UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS

LUIS GUSTAVO SABINO

**Estudo da distribuição de doses limiares em TFD para um
modelo de cultura tridimensional de células obtido pelo
método de levitação magnética**

São Carlos – SP
2014

LUIS GUSTAVO SABINO

Estudo da distribuição de doses limiares em TFD para um modelo de cultura tridimensional de células obtido pelo método de levitação magnética

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

Área de concentração: Física Aplicada
Opção: Biomolecular
Orientador: Profa. Dra. Cristina Kurachi

Versão Corrigida

(versão original disponível na Unidade que Aloja o Programa)

São Carlos – SP
2014

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

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

Sabino, Luis Gustavo

Estudo da distribuição de doses limiares em TFD
para um modelo de cultura tridimensional de células
obtido pelo método de levitação magnética / Luis
Gustavo Sabino; orientadora Cristina Kurachi -
versão corrigida -- São Carlos, 2014.
114 p.

Tese (Doutorado - Programa de Pós-Graduação em
Física Aplicada Biomolecular) -- Instituto de Física
de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2014.

1. Terapia fotodinâmica. 2. Photogem. 3. Cultura
tridimensional . 4. Citotoxicidade. 5. Distribuição
de dose limiar. I. Kurachi, Cristina, orient. II.
Título.

Dedico este trabalho aos meus pais e meus avós.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todas as pessoas que colaboraram para a realização deste trabalho. Para vocês, gostaria de citar um trecho de uma música que diz: “Sonho que se sonha só, é só um sonho que se sonha só, mas sonho que se sonha junto é realidade” (Raul Seixas). Um agradecimento especial aos meus pais Francisco Sabino e Nilce Teixeira Sabino pela dedicação e pelo apoio em todos os momentos da minha vida, sem vocês eu não chegaria até aqui. Agradeço aos meus irmãos, e toda a minha família pelo suporte e toda ajuda. Gostaria de agradecer a Ana Carina, minha companheira e amiga de todas as horas, das alegrias e das tristezas. Obrigado aos amigos do Laboratório de Biofotônica, Clóvão, Pri, Didi, Sebastião, Alessandra, Lili, Denis, Merê, Nat, Paulinha, Larissa, e tantos outros, vocês têm me ajudado muito nessa caminhada. Agradeço aos amigos do LAT (Blim Blim, Minduca, Jef, Guilherme), e ao pessoal da secretaria (Bel, Benê, Cris). Agradeço aos funcionários e professores do IFSC por toda a ajuda, especialmente ao Ítalo, a Renata, e a Neusa da biblioteca. Agradeço aos Professores Daniela e Tirapelli, e os alunos Fermino e Paulinho da FMRP-USP, pela ajuda nos experimentos de citometria. Um agradecimento especial à professora Cristina Kurachi e ao professor Vanderlei, por disponibilizar os recursos para que o trabalho fosse realizado. Um agradecimento especial aos professores Thomas Killian (Rice University) e Glauco Souza (Nano3D Biosciences), por todo o apoio e os ensinamentos. Obrigado também aos meus amigos de Houston, Jacob Gage, Sue Shiao, Jianbo Chan, e Shane Neeley, que tornaram minha estadia em Houston mais agradável. Gostaria de agradecer a participação, as lições e

O amor é a única loucura de um sábio e a única sabedoria de um tolo.

William Shakespeare

RESUMO

SABINO, L.G. **Estudo da distribuição de doses limiares em TFD para um modelo de cultura tridimensional de células obtido pelo método de levitação magnética.** 2014. 114 p. Tese (Doutorado) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2014.

Um conceito central na dosimetria da terapia fotodinâmica (TFD) é o limiar de dose (D_{th} – do inglês *threshold dose*). O D_{th} é definido como a quantidade mínima de luz que deve ser absorvida pelas moléculas de fotossensibilizador (FS) dentro das células malignas a serem tratadas para que ocorra a morte celular por necrose ou apoptose. Os resultados do estudo da captação de FS por células Hep G2 demonstraram que uma população celular de linhagem, cultivada em monocamada, apresenta captação de Photogem (PG) heterogênea, ou seja, algumas células têm maior capacidade de captar moléculas de PG, outras células captam o PG em menor quantidade. A captação heterogênea de PG pode ser a causa para fenômenos de seleção de células mais “resistentes” à TFD. É razoável supor que as subpopulações celulares de uma mesma massa de células malignas possam apresentar diferentes valores de D_{th} . Definiu-se uma função de distribuição das doses limiares ($g(D_{th})$) como uma função de distribuição gaussiana, e para a sua parametrização desenvolveu-se um método para o cultivo *in vitro* de culturas tridimensionais (culturas 3D), mais fidedignas ao tecido neoplásico maligno que as culturas tradicionais. Utilizando-se o método de levitação magnética (MLM) e o método de impressão magnética (MIM) para a dosimetria da TFD, foi possível parametrizar a $g(D_{th})$, investigar a resistência celular à TFD. O MLM demonstrou ser facilmente manuseável na rotina experimental, e consistente para o teste *in vitro* de novos FS. Comparando-se as culturas MDA-MB-231 e Hep G2, obtidas por MLM por mais de 185 horas de levitação, pode-se concluir que as células Hep G2 formaram uma estrutura celular mais densa e que ofereceu mais resistência ao dano causado pela TFD. É notável como as células Hep G2 retomaram o crescimento, e restabeleceram-se em cultura de modo semelhante ao grupo controle, por meio da reconstrução da matriz extracelular (MEC). Enquanto isso, no caso das células MDA-MB-231, a integridade da cultura não foi restabelecida após a aplicação da TFD, formando uma cultura fragmentada. O dano mais evidente, para ambas as culturas, foi observado nas margens dos tumores, evidenciando que os componentes importantes da reação fotodinâmica, como o fotossensibilizador, a luz e o oxigênio, estavam presentes em maiores quantidades na superfície da cultura, em comparação às outras regiões tumorais. Os resultados obtidos demonstram que para o Photogem (PG) é necessária uma fluência de luz da ordem de 40 J.cm^{-2} , para que o efeito fotodinâmico promova morte celular nas culturas 3D obtidas pelo MLM. O resultado da combinação de dois tipos celulares, o maligno (MDA-MB-231) e o sadio (HPF), demonstrou que o efeito fotodinâmico é efetivo quando se tem controle adequado da entrega dos agentes da terapia, independentemente do tipo celular. Algumas células sobreviveram ao tratamento, e existe um forte indicativo de que a presença de fibroblastos HPF esteja relacionada a esta pequena parcela de células que receberam dose de luz inferior ao seu D_{th} . Os resultados demonstraram que quanto maior a fluência de luz, menor é o IC_{50} do PG. Para a fluência de luz de 60 J.cm^{-1} obteve-se um IC_{50} de $3,1 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$, e para a fluência de luz de 30 J.cm^{-1} obteve-se um IC_{50} de $18,0 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$.

Palavras-chave: Terapia fotodinâmica. Photogem. Cultura tridimensional. Citotoxicidade. Distribuição de dose limiar.

ABSTRACT

SABINO, L.G. **Study of the threshold doses distribution in PDT using the three-dimensional cell cultures obtained by the method of magnetic levitation.** 2014. 114 p. Tese (Doutorado) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2014.

Photodynamic therapy (PDT) dosimetry includes a central concept: the threshold dose (D_{th}), which is the minimum amount of light to be absorbed by the photosensitizer (PS) molecules to induce irreversible oxidative damage, and hence to cause cell death by necrosis or apoptosis. It is reasonable to assume that cells subpopulation in one individual tumor cell mass may present different D_{th} values, which implies the existence of a distribution of D_{th} values defined by a Gauss distribution function ($g(D_{th})$). Developing methods for more realistic tissue emulation with *in vitro* cultures, such as three-dimensional (3D) cultures, have been encouraged aiming to avoid the above-mentioned dissimilarities. A 3D cell culture is preferable compared to monolayer cell cultures, because it provides cell-cell and cell-substrate interaction, and makes evaluating a culture and its volumetric dimension (which resembles the tumor morphology) possible. This study also includes the development of a 3D model, using the magnetic levitation method (MLM) and the magnetic printing method (MIM, from Portuguese *método de impressão magnética*) for PDT dosimetry. The aim is to define parameters for $g(D_{th})$, to investigate cell resistance to PDT, and to achieve a fast and consistent method for new PS *in vitro* tests. By comparing cultures from the different cell types studied, the ones obtained by MLM for more than 185 hours were found to present a denser cellular structure, which provided improved resistance to PDT-induced damage. Hep G2 cells showed a remarkable behavior by being able to recover culture integrity; meanwhile MDA-MB-231 cells were not able to do so. The most evident damage, for both cell culture types, was observed on tumor margins, showing that the main elements to play a role in PDT reaction (PS, light and oxygen) were present in larger quantities, at culture surface, when compared with internal regions of the cell culture. Results obtained for PG show that a light fluence of about 40 J.cm^{-2} is required to induce cell death by photodynamic effect on 3D cells obtained by MLM. A combination of two different cell types - a tumor cell line and a healthy cell line - shows clearly that there is no difference for the photodynamic outcome if one holds enough control on the therapeutic parameters. The results presented in this thesis show that even a strain cell population, grown in a monolayer cell culture, results in a non-homogeneous PG uptake, which means that part of the cells seems to be able to collect PG molecules more efficiently than other cells. This difference in collection among cells may be the cause of a selection of cells that are more "resistant" to PDT. There were cells that survived treatment, and the presence of HPF fibroblasts might be the cause of these surviving cells, since their D_{th} might have not been achieved. The results showed that as higher is the light fluence, as lower is the IC_{50} of PG. The fluence of 60 and 30 J.cm^{-1} resulted in IC_{50} of 3.1 and $18.0 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectively.

Keywords: Photodynamic therapy. Photogem. Tridimensional cell culture. Cytotoxicity assay. Threshold dose distribution.

