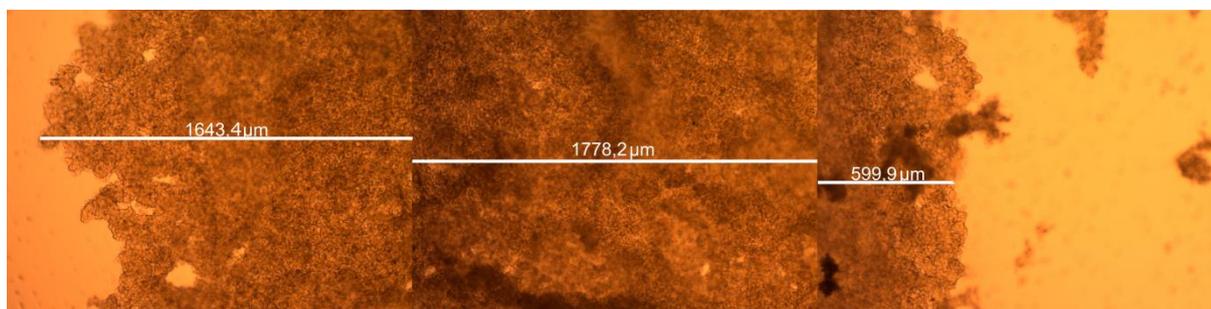


Figura 18 – Tumor de melanoma após 24 horas de levitação, em placa de 6 poços. Imagens do tumor foram tiradas em trechos, dado o seu grande tamanho. O diâmetro aproximado da cultura formada foi de 4mm.

Fonte: Elaborada pela autora.

3.2.2 Avaliação da viabilidade e espessura dos tumores de melanoma

Tomando por base que as placas de baixa adesão foram as melhor indicadas para realização do MLM, o acompanhamento dos tumores formados ao longo dos dias foi captado por imagens em microscopia óptica das culturas em placas de 24 poços (Figura 19), como descrito na seção 3.1.4.

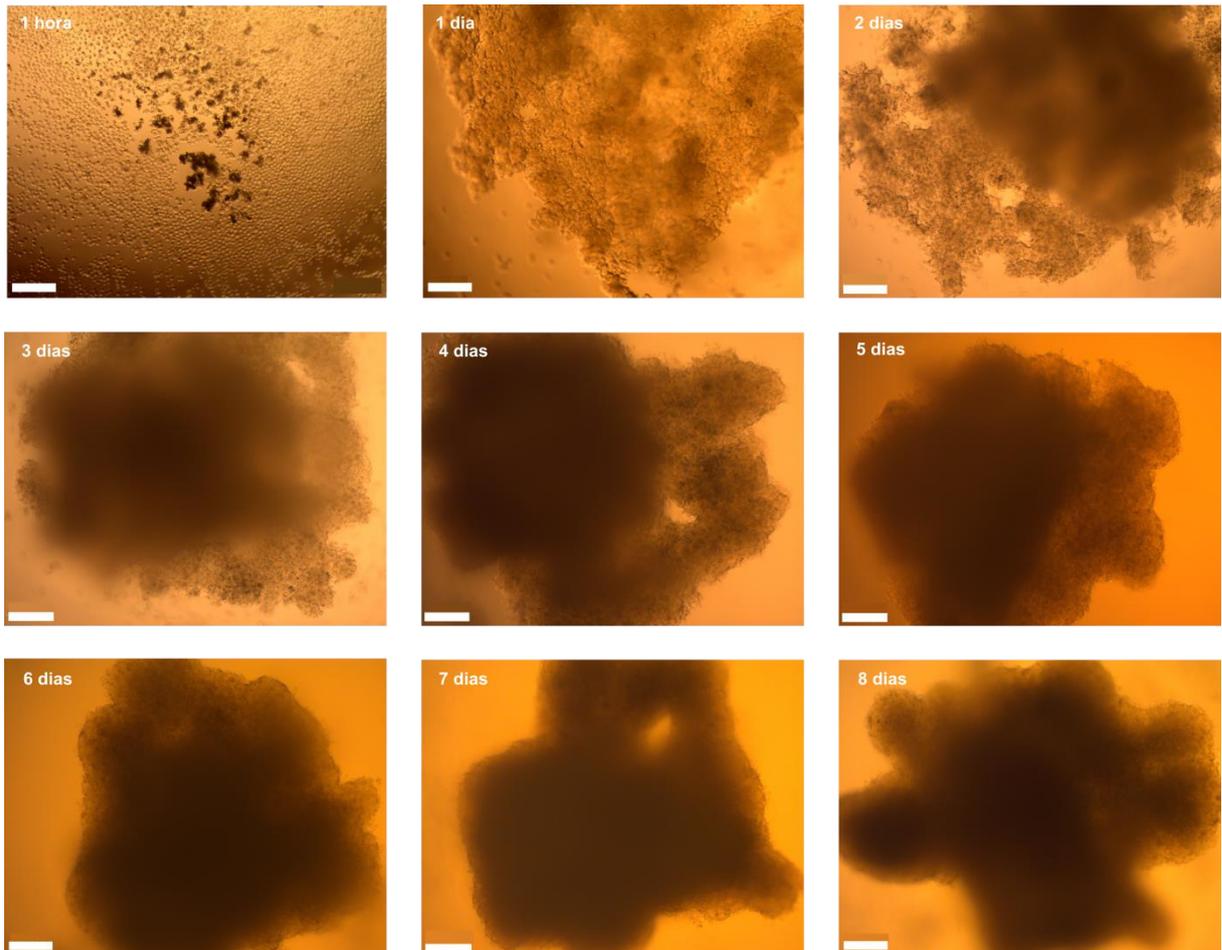


Figura 19 – Culturas tridimensionais de melanoma humano em função do tempo de levitação. Imagens em microscopia dos tumores em placa de 24 poços. Escala: 200 µm.

Fonte: Elaborada pela autora.

A sequência de imagens ilustra a rápida formação dos tumores de melanoma, mesmo com baixa concentração celular de 1×10^5 células por poço. Após 48 horas de levitação já se pôde observar uma estrutura mais densa, como mostrada na região escura indicando crescimento em outros planos, e íntegra já que os aglomerados celulares se agregaram em uma única cultura. Com o passar dos dias, as poucas lacunas presentes começaram a se fechar e em cinco dias de levitação, o tumor sólido foi formado, mantendo sua morfologia nos demais dias. O diâmetro médio dos tumores obtidos foi de 1,4 mm, menor que àqueles padronizados em placa de 6 poços (4 mm) devido ao menor tamanho dos 24 imãs, concentrando mais as culturas 3D formadas. Nota-se que não houve quebra da cultura ao longo do tempo, o que se infere que não ocorreu morte celular relevante dos tumores. Embora em teoria seja possível a presença de necrose no interior do tumor, devido à menor entrega de nutrientes do meio, esse efeito é pouco significativo, pois como reportado por Souza³⁶, isso ocorre para muitos dias de levitação (em torno de oito dias). Consequentemente, para

confirmar a viabilidade dos tumores, foi realizado o ensaio de MTT cujo resultado está demonstrado na Figura 20. De fato, os tumores de melanoma continuaram viáveis com o passar dos nove dias de levitação, em torno de 95%, com viabilidade similar ao controle (células antes da levitação e com nanopartículas). Isso permite avaliar posteriormente a TFD com a garantia que foi o tratamento que causou morte celular e não o próprio tempo de levitação das culturas.

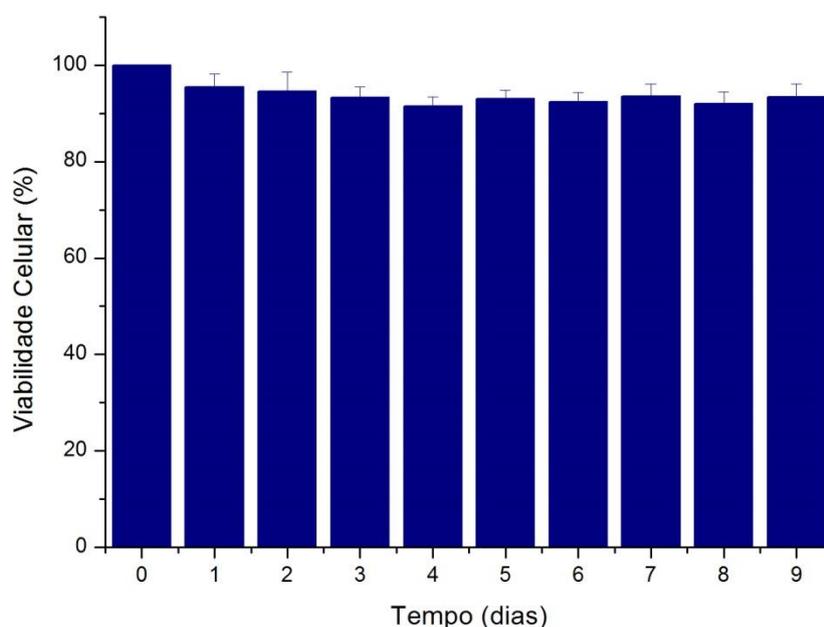


Figura 20 – Viabilidade celular dos tumores de melanoma ao longo dos dias de levitação.

Fonte: Elaborada pela autora.

Por outro lado, para avaliar a espessura dos tumores de melanoma por microscopia confocal, as células foram cultivadas em placa de 24 poços, após 48 horas de levitação e, os esferoides em placa de 96 poços com 1 hora de impressão de magnética. O resultado foi como apresentado na Figura 21. De modo geral, os tumores em 96 poços por terem os magnetos abaixo da placa durante a impressão, obtiveram menor espessura, em torno de 80 μm , enquanto que para o outro arranjo de 24 imãs, os tumores adquiriram profundidade aproximada entre 120 a 130 μm . Esses valores são condizentes para casos de melanomas primários, de espessura menor que 1 mm.

Sabe-se que a taxa de crescimento do melanoma se relaciona com diversos fatores, sendo maior para tumores mais espessos, pacientes de idade avançada e neoplasias cujas características histológicas são agressivas, como presença de ulcerações. Usualmente, o crescimento acentuado acompanha o tipo de melanoma, onde a ordem decrescente seria dos

nodulares, seguido dos expansivos superficiais e, por fim, os lentigo malignos.^{10,49} Desse modo, a rápida invasão do tumor em camadas inferiores da pele influencia na dificuldade no tratamento do melanoma, principalmente com as técnicas convencionais de baixa eficácia (cirurgia, quimioterapia e radioterapia). Portanto, o diagnóstico prévio aliado aos estudos com tratamentos alternativos como a TFD em tumores sólidos primários, obtidos com sucesso nesse trabalho, são fundamentais. Esses resultados confirmam que, o MLM para obtenção dos tumores de melanoma, pode ser considerado um melhor modelo *in vitro* de estudo para avaliar a resposta de um tratamento, em um ambiente mais próximo ao tecido presente no organismo.

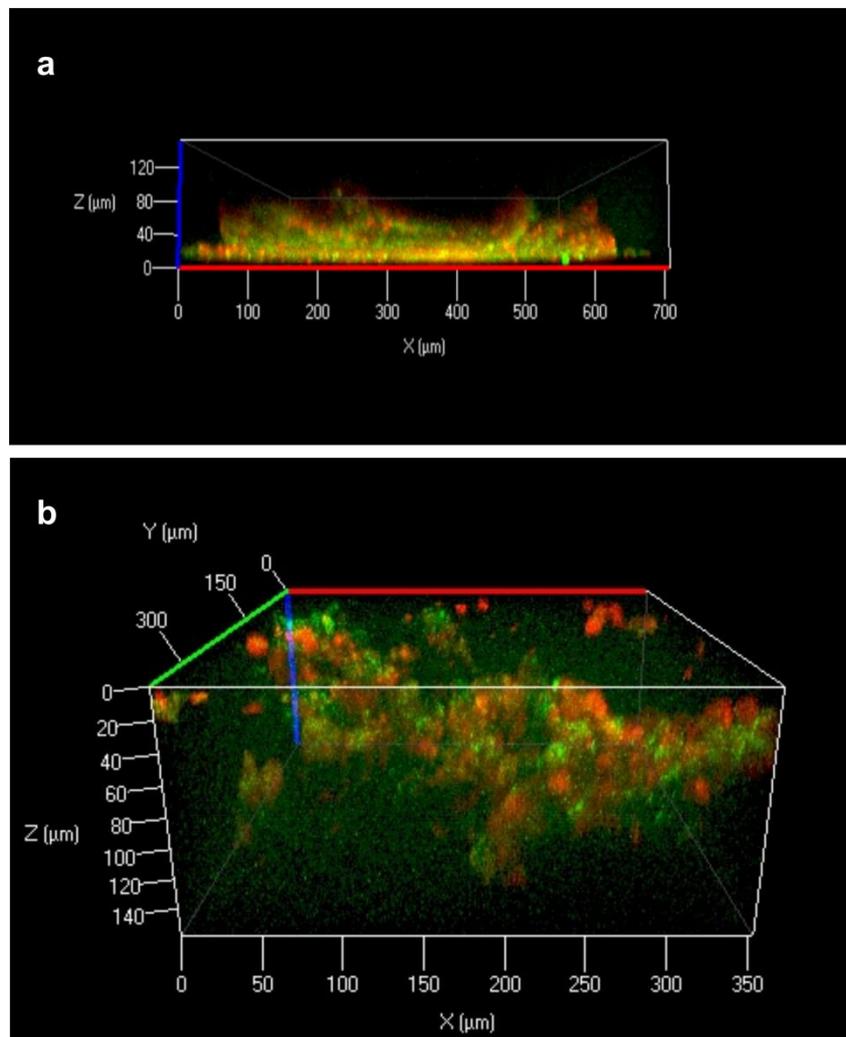


Figura 21 – Imagens em microscopia confocal de fluorescência dos tumores de melanoma. a) Os esferoides obtiveram espessura aproximada de 80 μm devido ao arranjo de ímãs abaixo da placa de 96 poços durante a impressão magnética, conferindo um maior “achatamento” do tumor. Os magnetos podem ser retirados após a formação dos esferoides sem perda da estrutura. b) Os tumores em placas de 24 poços adquiriram espessura entre 120 a 130 μm . Isso ocorreu porque o arranjo de ímãs, nesse caso, ficou acima da placa de cultivo, permitindo maiores graus de liberdade e interações em diferentes planos das células de melanoma.

Fonte: Elaborada pela autora.

4 TERAPIA FOTODINÂMICA EM TUMORES DE MELANOMA *IN VITRO*

4.1 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1.1 Fotossensibilizadores – Photogem[®] e Photodithazine[®]

A variedade de características fotofísicas e fotoquímicas de fotossensibilizadores influenciam na sua distribuição e localização celular e, a captação celular homogênea dos fotossensibilizadores é almejada para que a utilização em terapia fotodinâmica resulte em tratamento total da doença a ser estudada. Contudo, considerando a resistência do melanoma humano aos tratamentos convencionais devido à, principalmente, espessura dos tumores, alta absorção óptica na região do visível e metástase em estágios mais avançados da doença, a procura por moléculas fotossensibilizadoras que possam permear mais facilmente em camadas mais profundas da pele se faz necessária. Desse modo, optou-se por utilizar o fotossensibilizador Photodithazine[®] (PDZ) que possui uma forte banda de absorção na região entre 640 nm a 700 nm,⁵⁰ além do Photogem[®] com absorção em 620 nm, uma vez que absorção em maiores comprimentos de onda permite maior penetração dos compostos fotossensibilizadores no tecido biológico. As soluções estoque de ambos fotossensibilizadores foram preparadas em meio McCoy sem soro fetal bovino e sem fenol, totalizando concentração final de 5 mg/mL (as diluições também foram feitas com o mesmo meio de cultura).

O Photogem[®] (Moscou, Rússia), assim como outros derivados de hematoporfirina, apresenta um espectro de absorção característico, com banda de Soret próximo a 369 nm e outras quatro bandas Q em 507 nm, 540 nm, 570 nm e 620 nm, como visualizado na Figura 22, com Photogem[®] em meio PBS na concentração de 50µg/mL e medidas da absorbância realizadas em cubeta de quartzo com caminho óptico de 1cm. Ele é produzido de acordo com tecnologia de desfibrilação do sangue de animais e humanos, a partir de hematoporfirina IX existente na corrente sanguínea. Sua estrutura monomérica possui fórmula molecular $[C_{34}H_{38}N_4O_6]_n$ e contém massa molecular variável entre 598 a 2920 g/mol, pois se apresenta como uma mistura de monômeros, dímeros e oligômeros.

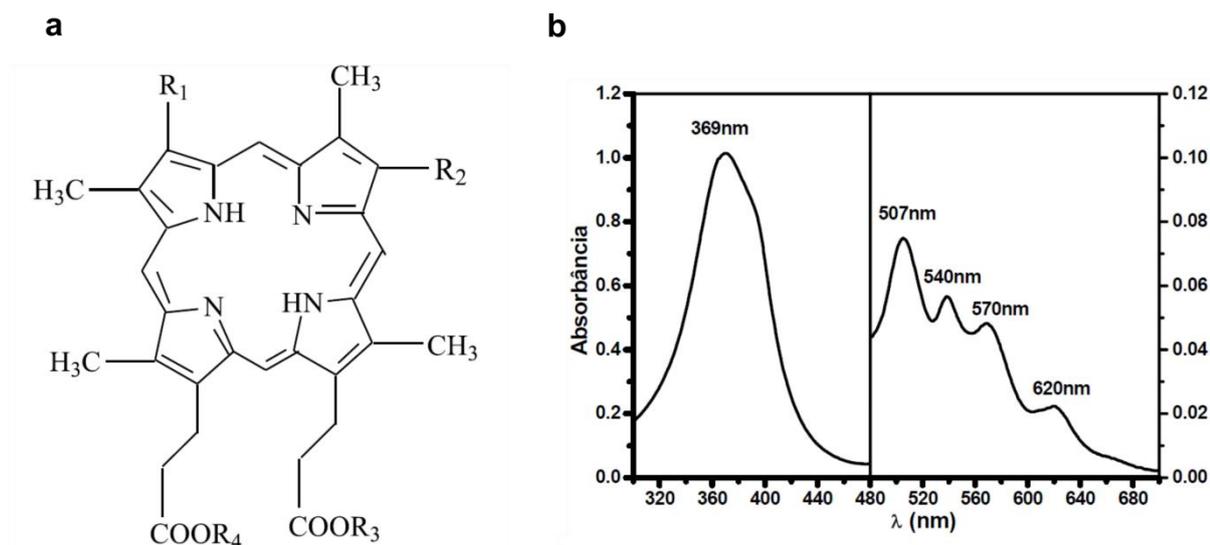


Figura 22 – a) Estrutura monomérica do Photogem[®]. Os grupos substituintes R₁ e R₂ se ligam aos grupos CH=(OH)CH₃, CH=CH₂ ou a outra molécula do monômero. Já os grupos R₃ e R₄ se ligam à molécula de hidrogênio ou ao próprio monômero. b) Espectro de absorvância normalizado do Photogem[®] em PBS pH=7,4. O lado esquerdo representa a banda de Soret, enquanto o lado direito do gráfico as quatro bandas Q.

Fonte: Adaptada de MENEZES.⁵¹

Por outro lado, o Mono-L-Aspartil Clorina e₆, cujo nome comercial é PDZ (VETA–GRAND, Moscou, Rússia), é sintetizado da cianobactéria *Spirulina platensis* através da adição de N-metil-D-glicosamina 0,5% como agente solubilizante, obtendo então forma de sal de glucamina. Possui fórmula molecular C₃₈H₃₇N₅Na₄O₉ e massa molecular de 799,69 g/mol. Seu espectro de absorção apresenta uma banda de Soret com máximo em 401 nm e outras três bandas Q com máximos em 505 nm, 600 nm e 655 nm, como demonstrado na Figura 23, com PDZ na concentração de 20µg/mL.

O PDZ apresenta algumas vantagens em comparação ao Photogem[®]. Primeiramente apresenta uma banda de absorção em comprimentos de onda mais elevados (até aproximadamente 660nm), permitindo maior penetração no tecido biológico. Além disso, ele é encontrado em maior quantidade por ser obtido através de uma fonte natural (alga), o que auxilia em seu menor custo e, também, é eliminado mais rapidamente pelo organismo, em torno de 94% em 24h pós-administração e 98% em 48h.⁵²

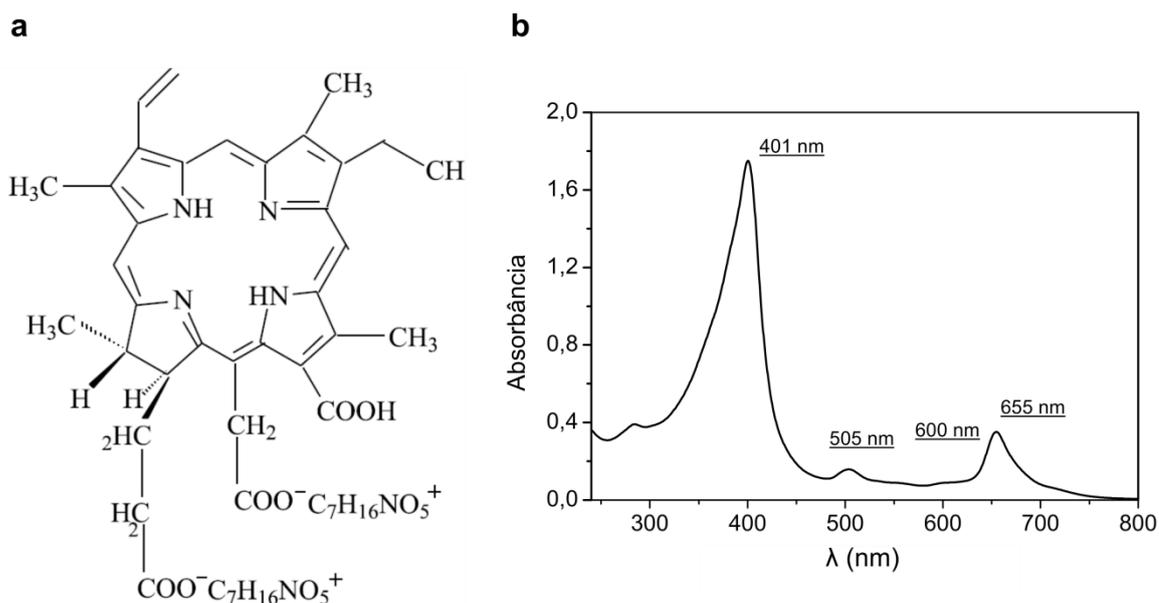


Figura 23 – a) Estrutura química do Photodithazine®. b) Espectro de absorvância do Photodithazine®. O lado esquerdo do gráfico demonstra a banda de Soret com máximo em 401nm. Por outro lado, o lado direito apresenta os valores das três bandas Q, com máximos em 505nm, 600nm e 655nm.

Fonte: Adaptada de CORREA.⁵³

Sabe-se que a agregação é definida como associação ou aglomeração de moléculas em solução e ela constitui um grande obstáculo na biodisponibilidade de vários fotossensibilizadores, além de ser um desafio na formulação de novos fármacos. Normalmente, a agregação de fotossensibilizadores é associada a vários fatores como aumento da sua concentração, adição de surfactantes iônicos no meio e, alteração do pH ou temperatura, que atribuem características relacionadas à diminuição da fluorescência do FS e do tempo de vida do oxigênio singlete.⁵⁴⁻⁵⁵ Os problemas decorrentes da agregação de FS incluem redução de fotossensibilização, redução na captação do FS pelas células alvo e aumento no risco de reações anafiláticas nos pacientes tratados, características negativas para aplicação da TFD.⁵⁶⁻⁵⁷ Logo, a verificação de propriedades espectrais, como absorvância dos fotossensibilizadores em função da concentração, é um parâmetro interessante para se assegurar um intervalo de concentrações adequado para os futuros experimentos de TFD. A ideia geral é que se tenha uma relação linear entre esses dois parâmetros, de modo que obedçam a lei de Beer-Lambert*, indicando que não houve mudanças nas propriedades físicas e químicas do FS. Portanto, para esse procedimento foram preparadas diferentes soluções dos fotossensibilizadores Photogem® e Photodithazine®, diluídas em meio McCoy sem fenol e sem soro fetal bovino, com concentrações variando entre 0,5 µg/mL a 150 µg/mL.

* A Lei de Beer-Lambert é a equação fundamental da espectrofotometria e mostra que a absorvância é diretamente proporcional à concentração da espécie, que absorve radiação de certo comprimento de onda.

A absorbância de cada concentração foi lida em espectrofotômetro (SpectraMax[®] Plus microplate reader) entre 350 nm a 750 nm , utilizando-se cubeta de quartzo com 1 cm de caminho óptico. Para a obtenção dos gráficos da absorbância em função da concentração de FS, foi escolhido a leitura em máximo de absorção do FS, assim, para o Photogem[®] em 630 nm e Photodithazine[®] em 660 nm.

4.1.2 Sistema de irradiação: Biotable[®]

A Biotable[®] é um dispositivo desenvolvido pelo Laboratório de Apoio Técnico (LAT, Instituto de Física de São Carlos – IFSC) da Universidade de São Paulo, que contém 24 LEDs (do inglês *Light Emitting Diodes*) distribuídos de modo a irradiar uniformemente amostras em placas multipoços, como representado na Figura 24. O comprimento de onda necessário para aplicar a irradiação e realizar terapia fotodinâmica (TFD) depende do fotossensibilizador utilizado e, para esse trabalho, optou-se por utilizar o Photodithazine[®], como será elucidado posteriormente. Nesse caso, os LEDs possuem comprimento de onda de 660 nm, o que corresponde ao máximo de absorção dessa molécula.

Considerando que o protótipo contém 24 LEDs e as amostras de tumores de melanoma foram distribuídas em placas de 24 e 96 poços para realização da TFD, a irradiância (em mW/cm²) que chega a cada poço se difere em arranjo. Para isso, diversas medidas da potência entregue pelo equipamento foram realizadas em espectrômetro modelo USB2000 (Ocean Optics) e sensor Sony ILX511B com área aproximada de 0,12 cm². Durante as medidas, o sensor foi colocado em cada posição na placa de cultura para aferir a potência. Dessa forma, obteve-se um valor médio de irradiância de 20,94 mW/cm² para placa de 96 poços e 30 mW/cm² para de 24 poços e, esses valores foram utilizados para se calcular as doses de irradiação para aplicação da TFD, conforme a equação (2). Deve-se ressaltar que ao se avaliar as potências individuais de todos os poços da placa de 96 poços, observou-se uma diferença grande nas medidas das colunas e linhas nas extremidades da placa (potências menores em aproximadamente 25% com relação ao centro), culminando no uso dos poços do meio da placa para irradiação das amostras tumorais nos experimentos de TFD.

A irradiância I (mW/cm²) se correlaciona com a dose (J/cm²) e tempo de irradiação (s) como abaixo:

$$D = I \times t_{ir} \quad (2)$$

Onde D é a dose (ou fluência) e t_{ir} o tempo.

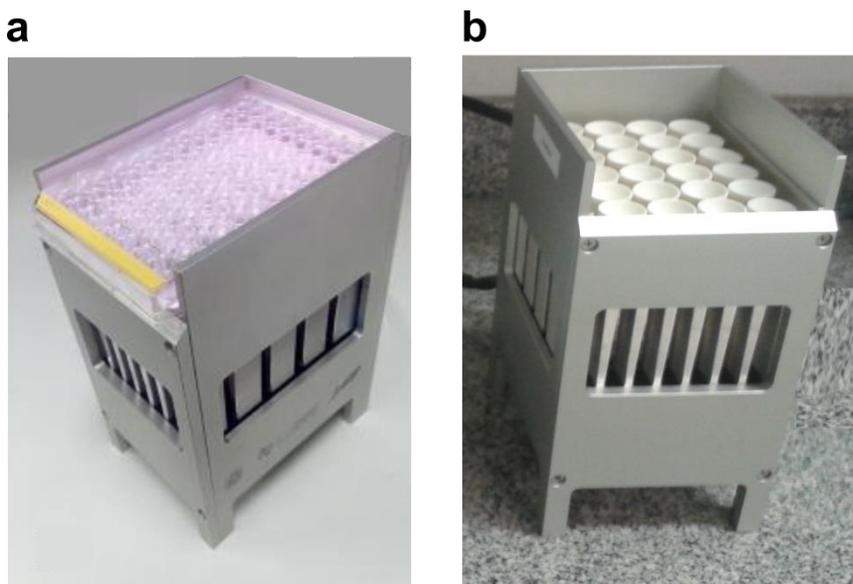


Figura 24 – Protótipos para irradiação de placas multipoços (Biotables). a) Para irradiação em placas de 96 poços a irradiância média é de 20,94 mW/cm² por poço. b) Nesse caso, para iluminação em placas de 24 poços, há 24 suportes de borracha sobre a Biotable, fornecendo irradiância média de 30 mW/cm² por poço.

Fonte: Elaborada pela autora.

4.1.3 *Variação de temperatura em função do tempo de irradiação*

Considerando que a variação de temperatura no meio de cultura, no qual as células se encontram durante a irradiação, influencia na resposta fotodinâmica, essa variável foi medida em intervalos de 5 minutos através de medidor termopar imerso em 1 mL de meio McCoy sem fenol, distribuído em placa de 24 poços.

4.1.4 *Citotoxicidade no escuro dos fotossensibilizadores por MTT*

Testes de citotoxicidade no escuro do Photogem[®] e Photodithazine[®] foram feitos com os tumores de melanoma previamente obtidos em placas de 96 poços (esferoides), como descrito na seção 3.1.5, para determinação do intervalo de concentrações adequado para realização da TFD, uma vez que não se quer que o dano tumoral seja causado pela toxicidade do fotossensibilizador aplicado. Após 1 hora de impressão magnética, cada placa de cultura (uma placa para cada fotossensibilizador) continha amostras de tumores. Assim, os poços foram triplamente lavados com PBS para se retirar o vermelho de fenol presente no meio de cultura, que poderia interferir nas leituras do espectrofotômetro.

A partir da solução estoque na concentração de 5mg/mL tanto para o Photogem[®] quanto o Photodithazine[®], realizaram-se diluições seriadas com meio McCoy sem fenol e sem soro fetal bovino e as concentrações escolhidas estavam no intervalo aproximado de 1µg/mL a 300µg/mL. O controle para efeito de comparação dos valores de viabilidade foi dos tumores sem incubação com fotossensibilizador, apenas com meio McCoy sem soro e fenol. Desse modo, os tumores foram incubados em triplicata com cada concentração de ambos fotossensibilizadores, como mostrado na Figura 25.

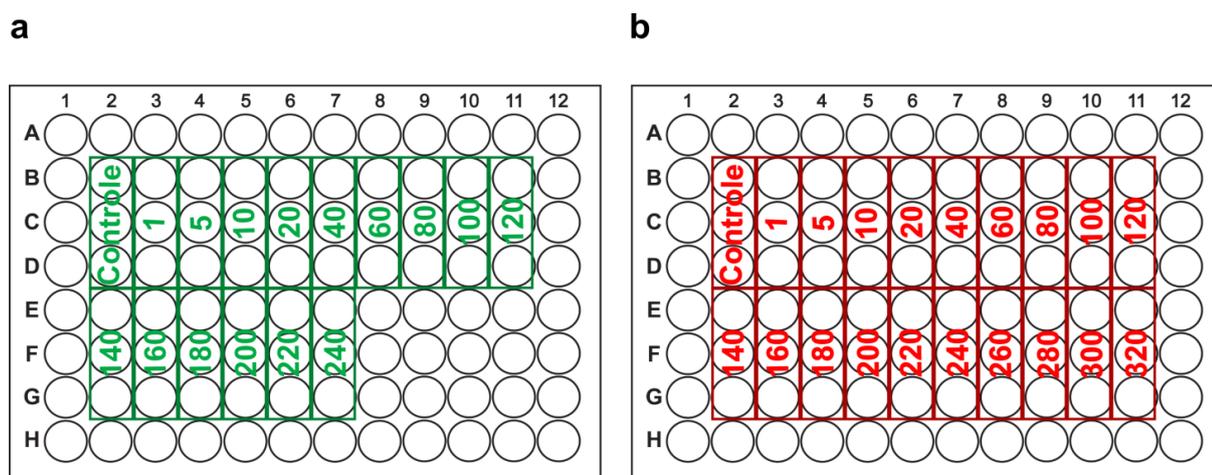


Figura 25 – Representação esquemática da disposição dos poços. a) Triplicata das diferentes concentrações (em µg/mL) de PDZ. Há menor número de poços em comparação ao Photogem[®], pois o PDZ é descrito na literatura que é mais tóxico, logo não havia necessidade de se incubar com concentrações mais altas. b) Concentrações (em µg/mL) de Photogem[®] em triplicata.

Fonte: Elaborada pela autora.

Cada placa foi envolta por papel alumínio (no escuro) e incubada por 16 horas (*overnight*) em incubadora umidificada (5% CO₂ e 37°C). Após o tempo de incubação, o fotossensibilizador foi retirado dos seus poços e as culturas 3D novamente lavadas com PBS. Assim, foram adicionados 100 µL por poço de MTT 0,5 mg/mL em ambas placas e os tumores foram dissociados mecanicamente (através da pipetagem). Em seguida, os cristais de formazan formados em cada poço foram solubilizados com 100 µL da solução de 0,04 M de HCl em isopropanol. Finalmente, as placas foram lidas a 570 nm em leitor de placa (Multiskan[®] GO, Thermo Scientific) para averiguar a viabilidade celular em função da concentração dos fotossensibilizadores.

4.1.5 Cinética de difusão dos fotossensibilizadores nos tumores de melanoma por microscopia confocal

Através do microscópio confocal invertido (LSM780, ZEISS, Alemanha) foi possível avaliar a distribuição e incorporação dos fotossensibilizadores Photogem[®] e Photodithazine[®] nos tumores de melanoma. Para isso, esferoides previamente formados em duas placas de 96 poços após 1 hora de impressão magnética (uma placa para cada fotossensibilizador), foram incubados com ambos fotossensibilizadores na concentração de 50 µg/mL e em diferentes tempos, conforme a Tabela 2. Esse valor não é tóxico para as células, como foi comprovado pelo teste de citotoxicidade no escuro. Após incubação, cada amostra tumoral foi triplamente lavada com 200 µL de tampão PBS e incubada com 100 µL do marcador de núcleo celular laranja de acridina, na concentração estoque de 100 µg/mL. Assim, com a retirada da solução do marcador em cada poço, o tumor foi repassado para placa com fundo de lamínula, acrescentando meio McCoy sem fenol o suficiente para cobrir a amostra, e levado ao microscópio. Utilizando-se aumento de 20 e 40 vezes e excitação com laser em 405 nm, as imagens foram adquiridas em dois canais, um entre 400 – 600 nm, correspondendo à fluorescência do laranja de acridina (com pico de emissão em 526 nm) e outro entre 600 – 700 nm, referente à fluorescência no vermelho de ambos fotossensibilizadores, para verificar possíveis acúmulos de FS no tumor de melanoma. Além disso, imagens do espectral, isto é, da fluorescência natural tanto dos fotossensibilizadores (com emissão rósea avermelhada) quanto do marcador de núcleo (verde) também foram realizadas.

Tabela 2 – Parâmetros experimentais de cada placa de 96 poços. Cinco amostras tumorais, por placa, foram incubadas com 200 µL do seu respectivo fotossensibilizador. Cada amostra foi incubada com um tempo diferente para avaliar a difusão de cada fotossensibilizador nos tumores de melanoma.

Fotossensibilizador	Concentração (µg/mL)	Tempo de incubação (horas)
Photogem[®]	50	2
		4
		12
		16
		24
Photodithazine[®]	50	2
		4
		12
		16
		24

Fonte: Elaborada pela autora.

4.1.6 *Quantificação de fotossensibilizadores intracelulares (uptake) em culturas 2D e 3D de melanoma humano – Teste piloto*

Para averiguar se há diferenças de captação entre cada fotossensibilizador em modelos tridimensionais e bidimensionais de melanoma humano, um teste piloto foi realizado para determinar a quantidade intracelular de ambas as moléculas, por emissão de fluorescência. Essa técnica se baseia na leitura de fluorescência do composto, de certa concentração, em amostras incubadas por diferentes tempos. A validação do método para quantificar o fotossensibilizador intracelular, corresponde à comparação da leitura para cada tempo com um padrão, ou seja, com um gráfico linear que contenha valores conhecidos de fluorescência em várias concentrações da substância. O padrão utilizado nesse experimento foi do Photogem[®] e PDZ com cinco concentrações cada, no intervalo entre 0,5 µg/mL a 7,5 µg/mL.