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 3.1** - PLACA DE PETRI COM LAMÍNULA DE ESPESSURA DE APROXIMADAMENTE 0,13 - 0,16 MM UTILIZADA NA AQUISIÇÃO DE IMAGENS DE FLUORESCÊNCIA POR MICROSCOPIA CONFOCAL DE VARREDURA A LASER 32
- FIGURA 3.2** - ESPECTRO DE ABSORÇÃO ÓTICA DO PG NA CONCENTRAÇÃO DE 50 MG.ML⁻¹, EM PBS, PH 7,4 E C = 0,2 CM. 34
- FIGURA 3.3** - (A) ESPECTRO DE EMISSÃO DE FLUORESCÊNCIA DE PG E SOLUÇÃO SALINA 50 MG.ML⁻¹ (PBS), PH 7,4, C = 0,2 CM, $\lambda_{exc} = 507$ NM; (B) IMAGEM GERADA COM O PROGRAMA "SPECTRUM VIEWER" MOSTRANDO A LINHA QUE DEMARCA O COMPRIMENTO DE ONDA DO LASER DE EXCITAÇÃO (AZUL-CLARO) E A BANDA DE AFERIÇÃO DA FLUORESCÊNCIA ADOTADA COMO REFERÊNCIA PARA O PG (VERMELHO). 35
- FIGURA 3.4** - ESPECTRO DE EMISSÃO DE FLUORESCÊNCIA DE CÉLULAS CONTENDO MOLÉCULAS DE PG OBTIDAS POR MICROSCOPIA CONFOCAL. ESPECTRO DE FLUORESCÊNCIA DAS CÉLULAS HEP G2, ADQUIRIDO ATRAVÉS DA MICROSCOPIA CONFOCAL DE FLUORESCÊNCIA, COM A EXCITAÇÃO EM 405 NM. O GRÁFICO REPRESENTA A EMISSÃO DE FLUORESCÊNCIA DAS MOLÉCULAS PRESENTES NO CITOSOL. PODE-SE NOTAR AS BANDAS DE EMISSÃO CENTRADA APROXIMADAMENTE EM 625 NM INDICADA PELA SETA AZUL, E OUTRA EM 675 NM INDICADA PELA SETA TRACEJADA. 37
- FIGURA 3.5** - ANATOMIA DE UM PULSO. (A) O PULSO COMEÇA QUANDO A PARTÍCULA, NESTE CASO A CÉLULA ENTRA NO FEIXE DE LUZ LASER, NESTE PONTO A INTENSIDADE DO FEIXE E A INTENSIDADE DO SINAL SÃO BAIXAS. (B) O PULSO ADQUIRE INTENSIDADE MÁXIMA QUANDO A CÉLULA ESTÁ CENTRADA NO FEIXE DE LUZ LASER, ONDE A INTENSIDADE DO FEIXE E A INTENSIDADE DO SINAL SÃO MÁXIMAS; A INTENSIDADE DE PICO É ADQUIRIDA NESTE PONTO. (C) A MEDIDA QUE A CÉLULA SE AFASTA DO CENTRO DO FEIXE O SINAL DESAPARECE. 38
- FIGURA 3.6** - PERFIL DA INTENSIDADE DE FLUORESCENCIA DAS CELULAS CONTENDO PG. 39
- FIGURA 3.7** - IMAGENS OBTIDAS ATRAVÉS DE MICROSCOPIA CONFOCAL DE FLUORESCÊNCIA DE MÚLTIPLAS CAMADAS DE UMA CULTURA DE CÉLULAS DA LINHAGEM HEP G2 + PG (5 µG.ML⁻¹, 2 HORAS DE INCUBAÇÃO, SEM SFB, FOI REALIZADA LAVAGEM DA CULTURA CELULAR COM PBS A ADICIONADO MEIO DE CULTURA FRESCO DMEM+SFB ANTES DA AQUISIÇÃO; EXCITAÇÃO: 488 NM; DETECÇÃO: 600 – 690 NM). (B) CONSTRUÇÃO DE UMA IMAGEM 3D EM "Z-STACK" DA FLUORESCÊNCIA DO PG. 40
- FIGURA 3.8** - SEQUÊNCIA DE IMAGENS DE FLUORESCÊNCIA DE UMA CÉLULA CONTENDO PG. UM RETÂNGULO FOI DEMARCADO PARA OBTENÇÃO DA INTENSIDADE MÉDIA DA FLUORESCÊNCIA NA REGIÃO CENTRAL DO CITOPLASMA. ESTE PROCEDIMENTO FOI REALIZADO INDIVIDUALMENTE EM 90 CÉLULAS POR AMOSTRA. 41
- FIGURA 3.9** - INTENSIDADE DE FLUORESCENCIA AFERIDA NAS REGIOES RETANGULARES DEMARCADAS NA FIGURA 3.8. 42
- FIGURA 3.10** - AJUSTE GAUSSIANO DO HISTOGRAMA DA INTENSIDADE MÉDIA DA FLUORESCÊNCIA DOS DERIVADOS DE HEMATOPORFIRINA CONTIDOS NAS CÉLULAS. 42
- FIGURA 3.11** - GRÁFICOS DE DISPERSÃO RELACIONANDO OS PARÂMETROS FSC E SSC DE CADA GRUPO EXPERIMENTAL. AS REGIÕES DEMARCADAS SELECIONAM OS EVENTOS, ELIMINANDO-SE O RESÍDUO ("DEBRIS") CELULAR E OS AGLOMERADOS CELULARES, E SEPARANDO APENAS OS EVENTOS COM PROPRIEDADES DE UMA CÉLULA INDIVIDUAL PARA OS GRUPOS: (A) CTRL_DMED (B) PG_DMED (C) CTRL_SFB (D) PG_SFB. O GRUPO EM AZUL REPRESENTA OS AGLOMERADOS CELULARES; O GRUPO EM VERDE REPRESENTA OS RESÍDUOS CELULARES, E O VERMELHO AS CÉLULAS DE HEP G2. 44

FIGURA 3.12 – DISTRIBUIÇÕES DE FREQUÊNCIA DA IF (AFERIDA ENTRE 670 E 725 NM) DO SUBGRUPO PRÉ-SELECIONADO E DENOMINADAS CÉLULAS HEP G2 DE CADA GRUPO EXPERIMENTAL. O HISTOGRAMA VIOLETA É REFERENTE AO GRUPO NO QUAL AS CÉLULAS FORAM INCUBADAS COM DMEM, CONTENDO SFB (10%) E PG. O HISTOGRAMA AZUL É REFERENTE AO GRUPO NO AS CÉLULAS FORAM INCUBADAS COM DMEM E PG. OS HISTOGRAMAS VERDE E VERMELHO REPRESENTAM OS GRUPOS CONTROLE NOS QUAIS AS CÉLULAS FORAM INCUBADAS COM DMEM+SFB E APENAS COM DMEM, RESPECTIVAMENTE, E REPRESENTAM A AUTOFLUORESCÊNCIA DAS CÉLULAS NA BANDA AFERIDA. A SETA DEMARCA O VALOR CRÍTICO DE FLUORESCÊNCIA (F^*). ISTO SIGNIFICA QUE À ESQUERDA DA SETA ESTÃO AS CÉLULAS DO GRUPO CONTROLE, AS QUAIS NÃO CAPTARAM O PG, ENQUANTO À SUA DIREITA ESTÃO AS CÉLULAS QUE CAPTARAM PG E ESTÃO EMITINDO FLUORESCÊNCIA COM INTENSIDADE MUITO MAIOR QUE A AUTOFLUORESCÊNCIA CELULAR. NOS GRUPOS TRATADOS A CONCENTRAÇÃO DO PG FOI DE $5,0 \mu\text{G.ML}^{-1}$. 46

FIGURA 3.13 – INTENSIDADE MÉDIA DA FLUORESCÊNCIA (MÉDIA DE IF, AFERIDA ENTRE 670 E 725 NM) DO SUBGRUPO PRÉ-SELECIONADO E DENOMINADAS CÉLULAS HEP G2 DE CADA GRUPO EXPERIMENTAL. 47

FIGURA 3.14 – COEFICIENTE DE VARIAÇÃO DA IF, QUE REPRESENTA O GRAU DE DISPERSÃO ATRAVÉS DA RAZÃO ENTRE O DESVIO PADRÃO E O VALOR MÉDIO DE IF. OS CÁLCULOS FORAM REALIZADOS PARA CADA AMOSTRA DE CADA GRUPO, DE UM EXPERIMENTO EM TRIPLICATA. 48

FIGURA 4.1 – IMAGENS DE CÉLULAS CULTIVADAS EM MONOCAMADAS OBTIDAS ATRAVÉS DE MICROSCOPIA ÓPTICA. (A) CÉLULAS HEP G2, ESCALA - 1 MM. (B) CÉLULAS HEP G2, ESCALA - 200UM. (C) CÉLULAS MDA-MB-231, ESCALA - 1 MM. (D) CÉLULAS MDA-MB-231, ESCALA - 200UM (E) CÉLULAS HPF, ESCALA - 1MM. (F) CÉLULAS HPF, ESCALA - 200UM. 52

FIGURA 4.2 - PRIMEIRO PASSO PARA A LEVITAÇÃO DAS CÉLULAS, QUE CONSISTE NA ADIÇÃO DE NS NAS GARRAFAS DE CULTIVO CONTENDO CÉLULAS EM APROXIMADAMENTE 80% DE CONFLUÊNCIA. 53

FIGURA 4.3 - CÉLULAS HEP G2 CONTENDO NANOSHUTTLE™-PL APÓS 12 HORAS DE INCUBAÇÃO E LAVAGEM COM PBS. 54

FIGURA 4.4 - CULTURA DE CÉLULAS LEVITANDO NA SUPERFÍCIE AR-LÍQUIDO. 55

FIGURA 4.5 - (A) KIT PARA LEVITAÇÃO EM 6 POÇOS. (B) MONTAGEM DO SISTEMA PARA CULTIVO DAS CÉLULAS MAGNETIZADAS EM PLACA DE 6 POÇOS. (C) SISTEMA DE 6 MAGNETOS BASEADO NO MÉTODO DE LEVITAÇÃO MAGNÉTICA. 55

FIGURA 4.6 - (A) KIT PARA LEVITAÇÃO EM PLACA DE 24 POÇOS. (B) SISTEMA DE PLACA DE 24 POÇOS BASEADO NO MÉTODO DE LEVITAÇÃO MAGNÉTICA. (C) AMOSTRAS SENDO FOTOGRAFADAS NO MICROSCÓPIO INVERTIDO. (D) VISUALIZAÇÃO DA CULTURA LEVITANDO EM PLACA DE 24 POÇOS DURANTE A AQUISIÇÃO DE IMAGENS DE MICROSCOPIA. 57

FIGURA 4.7 – (A) BioTABLE. (B) FILTROS DE ATENUAÇÃO (ESQUERDA PARA A DIREITA: 0%, 50%, 65%, E 100%). 58

FIGURA 4.8 – (A) FONTE DE LUZ LIGHTWELL, UM DISPOSITIVO COMPOSTO POR DISPOSITIVOS LED (LIGHT EMITTING DIODE) EMITINDO LUZ COM INTENSIDADE DE 30MW.cm^{-2} NA SUPERFÍCIE DE ILUMINAÇÃO NO COMPRIMENTO DE ONDA CENTRADO EM 630 NM. (B) POSICIONAMENTO DE DIVERSAS FONTES DE LUZ ABAIXO DA PLACA DE CULTIVO. (C) ILUMINACAO DE UMA CULTURA PARA A ATIVAÇÃO DO FS. (D) ILUMINACAO DA PLACA DE 24 POÇOS CONTENDO CULTURAS TRIDIMENSIONAIS SUBMETIDAS À TFD. 58

FIGURA 4.9 – ESPECTRO DE EMISSÃO DO LIGHTPAD® AFERIDO UTILIZANDO-SE O ESPECTROFOTÔMETRO DA USB2000+. 59

FIGURA 4.10 - MICROSCOPIA DE CULTURAS TRIDIMENSIONAIS MLM EM PLACA DE 6 POÇOS. (A) CÉLULAS HEP G2 APÓS O TEMPO DE LEVITAÇÃO DE 24 HORAS. ESCALA – 200 μM (B) CÉLULAS HEP G2 APÓS O TEMPO DE LEVITAÇÃO DE 120 HORAS. ESCALA – 200 μM . 60

FIGURA 4.11 - MICROSCOPIA DE CULTURAS TRIDIMENSIONAIS MLM EM PLACA DE 6 POÇOS. (A) CÉLULAS MDA-MB-231 APÓS O TEMPO DE LEVITAÇÃO DE 24 HORAS. ESCALA – 200 μM (B) CÉLULAS MDA-MB-231 APÓS O TEMPO DE LEVITAÇÃO DE 120 HORAS. ESCALA – 200 μM . 61