O procedimento em culturas 3D de melanoma se iniciou com os tumores obtidos em duas placas de 96 poços, como descrito anteriormente, e cada placa incubada com um fotossensibilizador, Photogem[®] ou PDZ, ambos na concentração de 50 µg/mL. Cada amostra tumoral foi incubada com um tempo diferente, como apresentado na Tabela 3. Após o tempo de incubação, cada cultura foi lavada com 200 µL (por poço) de PBS e, em seguida, lisada com 200 µL de solução com DMSO 90% e PBS 10%. Passados 10 minutos, o tumor foi dissociado mecanicamente (desagregação por pipetagem) e centrifugado a 2000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante, que contém o fotossensibilizador intracelular liberado em solução devido à lise celular, foi transferido para cubeta de quartzo, com caminho óptico de 1 cm, e a emissão de fluorescência lida em fluorímetro (SpectraMax[®] Plus microplate reader). A excitação usada para ambos fotossensibilizadores era de 405 nm, porém, a emissão de fluorescência detectada para o Photogem[®] correspondia a 630 nm enquanto para o PDZ 660 nm.

Por outro lado, as culturas em monocamada de melanoma foram cultivadas em placas de 96 poços (TPP), na concentração de 1×10^5 células, por 24 horas. Logo, cada poço foi incubado com 200 µL de um tipo de fotossensibilizador (50 µg/mL) por tempos diferentes, como apresentados na Tabela 3. As etapas seguintes são semelhantes às culturas tridimensionais exceto que não há dissociação mecânica da cultura celular, pois as células continuam aderidas aos poços. Consequentemente, após a lise com DMSO 90% e PBS 10%, o fotossensibilizador intracelular já foi liberado na solução e pode ser transferido à cubeta de quartzo para leitura de fluorescência.

Tabela 3 – Parâmetros experimentais para quantificação de fotossensibilizadores intracelulares em melanoma humano. Cada placa é incubada com um tipo de fotossensibilizador e cada poço corresponde a um tempo de incubação..

Fotossensibilizador	Concentração de FS (µg/mL)	Tempo de incubação (horas)
Photogem[®]	50	4
		8
		16
		24
Photodithazine[®]	50	4
		8
		16
		24

Fonte: Elaborada pela autora.

4.1.7 *Terapia fotodinâmica em placa de 24 e 96 poços*

Após seleção das concentrações adequadas de fotossensibilizador pelo teste de citotoxicidade no escuro (de 1 µg/mL a 150 µg/mL) e, sabendo que o fotossensibilizador Photodithazine[®] foi o mais captado e difundido pelos tumores de melanoma, como será elucidado em seções posteriores, é possível se irradiar as amostras e iniciar o tratamento dos tumores com TFD.

A obtenção dos tumores em duas diferentes espessuras (80 µm em placas de 96 poços e 130 µm para 24 poços) foi realizada como os protocolos descritos nas seções de 3.1.4 a 3.1.6 e, a irradiação das amostras foi avaliada em 660 nm (Biotable) com diferentes doses de luz. As condições experimentais são apresentadas na Figura 26 e Tabela 4, sendo que cada parâmetro foi testado em triplicata e os experimentos foram realizados com três repetições de ocasião. Os cálculos de tempo de irradiação foram baseados na Equação 2 da seção 4.1.2, onde o tempo é a razão entre a dose de luz e a irradiância fornecida pela Biotable[®].

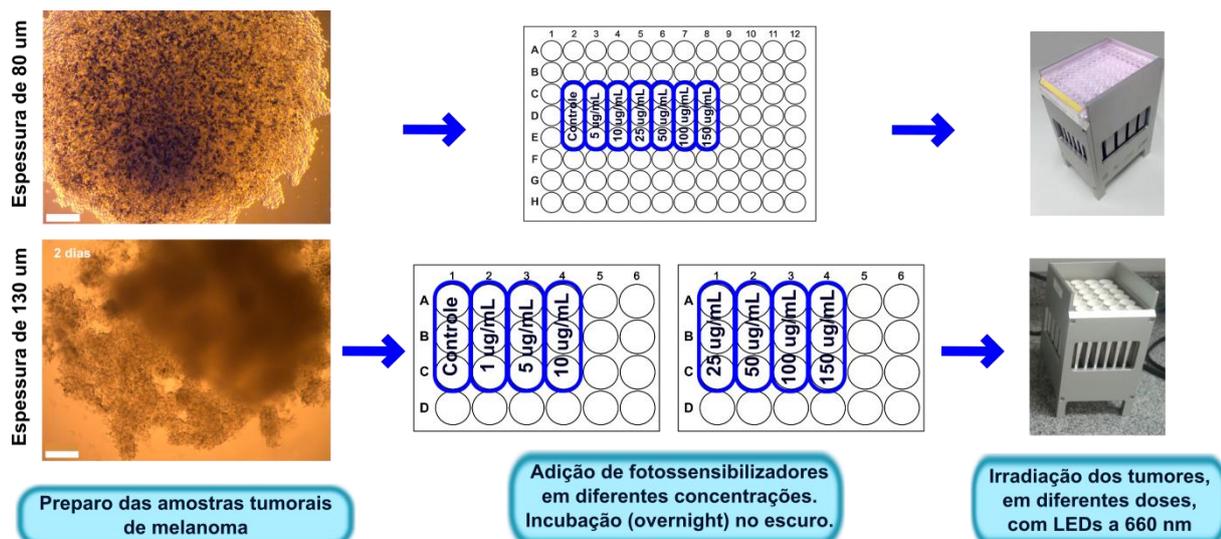


Figura 26 – Protocolo experimental da terapia fotodinâmica em tumores sólidos de melanoma. Inicialmente os tumores de diferentes espessuras, previamente obtidos, são incubados com PDZ em diferentes concentrações atóxicas e levados à estufa umidificada por 16 horas (*overnight*). Após incubação, o fotossensibilizador é retirado dos poços, as amostras lavadas com PBS e, por fim, meio McCoy sem fenol é acrescentado para posterior irradiação. As Biotables (com arranjo para 96 poços e 24 poços) fazem a irradiação a 660 nm dos tumores em diferentes doses de luz. Em seguida, meio é substituído para McCoy com fenol suplementado com 15% de soro fetal bovino e novamente levado à estufa para se avaliar a resposta fotodinâmica após 24 horas do tratamento. Escala: 200 μm .

Fonte: Elaborada pela autora.

Tabela 4 – Parâmetros experimentais avaliados nos experimentos de TFD em tumores sólidos de melanoma.

Tipo de placa	Irradiância da Biotable (mW/cm^2)	Concentração do FS ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Dose de luz (J/cm^2)	Tempo de irradiação
24 poços	30	Ausente	Ausente	Ausente
		1		
		5		
		10		
		25		
		50		
		100		
		150		
96 poços	20, 94	Ausente	Ausente	Ausente
		5		
		10		
		25		
		50		
		100		
		150		

Fonte: Elaborada pela autora.

O procedimento de irradiação, nas doses acima indicadas, começou após a incubação das culturas com PDZ. Os tumores foram lavados com solução tampão PBS (200 µL por poço em placas de 96 poços e 400 µL em placas de 24 poços), sendo posteriormente trocada por meio McCoy sem SFB e sem fenol. Assim, as culturas 3D foram iluminadas e, em seguida, o meio foi substituído para McCoy suplementado (15% SFB). Por fim, as placas foram levadas à incubadora umidificada (5% CO₂ e 37°C).

4.1.8 Avaliação da resposta fotodinâmica por microscopia óptica e MTT

Analogamente ao caso de citotoxicidade no escuro dos fotossensibilizadores Photogem[®] e Photodithazine[®], a viabilidade de amostras tumorais de duas espessuras (80 µm e 130 µm) após a TFD também foi avaliada pelo teste colorimétrico de redução do MTT, cujo procedimento está detalhado nas seções 3.1.4 para placa de 24 poços e 4.1.3 para de 96 poços.

Em resumo, após incubação (*overnight*) das culturas 3D com 400 µL por poço de PDZ em placa de 24 poços e 200 µL na de 96 poços, seguiu-se a etapa de irradiação. Depois de 24 horas, tempo para recuperação celular pós-tratamento fotodinâmico, a solução de MTT (0,5 mg/mL) foi acrescentada por poço, os cristais de formazan solubilizados e os poços foram lidos a 570 nm em leitor de placa. Isso permitiu avaliar a resposta fotodinâmica dos tumores tratados e irradiados. É importante ressaltar que a cada troca de soluções, os imãs foram colocados abaixo das placas para ancorar as culturas, para que não houvesse perda de células ou da integridade dos tumores.

Além disso, dadas às 24 horas pós TFD, os tumores foram acompanhados por microscopia óptica para averiguar se ocorreram mudanças morfológicas em função do dano oxidativo oriundo do tratamento fotodinâmico.

4.1.9 Ensaio da viabilidade celular com marcadores fluorescentes SYTOX[®] e C₁₂-resazurin

O ensaio (LIVE/DEAD[®] *Cell vitality assay kit*, ThermoFisher Scientific) desse experimento consiste na distinção da fluorescência de dois compostos, um que identifica células metabolicamente ativas e o outro, as células danificadas. O seu princípio é baseado na redução do C₁₂-resazurin (molécula não fluorescente) para C₁₂-resofurin que emite fluorescência vermelha (pico de emissão em 587 nm) em células viáveis e, na captação do corante SYTOX[®] (com pico de emissão de fluorescência em 523 nm) por células cuja membrana plasmática foi comprometida, marcando de verde os ácidos nucleicos de células

mortas. Essas duas populações celulares puderam ser distinguidas usando microscopia confocal de fluorescência, com excitação em 488 nm e aquisição de imagens em dois canais para se observar fluorescência dos dois marcadores, um entre 500 a 600 nm, correspondendo ao SYTOX[®] e outro entre 600 nm a 700 nm, referente ao C₁₂-resofurin.

Esse ensaio foi realizado para assegurar se houve morte celular pós TFD. Para isso, uma condição de dose de irradiação e espessura tumoral foi utilizada, no caso, tumores com 80 µm de profundidade (placa de 96 poços) submetidos à TFD com PDZ nas concentrações de 5 µg/mL a 150 µg/mL e iluminação com dose de 20 J/cm². O protocolo se iniciou com a lavagem tripla dos tumores com tampão PBS, após 24 horas da seção de TFD, seguido da adição de 50 µL por poço da mistura final com C₁₂-resazurin 10 µM e SYTOX[®] 0,1 µM. Após 30 minutos de incubação, a solução com os marcadores foi retirada dos poços de cultivo e as culturas lavadas com PBS, assim, meio McCoy sem fenol foi acrescentado e a placa levada ao microscópio confocal para detecção simultânea de células vivas e mortas.

4.1.10 BioAssay

O BioAssay[™] (Nano3D Biosciences Inc., Houston, USA) consiste em um kit para ensaios de toxicidade de compostos, através da impressão magnética de células em placas de 96 poços, ou seja, em esferoides cujo procedimento está descrito na seção 3.1.5. O princípio desse ensaio remete a uma metodologia previamente desenvolvida, onde células foram impressas magneticamente em formato de anel. Nesse procedimento, as células viáveis interagem umas com as outras, produzindo matriz extracelular e fecham o anel como resultado da proliferação e migração celular, mimetizando cicatrização de feridas.⁵⁸ De maneira similar, após remoção dos magnetos com o BioAssay[™], os esferoides se contraem também por ação da proliferação das células vivas e se rearranjam até a formação de uma cultura 3D que pode crescer de forma mais coesa ao longo dos dias. Para avaliação da toxicidade de substâncias, quando estas são acrescentadas aos esferoides a contração ocorre mais lentamente, visto que há presença de células mortas. Portanto, o acompanhamento do tamanho dos esferoides e da coloração do meio de cultura (sendo que células vivas consomem mais os nutrientes do meio) pode acarretar em medidas de viabilidade celular em tempo real. Assim, o BioAssay[™] nada mais é que um sistema para se tirar imagens ao longo do tempo dos esferoides, incubados com o composto a ser analisado.^{41,58}

A Figura 27 apresenta a montagem do sistema, que possui um iPod (Apple Computer, Inc.) que faz a aquisição das imagens, uma lente de Fresnel onde a placa de cultivo com os

esferoides é posicionada e, uma fonte de luz branca (Lightpad A920, Artograph Inc.). A fonte de luz aliada às nanopartículas presentes na cultura celular, confere o melhor contraste às imagens. Contudo, vale lembrar que nesse trabalho, ao invés do teste de apenas um composto, se deseja avaliar a viabilidade celular dos tumores após o tratamento por terapia fotodinâmica. Logo, a utilização da luz branca, durante a formação das imagens, sobre as amostras tumorais incubadas com fotossensibilizador, também resulta na excitação adicional do fotossensibilizador, que não é o efeito desejado. Por isso, um temporizador foi acoplado ao Lightpad, controlando seu acionamento apenas quando as imagens fossem tiradas. Esse procedimento minimizou os efeitos da iluminação contínua com a fonte de luz branca.

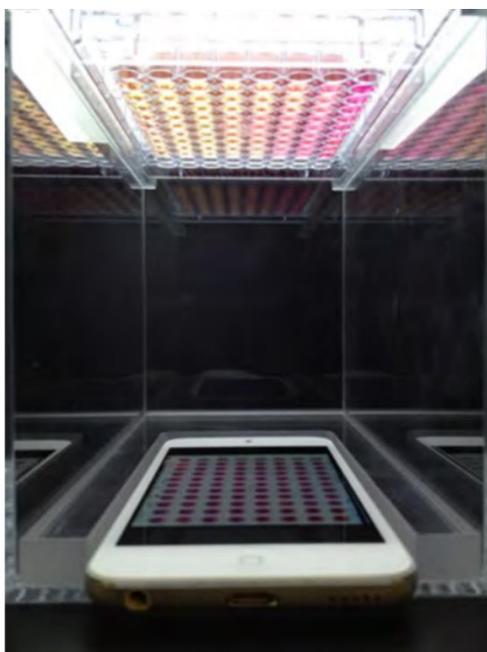


Figura 27 – Sistema para aquisição das imagens dos tumores de melanoma em esferoides a TFD.
Fonte: n3D Biosciences...⁴³

4.1.11 Análise estatística dos dados experimentais

Os resultados obtidos nesse trabalho foram analisados pelo programa Origin Pro 8, e as medidas encontradas foram expressas como a média \pm desvio padrão. Para aferir a confiabilidade das comparações de resultados, foi realizada a Análise de Variância de um fator (*One-way ANOVA*). Consideraram-se diferenças significativas as comparações com valor de significância $p < 0,05$.

4.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.2.1 Determinação da temperatura de amostras com Biotable em 660 nm

Para garantir que o dano fotodinâmico nos tumores de melanoma fosse decorrente da interação do fotossensibilizador intracelular com a luz entregue às amostras, medições de temperatura foram realizadas com auxílio de medidor termopar em meio McCoy sem fenol, em intervalos de 5 minutos por um período de até 50 minutos, tempo máximo de iluminação usado nos experimentos de terapia fotodinâmica. Essas medidas estão apresentadas na Tabela 5. Pode-se notar que não houve alterações significativas na temperatura ao longo do tempo, atingindo um valor médio de $(24,07 \pm 0,29)$ °C. Isso impede que se tenham efeitos foto-térmicos que desencadeiam morte celular, como desnaturação de proteínas ou lise de membrana.

Tabela 5 – Medidas de temperatura de meio McCoy sem fenol em Biotable a 660 nm,

Tempo de iluminação (minutos)	Temperatura (°C)
0	23,7
5	23,8
10	23,8
15	23,8
20	24
25	24
30	24,1
35	24,3
40	24,3
45	24,4
50	24,6

Fonte: Elaborada pela autora.

4.2.2 Investigação da agregação e citotoxicidade no escuro do Photogem[®] e Photodithazine[®]

O fenômeno de agregação tem sido associado a mudanças espectrais decorrentes do aumento na concentração de fotossensibilizadores. Essas alterações se relacionam a deslocamentos no pico de absorção tanto da banda de Soret quanto das bandas Q desses compostos, conferindo desvios na Lei de Beer-Lambert.⁵⁹ Logo, para se verificar a ausência da agregação de um fotossensibilizador em solução, a varredura espectral não deve apresentar

diferenças nos máximos de absorção e, portanto, a absorbância, para um dado comprimento de onda, será diretamente proporcional à concentração. Por conseguinte, a Figura 28 apresenta as medidas de absorbância em função da concentração dos dois fotossensibilizadores Photogem[®] e Photodithazine[®]. Nota-se que há uma linearidade para ambos os gráficos, indicando que não há agregação das duas moléculas quando diluídas em meio McCoy sem fenol, no intervalo de concentração até 150 µg/mL. Como a agregação reduz drasticamente a geração de oxigênio singlete, é possível garantir que para as concentrações utilizadas, não haverá diminuição na eficiência fotodinâmica desses fotossensibilizadores e, assim, a TFD não será prejudicada. É importante salientar que os gráficos apresentam elevados valores dos coeficientes de correlação linear ($R > 0,98$).

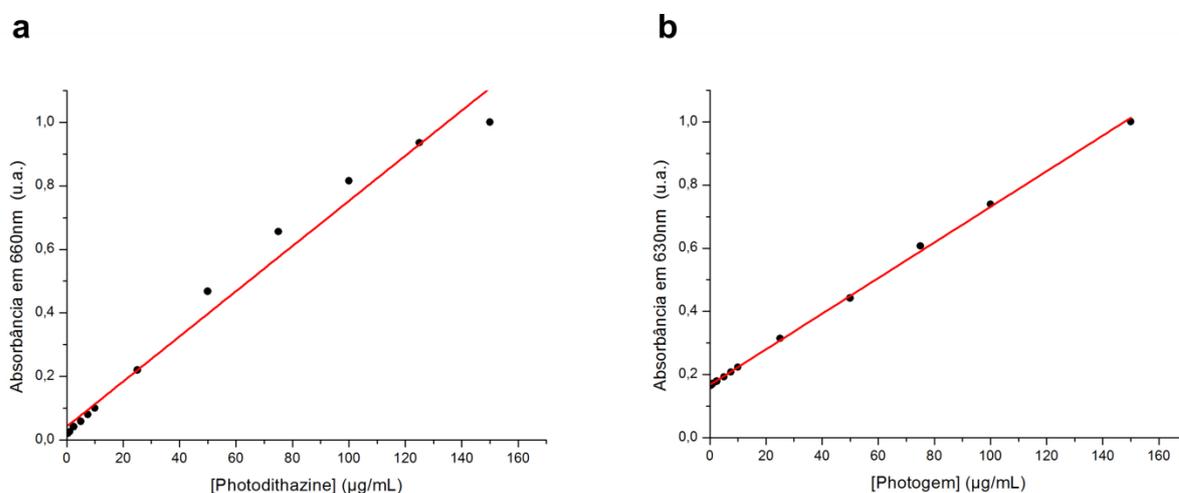


Figura 28 – Gráficos normalizados de absorbância em função da concentração de fotossensibilizadores. Ambos compostos foram diluídos em meio McCoy sem vermelho de fenol, resultando em diferentes soluções com concentrações variáveis, até 150 µg/mL. **a)** No máximo de absorção de 660 nm, é possível observar a dependência linear das medidas de absorbância de acordo com o aumento na concentração de Photodithazine[®]. Contudo, nota-se o início de uma saturação desse fotossensibilizador para a maior concentração, o que se infere a possibilidade de agregação para maiores concentrações. **b)** Novamente no máximo de absorção em 630 nm, percebe-se a linearidade dos dois parâmetros absorbância e concentração. No entanto, o efeito do princípio de saturação não é observado para o Photogem[®].

Fonte: Elaborada pela autora.

Outro teste realizado para se determinar as concentrações de fotossensibilizador adequadas para os futuros experimentos de TFD nos tumores de melanoma foi a avaliação da citotoxicidade celular no escuro, como representada na Figura 29.

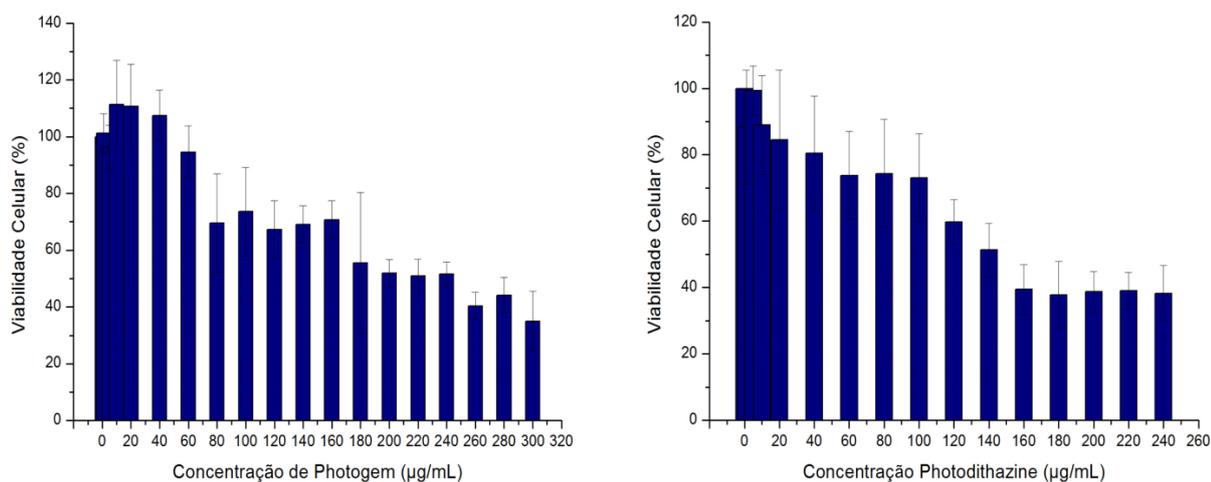


Figura 29 – Gráficos de citotoxicidade no escuro para Photogem[®] e Photodithazine[®] pelo teste colorimétrico MTT. Os tumores de melanoma foram dispostos em placas de 96 poços e incubados com os fotossensibilizadores por 16 horas (*overnight*).

Fonte: Elaborada pela autora.

Observa-se que houve uma redução significativa da viabilidade celular, a partir da concentração de 200 µg/mL para o Photogem[®], correspondendo a aproximadamente 50% de morte celular. Por outro lado, para a mesma concentração de PDZ, a mortalidade das células tumorais foi de 60%. Esse efeito de morte acentuada se iniciou precocemente para o PDZ (160 µg/mL), conferindo maior citotoxicidade no escuro do PDZ em tumores sólidos de melanoma quando comparado com o Photogem[®], como pode ser facilmente observado ao se analisar as duas curvas dose-resposta na função sigmoideal e encontrar IC₅₀ de ambas as moléculas, isto é, a concentração necessária para se reduzir (inibir) em 50% o crescimento celular. Para o caso do Photogem[®] o valor obtido foi de 189 µg/mL, enquanto para o PDZ 138 µg/mL.

Estudos averiguando a maior toxicidade do PDZ ou de outros derivados de clorina em comparação a porfirinas, foram relatados em diversas pesquisas, como por exemplo, o apresentado por Ivanov e colaboradores⁶⁰, que verificaram que o PDZ causou cerca de 17% de inibição no crescimento de células de carcinoma de ovário, enquanto o Photogem não apresentou toxicidade, além do demonstrado por Banfi et al.⁶¹, no qual células tumorais do cólon de útero incubadas com Foscam[®] (clorina) obtiveram citotoxicidade significativamente mais elevada do que o Photofrin[®] (derivado de hematoporfirina). Isso pode ser explicado pelo fato de algumas clorinas, como o Photodithazine, serem mais hidrofóbicas e, portanto, mais permeáveis à membrana celular. Com isso, esses fotossensibilizadores conseguem se difundir melhor pela linhagem celular estudada e apresentar maior citotoxicidade no escuro.

Experimentos para obtenção do coeficiente de partição do Photogem[®] (PG), Photodithazine[®] (PDZ) e hipericina (HY) já foram realizados, verificando que a ordem crescente de hidrofobicidade dessas moléculas foi HY > PDZ > PG.⁶² Dessa forma, como o PDZ é mais lipofílico, é esperado que a sua distribuição nos tumores de melanoma e, conseqüentemente sua toxicidade, seja maior do que o Photogem[®]. De fato, essas duas características foram comprovadas nesse trabalho, seja através do ensaio de MTT, cinética em microscopia confocal, quanto pela quantificação de fotossensibilizador intracelular, como será explicado posteriormente. Logo, os resultados aqui obtidos concordam com a literatura.

Considerando a inspeção da viabilidade ao longo das concentrações e o fato das diluições dos dois fotossensibilizadores não indicarem presença de agregados, foi determinado que o intervalo de 1 µg/mL a 150 µg/mL seria o utilizado para os demais ensaios com TFD, uma vez que esses valores exibiram menor morte tumoral decorrente do efeito tóxico dos fotossensibilizadores, caracterizando doses sub letais.

4.2.3 *Cinética em microscopia confocal*

Imagens espectrais (da fluorescência natural) dos tumores de melanoma incubados com ambos fotossensibilizadores Photogem[®] e Photodithazine[®] na concentração de 50 µg/mL e, com marcador de núcleo laranja de acridina (100 µg/mL), foram obtidas por microscopia confocal como mostrado na Figura 30. A emissão de fluorescência em vermelho (róseo) representa os fotossensibilizadores, enquanto em verde os núcleos celulares.

É possível observar que para as amostras tumorais incubadas com PDZ, a fluorescência do fotossensibilizador se faz presente mesmo em menores tempos de incubação, enquanto para o Photogem[®] isso só ocorre a partir de 12 horas e com menor intensidade. Para que o Photogem[®] tivesse uma presença expressiva nos tumores, foram necessárias 24 horas de incubação e, nos demais tempos, praticamente apenas a fluorescência nuclear foi vista. Isso indica que o PDZ apresentou maior afinidade pelos tumores de melanoma, pois foi necessário apenas 2 horas para que houvesse sua difusão nas culturas. Esse tempo de incubação é condizente com o apresentado por Stranadko et al., visto que o acúmulo de PDZ em diversos tipos de tumores foi apresentado após 1 hora – 2 horas da injeção do fotossensibilizador.⁶³ Então, por se tratar de uma molécula anfifílica e menor do que o Photogem[®], já que o Photogem[®] se apresenta em diferentes formas oligoméricas, se cria a hipótese que o PDZ poderia facilmente se ligar às membranas celulares e ser enviado para outras estruturas intracelulares, fato que corroborou na sua rápida distribuição por toda a cultura.

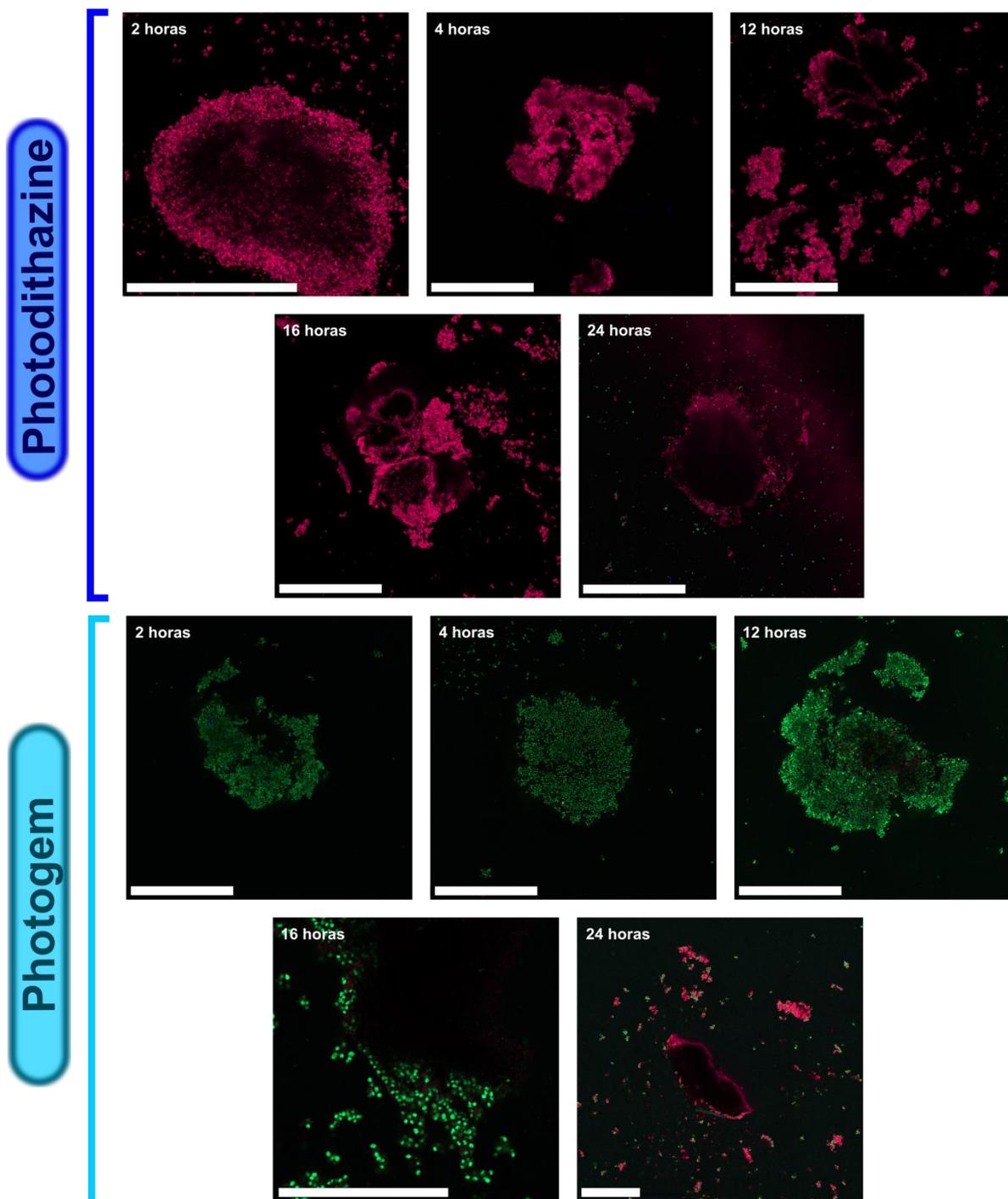


Figura 30 – Imagens espectrais, com aumento de 20 vezes, de tumores de melanoma incubados com Photodithazine® e Photogem®, em diferentes tempos. Escala: 1 mm.

Fonte: Elaborada pela autora.

Outro resultado importante para se avaliar melhor a distribuição dos fotossensibilizadores nas amostras tumorais tratadas foi a aquisição de imagens de fluorescência em dois canais (em vermelho correspondendo às moléculas fotossensibilizadoras e em verde o laranja de acridina). Esse método permite discriminar a

fluorescência dos dois compostos utilizados, bem como a caracterização da sua difusão e localização em estruturas celulares, nesse caso quando na presença de barreiras criadas pela própria organização em crescimento tridimensional, como a produção de matriz extracelular. As imagens são apresentadas na Figura 31.

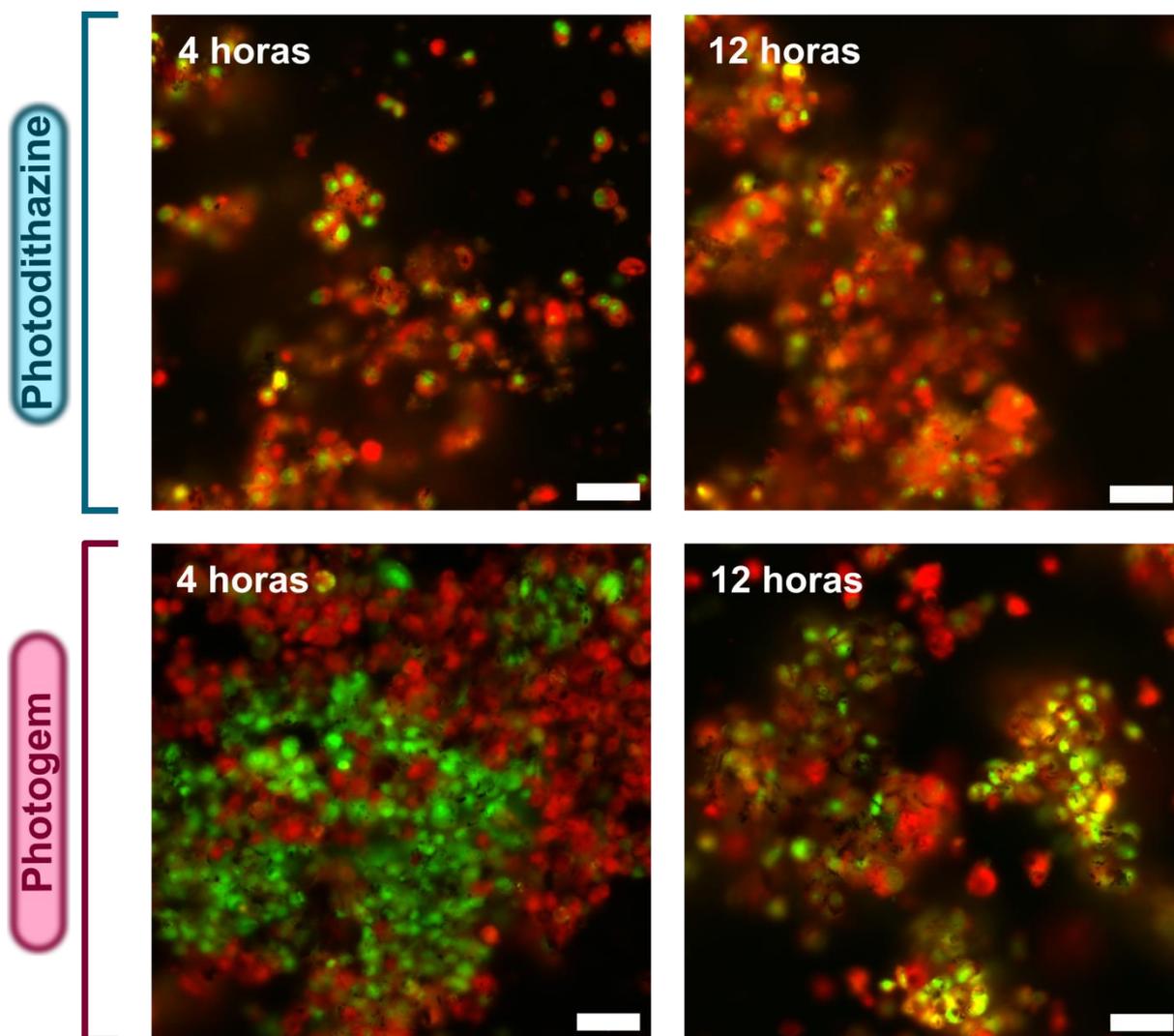


Figura 31 – Imagens de fluorescência em microscopia confocal de tumores de melanoma imersos em solução de PDZ e Photogem[®], ambos na concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$. Destaque para a distribuição homogênea do PDZ nas culturas em detrimento da heterogênea para o Photogem[®]. As imagens foram obtidas com aumento de 40 vezes e a escala refere-se à 50 μm .

Fonte: Elaborada pela autora.

São notáveis as diferenças nas distribuições de ambos fotossensibilizadores nos tumores de melanoma. Embora não tenha sido possível se afirmar a exata localização dos fotossensibilizadores nas estruturas celulares, pode-se inferir pelas imagens que eles se difundiram tanto para o arcabouço da cultura tridimensional, matriz extracelular, quanto para todo o citoplasma. Futuros estudos utilizando marcadores específicos são necessários para

comprovação de interações entre fotossensibilizador e os componentes celulares. Além disso, pode-se observar que o PDZ, mesmo para menores tempos de incubação, apresentou uma distribuição homogênea na cultura, enquanto o Photogem[®] mostrou um acúmulo claramente heterogêneo em 4 horas de incubação e também em 12 horas. Essa distribuição heterogênea do Photogem[®] em células e tumores, já foi demonstrada em diversos estudos, como o apresentado por Vollet-Filho e colaboradores com tecido de fígado.⁶⁴ Isso traz implicações como uma baixa entrega de fotossensibilizador no tecido alvo, acarretando numa deficiente resposta fotodinâmica que culmina na parcialidade ou ausência do tratamento para a doença estudada com TFD. Portanto, os resultados aqui apresentados sugerem que o Phodithazine[®] é o fotossensibilizador melhor indicado, quando comparado com o Photogem[®], para a realização de TFD em tumores de melanoma, por sua rápida e relativamente homogênea incorporação em toda a cultura.