- FIGURA 4.12** - (A) IMAGEM MACROSCÓPICA DA PLACA DE CULTIVO DE 24 POÇOS CONTENDO CULTURAS DE CÉLULAS HEP G2 APÓS 120 HORAS DE LEVITAÇÃO OBTIDAS DA FACE SUPERIOR DA PLACA DE CULTIVO, SEM O MAGNETO E A TAMPA DA PLACA. (B) IMAGEM DE MICROSCOPIA DE UMA CULTURA TRIDIMENSIONAL DE HEP G2 APÓS 120 HORAS DE LEVITAÇÃO (ESCALA: 200 μ M). 62
- FIGURA 4.13** - MICROSCOPIA DAS CULTURAS TRIDIMENSIONAIS DE CÉLULAS HEP G2 OBTIDAS PELO MÉTODO DE LEVITAÇÃO. (A) T₀. (B) T₂. (C) T₁₈. (D) T₄₁. (E) T₆₅. (F) T₉₀. (G) T₁₃₄. (H) T₁₈₂. ESCALA DE 200 μ M. 63
- FIGURA 4.14** - MICROSCOPIA DAS CULTURAS TRIDIMENSIONAIS DE CÉLULAS MDA-MB-231 OBTIDAS PELO MLM. (A) T₀. (B) T₂. (C) T₁₈. (D) T₄₁. (E) T₆₅. (F) T₉₀. (G) T₁₃₄. (H) T₁₈₂. AS IMAGENS (A)-(H) CONTÉM UMA BARRA DE ESCALA DE 1 MM, ENQUANTO AS IMAGENS (I)-(P) APRESENTAM BARRAS DE ESCALA DE 200 μ M E TEMPO DE LEVITAÇÃO DE SUA RESPECTIVA IMAGEM À ESQUERDA. 65
- FIGURA 4.15** - CULTURAS TRIDIMENSIONAIS DE CÉLULAS HEP G2: (A) ANTES DA APLICAÇÃO DA TFD (240 HORAS DE LEVITAÇÃO) (B) 24 HORAS APÓS A APLICAÇÃO DA TFD. ESCALA 1MM. (C) ANTES DA APLICAÇÃO DA TFD (240 HORAS DE LEVITAÇÃO) (D) 24 HORAS APÓS A APLICAÇÃO DA TFD. ESCALA 200 μ M. 68
- FIGURA 4.16** - CULTURAS TRIDIMENSIONAIS DE CÉLULAS MDA-MB-231: (A) ANTES DA APLICAÇÃO DA TFD (240 HORAS DE LEVITAÇÃO) (B) 24 HORAS APÓS A APLICAÇÃO DA TFD. ESCALA 1 MM. (C) ANTES DA APLICAÇÃO DA TFD (240 HORAS DE LEVITAÇÃO) (D) 24 HORAS APÓS A APLICAÇÃO DA TFD. ESCALA 200 μ M. 69
- FIGURA 4.17** - (A) CULTURA TRIDIMENSIONAL DE CÉLULAS HEP G2 APÓS DE APLICAÇÃO DA TFD E RECRESCIMENTO, TOTALIZANDO 640 HORAS DE CULTIVO. (B) GRUPO CONTROLE, TEMPO DE CULTIVO DE 640 HORAS. ESCALA: 1MM. 69
- FIGURA 4.18** - (A) CULTURA TRIDIMENSIONAL DE CÉLULAS MDA-MB-231 APÓS DE APLICAÇÃO DA TFD E RECRESCIMENTO, TOTALIZANDO 640 HORAS DE CULTIVO. (B) GRUPO CONTROLE, TEMPO DE CULTIVO DE 640 HORAS. ESCALA: 1MM. 70
- FIGURA 5.1** - COMPONENTES DO SISTEMA PARA TESTES DE CITOTOXICIDADE BIO ASSAY. 73
- FIGURA 5.2** - (A) ACOPLAMENTO DA PLACA DE CULTIVO DE 96 POÇOS NO ARRANJO DE MAGNETOS PARA A GERAÇÃO DE ANÉIS. (B) OS PONTOS PRETOS INDICADOS PELA SETA PRETA SÃO OS ANÉIS FORMADOS PELA MIM APÓS UMA HORA DE PADRONIZAÇÃO. (C) ACOPLAMENTO DA PLACA DE CULTIVO DE 96 POÇOS NO ARRANJO DE MAGNETOS PARA A GERAÇÃO DE ESFERÓIDES. (D) OS PONTOS PRETOS INDICADOS PELA SETA PRETA SÃO OS ESFERÓIDES FORMADOS PELA MIM APÓS UMA HORA DE PADRONIZAÇÃO. 74
- FIGURA 5.3** - N3DOCK SISTEMA DE AQUISIÇÃO DE IMAGENS UTILIZANDO UM IPOD. 75
- FIGURA 5.4** - IMAGEM DE FUNDO UTILIZADA PARA O PROCESSAMENTO DOS RESULTADOS DO BIO ASSAY. 76
- FIGURA 5.5** - (A) ESFERÓIDES IMPRESSOS EM PLACA DE 96 POÇOS APÓS UMA HORA DE IMPRESSÃO, IMAGEM INICIAL DO ENSAIO COM O BIO ASSAY. (B) APÓS 24 HORAS DE AQUISIÇÃO A IMAGEM FINAL DO BIO ASSAY. AS SETAS PRETAS INDICAM ALGUMAS DAS CULTURAS QUE SOFRERAM MAIOR ALTERAÇÃO DE TAMANHO. 79
- FIGURA 5.6** - (A) IMAGEM INICIAL DO ENSAIO COM O BIO ASSAY RING COMBINANDO-SE DUAS LINHAGENS CELULARES. (B) IMAGEM FINAL DO ENSAIO COM O BIO ASSAY RING. SETAS PRETAS INDICAM MAIORES ALTERAÇÕES NA COLORAÇÃO DO MEIO E DO FORMATO DA CULTURA. 80
- FIGURA 5.7** - (A) INÍCIO DO ENSAIO COM O BIO ASSAY NA N3D DOCK, 24 HORAS APÓS A TFD. (B) APÓS O ENSAIO COM O BIO ASSAY (24 HORAS DE DURAÇÃO), APROXIMADAMENTE 60 HORAS APÓS A TFD, NÃO HOUVE MIGRAÇÃO, MAS HOUVE ALTERAÇÃO DO PH DO MEIO PARA OS GRUPOS CONTROLE, CAUSADO PELO ACENTUADO METABOLISMO CELULAR ANAERÓBICO. 80
- FIGURA 5.8** - (A) IMAGEM DE ESFERÓIDES DE CÉLULAS MDA-MB-231, COM DIFERENTES NÚMEROS DE CÉLULAS (TRIPPLICATA), NO INÍCIO DO ENSAIO COM O BIO ASSAY. (B) IMAGEM DOS MESMOS ESFERÓIDES APÓS 24 HORAS NO FINAL DO

ENSAIO (TRIPLICATA). A QUANTIDADE DE CÉLULAS POR AMOSTRA FOI DE 200, 150, 100, 50 E 25 MIL CÉLULAS. A SETA VERMELHA INDICA AS BOLHAS QUE SE FORMARAM DURANTE O PROCESSO DO MIM.	81
FIGURA 5.9 – MONITORAMENTO DO PARÂMETRO <i>HUE</i> NO TEMPO ATRAVÉS DO PROCESSAMENTO DAS IMAGENS OBTIDAS NO BIO ASSAY DOT. O NÚMERO DE CÉLULAS UTILIZADAS FOI DE 200, 150, 100, 50, E 25 MIL CÉLULAS POR AMOSTRA. ESTE RESULTADO REPRESENTA A MÉDIA DA MEDIDA DAS TRÊS AMOSTRAS TRIPLICADAS.	82
FIGURA 5.10 – GRÁFICOS QUE REPRESENTAM O PERCENTUAL DE ALTERAÇÃO DO PARÂMETRO <i>HUE</i> PARA CADA UNS DOS GRUPOS SUBMETIDOS À TFD COM RELAÇÃO AO VALOR DE <i>HUE</i> INICIAL. O RESULTADO APRESENTADO É O VALOR MÉDIO DA TRIPLICATA. AS SETAS PRETAS APONTAM PARA O GRÁFICO DO GRUPO TRATADO COM A 3,13 µG.ML ⁻¹ .	84
FIGURA 5.11 – INCLINAÇÃO DO GRÁFICO DE VARIAÇÃO DO PARÂMETRO SATURAÇÃO DA IMAGEM NO TEMPO PARA OS GRUPOS CONTENDO 200, 150, 100, 50, 25 MIL CÉLULAS.	86
FIGURA 5.12 – VALOR DO IC ₅₀ NO TEMPO OBTIDO DO ATRAVÉS DO PARÂMETRO <i>HUE</i> .	86
FIGURA 5.13 – GRÁFICOS REPRESENTANDO A INCLINAÇÃO DO PARÂMETRO VALUE. (A) VARIANDO-SE O NÚMERO DE CÉLULAS (25, 50, 100, 150 E 200 MIL). (B) DOTS CONTENDO 150 MIL CÉLULAS, SUBMETIDOS À TFD.	87
FIGURA 5.14 – GRÁFICOS DE DOSE-RESPOSTA PARA O PG OBTIDOS ATRAVÉS DOS MÉTODOS (A) MTT E (B) <i>HUE</i> (COLORIMÉTRICO); VARIAÇÃO DO PARÂMETRO <i>HUE</i> .	88
FIGURA 5.15 - COMPARAÇÃO DAS CURVAS DE IC ₅₀ EM FUNÇÃO DA FLUÊNCIA DE LUZ OBTIDAS PELO MÉTODO DO (A) MTT E DO (B) <i>HUE</i> .	90
FIGURA 5.16 – CURVAS DE DOSE RESPOSTA DAS CÉLULAS DAS LINHAGENS HEP GE E MDA-MB-231 OBTIDAS PELO ENSAIO COM MTT. AS CULTURAS FORAM CRIADAS PELO MLM E SUBMETIDAS À TFD. DEPOIS DE 30 HORAS DA APLICAÇÃO DA TFD FORAM CRIADOS DOTS UTILIZANDO-SE O MIM E EM SEGUIDA FOI REALIZADO O ENSAIO COM MTT.	92
FIGURA 5.17 - IMAGENS DE FLUORESCÊNCIA DE CULTURAS DE GEOMETRIA ESFÉRICA DE CÉLULAS QUE FORAM SUBMETIDAS À AÇÃO FOTODINÂMICA. VERDE INDICA AS CÉLULAS VIVAS (CALCEÍNA AM), E VERMELHO AS CÉLULAS MORTAS (ETÍDIO HOMODÍMERO). (A) CULTURA DE CÉLULAS HPF COM 150 MIL CÉLULAS POR AMOSTRA. (B) COCULTURA DE CÉLULAS DAS LINHAGENS HPF E MDA-MB-231 (50 E 100 MIL CÉLULAS POR AMOSTRA, RESPECTIVAMENTE). (C) COCULTURA DE CÉLULAS DAS LINHAGENS HPF E MDA-MB-231 (75 E 75 MIL CÉLULAS POR AMOSTRA, RESPECTIVAMENTE). (D) CULTURAS DE CÉLULAS DA LINHAGEM MDA-MB-231 (150 MIL CÉLULAS POR AMOSTRA). SETAS AMARELAS INDICANDO ALGUMAS CÉLULAS VIVAS REMANESCENTES.	93
FIGURA A.1 – ESTRUTURA MOLECULAR DO VERMELHO DE FENOL.	108
FIGURA A.2 – ESCALA DE CORES DO MEIO DE CULTURA CELULAR EM FUNÇÃO DO PH DO MESMO.	108
FIGURA A.3 – REAÇÃO QUÍMICA DE EQUILÍBRIO ENTRE O VERMELHO DE FENOL (VERMELHO EM SOLUÇÃO DE PH BÁSICO) E SUA FORMA HIDROLISADA (AMARELA EM SOLUÇÃO DE PH ÁCIDO).	109
FIGURA B.2 – IMAGEM DE AMOSTRAS DE AMOSTRAS DE CULTURAS DE CÉLULAS TUMORAIS HUMANAS SUBMETIDAS AO TESTE COM O MTT COM 4 HORAS DE INCUBAÇÃO. DA ESQUERDA PARA A DIREITA TEMOS GRUPOS COM DIFERENTES QUANTIDADES DE CÉLULAS POR AMOSTRA, EM TRIPLICATA.	110
FIGURA B.1 – REAÇÃO DE REDUÇÃO OCORRIDA NAS MITOCÔNDRIAS.	111
FIGURA C.1 – DIAGRAMA ILUSTRATIVO DO PRINCÍPIO BÁSICO DE AQUISIÇÃO DE IMAGENS UTILIZANDO O MICROSCÓPIO CONFOCAL.	112