4.2.4 *Quantificação de Photogem[®] e Photodithazine[®] intracelular e modelos 2D e 3D de melanoma humano*

Uma vez que a quantidade de fotossensibilizador intracelular é determinante para a realização de terapia fotodinâmica, pois é a entrega efetiva da molécula no tecido alvo, essa medida foi realizada através da leitura de fluorescência de culturas bidimensionais e tridimensionais de melanoma humano, incubadas com Photogem[®] e Photodithazine[®] em quatro diferentes tempos, como descrito na Tabela 3. Esse experimento permitiu avaliar possíveis diferenças na concentração intracelular dos fotossensibilizadores para cada modelo de cultivo.

O procedimento piloto teve início com a obtenção de uma curva padrão para cada fotossensibilizador, que fornece uma relação entre a leitura de fluorescência de cada molécula nos seus máximos de emissão (660 nm para Photodithazine[®] e 630 nm para o Photogem[®]), e sua concentração. A partir da equação de reta para cada curva padrão, é possível se estimar a concentração de fotossensibilizador intracelular nas amostras incubadas em diferentes tempos. Essas curvas são apresentadas na Figura 32 e obtiveram coeficiente de correlação linear maior $R > 0,97$.

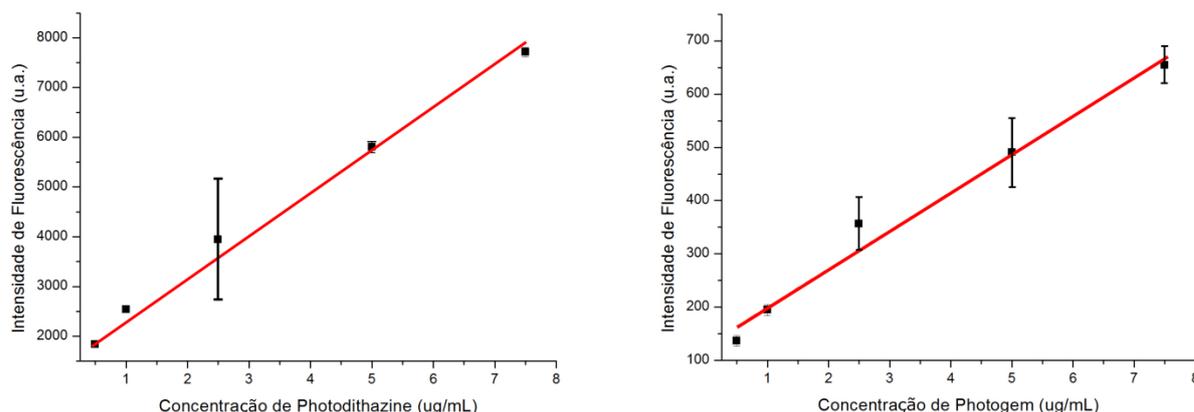


Figura 32 – Curvas de padronização do PDZ e Photogem[®] a partir das intensidades de fluorescência em 660 nm e 630 nm, respectivamente. A excitação foi de 405 nm e ambos fotossensibilizadores estavam diluídos na solução de lise, contendo DMSO 90% e PBS 10%. Os experimentos foram realizados em triplicata.

Fonte: Elaborada pela autora.

Assim, foram feitas as leituras de fluorescência das culturas previamente incubadas com os fotossensibilizadores em diferentes tempos de incubação (4 horas, 8 horas, 16 horas e 24 horas), e lisadas com solução de DMSO 90% e PBS 10%, ou seja, dos fotossensibilizadores intracelulares liberados em solução pós-lise. Por fim, de acordo com as equações de reta das curvas de padronização, foi possível se obter a concentração de Photogem[®] e Photodithazine[®] intracelular conforme as Tabela 6 e Tabela 7, sendo que a primeira é referente aos experimentos realizados com culturas 2D e a segunda com culturas 3D. Os resultados estão representados de acordo com a média e o erro associado à medida, isto é, o desvio padrão.

Tabela 6 – Resultados da quantificação de fotossensibilizadores intracelulares em culturas de melanoma humano em monocamada.

Fotossensibilizador	Tempo de incubação (horas)	Concentração de FS intracelular ($\mu\text{g/mL}$)
Photodithazine[®]	4	(3,00 \pm 0,05)
	8	(3,24 \pm 0,05)
	16	(5,70 \pm 0,11)
	24	(3,45 \pm 0,06)
Photogem[®]	4	(1,52 \pm 0,05)
	8	(2,71 \pm 0,50)
	16	(3,25 \pm 0,59)
	24	(6,14 \pm 0,82)

Fonte: Elaborada pela autora.

Tabela 7 – Resultados da quantificação de fotossensibilizadores intracelulares em culturas tridimensionais de melanoma humano.

Fotossensibilizador	Tempo de incubação (horas)	Concentração de FS intracelular ($\mu\text{g/mL}$)
Photodithazine[®]	4	(0,82 \pm 0,02)
	8	(1,60 \pm 0,03)
	16	(2,67 \pm 0,04)
	24	(1,90 \pm 0,03)
Photogem[®]	4	(0,25 \pm 0,03)
	8	(0,80 \pm 0,10)
	16	(1,08 \pm 0,12)
	24	(1,97 \pm 0,19)

Fonte: Elaborada pela autora.

A quantificação dos fotossensibilizadores intracelulares toma por base a relação de 100% como a concentração inicial no qual as culturas foram incubadas, ou seja, 50 $\mu\text{g/mL}$, e o *uptake* como sendo a porcentagem correspondente à concentração encontrada pelo método da leitura de fluorescência.

Observam-se em ambas as tabelas que houve um aumento no acúmulo de Photodithazine[®] nas 16 horas iniciais de incubação, porém, após 24 horas ocorreu uma diminuição da concentração do fotossensibilizador intracelular. Esse resultado corrobora com a rápida eliminação do PDZ no organismo, como já reportado.⁵¹ Além disso, as diferenças na incorporação do PDZ em culturas bidimensionais e tridimensionais foram claras, uma vez que para o maior valor de concentração intracelular, em 16 horas de incubação, o *uptake* encontrado foi de 11,4% para as células em monocamada e 5,34% para os tumores sólidos de melanoma. A menor quantidade de fotossensibilizador em um modelo tridimensional já era esperada, pois o maior volume celular e a presença de matriz extracelular são limitantes ao processo de difusão das moléculas incubadas na cultura, embora a via de entrega neste experimento seja tópica e nos modelos animais e clínicos endovenosa. Além disso, esse resultado da diminuição na concentração intracelular de Photodithazine[®] em maiores tempos é similar ao apresentado em estudos com injeção de PDZ em diferentes tumores, como de carcinoma basocelular, câncer pulmonar e no estômago, onde aproximadamente 6% do composto administrado permaneceu nos tecidos após 24 horas da administração.⁶³

As diferenças na captação de fotossensibilizador por culturas 2D e 3D foram verificadas nos experimentos de Chan et al., onde foi observado que a incorporação de espécies sulfonadas de alumínio ftalocianina em esferoides foi menor que nas células de

carcinoma colo-retal em monocamada, culminando na diminuição da resposta fotodinâmica pela irradiação.⁶⁵ Além dessa pesquisa, outra realizada por Huygens e colaboradores apontaram as diferenças na captação de derivados iodados de hipericina por células tumorais da bexiga em cultura 2D e 3D (modelo em esferoide). Nesse caso, três diferentes fotossensibilizadores, hipericina, mono – iodohipericina e di – iodohipericina na mesma concentração de 10 μM exibiram, respectivamente, acúmulo aproximado de 10, 9 e 5 vezes maior em monocamada do que em esferoides.⁶⁶ Para o presente trabalho, a relação encontrada do Photodithazine[®] intracelular quantificado foi duas vezes maior nas células de melanoma em comparação com o tumor sólido.

As comparações entre *uptake* de culturas 2D e 3D indicam que características como interações intercelulares em diferentes planos e produção de matriz extracelular, presentes nos tumores obtidos pelo método de levitação magnética, formaram estruturas intrincadas e sólidas que dificultaram a máxima difusão do PDZ. No entanto, mesmo com o menor acúmulo do PDZ nesses tumores sólidos, a sua distribuição ocorreu de forma aparentemente homogênea como apresentado anteriormente nas imagens de fluorescência em microscopia confocal, o que não desmerece a aplicação desse composto para o tratamento do melanoma por TFD.

Por outro lado, o Photogem[®] apresentou um baixo e lento aumento na sua incorporação ao longo das 24 horas de incubação. Nesse tempo, onde a concentração do fotossensibilizador é maior, o *uptake* para as culturas 2D foi em média de 12,3 % e de 3,94% para as culturas 3D. Esses valores demonstram que é necessário um tempo bem maior de incubação para se ter uma quantidade intracelular expressiva do Photogem[®] em tumores e, também, com efeitos semelhantes ao Photodithazine[®] já em processo de eliminação. Outra análise interessante de se lembrar remete aos experimentos nos tumores sólidos de melanoma incubados por 4 horas, no qual o acúmulo de Photogem[®] foi muito pequeno, em torno de 0,5%. Para esse tempo de incubação, houve uma baixa incorporação nas culturas 3D, sendo que esse resultado foi comparável ao mostrado pelas imagens em microscopia confocal, onde a fluorescência real do Photogem[®] praticamente não é vista. Isso aliado à sua distribuição heterogênea encontrada previamente na cultura 3D sugere que o Photogem[®] poderia ter uma baixa eficiência na TFD para o tratamento de melanoma.

Portanto, todos os resultados aqui apresentados indicam que o Photodithazine[®], em especial quando presente nos tumores de melanoma incubados por 16 horas, é melhor indicado para tratamento com TFD. Esses parâmetros foram então os utilizados para os demais experimentos de TFD.

4.2.5 Resposta fotodinâmica de tumores em diferentes espessuras com Photodithazine®

- Terapia fotodinâmica em tumores com 80 µm de espessura

Após o estabelecimento dos tumores de melanoma em esferoides (80 µm de espessura) distribuídos em placas de 96 poços, como descrito na seção 3.1.5, seguiu-se a aplicação da terapia fotodinâmica, com incubação dos tumores com Photodithazine® por 16 horas (*overnight*) e iluminação mediante o uso de dispositivo à base de LED em 660 nm, nas doses de 10 J/cm², 20 J/cm² e 60 J/cm². Os resultados da TFD pelo ensaio de MTT estão apresentados na Figura 33.

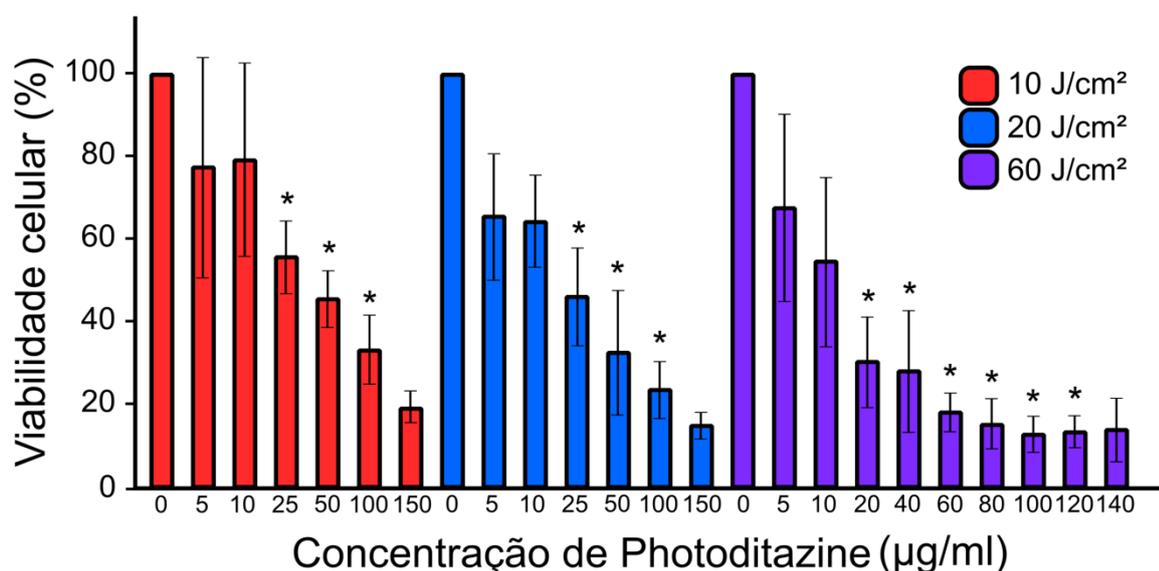


Figura 33 – Gráfico normalizado dos experimentos de TFD em tumores de 80 µm de espessura (placa de 96 poços) com diferentes doses de irradiação, através do ensaio de MTT. Cada dose de luz define um determinado tempo de iluminação, sendo em ordem crescente 7min e 58 s, 15 min e 55 s, 47 min e 45 s. Os respectivos grupos controle designados por “0”, representam as amostras tumorais não incubadas com Photodithazine®. Os grupos identificados por * se referem aos que apresentaram diferença estatística significativa ($p < 0,05$), com relação aos seus respectivos grupos controle.

Fonte: Elaborada pela autora.

A avaliação dos resultados obtidos pelo ensaio de MTT deixa evidente o potencial da TFD sobre os tumores de melanoma humano. Considerando-se que as concentrações de Photodithazine® utilizadas correspondem a doses sub letais, salvo a concentração de 150 µg/mL que demonstrou certa toxicidade no escuro, pode-se garantir que o dano oxidativo resultante do tratamento ocorreu pelo efeito associativo do fotossensibilizador intracelular com a quantidade de luz entregue às amostras tumorais. Também podem-se excluir

considerações térmicas, pois como já foi elucidado anteriormente, não houveram mudanças significativas de temperatura capazes de causar algum dano celular.

Percebe-se que a menor concentração de Photodithazine[®] administrada, no caso 5 µg/mL, resultou em pequenas alterações na viabilidade celular, quando comparadas com o grupo controle, correspondendo à aproximadamente 30% de morte celular para as três medidas de irradiação. Esse valor é estatisticamente baixo, pois é equiparável a manipulações cotidianas de cultura celular, como perda de células por pipetagem ou tripsinização. De fato, variações na viabilidade foram mais visíveis a partir de 20 a 25 µg/mL. Nesse caso, houve um efeito progressivo de morte mediante o aumento das doses de luz. Também é possível observar valores similares de viabilidade celular ao se utilizar concentrações mais baixas do fotossensibilizador conforme o aumento da dose de iluminação, por exemplo, para valores de morte celular de aproximadamente 70%, a concentração de PDZ requerida foi de 100 µg/mL em 10 J/cm², 50 µg/mL para 20 J/cm² e 20 µg/mL com 60 J/cm². Esse efeito alude à necessidade do ajuste nos parâmetros fotodinâmicos para otimização da TFD, logicamente se certificando que os valores não apresentem citotoxicidade no escuro ou fototoxicidade. Contudo, os resultados demonstram que não existe um incremento muito significativo da morte celular em função do aumento da dose de energia entregue. Esse comportamento demonstra que o fator mais limitante da reação fotodinâmica nesse modelo é a baixa concentração intracelular do fotossensibilizador.

De todas as condições experimentais apresentadas, a responsável pelo maior dano foi a maior dose de irradiação com a concentração de Photodithazine[®] de 100 µg/mL. Esse critério proporcionou um decréscimo máximo na sobrevivência celular de $87,3 \pm 4,7$ %. Embora com 150 µg/mL e 20 J/cm² se tenha atingido um valor correlato, essa concentração de PDZ apresentou prévia citotoxicidade no escuro e, portanto, o dano fotodinâmico pode ter sido adquirido por uma junção da própria toxicidade da molécula aliada à iluminação. No entanto, também pode-se ressaltar o resultado encontrado na concentração de 100 µg/mL quando na presença de irradiação a 20 J/cm², visto que a morte celular foi elevada, em torno de $76,5 \pm 7,3$ %.

Os parâmetros experimentais causadores do maior dano pela TFD, descritos anteriormente, são comparáveis com experimentos *in vitro* realizados por Haddad et al. Nesse estudo, células de melanoma B16 em monocamada foram incubadas com alumínio ftalocianina tetrasulfonada (AlPcS₄) e, submetidas a diferentes doses de irradiação (50 J/cm², 100 J/cm² e 200 J/cm²) com lâmpada de xenônio entre 600-720nm. Os respectivos valores de

viabilidade obtidos foram de $15,5 \pm 0,7 \%$, $11,5 \pm 2,1 \%$ e $1,5 \pm 0,7 \%$.⁶⁷ Dessa forma, é possível notar que para a dose de 100 J/cm^2 , o resultado foi semelhante ao encontrado nesse trabalho com Photodithazine® $100 \mu\text{g/mL}$ com iluminação a 60 J/cm^2 . Contudo, vale salientar que os resultados *in vitro* encontrados por Haddad tomaram por base células em culturas 2D que não são representativos de tumores presentes no organismo e, que não exibem aglomerados tridimensionais sólidos que dificultam difusão de fotossensibilizador em estruturas intracelulares. Portanto, todos esses aspectos reforçam a idéia que a aplicação de Photodithazine® traz resultados promissores para o tratamento de tumores de melanoma humano por TFD.

Com o objetivo de se averiguar e comprovar que houve dano celular pela TFD, imagens em microscopia óptica e microscopia confocal de fluorescência (espectral) com uso de marcadores específicos que discriminam células vivas e mortas (descrição na seção 4.1.9), foram adquiridas. Para tanto, foi escolhida uma condição experimental, isto é, dos tumores de melanoma com $80 \mu\text{m}$ de espessura distribuídos em placas de 96 poços, incubadas com Photodithazine® nas concentrações até $150 \mu\text{g/mL}$ e iluminadas com 20 J/cm^2 . As imagens estão apresentadas nas figuras 34 e 35.

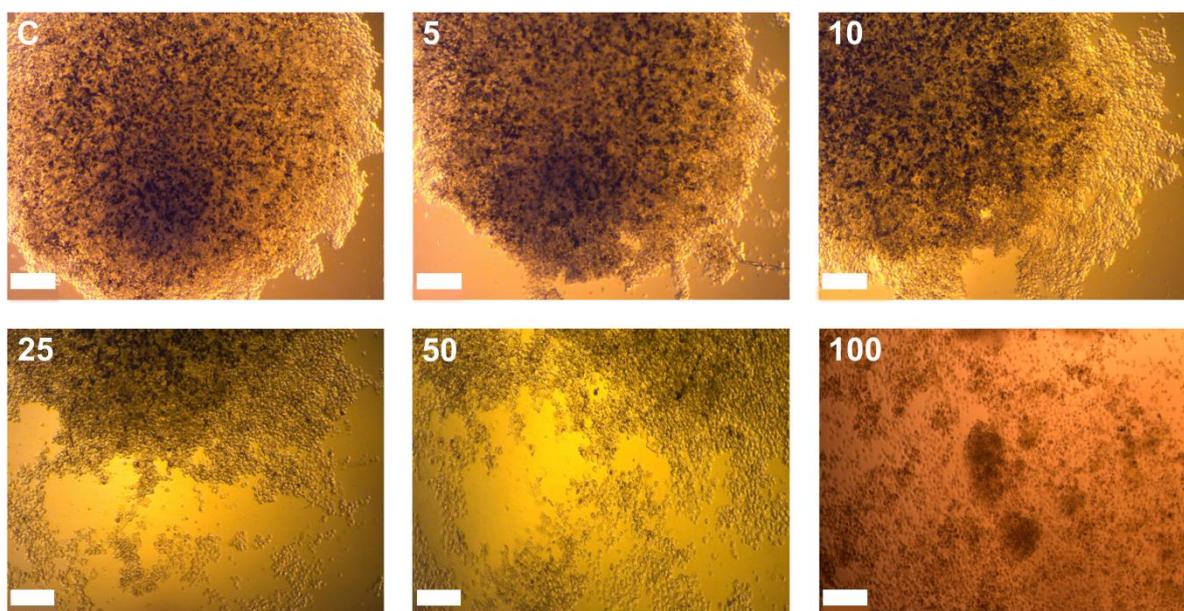


Figura 34 – Imagens em microscopia óptica dos tumores de melanoma humano (com $80 \mu\text{m}$ de espessura) após 24 horas da TFD em 20 J/cm^2 . A letra C representa o grupo controle, enquanto os demais números as concentrações de Photodithazine® utilizadas. Escala: $200 \mu\text{m}$.

Fonte: Elaborada pela autora.

Após as 24 horas da aplicação da TFD, foi possível verificar alguns efeitos da ação fotodinâmica, através das imagens em microscopia tanto óptica quanto confocal de fluorescência. Primeiramente, ao se comparar a cultura 3D controle (sem incubação com fotossensibilizador) com as demais tratadas, podem-se notar fragmentações nas culturas tridimensionais de acordo com o aumento na concentração de Photodithazine[®] (Figura 34). Essa quebra formou aglomerados de diversos tamanhos, a partir da superfície dos tumores, local onde a entrega de luz e fotossensibilizador é mais facilitada. Os aglomerados são resultado da quebra de ligações intercelulares e, possivelmente, da própria matriz extracelular, que corroboraram na perda da integridade dos tumores. Esse efeito é acentuado nas amostras incubadas com concentrações mais altas de PDZ, como de 100 µg/mL, onde as células estão aparentemente espalhadas por todo o poço de cultivo.

Em cultura celular *in vitro*, esses aglomerados, caso sejam formados por células viáveis, podem promover o recrescimento tumoral. Em um organismo, como existe a nutrição e oxigenação promovida pelos vasos sanguíneos, dependendo do tamanho, assim como da sua localização próxima a um vaso, esses aglomerados celulares podem ou não resultar no recrescimento do tumor. Esses fatores somente podem ser investigados em modelos animais, no entanto, a possibilidade de alta desagregação do melanoma, como apresentado nos resultados anteriores, também constitui em uma resposta favorável à TFD.

Agora, para se mostrar qualitativamente o efeito da TFD e a visualização de células de melanoma vivas e mortas após o tratamento, os tumores foram incubados com os marcadores SYTOX[®], que marca de verde as células mortas cuja membrana celular foi danificada, e o C₁₂-resazurin que é reduzido a C₁₂-resofurin em células vivas, emitindo fluorescência vermelha. Na Figura 35, é possível observar que até a concentração de 10 µg/mL de PDZ, praticamente só a fluorescência das células vivas (em vermelho alaranjado) é vista, e os tumores não perderam sua integridade. Contudo, se iniciando com 25 µg/mL, a fluorescência do PDZ também começa a ser vista (vermelho róseo) no aglomerado central e os demais pedaços da cultura apresentam células mortas (verde). Com o aumento da concentração, a quebra dos tumores ficou mais evidente e não houve traços aparentes de células sobreviventes. A presença da fluorescência do fotossensibilizador, nas amostras incubadas com 25 µg/mL e 50 µg/mL de PDZ, indica duas possíveis explicações, que resquícios do composto não saíram na lavagem das amostras com PBS e por isso a sua fluorescência sobrepujou a do marcador de células vivas, ou que células presentes no tumor de melanoma, contendo o fotossensibilizador intracelular, não sofreram degradação pela ação da irradiação, fazendo com que parte da cultura não tivesse recebido dano fotodinâmico. Essa última

proposta é mais coerente, pois a lavagem das amostras é realizada três vezes justamente para evitar excessos de fotossensibilizador nas amostras e, essa análise condiz com os resultados obtidos pelo ensaio de MTT, onde nas concentrações de 25 $\mu\text{g/mL}$ e 50 $\mu\text{g/mL}$ há morte celular significativa, mas não total das células presentes no tumor.

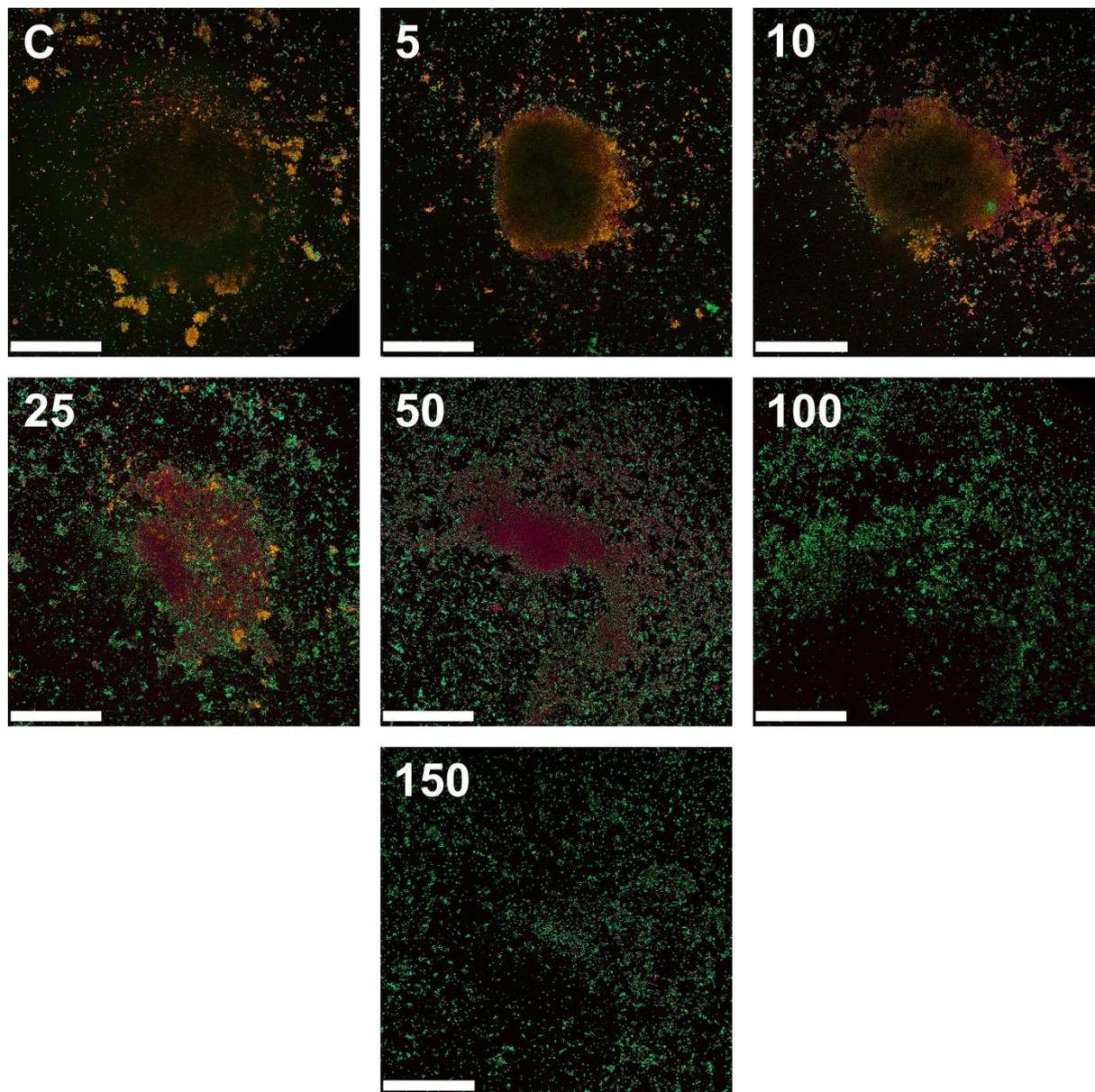


Figura 35 – Imagens em microscopia confocal da fluorescência natural de tumores de melanoma humano (com 80 μm de espessura) incubados com marcadores, após 24 horas da TFD em 20 J/cm^2 . A emissão de fluorescência em verde representa as células mortas (SYTOX[®]), enquanto em vermelho as vivas (C_{12} -resofurin). A letra C é o controle e, os outros números, as concentrações de Photodithazine[®]. Escala: 1 mm.

Fonte: Elaborada pela autora.

Ambos os conjuntos de imagens, tanto de microscopia de fluorescência quanto óptica, se correlacionam com os resultados quantitativos do ensaio de MTT, uma vez que foi observado um dano mais significativo a partir das amostras incubadas com Photodithazine[®] na concentração de 25 µg/mL e, para as outras maiores concentrações, a morte celular foi mais acentuada. Justamente nessas concentrações mais altas, os tumores tiveram uma desagregação tecidual periférica expressiva, chegando a camadas mais no interior do tumor. Desse modo, os resultados apresentados demonstram que a TFD em tumores de melanoma de menor espessura (80 µm) incubadas com Photodithazine[®] obtiveram relativo sucesso.

- Terapia fotodinâmica em tumores com 130 µm de espessura e comparações com resultados obtidos em 80 µm de espessura

Já para os tumores de melanoma obtidos com maior espessura pelo método de levitação magnética (130 µm), através do cultivo em placas de 24 poços como descrito na seção 3.1.4, o procedimento de TFD teve início com a incubação dos tumores com Photodithazine[®] em diferentes concentrações por 16 horas (*overnight*). Esse tempo foi o encontrado em experimentos anteriores que acarretou na maior concentração de Photodithazine[®] intracelular nos tumores. Em seguida, as amostras foram iluminadas a 660 nm em duas doses diferentes de irradiação, 10 J/cm² e 20 J/cm² e, o ensaio de MTT prosseguiu para quantificar a viabilidade celular em função das concentrações de Photodithazine[®] administradas. Nesse caso, a dose de 60 J/cm² não foi escolhida, pois o intuito era analisar se haveriam diferenças na resposta fotodinâmica de acordo com aumento da espessura dos tumores. A dose de 60 J/cm² foi a que acarretou na maior morte tumoral em tumores de 80 µm, e esse dano começou a partir de concentrações mais baixas do fotossensibilizador, como de 20 µg/mL. Portanto, nessa quantidade de luz, poderia haver perda de informações quanto a diferenças morfológicas dos tumores após a TFD, já que os efeitos esperados eram de desagregação dos tumores em função da terapia aplicada e isso poderia ser muito potencializado em 60 J/cm².

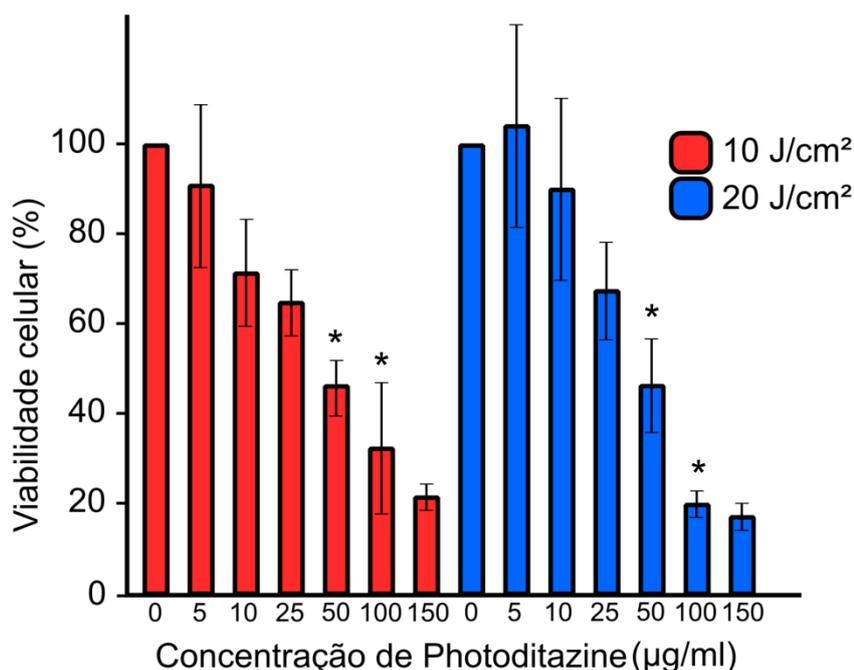


Figura 36 – Gráfico normalizado dos experimentos de TFD em tumores de 130 µm de espessura (placa de 24 poços) com diferentes doses de irradiação, pelo ensaio de MTT. Cada dose de luz corresponde a um tempo de iluminação, nesse caso seus valores crescentes são 5 min e 33s, 11 min e 7s. Os grupos controle (sem incubação com Photodithazine®) são designados como zero no gráfico. Os grupos identificados por * se referem aos que apresentaram diferença estatística significativa ($p < 0,05$), com relação aos seus respectivos grupos controle.

Fonte: Elaborada pela autora.

De modo geral, a TFD nos parâmetros empregados como na Figura 36 resultou em um dano fotodinâmico mais expressivo a partir da concentração de 50 µg/mL de Photodithazine®, uma vez que para os menores valores a viabilidade celular é praticamente equivalente aos respectivos grupos controle. Contudo, mesmo para essa concentração não se veem diferenças entre as duas doses de irradiação empregadas, onde a morte celular em ambos os casos foi de aproximadamente 55 %. Mudanças na viabilidade em relação às duas quantidades de iluminação, aparecem com 100 µg/mL e, nessa concentração, se encontra o resultado de melhor desempenho da TFD, com morte celular de $79,2 \pm 3,1$ %, mediante emprego da dose de 20 J/cm². Esses dados concordam com as imagens em microscopia óptica dos tumores espessos apresentados na Figura 37, que demonstra os tumores de melanoma (130 µm de profundidade) 24 horas depois da TFD a 20 J/cm².

Observa-se um princípio de desagregação da cultura 3D mais tardio, em 50 µg/mL e, nas demais concentrações, a quebra das estruturas tridimensionais permeia as margens da cultura. Dessa forma, fica claro que os tumores obtidos em placas de 24 poços, constituídos por uma estrutura celular mais densa e espessa, ofereceram maior resistência à TFD, pois

houve a necessidade de concentrações elevadas de Photodithazine[®] para se obter alterações morfológicas nas culturas tridimensionais. Além disso, como ainda há resquício de grandes aglomerados celulares mesmo nas concentrações mais altas de Photodithazine[®], é possível se inferir que não houve destruição completa dos tumores. Logo, estudos futuros avaliando recrescimento tumoral dias após a terapia são necessários para confirmar se houve recorrência da doença, como o acompanhamento da viabilidade celular e do tamanho dos tumores ao longo do tempo.

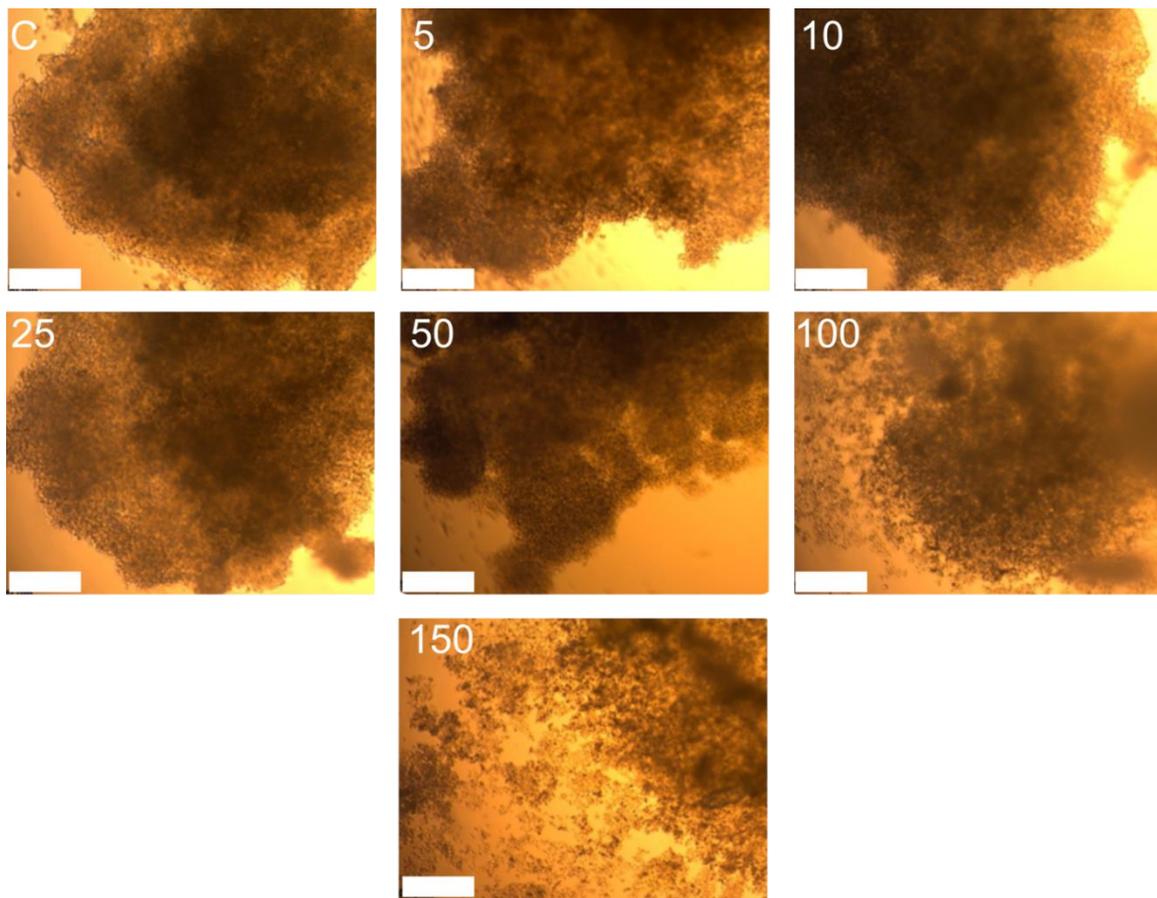


Figura 37 – Imagens em microscopia óptica, com aumento de 5 vezes, dos tumores de melanoma humano com 130 μm de espessura, após 24 horas da TFD com 20 J/cm^2 . Estão representados os tumores do grupo controle e os demais incubados com Photodithazine[®], em concentrações crescentes. Escala: 200 μm .