LISTA DE TABELAS

TABELA 3.1 - GRUPOS DE ESTUDO DA PRIMEIRA ETAPA DO ENSAIO DE CAPTAÇÃO DE PHOTOGEM® POR CÉLULAS HEP G2.....	34
TABELA 3.2 - NÚMERO TOTAL DE EVENTOS PARA CADA GRUPO EXPERIMENTAL, E NÚMERO DE EVENTOS DE CADA SUBGRUPO PRÉ-SELECIONADO NO GRÁFICO DE DISPERSÃO FSC vs. SSC.	45
TABELA 5.1 - CONCENTRAÇÕES DOS AGENTES TESTADOS NO ENSAIO DE CITOTOXICIDADE COM O BIO ASSAY. CONCENTRAÇÕES DOS AGENTES UTILIZADAS NO ENSAIO DE CITOTOXICIDADE EM CÉLULAS MDA-MB-231, CONTENDO $1,5 \times 10^5$ CÉLULAS POR ESFERÓIDE, AMOSTRAS EM TRIPLICATA. O TEMPO DE IMPRESSÃO FOI DE 1 HORA.	77

LISTA DE ABREVIATURAS SIGLAS

AICIPc - Ftalocianina hidrofóbica

2D - Bidimensional

3D - Tridimensional

ANVISA - Agencia Nacional de Vigilância Sanitária

CC - Coeficiente de correlação

CCD27SK - Fibroblastos de derme humana

CV - Coeficiente de variação

DMEM - Dulbecco's Modified Eagle's Medium

DMSO - Dimetilsulfóxido

D_{th} - Limiar de dose

$\overline{D_{th}}$ - valor médio da dose limiar

EDTA - Ethylenediamine tetraacetic acid (ácido etilenodiamino tetra-acético)

ERO - Espécie reativa de oxigênio

EthD-1 - Homodímero-1 de etídio

F^* - Valor limiar de intensidade de fluorescência

FDA - Food and drugs administration

FS - Fotossensibilizador

FS^* - Fotossensibilizador no estado excitado

FSC - Forward scattering (espalhamento frontal)

$g(D_{th})$ - Distribuição de doses limiares

$\sigma(D_{th})$ - largura da distribuição

Hep G2 - Linhagem celular de hepatocarcinoma

HpD - Derivados de hematoporfirina

HPF - Human pulmonary fibroblast (fibroblasto de pulmão humano)

HSV - Hue, Saturation and Value (cor, saturacao e valor)

IC₅₀ - Concentração do fármaco capaz de causar 50% do efeito citotóxico máximo

IF - Intensidade de fluorescência

LAT - Laboratório de Apoio Tecnológico

LED - Light Emitting Diodes – Diodos emissores de luz

MDA-MB-231 – linhagem celular de carcinoma de mama

MEC - Matriz extracelular

MIM - Método de impressão magnética

MLM - Método de levitação magnética

MTT - 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-Yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide

NS - Nanoshuttle

PBS - Phosphate buffer saline (solução salina tamponada)

PK-L,R – Piruvato quinase L,R

PK-M1 – Piruvato quinase M1

PK-M2 – Piruvato quinase M2

PG - Photogem[®]

PMT – Photomultiplier (fotomultiplicadora)

ROI - Region of interest (região de interesse)

SDS - Sodium dodecyl sulfate (Dodecil sulfato de sódio)

SFB - Soro fetal bovino

SSC - Side scattering (espalhamento lateral)

TFD - Terapia fotodinâmica

UI - Unidades internacionais

WM1617 – melanoma humano

SUMÁRIO

1 Introdução.....	23
2 Objetivos do estudo	29
2.1 Objetivos gerais.....	29
2.2 Objetivos específicos	29
3 Estudo da captação de Photogem® por células Hep G2 em monocamada utilizando-se Microscopia Confocal de fluorescência e Citometria de fluxo	31
3.1 <i>Metodologias</i>	31
3.1.1 Cultura celular	31
3.1.2 Preparo das amostras para a citometria de fluxo.....	31
3.1.3 Preparo das amostras para a microscopia confocal	32
3.1.4 Microscopia confocal de fluorescência	32
3.1.5 Fotossensibilizador	33
3.1.6 Estudo da variação da captação de Photogem® por células Hep G2	34
3.1.7 Citometria de fluxo.....	35
3.2 <i>Resultados e discussão</i>	39
3.2.1 Microscopia confocal de fluorescência	39
3.2.2 Citometria de fluxo para o estudo da captação de Photogem® por células Hep G2 em cultura de monocamada	43
4 Ensaio de citotoxicidade de TFD utilizando-se culturas tridimensionais obtidas pelo método de levitação magnética.....	51
4.1 <i>Metodologias</i>	51
4.1.1 Cultivo celular	51
4.1.3 “Nanoshuttle” e a magnetização da estrutura celular.....	53
4.1.2 Método de levitação magnética 6 poços	55
4.1.3 Método de levitação magnética - 24 poços	56
4.1.4 Aplicação da TFD	57
4.2 <i>Resultados e discussão</i>	60
4.2.1 MLM - placa de 6 poços.....	60
4.2.2 MLM - placa de 24 poços.....	61
4.2.3 Resultado da TFD.....	67
5 Dosimetria da TFD utilizando-se culturas 3D obtidas pelo MIM	73
5.1 <i>Metodologias</i>	73
5.1.1 Métodos de impressão magnética	73
5.1.2 BiO Assay.....	75

5.1.3	Análise dos dados	76
5.1.4	Agentes quimioterápicos, químicos e fotossensibilizador	77
5.1.5	Ensaio de citotoxicidade	77
5.1.5.1	Ensaio de viabilidade celular utilizando-se os marcadores fluorescentes Calceína AM e o homodímero-1 de etídio.....	77
5.1.5.2	Ensaio de MTT	78
5.2	<i>Resultados e discussão</i>	79
5.2.1	BiO Assay.....	79
5.2.2	Ensaio com MTT e a comparação dos resultados obtidos com o BiO Assay.....	87
5.2.3	Resultado do ensaio de viabilidade celular utilizando microscopia de fluorescência.....	92
6	CONCLUSÃO.....	99
	REFERÊNCIAS	101
	ANEXO A – Vermelho de fenol e a coloração do meio de cultura celular	109
	ANEXO B – Ensaio de citotoxicidade utilizando MTT.....	111
	ANEXO C – Princípio físico da formação de imagens por microscopia confocal.....	113

1 Introdução

A terapia fotodinâmica (TFD) tem sido considerada uma terapia promissora para o tratamento de diversos tipos de câncer, como o câncer de pele não-melanoma, os tumores de cabeça e pescoço e o câncer de esôfago, entre outros tipos de câncer. A TFD combina um agente fotossensibilizador (FS), luz de comprimento de onda específico e oxigênio molecular para a geração de espécies reativas de oxigênio (ERO), e eliminação de tecidos neoplásicos malignos. O dano causado pela TFD é seletivo, causando efeito colateral tolerável. (1-12)

Na aplicação da TFD utilizando-se os derivados de hematoporfirina (HpD), a administração do FS é intravenosa e a iluminação da lesão maligna é realizada após um período de tempo de 30-50 horas. Este é o tempo necessário para que a concentração de FS na lesão seja superior à concentração de FS em tecidos sadios adjacentes (comumente numa proporção de 2:1). O tecido maligno retém o FS por mais tempo, enquanto o tecido sadio elimina mais rapidamente as moléculas de FS. O acúmulo seletivo do FS HpD em lesões malignas foi inicialmente utilizado para fins de diagnóstico, para gerar contraste em imagens de fluorescência, até a descoberta do poder citotóxico desta combinação. A luz é aplicada apenas no local da lesão, aumentando a seletividade da ação fotodinâmica de forma que apenas o tecido neoplásico maligno é a recebe os danos oxidativos. (1,9,13)

A absorção da luz causa a excitação das moléculas do FS, levando-as a um estado tripleto excitado (FS*). O FS* pode interagir diretamente com as biomoléculas do ambiente intracelular, causando danos as estruturas macromoleculares e perda de função (mecanismo tipo I). Ou interagir com o oxigênio molecular formando o oxigênio singlete (O^1_2), é apontado como o principal agente mediador do dano celular (mecanismo tipo II). (2,4,13-17)

Existem duas vias de morte celular. Uma delas é a necrose, que é caracterizada pelo rompimento da membrana celular e extravasamento do conteúdo intracelular no interstício, o que estimula a resposta das células do sistema imunológico e o aumento de circulação sanguínea na região da lesão. (19-21) A outra via é a apoptose, caracteriza-se por uma cascata de reações que culminam na morte celular. A apoptose também é conhecida como “morte celular programada” e pode ser de intrínseca ou extrínseca. A morte celular por apoptose é um fenômeno complexo caracterizado por condensação da cromatina, fragmentação do DNA e formação dos corpos apoptóticos. Células malignas apresentam alterações genéticas que inibem a apoptose, isso pode ser revertido por vias alternativas, por exemplo por meio do estresse oxidativo, que pode acarretar a morte celular. (12,18-22)

A aplicação da TFD induz uma resposta imunológica do organismo do paciente, que atua no tecido maligno alvo a partir do momento da iluminação, essa resposta pode durar de horas até dias após a aplicação. Além do dano direto ao tecido maligno, a TFD age de forma indireta quando se trata de dano vascular tumoral. Ajustando-se o tempo entre a administração do FS e a iluminação para que a concentração do FS nos vasos seja suficientemente alta, o efeito fotodinâmico causa o dano e a eliminação dos vasos, reduzindo o fluxo de sangue e a chegada de nutrientes. (23-26) O efeito colateral mais alarmante da TFD é a fotossensibilidade dérmica e ocular, que pode durar de algumas horas a quatro semanas dependendo do FS utilizado e da forma de administração do FS. Além disso, pacientes relataram sentir dor durante a iluminação em aplicações de lesões malignas de pele. (10,27)

A TFD tem sido considerada não só uma terapia paliativa, mas também uma opção de tratamento para tumores em estágio inicial de pulmão e esôfago, e para carcinoma basocelular. (4-5,8-10,28-32) Além disso, muitos estudos clínicos têm sido delineados para aperfeiçoar as aplicações da TFD, e a técnica tem sido aprovada em um número crescente de países. Contudo, há resultados clínicos que têm se apresentado aquém do esperado, principalmente nos casos de tumores massivos volumosos, e de lesões malignas infiltrativas. (7,9,13,30,33) O poder de ação da TFD tem sido comprovado por inúmeros estudos. Ainda assim, o tratamento de alguns tipos de câncer ainda esbarra na falta de informação sobre as lesões resistentes ao tratamento, como no caso do colangiocarcinoma. (34) Existe um esforço da comunidade científica para entender os mecanismos de resistência das células que não morrem e consequentemente causam a recidiva tumoral. (11,22,34-46) Nesses casos, os estudos apontam para a necessidade de se combinar terapias no intuito de atacar por diversas vias os tecidos malignos.

Na dosimetria da TFD um conceito central é o limiar de dose (D_{th} – do inglês *threshold dose*), que é a quantidade mínima de luz que deve ser absorvida pelas moléculas de FS para que o dano celular oxidativo causado seja irreversível, e cause a morte celular. (11,18-20,47-51) Para os derivados de hematoporfirina, como o Photogem[®] (PG), o D_{th} para o comprimento de onda de 630 nm é da ordem de 10^{18} fótons.cm⁻³ o que representa aproximadamente uma dose de luz de 18 J.cm⁻². O número de fótons entregues e absorvidos que iniciarão a reação fotodinâmica deve ser superior ao limiar de dose em toda a lesão para eliminação completa da neoplasia maligna. (11,18-20,49)

O conceito de dose limiar foi criado a partir de observações iniciais em experimentos *in vivo*. Verificou-se que após a aplicação da TFD em fígado de ratos Wistar, a região necrótica do tecido hepático apresentava uma borda bem delimitada. Isso ocorre porque o fígado sadio de um rato é um tecido homogêneo, no qual a distribuição do FS ocorre de maneira mais

homogênea. (18-20) Na irradiação superficial observa-se que a intensidade de luz e, portanto, a dose de luz entregue decresce exponencialmente em função da profundidade de penetração no tecido. Desse modo, a necrose causada pela TFD se inicia na superfície do fígado, e se aprofunda até a borda interna da necrose, comumente chamada “profundidade de necrose”. Definiu-se que a dose de luz entregue na região dessa fronteira entre o tecido necrosado e o tecido não necrosado como o limiar de dose, ou seja, a dose mínima para induzir necrose tecidual hepática. (1,11,16-17,50-52)

Um tumor maligno ou neoplasia maligna é uma formação massiva de células alteradas; que tem sua origem em uma única célula cancerosa, a qual apresenta diversas adaptações genótípicas e fenotípicas, causadas por agentes internos e externos ao organismo. (53-55) Sabe-se que lesões malignas em estágio avançado são compostas por uma diversidade de tipos celulares, e nestes casos mais avançados se verifica maior resistência tumoral à TFD. Assim como em outros casos de resistência às terapias anticâncer, como a quimioterapia, a heterogeneidade celular tem sido investigada como uma das causas dessa resposta indesejável. (56-57)

Como uma terapia coadjuvante, a TFD tem inúmeras vantagens, mas a principal é o fato de seu mecanismo de ação permitir a combinação da TFD com outras terapias disponíveis, como a radioterapia e a quimioterapia. Apesar disso, alguns estudos demonstram o efeito sinérgico de radioterapia e TFD no tratamento de câncer de esôfago, enquanto outros estudos apontam que não existe tal vantagem em se combinar tais técnicas. (58) Adicionalmente, existe outra vertente na pesquisa em TFD que é a combinação de diversos FS e uma fonte de luz composta por um espectro amplo capaz de excitar todos os FS utilizados na aplicação. (59)

Muitos autores citam a pouca penetração da luz em tecidos biológicos como um fator limitante da TFD. (48,60-63) A entrega de luz, pode ser aperfeiçoada usando fontes de luz acopladas a fibras de diferentes geometrias, como fibras ópticas difusoras cilíndricas ou arranjos com várias fibras. (30,48,50,61-62) Mesmo assim, diversos casos em que a iluminação e a administração do FS foram realizadas adequadamente apresentaram grande variabilidade nas respostas clínicas à TFD. Em alguns casos, a heterogeneidade celular, que é uma característica fundamental na progressão das neoplasias malignas, teria consequências desfavoráveis para a distribuição adequada do FS, diminuindo a eficácia da TFD. (64-65) Além disso, as células localizadas no interior da lesão maligna recebem menos luz, pelo fato de receberem uma dose de luz reduzida quando comparada com as células próximas à superfície de iluminação. (60,65)

Para obter o máximo controle possível sobre as aplicações de TFD, parâmetros como a distribuição adequada do FS, a entrega apropriada da luz ao tecido e o monitoramento da oxigenação da lesão são obstáculos a serem superados. Os estudos de TFD relatados na literatura, em geral, são dispersos e heterogêneos, utilizando diferentes FS e parâmetros de iluminação, o que torna difícil a avaliação da efetividade da TFD na clínica. Por isso, padronizar os protocolos de aplicação ainda é um dos maiores desafios na área, e para isso se faz necessário um modelo experimental que apresente a maior semelhança possível com o microambiente tumoral. (30,34)

Certamente os tumores são mais do que simples massas de células proliferativas. É sabido que lesões em estágios mais avançados são constituídas de populações heterogêneas de células. (26,36,55,60,66) É razoável supor que, por conta disso, as subpopulações celulares de uma mesma lesão possam apresentar diferentes valores de limiar de dose (D_{th}), implicando na existência de uma distribuição de doses limiaries, que pode ser definida como uma função de distribuição gaussiana dessas doses ($g(D_{th})$).

Em 2011 demonstrou-se, com culturas celulares em monocamada da linhagem de hepatocarcinoma humano (Hep G2), que sessões sucessivas da TFD numa mesma cultura celular têm efeitos distintos, empregando-se os mesmos parâmetros de iluminação e mesma concentração de FS. O resultado sugere que o recrescimento celular ocorre de tal forma que há redução da ação fotodinâmica, essa redução está relacionada com o aumento da resistência média da população celular reincidente, ou seja, com o aumento do valor médio da função $g(D_{th})$ sessão após sessão. Isto significa que, após a TFD em células Hep G2 *in vitro*, o restante das células que sobreviveram à TFD gera uma nova população, cuja resposta à TFD pode ser diferente daquela observada para a população inicial. Diversos fatores podem influenciar a resposta celular à TFD, entre eles a capacidade de retenção do FS, a quantidade de oxigênio molecular, a dose de luz entregue e a heterogeneidade celular tumoral. (11)

Atualmente, a maioria dos tratamentos com TFD têm base na dosimetria explícita, que é embasada em resultados empíricos obtidos em ensaios de administração de FS e de dose de luz em modelos *in vivo* e modelos *in vitro*. (11,43,47,67-79) Apenas alguns destes estudos estão relacionados à heterogeneidade celular, à grande variação inter e intralesão maligna relacionado à farmacocinética e à distribuição do FS, apresentando maior enfoque nas propriedades ópticas dos tecidos do que nas propriedades das células que compõem a lesão. Neste contexto, se faz necessária a utilização de novos métodos de dosimetria que possam mimetizar o microambiente tumoral e simular barreiras para a distribuição de FS e luz, e assim elucidar aspectos ainda não explorados na dosimetria da TFD.

Por um lado os experimentos padrão atuais para o teste de compostos em animais são de grande importância para a segurança dos futuros pacientes, por outro lado, são caros e de difícil acesso. Além do apelo ético de que o número de animais seja reduzido ao mínimo. Por outro lado, as culturas em monocamada podem fornecer uma quantidade maior de resultados, mas não são propriamente representativas com relação ao tecido *in vivo*. Por esse motivo existe uma demanda por ensaios *in vitro* que forneçam resultados preditivos e ao mesmo tempo apresentem vantagens práticas.

Uma das modalidades importantes atualmente no estudo dessa dosimetria é o desenvolvimento de fármacos apropriados para TFD – fármacos que possibilitem alta seletividade de tecidos alterados, baixa toxicidade no escuro e ativação em comprimentos de onda melhor situados dentro da janela biológica (em geral, no infravermelho). (3,9,13,15,24, 28,48,68) Tal desenvolvimento em geral tem início em testes de citotoxicidade *in vitro*. O teste *in vitro* define o IC₅₀ (concentração do fármaco capaz de causar 50% do efeito citotóxico máximo) e o potencial de ação de um determinado composto. Através da determinação do IC₅₀, um conjunto de compostos ativos é escolhido dentre inúmeros compostos. Os compostos de interesse são então caracterizados e assim os parâmetros para os testes *in vivo* são escolhidos e testados em animais. No caso da TFD, se faz necessária a obtenção do IC₅₀ de cada FS, levando em consideração a dose de luz utilizada, a intensidade de luz, o comprimento de onda, e a oxigenação da amostra. Além disso, o processo de desenvolvimento de fármacos pode durar entre anos e décadas e, mesmo após inúmeros ensaios pré-clínicos, em muitos casos os compostos que apresentaram um alto potencial de ação *in vitro* são reprovados nos testes clínicos com humanos. (80)

Apesar de existirem dezenas de FSs sendo desenvolvidos em diversos países, apenas uma parcela é aprovada por órgãos de vigilância como o *Food and Drugs Administration* (FDA) nos Estados Unidos, e a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) aqui no Brasil. Para o grupo de FSs que obteve a aprovação, e teve sua eficácia verificada para uso num determinado país, ainda existe uma barreira com relação a aprovação em outros países. Novos métodos para a comparação da eficácia e segurança de diversos FSs estão sendo desenvolvidos e testados. Na literatura para dosimetria da TFD ainda existem inconsistências entre estudos *in vitro* e *in vivo*. O desenvolvimento de métodos de cultivo *in vitro* mais fidedignos ao tecido maligno, como as culturas tridimensionais (culturas 3D), têm sido estimulados visando sanar tais disparidades. As culturas celulares 3D oferecem vantagens com relação ao cultivo em monocamada, como a possibilidade de interação célula-célula, célula-substrato, e a avaliação da dimensão volumétrica e da cultura, que se assemelha a morfologia tumoral. Por outro lado,

algumas adaptações são necessárias para transpor dificuldades, como a ausência de vascularização e a quantificação da citotoxicidade (60,64- 65,80-82)

Existem diversos métodos de cultivo celular 3D: aqueles que utilizam matrizes em gel (Matrigel®) contendo componentes de matriz extracelular (MEC) para o suporte da estrutura 3D, e o Método de levitação magnética (MLM), que tem como princípio a magnetização das células por meio de nanopartículas (NS) seguida de levitação induzida por magnetismo. Em particular, o MLM utiliza-se de nanopartículas formadas por poli-lisina e átomos de ferro para a marcação das células, o que confere às células propriedades magnéticas. Na sequência, as células que receberam as NS são cultivadas sob o efeito de um magneto posicionado na região superior da placa de cultivo, iniciando a levitação; o que segue é a interação célula-célula e a produção de MEC. Além do MLM, as células magnetizadas podem ser guiadas por um magneto posicionado na base da placa de cultivo, para a formação de culturas com geometria esférica e ou toroidal, pelo Método de levitação magnética (MIM). Colocadas as possibilidades de TFD e suas limitações, fica clara a importância da dosimetria no desenvolvimento da terapia, e para isso, a necessidade do estabelecimento de um método de validação de modelos de distribuição de doses limiares.

2 Objetivos do estudo

2.1 Objetivos gerais

Os objetivos deste estudo são: o de investigar a captação do PG por células de uma linhagem de hepatocarcinoma (Hep G2) *in vitro*, utilizando as técnicas de citometria de fluxo e microscopia confocal, e verificar uma possível variação no valor do D_{th} a nível celular associada à captação de FS; desenvolver um modelo de cultura celular tridimensional utilizando-se os métodos MLM e MIM para a dosimetria da TFD, com o objetivo de parametrizar a $g(D_{th})$, investigar a resistência celular à TFD; e obter um método rápido, prático e consistente para o teste *in vitro* de novos fotossensibilizadores.

2.2 Objetivos específicos

Como metas específicas, os experimentos realizados foram idealizados com o intuito de:

- a) avaliar qualitativamente e, se possível, quantitativamente a relação entre a captação do PG e a heterogeneidade celular;
- b) estabelecer um modelo 3D para estudos de dosimetria em TFD;
- c) parametrizar a $g(D_{th})$ para células Hep G2 e MDA-MB-231 cultivadas pelo MLM e MIM;
- d) investigar a possível existência de células resistentes à ação fotodinâmica utilizando-se o PG.

3 Estudo da captação de Photogem[®] por células Hep G2 em monocamada utilizando-se Microscopia Confocal de fluorescência e Citometria de fluxo

3.1 Metodologias

3.1.1 Cultura celular

Nessa sequência de experimentos, utilizou-se linhagens celulares secundárias (oriundas do subcultivo) obtidas originalmente de um carcinoma hepático humano (Hep G2), obtidas originalmente da ATCC (*American Type Culture Collection*). As células foram mantidas em criotubos, primeiro foram congeladas gradualmente em um congelador por um período de 2 horas até atingir a temperatura de -20°C, e na sequência foram armazenadas submersas em nitrogênio líquido e mantidas à -196 °C. Cada criotubo contém em média 10⁶ células que foram congeladas em solução contendo soro fetal bovino (SFB), e 5% de dimetilsulfóxido (DMSO) como agente criogênico. Durante uma bateria de experimentos é necessário descongelá-las, e cultivá-las em garrafas plásticas em meio de cultura *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM, Life Technologies, Thermo Fisher Scientific Inc., EUA) contendo 10% de SFB para promover a adesão, a expansão e o aumento do número de células da cultura.