Fonte: Elaborada pela autora.

Considerando-se as diferenças na resposta da TFD em tumores de diferentes espessuras, essas características são mais evidentes ao se colocar lado a lado os resultados do ensaio de MTT para a mesma dose de irradiação (20 J/cm^2), como esquematizado na Figura 38. É notável como os tumores menos espessos (80 μm) foram mais sensíveis à TFD. Esse efeito era esperado pois as problemáticas em se tratar tumores de melanoma remetem à presença de melanina e ao seu rápido crescimento vertical em camadas inferiores da pele,

características que dificultam a difusão dos fotossensibilizadores e a entrega de luz em amostras tumorais de maior profundidade. Dessa forma, tumores menos espessos necessitam de menores concentrações de fotossensibilizador para exibir uma morte celular mais acentuada.

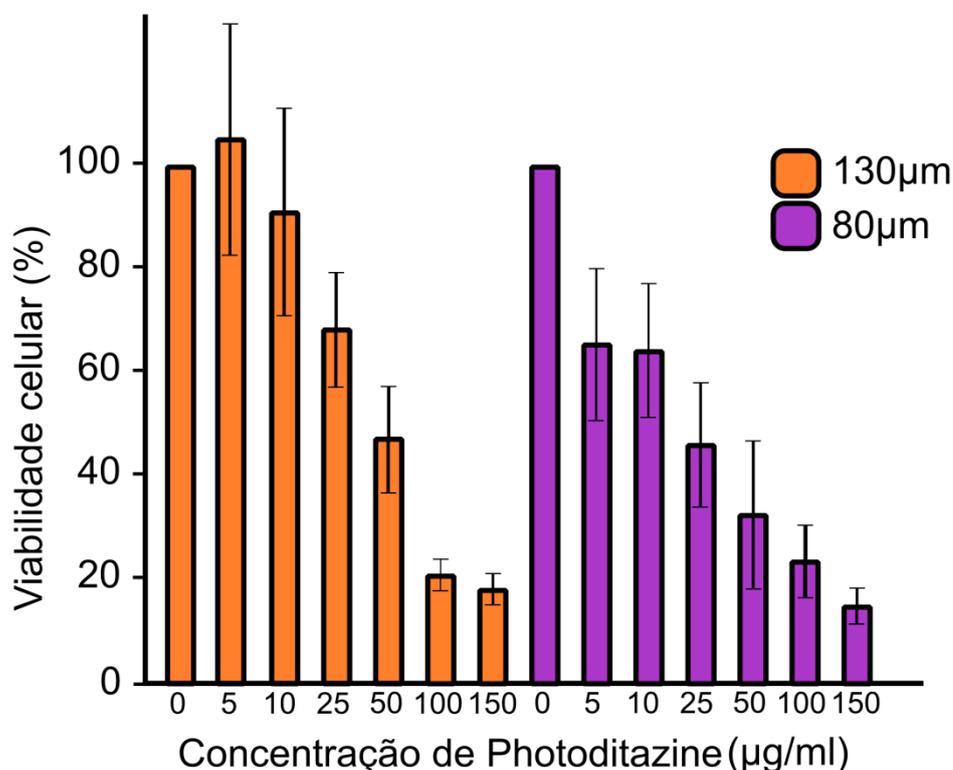


Figura 38 – Comparativo da resposta fotodinâmica em tumores de diferentes espessuras, para a mesma dose de irradiação (20 J/cm²) e intervalo de concentrações de Photodithazine[®].

Fonte: Elaborada pela autora.

No entanto, como foi observado que o aumento na dose de irradiação não acarretou em mudanças muito significativas na morte celular (resultados mostrados nos experimentos com tumores de 80 µm de espessura), um possível parâmetro que pode ser alterado para aumentar a eficiência da TFD com o Photodithazine[®] seria o número de seções, já que os experimentos foram realizados com uma única seção de TFD e o melanoma, por ser um tumor altamente agressivo, necessitaria de uma completa eliminação das células neoplásicas. Atualmente existem protocolos clínicos que indicam o tratamento de doenças com duas ou mais seções,⁶⁸ como é o caso do tratamento empregando duas seções de TFD com aminolevulinato de metila (MAL), em pacientes com carcinoma basocelular, que apresentou 92 % de remissão da doença para os casos superficiais e, 87 % para os nodulares.⁶⁹ Além disso, para a queratose actínica, resultados similares foram encontrados aplicando o mesmo

fotossensibilizador, com 91 % dos pacientes com atenuação da doença.⁷⁰ Desse modo, considerando que os estudos desse trabalho demonstraram uma resposta fotodinâmica mais efetiva do Photodithazine[®] em comparação com o Photogem[®], o uso do Photodithazine[®] em mais de uma sessão de TFD para melanoma, pode resultar em efeitos promissores no tratamento dessa doença.

4.2.6 *BioAssay*

O BioAssay foi outra análise realizada para avaliar a viabilidade celular após o tratamento com TFD.⁷¹ Após a TFD nos tumores em placas de 96 poços, incubados com Photodithazine[®] (80 µm de espessura) e com duas doses de irradiação, 10 J/cm² e 20 J/cm², cada placa foi levada ao suporte do kit BioAssay, o iPod foi posicionado abaixo da placa e, a fonte de luz branca acoplada ao temporizador foi colocada sobre o arranjo, para melhorar o contraste das imagens. Os resultados foram extraídos da aquisição das imagens ao longo do tempo. Na Figura 39, estão representadas as imagens no início e final para a dose de 10 J/cm², enquanto a Figura 40 é referente a 20 J/cm².

De modo geral, é possível notar a alteração na coloração do meio de cultura para os grupos controle e aqueles tratados com menores concentrações de Photodithazine[®]. Em especial, com irradiação em 10 J/cm², observa-se uma cor amarelada até aproximadamente a concentração de 10 µg/mL, enquanto para os demais essa mudança na cor do meio não é tão evidente. Para 20 J/cm², a cor amarela é mais acentuada nas concentrações de 1 µg/mL e 5 µg/mL, enquanto para as outras, esse efeito diminui gradativamente. Esses resultados se relacionam com o ensaio de MTT, uma vez que não foram observadas mudanças significativas na morte celular com o aumento da dose de luz entregue e, com o BioAssay, as alterações na coloração do meio foram semelhantes tanto para os tumores submetido à iluminação com 10 J/cm² quanto 20 J/cm². Além disso, a morte celular foi mais acentuada, para ambas as doses de irradiação, a partir de 25 µg/mL e, portanto, é esperado que nesse teste de BioAssay, para concentrações acima desse valor não se tenham alterações nos tumores ao longo do tempo, porque o metabolismo celular foi prejudicado pela TFD.

A diferença na coloração do meio ocorreu devido à atividade metabólica das células viáveis que consomem os nutrientes da solução e alteram o pH para ácido.* Esse efeito foi reportado por Otto Warburg, onde células tumorais por criarem um ambiente deficitário em oxigênio, trocam o fornecimento de energia da respiração aeróbia pela fermentação anaeróbia.⁷² Assim, a conversão de piruvato para ácido lático, através da fermentação, pelas células tumorais metabolicamente ativas (vivas) induz o processo de acidificação do meio de cultura, pois o ácido lático se acumula nas células e depois é liberado no meio. De fato, mutação em genes nucleares, componentes da cadeia respiratória e mais especificamente do ciclo de Krebs, foram demonstradas por Isidoro e colaboradores, provocando essa alteração na via metabólica celular para anaeróbia e, um aumento na expressão de marcadores glicolíticos em células cancerígenas.⁷³

Em concentrações baixas de Photodithazine[®] é possível perceber uma diminuição dos tumores, devido à contração dos mesmos na presença de células vivas, especialmente para os grupos controle. Contudo, é difícil perceber visivelmente a diminuição dos tumores, isso porque após a TFD os tumores acabam se desagregando, dispersando parte da cultura 3D nos poços. Assim, o contraste das imagens é dificultado e, a análise da contração dos tumores não se torna o método mais adequado para quantificar a viabilidade celular ao longo dos dias. Portanto, embora o BioAssay permita ter essa informação temporal da contração dos tumores, e o kit contenha um programa para quantificar os tamanhos do tumores ao longo dos dias, levando a análises da citotoxicidade celular em tempo real, esse método não foi o analisado nesse trabalho.

Possivelmente, outros parâmetros teriam que ser variados para que esse efeito da contração fosse mais aparente, como por exemplo, um aumento expressivo na quantidade de células por poço, para que os esferoides tivessem um tamanho muito maior inicialmente e, com o tempo, a diminuição dos tumores pela presença das células vivas de melanoma humano, fosse destacada. Mesmo assim, como a TFD promoveu a desagregação dos tumores, principalmente com concentrações mais altas de Photodithazine[®], ainda não seria garantia que nessas condições a análise das imagens teria algum sucesso.

* O vermelho de fenol ou fenolsulfoftaleína, é um indicador de pH encontrado nos meios de cultura, que apresenta coloração amarela em pH ácido (< 6,8), vermelho em pH intermediário e em pH básico (> 8,2) uma cor rosa brilhante (fúcsia). Além de ajudar no monitoramento da cultura de células, indicando quando o meio precisa ser trocado para reposição dos nutrientes necessários no crescimento celular, ele também foi estudado como um componente que auxilia na proliferação celular, cujo efeito obteve uma dependência com a sua dose.

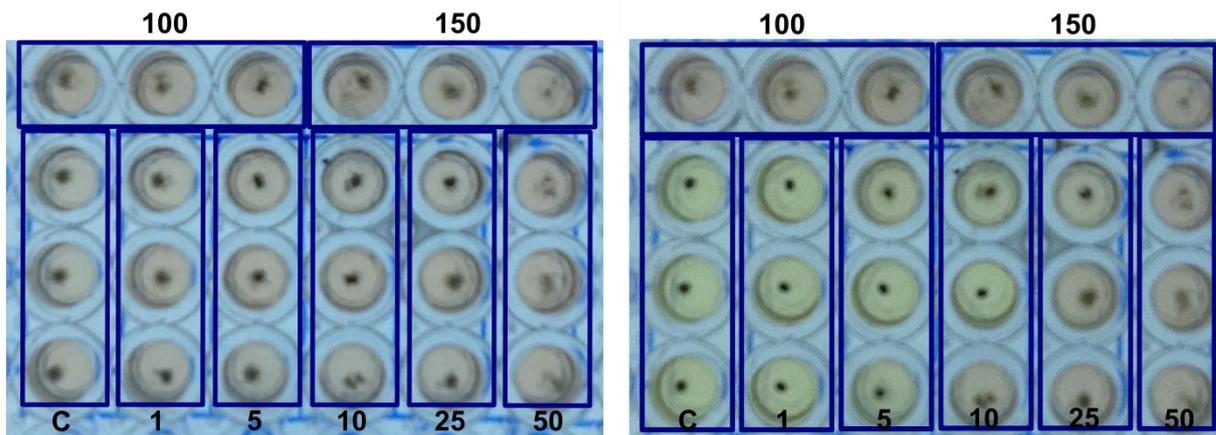


Figura 39 – Esferoides em placa de 96 poços após 1 hora de impressão magnética. No lado esquerdo se tem a imagem inicial com ensaio de BioAssay, logo após a TFD com $10\text{J}/\text{cm}^2$, enquanto no direito a imagem final 48 horas depois da terapia. Os números indicados na figura representam as concentrações de Photodithazine[®] utilizadas nos experimentos de TFD.

Fonte: Elaborada pela autora.

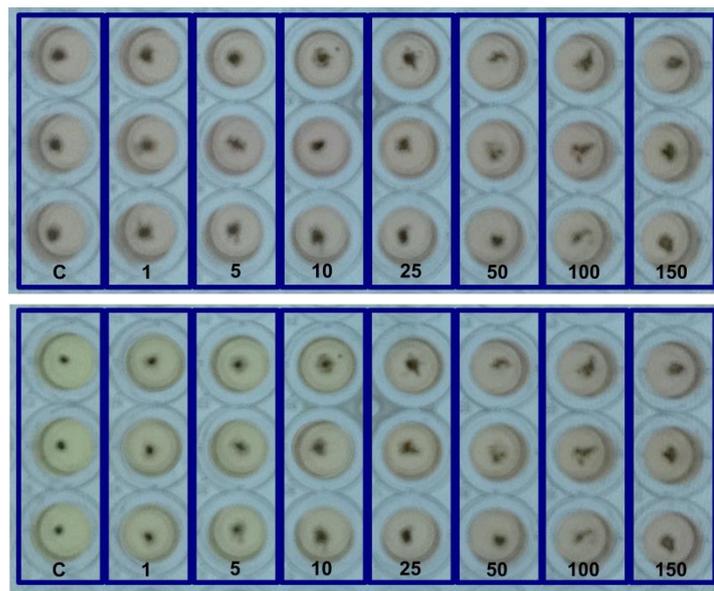


Figura 40 – Esferoides em placa de 96 poços após 1 hora de impressão magnética. Acima está a imagem inicial logo após TFD com $20\text{J}/\text{cm}^2$, e abaixo 48 horas depois do tratamento. Para cada concentração de Photodithazine[®], as amostras tumorais estavam em triplicata.

Fonte: Elaborada pela autora.

5 CONCLUSÃO

A resposta fotodinâmica em melanoma humano foi investigada em um modelo de tumor tridimensional, por levitação magnética. Os resultados descritos nesse trabalho indicam que o Photodithazine[®] apresentou uma melhor distribuição intratumoral em comparação ao Photogem[®], tanto na homogeneidade, como mostrado nos estudos de cinética em microscopia confocal, quanto na concentração e tempo de internalização celular, onde o *uptake* foi de aproximadamente 5,34% para tumores incubados por 16 horas com o fotossensibilizador. Isso pode ser explicado pelo fato do Photodithazine[®] ser mais hidrofóbico do que o Photogem[®], conferindo um rápido e maior acúmulo nas células tumorais.

Os melhores resultados de TFD foram obtidos com a concentração do Photodithazine[®] de 100 µg/mL e dose de irradiação de 60 J/cm², porém a morte celular não foi superior a 90% nos tumores de 80 µm de espessura e, foi observado que variações na quantidade de luz entregue não resultaram em mudanças muito expressivas no dano celular. Além disso, os tumores de 130 µm de espessura apresentaram resposta inferior aos de 80 µm, como o esperado dado o seu maior volume celular.

Considerando que o melanoma é um tipo de câncer muito agressivo, com resistência aos tratamentos convencionais e de rápido crescimento tumoral, a completa eliminação das células neoplásicas se faz necessária. Logo, o principal fator limitante encontrado para obtenção de uma reação fotodinâmica mais efetiva foi a baixa concentração intracelular do fotossensibilizador, resultante de uma difusão dificultada pela presença de matriz extracelular e maior volume celular, quando comparado às culturas em monocamada. No entanto, embora a morte tumoral nesse modelo não tenha sido completa, a TFD promoveu a desagregação dos tumores, como foi demonstrado nas imagens em microscopia óptica e confocal de fluorescência, onde o decréscimo na sobrevivência celular foi próximo a 90%. Essas características demonstraram que a utilização do Photodithazine[®] aliada à irradiação com LEDs de 660nm, levou a resultados favoráveis na TFD. Uma possível alternativa para se aprimorar os parâmetros de TFD é a aplicação de múltiplas sessões, como normalmente utilizado nos protocolos clínicos para carcinoma basocelular e queratose actínica, podendo resultar em um aumento da eficiência da terapia para o tratamento do melanoma humano.

REFERÊNCIAS

- 1 GARBE, C. et al. Diagnosis and treatment of melanoma. European consensus-based interdisciplinary guideline-Update 2012. **European Journal of Cancer**, v. 48, n. 15, p. 2375-2390, Oct. 2012. ISSN 1879-0852. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22981501> >. Acesso em 01/12/2015.
- 2 CARVALHO, C. A. et al. Melanoma hereditário: prevalência de fatores de risco em um grupo de pacientes no Sul do Brasil. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 79, p. 53-60, 2004. ISSN 0365-0596. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0365-05962004000100006&nrm=iso >. Acesso em 01/12/2015.
- 3 FERNANDES, N. C. et al. Melanoma cutâneo: estudo prospectivo de 65 casos. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 80, p. 25-34, 2005. ISSN 0365-0596. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0365-05962005000100004&nrm=iso >. Acesso em 01/12/2015.
- 4 TYPES of melanoma. Disponível em: < <http://www.cancerresearchuk.org/about-cancer/type/melanoma/about/types-of-melanoma> >. Acesso em: 01/12/2015.
- 5 FORMAN, S. B. et al. Is superficial spreading melanoma still the most common form of malignant melanoma? **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 58, n. 6, p. 1013-1020, 2008. ISSN 0190-9622. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaad.2007.10.650> >. Acesso em: 06/01/2016.
- 6 MACKIE, R. M. **Skin cancer: an illustrated guide to the aetiology, clinical features, pathology and management of benign and malignant cutaneous tumours**. Boca Raton: CRC Press, 1996. 368p.
- 7 NATIONAL CANCER INSTITUTE. **Melanoma treatment**. Disponível em: < <http://www.cancer.gov/types/skin/patient/melanoma-treatment-pdq> >. Acesso em: 02/12/2015.
- 8 PFLUGFELDER, A. et al. Malignant melanoma S3-guideline “Diagnosis, therapy and follow-up of melanoma”. **JDDG: Journal Der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft**, v. 11, n. s6, p. 1-116, 2013. ISSN 1610-0387. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1111/ddg.12113_suppl >. Acesso em 01/12/2015.
- 9 CLARK, W. H. et al. The histogenesis and biologic behavior of primary human malignant melanomas of the skin. **Cancer Research**, v. 29, n. 3, p. 705-727, 1969. Disponível em: < <http://cancerres.aacrjournals.org/content/29/3/705.abstract> >. Acesso em 01/12/2015.
- 10 BRESLOW, A. Thickness, cross-sectional areas and depth of invasion in the prognosis of cutaneous melanoma. **Annals of Surgery**, v. 172, n. 5, p. 902-908, 1970. ISSN 0003-4932 1528-1140. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1397358/> >. Acesso em 01/12/2015.