3.1.2 Preparo das amostras para a citometria de fluxo

Nos experimentos de citometria de fluxo, as culturas celulares de Hep G2 foram disponibilizadas pela Professora Dra. Daniela Pretti da Cunha Tirapelli do Laboratório de Biologia Molecular, do Departamento de Cirurgia e Anatomia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. As células foram cultivadas em garrafas de 25 cm² (Techno Plastic Products – TPP, Trasadingen, Suíça) imersas em 5,0 mL de meio de cultura (DMEM, GIBCO[®], Life Technologies, Thermo Fisher Scientific Inc., EUA), contendo 10% de SFB (Cultilab, Campinas, Brasil), e 1,0 mL de solução com antibióticos (10.000 UI.mL⁻¹ penicilina, 10 mg.mL⁻¹ estreptomicina), em temperatura de 37°C, em ambiente umedecido com 5% de CO₂. As culturas celulares foram lavadas com solução salina (PBS, do inglês *phosphate buffer saline*) e receberam meio de cultura fresco a cada dois ou três dias. As culturas de células tumorais promovem uma alteração da coloração do meio de cultura após o consumo dos nutrientes, apontando a necessidade de reposição do meio de cultura. Esta alteração na cor

ocorre em resposta a alteração do pH do meio, que se torna mais ácido por causa do aumento da concentração de metabólitos (principalmente o ácido láctico) e a diminuição dos nutrientes. (54,83-85)

Após um período de uma semana – ou até que a cultura atingisse a confluência (aproximadamente 80% da superfície da garrafa coberta por células), as células foram desprendidas da garrafa, utilizando-se 50 μ L de uma solução de tripsina EDTA (0,05%, incubação durante 3-5 minutos), e cultivadas em placas de seis poços. As células foram contadas utilizando-se o hemocitômetro, também conhecido como câmara de Neubauer. Em seguida, as culturas foram cultivadas em placa de 6 (TPP Techno Plastic Products AG, Modelo 92006, Suíça) poços e incubadas por um período de dois dias, tempo necessário para a adesão e estabelecimento da monocamada celular. Na sequência foram tratadas com o fotossensibilizador Photogem como descrito na seção 3.1.5.

3.1.3 Preparo das amostras para a microscopia confocal

Para a aquisição de imagens de microscopia confocal de fluorescência, 10^4 células Hep G2 foram cultivadas em placas de Petri de 35 mm de diâmetro, com uma lamínula (espessura de 0,13 - 0,16 mm) na base da placa, como mostra a Figura 3.1. As células foram cultivadas por um período de 48 horas para a adesão e estabelecimento das monocamadas celulares.

Figura 3.1 - Placa de Petri com lamínula de espessura de aproximadamente 0,13 - 0,16 mm utilizada na aquisição de imagens de fluorescência por microscopia confocal de varredura a laser

Fonte: Elaborada pelo autor.

3.1.4 Microscopia confocal de fluorescência

Através das imagens adquiridas utilizando-se microscopia confocal de fluorescência (LSM 780 invertido - Carl Zeiss, Munique, Alemanha) foi possível avaliar a distribuição intracelular das moléculas de PG. Utilizando-se um aumento de 40x e um laser de excitação em 488 nm, a fluorescência das células foi coletada em dois intervalos do espectro de emissão,

utilizando-se os canais de 500-590 nm para coleta da autofluorescência celular, e de 600-700 nm para coleta da fluorescência das moléculas de PG. Para o processamento das imagens utilizou-se o software ZEN 2011 (Carl Zeiss, Munique, Alemanha). Uma descrição do princípio físico da formação de imagens por microscopia confocal está presente no ANEXO C.

3.1.5 Fotossensibilizador

O fotossensibilizador utilizado foi o Photogem[®] (TimTec, EUA), um derivado de hematoporfirina (HpD) criado na Rússia, e fornecido apenas para ensaios de laboratório. O PG foi previamente diluído em uma solução estoque ($5,0 \text{ mg.mL}^{-1}$) para cada sequência de experimentos. Antes da incubação com PG, as culturas foram lavadas utilizando-se PBS, e em seguida receberam o meio de cultura sem SFB, contendo o PG na concentração de $5,0 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$. Em seguida as amostras foram incubadas em um ambiente úmido, à 37°C e com 5% de CO_2 .

O espectro de absorção do PG em solução de PBS na concentração de $50 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$, pH 7,4 e caminho óptico $c = 0,2 \text{ cm}$ pode ser observado na figura 3.2. Com base neste espectro, utilizou-se nos ensaios de citometria de fluxo um sistema LASER com emissão centrada em 488 nm, para a excitação do PG. Neste comprimento de onda a absorbância do PG é relativamente menor que na banda de Soret em 369 nm, porém, suficientemente alta para excitar as moléculas do PG.

Figura 3.2 - Espectro de absorção ótica do PG na concentração de $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$, em PBS, pH 7,4 e $c = 0,2 \text{ cm}$.

Fonte: MENEZES (86)

3.1.6 Estudo da variação da captação de Photogem[®] por células Hep G2

A citometria de fluxo foi escolhida para avaliar esse processo por ser uma técnica de análise de fluorescência de células que permite avaliá-las individualmente, e por ser capaz de avaliar milhares de células em um único experimento. Além disso, a técnica permite a coleta em canais que correspondem às bandas de emissão de fluorescência específicas – neste caso, do PG, que é o fotossensibilizador de interesse do estudo. No experimento inicial, cultivamos $5,0 \times 10^4$ células por poço e criamos quatro grupos, cada grupo em triplicata, como mostra a tabela 3.1. O tempo de incubação das células com o PG foi de duas horas para todos os grupos. Após a incubação, as culturas celulares foram lavadas com PBS para eliminação das células mortas, e para que fosse possível analisar apenas aquelas que mantiveram a adesão. Em seguida, as células de cada amostra foram preparadas para a análise por citometria de fluxo para que o citômetro avaliasse um total de 10^4 células por grupo, no mínimo.

Tabela 3.1 - Grupos de estudo da primeira etapa do ensaio de captação de PG por células Hep G2.

<i>Grupos</i>	<i>DMEM (mL)</i>	<i>SFB (%)</i>	<i>PG ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)</i>
<i>CTRL_DMEM</i>	2,0	-	-
<i>CTRL_SFB</i>	2,0	10	-
<i>PG_SFB</i>	2,0	10	5,0
<i>PG_DMEM</i>	2,0	-	5,0

Fonte: Elaborada pelo autor.

3.1.7 Citometria de fluxo

Para a análise por citometria de fluxo utilizou-se um aparelho BD FACSCanto II Flow Cytometer (BD BioSciences, San Jose, CA, USA) com todos os canais de fluorescência abertos. O número total de eventos aferidos foi de dez mil, a uma taxa de $10 \mu\text{L}.\text{min}^{-1}$, o que representa um fluxo baixo de células. O intuito era de investigar a fluorescência do PG presente nas células, assumindo que a intensidade da fluorescência na faixa do espectro indicado na Figura 3.3(A), em vermelho, seja proporcional à quantidade de moléculas de PG captada por cada célula.

O sistema detector de fluorescência foi delineado com um filtro de transmissão, do tipo passa-banda, acoplado a cada fotomultiplicadora (PMT). Após averiguar o espectro de emissão do PG presente nas células, ilustrado na figura 3.4(A), tomou-se como referência deste estudo a PMT do canal que afere no intervalo de 670-735 nm, usualmente utilizado para detectar o PerCP-Cy5.5.

Figura 3.3 - (A) Espectro de emissão de fluorescência de PG e solução salina $50 \mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ (PBS), pH 7,4, $c = 0,2 \text{ cm}$, $\lambda_{\text{exc}} = 507 \text{ nm}$; (B) Imagem gerada com o programa “Spectrum Viewer” mostrando a linha que demarca o comprimento de onda do laser de excitação (azul-claro) e a banda de aferição da fluorescência adotada como referência para o PG (vermelho).

Fonte: (A) Elaborada pelo autor. (B) BDbiosciences (87).

$$\gamma_s = \frac{IF_{611}}{IF_{672}} \cong \frac{1100}{120} \cong 9,2 \quad (1)$$

Os parâmetros IF_{625} e IF_{672} dependem da calibração do equipamento, mas são de mesma unidade. O parâmetro γ_s é, portanto, adimensional, pois resulta da razão entre IF_{625} e IF_{672} . O espectro de fluorescência do PG em solução apresenta o pico de maior intensidade em 611 nm, enquanto o espectro de fluorescência do PG no interior de uma célula Hep G2 apresenta o pico de maior intensidade em 625 nm. Sendo assim, deve-se considerar esse deslocamento $\Delta\lambda$ do pico máximo no cálculo da razão entre picos do PG em solução, definido como γ_s' e descrito pela equação 2.

$$\gamma_s' = \frac{IF_{625}}{IF_{672}} \cong \frac{375}{125} \cong 3 \quad (2)$$

Pode-se adquirir o espectro de emissão de fluorescência através das imagens capturadas utilizando-se a microscopia confocal de fluorescência. A figura 3.4 apresenta o espectro de emissão de fluorescência de células Hep G2 contendo PG, para as quais a excitação foi realizada em 405 nm e a aquisição nos canais 600-700 nm. Após o fenômeno de absorção óptica, a emissão de fluorescência pelas moléculas de PG pode ocorrer por consequência da transição eletrônica $S1 \rightarrow S0$; em solução salina, a pH fisiológico, o espectro de emissão do PG apresenta bandas centradas aproximadamente em 618 e 680 nm. Quando o PG está no citosol pode-se notar um pequeno deslocamento das bandas de emissão do PG, centradas em aproximadamente 625 nm e 675 nm. Além disso, a razão entre as intensidades dos picos é diferente, quando se compara o espectro de emissão do PG em solução e do PG captado pelas células.

Figura 3.4 - Espectro de emissão de fluorescência de células contendo moléculas de PG obtidas por microscopia confocal. Espectro de fluorescência das células Hep G2, adquirido através da microscopia confocal de fluorescência, com a excitação em 405 nm. O gráfico representa a emissão de fluorescência das moléculas presentes no citosol. Pode-se notar as bandas de emissão centrada aproximadamente em 625 nm indicada pela seta azul, e outra em 675 nm indicada pela seta tracejada.

Fonte: Elaborada pelo autor.

$$\gamma_{cel} = \frac{IF_{625}}{IF_{672}} \approx \frac{120}{80} \approx 1,3 \quad (3)$$

O parâmetro γ_{cel} determinado pela razão entre o pico de fluorescência em 625 nm (IF_{625}) e o pico de fluorescência entre 672 nm ($\overline{IF_{672}}$) do espectro de emissão obtido por microscopia confocal, descrito na equação 3, demonstra como o espectro de fluorescência do PG contido nas células difere daquele obtido nos ensaios com o PG em solução.

Como indicado na tabela 3.1, o experimento consiste em avaliar a variação intercelular da quantidade de PG captado pelas células da linhagem Hep G2, através da aferição da IF das células na presença e na ausência de SFB no meio de cultura durante a incubação com PG.

Durante a coleta de dados, as células interceptam o ponto de interrogação, no qual o laser de excitação incide, e a pressão do sistema fluído deve ser ajustada para garantir que as células sejam analisadas individualmente (qualquer partícula ou célula com tamanho entre 2,00 - 150 μm pode ser analisada). As células de tecidos podem ser desagregadas e analisadas individualmente.

A fonte de luz de excitação utilizada foi um Sistema Laser Coherent Sapphire (488 nm, estado sólido, 20 mW de potência de saída), que corresponde à região entre a banda de Soret e as bandas “Q” do espectro de absorção do PG; o feixe de luz laser é elíptico e tem dimensões de 9 μm x 65 μm . O espalhamento frontal (FSC – do inglês *forward scattering*) de luz foi aferido por um fotodiodo (499 $\pm$ 10 nm Passa-banda) e mede o tamanho das células. O espalhamento lateral (SSC – *side scattering*) foi aferido por uma PMT (488 $\pm$ 10 nm BP) e mede a regularidade intracelular, e das organelas. (45) O sinal é capturado quando a célula atravessa o feixe de luz laser, como mostra a anatomia do pulso descrita na figura 3.5, e a aferição é realizada instantaneamente em todos os canais.