- 11 MORTON, D. L. et al. Technical details of intraoperative lymphatic mapping for early stage melanoma. **Archives of Surgery**, v. 127, n. 4, p. 392-399, 1992. ISSN 0004-0010. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1001/archsurg.1992.01420040034005> >. Acesso em 01/12/2015.
- 12 BALCH, C. M. et al. Final version of 2009 AJCC melanoma staging and classification. **Journal of Clinical Oncology**: official journal of the american society of clinical oncology, v. 27, n. 36, p. 6199-6206, Dec. 2009. ISSN 1527-7755. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19917835> >. Acesso em 01/12/2015.
- 13 WHAT you need to know about melanoma, 2014. Disponível em: < <http://blog.houstonmethodist.org/need-know-melanoma/> >. Acesso em 01/12/2015.
- 14 INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. **Pele melanoma**. Disponível em: < http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/pele_melanoma/ >. Acesso em: 01/12/2015.
- 15 SAHIN, S. et al. Predicting ten-year survival of patients with primary cutaneous melanoma: corroboration of a prognostic model. **Cancer**, v. 80, n. 8, p. 1426-1431, Oct. 1997. ISSN 0008-543X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9338466> >. Acesso em 01/12/2015.
- 16 SIMPLICIO, F. I.; MAIONCHI, F.; HIOKA, N. Terapia fotodinâmica: aspectos farmacológicos, aplicações e avanços recentes no desenvolvimento de medicamentos. **Química Nova**, v. 25, p. 801-807, 2002. ISSN 0100-4042. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422002000500016&nrm=iso >. Acesso em 01/12/2015.
- 17 DOLMANS, D. E. J. G. J.; FUKUMURA, D.; JAIN, R. K. Photodynamic therapy for cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 3, n. 5, p. 380-387, 2003. ISSN 1474-175X. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/nrc1071> >. Acesso em 01/12/2015.
- 18 KESSEL, D. **Optical methods for tumor treatment and detection**: mechanism and techniques in photodynamic therapy XIV. San Jose: SPIE, 2005. (SPIE proceedings, v.5689).
- 19 ROBERTS, D. J. H.; CAIRNDUFF, F. Photodynamic therapy of primary skin cancer: a review. **British Journal of Plastic Surgery**, v. 48, n. 6, p. 360-370, 1995. ISSN 1748-6815. Disponível em: < [http://dx.doi.org/10.1016/S0007-1226\(95\)90065-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0007-1226(95)90065-9) >. Acesso em: 01/05/2016.
- 20 ABDEL-KADER, M. H. **Photodynamic therapy**: from theory to application. New York: Springer Science & Business Media, 2014.
- 21 LUKSIENE, Z. Photodynamic therapy: mechanism of action and ways to improve the efficiency of treatment. **Medicina**, v. 39, n. 12, p. 1137-1150, 2003. ISSN 1010-660X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14704501> >. Acesso em 01/12/2015.
- 22 ZHU, Z. et al. Regulation of singlet oxygen generation using single-walled carbon nanotubes. **Journal of the American Chemical Society**, v. 130, n. 33, p. 10856-10857, 2008.

ISSN 0002-7863. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1021/ja802913f> >. Acesso em 01/12/2015.

23 BECKER, J. L.; SOUZA, G. R. Using space-based investigations to inform cancer research on Earth. **Nature Reviews Cancer**, v. 13, n. 5, p. 315-327, 2013. ISSN 1474-175X. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/nrc3507> >. Acesso em 01/12/2015.

24 CHOROMAŃSKA, A. et al. **Can photodynamic therapy be an alternative method in melanoma treatment?**. Treatment of metastatic melanoma, 2011. Disponível em: < <http://www.intechopen.com/books/treatment-of-metastatic-melanoma/can-photodynamic-therapy-be-an-alternative-method-in-melanoma-treatment-> >. Acesso em 01/12/2015.

25 JUZENIENE, A.; NIELSEN, K. P.; MOAN, J. Biophysical aspects of photodynamic therapy. **Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology**: official organ of the international society for environmental toxicology and cancer, v. 25, n. 1-2, p. 7-28, 2006. ISSN 0731-8898. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16566708> >. Acesso em 01/12/2015.

26 AGOSTINIS, P. et al. Photodynamic therapy of cancer: an update. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 61, n. 4, p. 250-281, 2011. ISSN 1542-4863. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21617154> >. Acesso em 01/12/2015.

27 HAMBLIN, M. R.; WAYNANT, R. W.; ANDERS, J. **Mechanisms for low-light therapy**. San Jose: SPIE, 2006. (SPIE proceedings, v.6140).

28 SHELEG, S. V. et al. Photodynamic therapy with chlorin e6 for skin metastases of melanoma. **Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine**, v. 20, n. 1, p. 21-26, 2004. ISSN 1600-0781. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-0781.2004.00078.x> >. Acesso em 01/12/2015.

29 BALDEA, I.; FILIP, A. G. Photodynamic therapy in melanoma-an update. **Journal of Physiology and Pharmacology**: an official journal of the polish physiological society, v. 63, n. 2, p. 109-118, Apr. 2012. ISSN 1899-1505. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22653896> >. Acesso em 01/12/2015.

30 BRESLIN, S.; O'DRISCOLL, L. Three-dimensional cell culture: the missing link in drug discovery. **Drug Discovery Today**, v. 18, n. 5-6, p. 240-249, Mar. 2013. ISSN 1878-5832. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23073387> >. Acesso em 01/12/2015.

31 BISSELL, M. J.; RIZKI, A.; MIAN, I. S. Tissue architecture: the ultimate regulator of breast epithelial function. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 15, n. 6, p. 753-762, Dec. 2003. ISSN 0955-0674. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14644202> >. Acesso em 01/12/2015.

32 WEAVER, V. M. et al. Reversion of the malignant phenotype of human breast cells in three-dimensional culture and in vivo by integrin blocking antibodies. **Journal of Cell Biology**, v. 137, n. 1, p. 231-45, Apr. 1997. ISSN 0021-9525. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9105051> >. Acesso em 01/12/2015.

- 33 XU, X.; FARACH-CARSON, M. C.; JIA, X. Three-dimensional in vitro tumor models for cancer research and drug evaluation. **Biotechnology Advances**, v. 32, n. 7, p. 1256-1268, Nov. 2014. ISSN 1873-1899. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25116894> >. Acesso em 01/12/2015.
- 34 PAMPALONI, F.; REYNAUD, E. G.; STELZER, E. H. K. The third dimension bridges the gap between cell culture and live tissue. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 8, n. 10, p. 839-845, 2007. ISSN 1471-0072. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/nrm2236> >. Acesso em 01/12/2015.
- 35 HAYCOCK, J. W. 3D cell culture: a review of current approaches and techniques. **Methods in Molecular Biology**, v. 695, p. 1-15, 2011. ISSN 1940-6029. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21042962> >. Acesso em 01/12/2015.
- 36 SOUZA, G. R. et al. Three-dimensional tissue culture based on magnetic cell levitation. **Nature Nanotechnology**, v. 5, n. 4, p. 291-296, 2010. ISSN 1748-3387. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/nnano.2010.23> >. Acesso em 01/12/2015.
- 37 TSENG, H. et al. Assembly of a three-dimensional multitype bronchiole coculture model using magnetic levitation. **Tissue Engineering: part c methods**, v. 19, n. 9, p. 665-675, Sept. 2013. ISSN 1937-3392. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23301612> >. Acesso em 01/12/2015.
- 38 SOUZA, G. R. et al. Bottom-up assembly of hydrogels from bacteriophage and Au nanoparticles: the effect of cis- and trans-acting factors. **PLoS ONE**, v. 3, n. 5, p. e2242, 2008. Disponível em: < <http://dx.plos.org/10.1371%2Fjournal.pone.0002242> >. Acesso em 01/12/2015.
- 39 SOUZA, G.R. et al. Networks of gold nanoparticles and bacteriophage as biological sensors and cell-targeting agents. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 5, p. 1215-1220, 2006. ISSN 0027-8424 1091-6490. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1346765/> >. Acesso em 01/12/2015.
- 40 HAISLER, W. L. et al. Three-dimensional cell culturing by magnetic levitation. **Nature Protocols**, v. 8, n. 10, p. 1940-1949, 2013. ISSN 1754-2189. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/nprot.2013.125> >. Acesso em 01/12/2015.
- 41 TSENG, H. et al. A spheroid toxicity assay using magnetic 3D bioprinting and real-time mobile device-based imaging. **Scientific Reports**, v. 5, p. 13987, 2015. ISSN 2045-2322. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26365200> >. Acesso em 01/12/2015.
- 42 TSENG, H. et al. A three-dimensional co-culture model of the aortic valve using magnetic levitation. **Acta Biomaterialia**, v. 10, n. 1, p. 173-182, Jan. 2014. ISSN 1878-7568. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24036238> >. Acesso em 01/12/2015.
- 43 n3D Biosciences, Inc. Disponível em: < <http://www.n3dbio.com> >. Acesso em: 10/12/2015.

- 44 NANO3D BIOSCIENCES INC. Glauco Souza. **Hardware for magnetic 3d culture**. WO2013019212, Feb. 2013.
- 45 CIAPETTI, G. et al. In vitro evaluation of cell/biomaterial interaction by MTT assay. **Biomaterials**, v. 14, n. 5, p. 359-364, Apr. 1993. ISSN 0142-9612. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8507779> >. Acesso em 01/12/2015.
- 46 ALBERTS, B. et al. **Molecular biology of the cell**. 5th edition. New York: Garland Science, 2007. ISBN 978-0-8153-4105-5. Acesso em 01/12/2015.
- 47 CURTIS, A. S. et al. Adhesion of cells to polystyrene surfaces. **Journal of Cell Biology**, v. 97, n. 5, p. 1500-1506, Nov. 1983. ISSN 0021-9525. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6355120> >. Acesso em 01/12/2015.
- 48 LARSON, A. R. et al. Melanoma spheroid formation involves laminin-associated vasculogenic mimicry. **The American Journal of Pathology**, v. 184, n. 1, p. 71-78, 2014. ISSN 0002-9440. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0002944013006779> >. Acesso em 01/12/2015.
- 49 LIU, W. et al. Rate of growth in melanomas: characteristics and associations of rapidly growing melanomas. **Archives of Dermatology**, v. 142, n. 12, p. 1551-1558, 2006. ISSN 0003-987X. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1001/archderm.142.12.1551> >. Acesso em 01/12/2015.
- 50 SPIKES, J. D. New trends in photobiology: Chlorins as photosensitizers in biology and medicine. **Journal of Photochemistry and Photobiology**, v. 6, n. 3, p. 259-274, 1990. ISSN 1011-1344. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/101113449085096F> >. Acesso em 01/12/2015.
- 51 MENEZES, P. F. C. **Estudos espectroscópicos e citotóxicos do Photogem fotodegradado e dos fotoprodutos formados pela irradiação com laser**. 2006. 181p (Doutorado em Ciências). Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2006.
- 52 SILVA, R. C. **Avaliação da eficiência fotodinâmica de fotossensibilizadores com aplicação em terapia fotodinâmica**. 2007. 71p (Mestrado em Ciências). Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2007.
- 53 CORREA, J. C. **Fotodegradação do Photodithazine e citotoxicidade dos fotoprodutos formados após irradiação com laser**. 2006. 114p (Mestrado em Ciências). Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2006.
- 54 PASTERNAK, R. F. et al. Aggregation of meso-substituted water-soluble porphyrins. **Journal of the American Chemical Society**, v. 94, n. 13, p. 4511-4517, 1972. ISSN 0002-7863. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1021/ja00768a016> >. Acesso em 01/12/2015.
- 55 UCHOA, A. F. et al. Chlorin photosensitizers sterically designed to prevent self-aggregation. **Journal of Organic Chemistry**, v. 76, n. 21, p. 8824-8832, Nov. 2011. ISSN

1520-6904. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21932835> >. Acesso em 01/12/2015.

56 HAMBLIN, M. R. et al. Pegylation of charged polymer-photosensitizer conjugates: effects on photodynamic efficacy. **British Journal of Cancer**, v. 89, n. 5, p. 937-943, 2003. ISSN 0007-0920. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/sj.bjc.6601210> >. Acesso em 01/12/2015.

57 SOBCZYŃSKI, J.; TØNNESEN, H. H.; KRISTENSEN, S. Influence of aqueous media properties on aggregation and solubility of four structurally related meso-porphyrin photosensitizers evaluated by spectrophotometric measurements. **Pharmazie**, v. 68, n. 2, p. 100-109, Feb. 2013. ISSN 0031-7144. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23469681> >. Acesso em 01/12/2015.

58 TIMM, D. M. et al. A high-throughput three-dimensional cell migration assay for toxicity screening with mobile device-based macroscopic image analysis. **Scientific Reports**, v. 3, p. 3000, 2013. ISSN 2045-2322. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24141454> >. Acesso em 01/12/2015.

59 KESSEL, D. **Methods in porphyrin photosensitization**. Philadelphia: Springer Science & Business Media, 1985. 352 p. ISBN 978-1-4613-2165-1.

60 IVANOV, A. V.; RESHETNICKOV, A. V.; PONOMAREV, G. V. **One more PDT application of chlorin e6**. San Jose: SPIE, 2000. p. 131-137. (SPIE proceedings, v.3909).

61 BANFI, S. et al. Photodynamic effects of porphyrin and chlorin photosensitizers in human colon adenocarcinoma cells. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 12, n. 18, p. 4853-4860, Sept. 2004. ISSN 0968-0896. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15336264> >. Acesso em 01/12/2015.

62 BERNAL, C. et al. Photodynamic efficiency of hypericin compared with chlorin and hematoporphyrin derivatives in HEp-2 and Vero epithelial cell lines. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 12, n. 2, p. 176-185, 2015. ISSN 1572-1000. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.pdpdt.2015.04.003> >. Acesso em: 2016/01/22.

63 STRANADKO, E. P. et al. First experience of photodithazine clinical application for photodynamic therapy of malignant tumors. In: DOUGHERTHY, T. J. **Optical methods for tumor treatment and detection: mechanism and techniques in photodynamic therapy IX**. San Jose: SPIE, 2000. (SPIE proceedings, v. 3909).

64 VOLLET-FILHO, J. D. et al. Non-homogeneous liver distribution of photosensitizer and its consequence for photodynamic therapy outcome. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 7, n. 3, p. 189-200, 2010. ISSN 1572-1000. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.pdpdt.2010.07.002> >. Acesso em: 2016/01/18.

65 CHAN, W. S. et al. Photocytotoxic efficacy of sulphonated species of aluminium phthalocyanine against cell monolayers, multicellular spheroids and in vivo tumours. **British Journal of Cancer**, v. 64, n. 5, p. 827-832, Nov. 1991. ISSN 0007-0920. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1931602> >. Acesso em 01/12/2015.

- 66 HUYGENS, A. et al. Accumulation and photocytotoxicity of hypericin and analogs in two- and three-dimensional cultures of transitional cell carcinoma cells. **Photochemistry and Photobiology**, v. 78, n. 6, p. 607-614, Dec. 2003. ISSN 0031-8655. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14743871> >. Acesso em 01/12/2015.
- 67 HADDAD, R. et al. In vitro and in vivo effects of photodynamic therapy on murine malignant melanoma. **Annals of Surgical Oncology**, v. 5, n. 3, p. 241-247, 1998. ISSN 1534-4681. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/BF02303780> >. Acesso em 01/12/2015.
- 68 BRAATHEN, L. R. et al. Guidelines on the use of photodynamic therapy for nonmelanoma skin cancer: an international consensus. International Society for Photodynamic Therapy in Dermatology, 2005. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 56, n. 1, p. 125-43, Jan. 2007. ISSN 1097-6787. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17190630> >. Acesso em 01/12/2015.
- 69 HORN, M. et al. Topical methyl aminolaevulinate photodynamic therapy in patients with basal cell carcinoma prone to complications and poor cosmetic outcome with conventional treatment. **British Journal of Dermatology**, v. 149, n. 6, p. 1242-1249, Dec. 2003. ISSN 0007-0963. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14674903> >. Acesso em 01/12/2015.
- 70 FREEMAN, M. et al. A comparison of photodynamic therapy using topical methyl aminolevulinate (Metvix) with single cycle cryotherapy in patients with actinic keratosis: a prospective, randomized study. **Journal of Dermatological Treatment**, v. 14, n. 2, p. 99-106, June 2003. ISSN 0954-6634. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12775317> >. Acesso em 01/12/2015.
- 71 SABINO, L. G. **Estudo da distribuição de doses limiars em TFD para um modelo de cultura tridimensional de células obtido pelo método de levitação magnética**. 2014. 114p (Doutorado em Ciências). Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2014.
- 72 WARBURG, O. On the origin of cancer cells. **Science**, v. 123, n. 3191, p. 309-314, Feb. 1956. ISSN 0036-8075. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13298683> >. Acesso em 01/12/2015.
- 73 ISIDORO, A. et al. Breast carcinomas fulfill the Warburg hypothesis and provide metabolic markers of cancer prognosis. **Carcinogenesis**, v. 26, n. 12, p. 2095-2104, Dec. 2005. ISSN 0143-3334. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16033770> >. Acesso em 01/12/2015.