Figura 3.5 - Anatomia de um pulso. (a) O pulso começa quando a partícula, neste caso a célula entra no feixe de luz laser, neste ponto a intensidade do feixe e a intensidade do sinal são baixas. (b) O pulso adquire intensidade máxima quando a célula está centrada no feixe de luz laser, onde a intensidade do feixe e a intensidade do sinal são máximas; a intensidade de pico é adquirida neste ponto. (c) A medida que a célula se afasta do centro do feixe o sinal desaparece.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Os arquivos gerados pelo citômetro de fluxo têm formato próprio, com extensão “.FSC”, e contém os valores de cada evento por canal, incluindo as medidas de espalhamento FSC e SSC. Estes dados foram processados utilizando-se o software KALUZA 1.2 (BECKMAN COULTER, Brea, CA, USA).

3.2 Resultados e discussão

3.2.1 Microscopia confocal de fluorescência

As células Hep G2 foram cultivadas em placas de Petri com lamínula de 0,6 μm de espessura. Uma célula Hep G2 tem em média 30 μm de diâmetro, e o cultivo em placas promove o crescimento das células em uma superfície plana. Elas receberam PG na concentração de 5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ por um período de 2 horas. O meio de cultura utilizado (DMEM) não continha SFB. As imagens obtidas por microscopia confocal de fluorescência demonstraram que as moléculas de PG captadas pelas células se localizavam no citosol, como pode-se observar na figura 3.6.

Figura 3.6 - Perfil da intensidade de fluorescência das células contendo PG.

Fonte: Elaborada pelo autor.

A posição espectral das bandas de emissão dependem do substrato em que o PG está incorporado. A medida do perfil de intensidade de fluorescência do PG contido nas células mostra a localização destas moléculas no citosol. Nota-se também que o núcleo celular não contém PG.

As intensidades das bandas de fluorescência são proporcionais à intensidade e ao comprimento de onda da luz de excitação, bem como à concentração local de moléculas de PG. Este parâmetro pode ser utilizado para quantificar indiretamente o efeito fotodinâmico. Neste sentido, as imagens de fluorescência confocal foram adquiridas no plano transversal das culturas de células, em “z-stack”, que consiste na aquisição de diversas imagens planares

paralelas, extraídas em intervalos de 2,2 μm , como mostra a figura 3.7(A). Utilizando o programa ZEN 2011 obteve-se a imagem 3D da fluorescência do PG captado pelas culturas de células Hep G2. Avaliando a figura 3.7(B), nota-se que a fluorescência das moléculas de PG é intensa na região interna das células e baixíssima no núcleo. Isto indica que, para essas condições, o PG está localizado nas organelas e no citoplasma. Provavelmente, a ausência de SFB durante a incubação das células facilitou a maior captação de moléculas de PG.

Figura 3.7 - Imagens obtidas através de microscopia confocal de fluorescência de múltiplas camadas de uma cultura de células da linhagem Hep G2 + PG ($5 \mu\text{g.mL}^{-1}$, 2 horas de incubação, sem SFB, foi realizada lavagem da cultura celular com PBS a adicionado meio de cultura fresco DMEM+SFB antes da aquisição; excitação: 488 nm; detecção: 600 – 690 nm). (b) Construção de uma imagem 3D em “z-stack” da fluorescência do PG.

Fonte: Elaborada pelo autor.

O parâmetro investigado neste experimento é a intensidade da fluorescência. Considera-se que a fluorescência do PG é proporcional à quantidade de moléculas excitadas durante a aquisição das imagens. Pode-se notar que a distribuição do PG na população celular é heterogênea. Observa-se também que a morfologia e o tamanho das células variam. Além da localização dos pontos de mais alta intensidade de fluorescência, há uma diferença notável na intensidade da fluorescência entre as células de uma mesma cultura.

Foram estudadas 90 células de uma cultura de células Hep G2. Para isso, selecionou-se uma região retangular localizada no citoplasma das células, como mostra a Figura 3.8. A intensidade média dos pixels no interior da região retangular foi adquirida para cada posição z de cada célula. Para a posição z que apresentou a maior intensidade média dentro do retângulo foi considerada na análise estatística, como medida que representa a IF e a quantidade de PG absorvido por cada célula.

Figura 3.8 - Sequência de imagens de fluorescência de uma célula contendo PG. Um retângulo foi demarcado para obtenção da intensidade média da fluorescência na região central do citoplasma. Este procedimento foi realizado individualmente em 90 células por amostra.

Fonte: Elaborada pelo autor.

O software ZEN é capaz de medir a intensidade média de fluorescência nas regiões retangulares selecionadas nas imagens de microscopia confocal, na Figura 3.9 pode-se notar como a intensidade de fluorescência varia em função da camada, ou seja, a distribuição das moléculas de FS nas células não é homogênea.

Figura 3.9 - Intensidade de fluorescência aferida nas regiões retangulares demarcadas na figura 3.8.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Os dados de intensidade média de fluorescência das 90 células estão representados na distribuição de frequência que relaciona a intensidade de fluorescência e a quantidade de células, apresentado na figura 3.10.

Figura 3.10 - Ajuste gaussiano do histograma da intensidade média da fluorescência dos derivados de hematoporfirina contidos nas células.

Fonte: Elaborada pelo autor.

O coeficiente de determinação do ajuste realizado, também chamado de R^2 , é uma medida de qualidade do modelo em relação à sua habilidade de estimar corretamente os valores

da variável de resposta – que variam entre 0 e 1 – sendo que, quanto maior o valor de R^2 , maior a correlação entre os dados e o modelo escolhido. No ajuste realizado acima, o valor de R^2 foi de 0,85, o que significa que 85% da variância dos dados de IF das células podem ser representadas por um modelo gaussiano.

3.2.2 Citometria de fluxo para o estudo da captação de Photogem® por células Hep G2 em cultura de monocamada

O total de eventos esperados para cada uma das amostras dos grupos CTRL_DMED, CTRL_SFB, e PG_SFB foi de aproximadamente 10^4 por amostra, valor usualmente utilizado nesse tipo de análise. Contudo, para o grupo PG_DMED, o número de eventos máximo alcançado foi $N_{max} = 8.372$, obtido ao somar contagens das três amostras, um número bastante reduzido comparando-se com os grupos controle. Isso demonstra que há efeito citotóxico no escuro causado pelo PG na concentração de $5,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Adicionalmente, na ausência do SFB, observou-se estresse celular acentuado, por meio da contagem em câmara de Neubauer. Dentre milhares de eventos aferidos, existem partículas que não estão sendo avaliadas, como os resíduos celulares (“*debris celular*”) e os aglomerados de células, sendo a população-alvo aquela formada por células individuais apenas. Para selecioná-las, realizou-se a demarcação da região de interesse – procedimento chamado de “*gating*”.

No gráfico de dispersão apresentado na figura 3.11, que relaciona os parâmetros FSC e SSC (os quais representam o tamanho celular e a granulosidade interna das células, respectivamente) a região demarcada em vermelho representa a população de células individuais. O alvo do nosso estudo são as células individuais, portanto a seleção da região de interesse. O número mínimo de eventos de interesse aferidos foi observado no grupo PG_DMED, e foi adotado como o número de eventos que seriam analisados, com o intuito de avaliar o mesmo número de eventos para todos os grupos experimentais.

Figura 3.11 - Gráficos de dispersão relacionando os parâmetros FSC e SSC de cada grupo experimental. As regiões demarcadas selecionam os eventos, eliminando-se o resíduo (“debris”) celular e os aglomerados celulares, e separando apenas os eventos com propriedades de uma célula individual para os grupos: (a) CTRL_DMEM (b) PG_DMEM (c) CTRL_SFB (d) PG_SFB. O grupo em azul representa os aglomerados celulares; o grupo em verde representa os resíduos celulares, e o vermelho as células de Hep G2.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Uma das amostras do grupo CTRL_SFB foi descartada por apresentar baixo número de células, provavelmente por consequência do dano celular causado pelo excesso de tempo durante a tripsinização, o que resultou num gráfico de dispersão FSC vs. SSC de padrão atípico. O total de eventos considerados como células individuais, e posteriormente utilizados na análise estatística, está indicado na tabela 3.2. Considerando-se o cultivo inicial de $5,0 \times 10^4$ células Hep G2 por amostra, pode-se considerar que no mínimo 10% das amostras foram analisadas por citometria, e posteriormente analisadas estatisticamente.

Tabela 3.2 - Número total de eventos para cada grupo experimental, e número de eventos de cada subgrupo pré-selecionado no gráfico de dispersão FSC vs. SSC.

Grupos	CTRL_DMEM	PG_DMEM	CTRL_SFB	PG_SFB
Células Hep G2	5005	5027	5009	5020
Debris celular	3703	2328	1499	3060
Aglomerados	3133	248	2727	4216
Total	28112	8372	20902	30940

Fonte: Elaborada pelo autor.

Durante a citometria de fluxo, todas as amostras foram analisadas com todos os canais de fluorescência do citômetro abertos, possibilitando a aquisição da IF de diversas bandas do espectro. Apenas a fotomultiplicadora 670-725 nm é adequada para captar a fluorescência das moléculas do PG, e este foi o parâmetro utilizado para caracterizar a quantidade de moléculas de PG captadas por cada célula. Quanto mais moléculas de PG captadas por uma célula, maior será a IF aferida entre 670-725 nm. A Figura 3.12 apresenta os histogramas que representam a distribuição de frequência da IF entre 670-725 nm das células Hep G2. Os dados foram normalizados de forma que a área de todos os histogramas comparados seja igual, o que facilitou a avaliação estatística.

Figura 3.12 – Distribuições de frequência da IF (aferida entre 670 e 725 nm) do subgrupo pré-selecionado e denominadas células Hep G2 de cada grupo experimental. O histograma violeta é referente ao grupo no qual as células foram incubadas com DMEM, contendo SFB (10%) e PG. O histograma azul é referente ao grupo no qual as células foram incubadas com DMEM e PG. Os histogramas verde e vermelho representam os grupos controle nos quais as células foram incubadas com DMEM+SFB e apenas com DMEM, respectivamente, e representam a autofluorescência das células na banda aferida. A seta demarca o valor crítico de fluorescência (F^*). Isto significa que à esquerda da seta estão as células do grupo controle, as quais não captaram o PG, enquanto à sua direita estão as células que captaram PG e estão emitindo fluorescência com intensidade muito maior que a autofluorescência celular. Nos grupos tratados a concentração do PG foi de $5,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Partindo das distribuições de IF foram obtidos os valores do coeficiente de variação (CV) de IF, o percentual de células marcadas – ou seja, fotossensibilizadas, e o coeficiente de correlação entre FSC e IF para o grupo que recebeu PG. Segundo o estudo de Leunig e colaboradores (1993), a intensidade de fluorescência celular está diretamente ligada a quantidade de FS captado pela célula (88). Assumindo que IF está relacionada com a quantidade de moléculas de PG absorvidas por cada célula, pode-se verificar a variação da sua captação pelas células Hep G2 através dos histogramas de IF, e do deslocamento de tais distribuições. A IF média do grupo PG_DMED é superior à IF dos outros grupos. Observamos, que há maior dispersão dos valores de IF, sendo que o desvio padrão também supera os valores encontrados para os demais grupos.

Avaliando a figura 3.12, observa-se que a presença do SFB no meio de cultura causou uma diminuição na captação do PG pelas células Hep G2, comparativamente ao grupo PG_DMED. É possível que as moléculas contidas no SFB interajam com as moléculas de PG, causando agregação e, portanto, dificultando a captação do PG pelas células. Esta redução na captação de moléculas de HpD na presença do SFB já havia sido relatada por Bohmer e Morstyn em um estudo semelhante utilizando-se citometria de fluxo (51, 88).

A ausência de SFB aumenta a citotoxicidade do PG, ao passo que aumenta a captação do mesmo pelas células. Através da análise estatística dos histogramas apresentados, obteve-se a média e o desvio padrão do parâmetro IF. Na figura 3.13, pode-se verificar a superioridade da IF do grupo PG_DMEDM comparado com o grupo PG_SFB que, por sua vez, é superior à autofluorescência celular representada pelos grupos controle. Apesar disso, a média, a mediana e a moda das intensidades das distribuições de IF foram analisadas, e os coeficientes de correlação entre esses parâmetros encontrado foi de 0,99, para todos os grupos experimentais. Isto significa que a distribuição de IF é uma distribuição normal, mais precisamente distribuições mesocúrticas (tem o mesmo achatamento que a distribuição normal). Assume-se que a intensidade máxima da autofluorescência celular é $F^* \approx 10^1$, que representa a fluorescência crítica acima da qual se pode concluir que houve a mínima captação de moléculas de PG pelas células. No caso em que se considera o grupo marcadas, o truncamento que corresponda ao limite de não marcação/marcação das células está localizado em $2 \cdot 10^2$ no eixo IF (670-725 nm). Com base nisso, foi possível identificar uma parcela dos dados como o grupo “Marcadas” (vide figura 3.13), que indica que apenas aproximadamente 40% das células do grupo PG_SFB foram marcadas, enquanto aproximadamente 99% das células do grupo PG_DMEDM foram marcadas. Por outro lado, se considerarmos a seleção denominada Marcadas*, que tem limite marcação/não marcação que tem como referência a intensidade máxima aferida para o grupo controle, para este tipo de delimitação a presença do PG atinge 96% e 100%, para os grupos PG_SFB e PG_DMEDM, respectivamente.

Figura 3.13 – Intensidade média da fluorescência (média de IF, aferida entre 670 e 725 nm) do subgrupo pré-selecionado e denominadas células Hep G2 de cada grupo experimental.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Os valores de desvio padrão de dois conjuntos de dados apresentados na figura 3.14, por si só, não podem ser utilizados para determinar qual conjunto apresenta maior dispersão, uma vez que podem variar consideravelmente de acordo com o conjunto ao redor do qual ocorram. Por outro lado, é possível utilizar um parâmetro adimensional, definido como a razão entre a média e o desvio padrão de uma variável, que são expressos na mesma unidade. Este parâmetro é chamado de coeficiente de variação (CV), e pode ser comparado com outros CV. O CV de uma determinada variável ou de um conjunto de dados pode ser considerado uma medida significativa se o conjunto de dados apresentar apenas valores positivos, como é o caso da distribuição de IF. Nestes casos, a comparação dos CV pode assumir um caráter significativo: entre dois conjuntos de dados, aquele com o CV menor é menos disperso que aquele com CV maior.

Abaixo, na figura 3.14, são apresentados os valores de CV para os grupos experimentais em forma percentual. Nota-se que o CV do grupo PG_DMED é semelhante ao do grupo PG_SFB – em torno de 45% – o que mostra que a dispersão dos dados e as propriedades das distribuições de IF para esses grupos são semelhantes, apesar da diferença no valor médio e no desvio padrão de IF dos mesmos.

Figura 3.14 – Coeficiente de variação da IF, que representa o grau de dispersão através da razão entre o desvio padrão e o valor médio de IF. Os cálculos foram realizados para cada amostra de cada grupo, de um experimento em triplicata.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Ao correlacionarmos a média, a mediana e a moda de cada distribuição, verificamos que esses parâmetros são aproximadamente iguais em todas as distribuições, sendo o coeficiente de correlação aproximadamente 0,99. Isso significa que essas distribuições são normais, ou seja, embora a captação do PG varie entre células de uma mesma cultura, tem-se apenas um tipo de população celular, o que justifica uma distribuição normal.

Adicionalmente, o coeficiente de correlação (CC) entre o tamanho das células individuais (representado pelo FSC) e a IF máxima do PG encontrado foi de aproximadamente 0,7 para os grupos DMEM_T e SFB_T. Este CC indica uma correlação moderada entre esses parâmetros – ou seja, indica que o tamanho da célula influencia na quantidade de moléculas de HpD captadas, fenômeno já relatado nos estudos de Bohmer e Morstyn. (51) A correlação moderada também indica que outros fatores podem influenciar a captação das moléculas de PG, como a quantidade de receptores de LDL presentes na membrana celular, a fase do ciclo celular em que se encontra a célula e, provavelmente, uma heterogeneidade intrínseca que é produto da diversidade celular tumoral.

4 Ensaio de citotoxicidade de TFD utilizando-se culturas tridimensionais obtidas pelo método de levitação magnética

Os experimentos descritos neste capítulo e no capítulo seguinte foram realizados no Departamento de Física da Rice University, Houston, Texas, EUA, sob a orientação do Prof. Dr. Thomas C. Killian; em colaboração com a empresa Nano3D Biosciences, Inc., University of Texas, Houston, Texas, EUA, sob orientação do Dr. Glauco Souza. O objetivo deste trabalho foi a criação de amostras que mimetizassem o crescimento celular e o parênquima de um tecido neoplásico, para tal utilizou-se o método de levitação magnética para a produção de culturas tridimensionais. Os ensaios *in vitro* constituem a etapa inicial na verificação do potencial de ação de um agente fotossensibilizador. Além disso, o cultivo de células em culturas tridimensionais utilizando-se o MLM é uma forma de se criar tecidos milimétricos compostos por um número de células que varia entre milhares e milhões, as quais podem pertencer a uma linhagem apenas ou a uma combinação de diversas linhagens. A interação célula-célula promovida estimula a geração de proteínas de adesão, MEC, e um microambiente que mimetiza o microambiente tumoral. Em particular, o MLM utiliza-se de nanopartículas com propriedade magnética para a ancoragem das células, e apresenta vantagens do ponto de vista prático e econômico para ensaios de citotoxicidade porque não requer uso adicional de MEC de origem animal ou estruturas artificiais como “*scaffolds*”.

4.1 Metodologias

4.1.1 Cultivo celular

As linhagens de células utilizadas neste estudo foram a Hep G2, a MDA-MB-231 e a HPF. As células foram cultivadas em garrafas de 75 cm² (Techno Plastic Products – TPP, Trasadingen, Suíça) contendo 11,0 mL de meio de cultura DMEM, suplementado com 10% de SFB, e 1,0 mL da solução com antibióticos (10.000 UI.mL⁻¹ penicilina, 10 mg.mL⁻¹ estreptomicina) na temperatura de 37°C em ambiente úmido com 5% de CO₂. As culturas celulares foram lavadas com solução salina (PBS) e receberam meio de cultura fresco a cada dois ou três dias. Culturas de células tumorais promovem uma alteração da coloração do meio de cultura após consumir os nutrientes, apontando a necessidade de reposição do meio de cultura. Uma garrafa de 75 cm² em confluência de aproximadamente 80% fornece aproximadamente 6x10⁶ células de linhagem tumoral, e aproximadamente 10⁶ células no caso

de linhagem derivada de tecido sadio. O metabolismo de células provenientes de tecidos sadios cultivadas *in vitro* causa menor alteração no pH do meio e, portanto, menor alteração da coloração do meio, o que pôde ser constatado observando-se a menor alteração de cor em meio de cultivo contendo vermelho de fenol. Mais detalhes sobre o vermelho de fenol podem ser encontrados no ANEXO A.

Os experimentos de levitação têm início no cultivo em monocamada, para os experimentos utilizando o MLM descritos a seguir, foi necessário o cultivo de dezenas de garrafas de cultivo de 75 cm².

Células cultivadas em monocamada estão aderidas à superfície plástica do frasco de cultivo. As células Hep G2 se agrupam em conjuntos de algumas dezenas de células como mostra a figura 4.1(A). As células MDA-MB-231 formam grupos de células menores quando comparadas com as células Hep G2, como se pode observar na comparação das figuras 4.1(A) e (B). As células HPF, que no tecido apresentam uma forma poliédrica ou estrelada, apresentam um formato mais alongado e alinhado com as células vizinhas quando cultivadas em monocamadas, como mostra a figura 4.1(C). De maneira geral, as células aderidas em monocamada interagem com as células vizinhas e com o plástico, e tem formato diferente daquele observado no tecido.

Figura 4.1 – Imagens de células cultivadas em monocamadas obtidas através de microscopia óptica. (A) Células Hep G2, escala - 1 mm. (B) Células Hep G2, escala - 200um. (C) Células MDA-MB-231, escala - 1 mm. (D) Células MDA-MB-231, escala - 200um (E) Células HPF, escala - 1mm. (E) Células HPF, escala - 200um.

Continua

continuação

Fonte: Elaborada pelo autor.

As células de linhagem de tecido sadio, quando cultivadas em monocamada, têm seu crescimento limitado pelo contato com outras células, um fenômeno conhecido como inibição por contato. As células tumorais podem crescer e formar algumas camadas de células, não apresentando grande sensibilidade à inibição por contato. Dessa maneira, as células tumorais que estão aderidas na superfície plástica, nas camadas inferiores da monocamada, tem acesso reduzido aos nutrientes do meio de cultivo. A falta de acesso aos nutrientes causa a morte celular, e assim a cultura perde em viabilidade. Além disso, durante a troca do meio de cultivo, muitas células são eliminadas no sobrenadante. Dessa forma, o cultivo em monocamada apresenta limitações para o cultivo celular por um longo período de tempo; em contrapartida, é essencial para o início da experimentação utilizando-se o MLM.

4.1.2 “Nanoshuttle” e a magnetização da estrutura celular

No momento em que as culturas em monocamada atingiram a confluência de aproximadamente 80%, as garrafas receberam a solução contendo as nanopartículas com propriedade magnética (NanoShuttle™-PL - Nano3D Biosciences, Inc. - aqui abreviadas como NS) na proporção de 1 μ l para cada 10^4 células, um total de 600 μ l para uma garrafa de 75 cm² (figura 4.2). As células foram incubadas com NS durante aproximadamente 12 horas.

Figura 4.2 - Primeiro passo para a levitação das células, que consiste na adição de NS nas garrafas de cultivo contendo células em aproximadamente 80% de confluência.

Fonte: Elaborada pelo autor.

A solução de NanoShuttle™-PL é composta por nanopartículas de ouro, de óxido de ferro, e de poli-L-lisina. As NS se aderem nas membranas celulares através de interações eletrostáticas, conferindo propriedades magnéticas às células. Células magnetizadas tem coloração mais escurecida, com pequenos pontos escuros como mostra a figura 4.3.

Figura 4.3 - Células Hep G2 contendo NanoShuttle™-PL após 12 horas de incubação e lavagem com PBS.

Fonte: Elaborada pelo autor.

As NS se mantêm ligadas à membrana celular por 8 dias. Após esse período, elas se localizam na MEC da cultura 3D. O NS é biocompatível, não afeta o metabolismo celular, pode aumentar a proliferação celular (dependendo do tipo celular), e não promove estresse celular. Além disso, não interfere em outras técnicas experimentais como a marcação para ensaios de fluorescência, por exemplo.

Após a incubação com NS por 12 horas, as culturas foram triplamente lavadas com PBS, e desprendidas da superfície pelo processo de tripsinização utilizando-se solução de tripsina pré-aquecida (EDTA 0,05%, 1 mL - volume necessário para cobrir toda a superfície da garrafa; incubação durante 3-5 minutos). As células foram contadas utilizando-se o hemocitômetro, e então transferidas para placas de Petri de 35 mm, de baixa adesão (Fisher Thermo Scientific 12-566-339, Nunc 174913). O método de levitação magnética, na sua configuração mais simples, é composto por um magneto de neodímio, uma placa de Petri, e as NS. O meio de cultura deve ser o mesmo utilizado no cultivo em monocamada. O magneto de neodímio gera um campo que intensidade de 0,2 Tesla, as células estão levitando a uma distância de aproximadamente 10 mm da superfície do magneto, nesta região a intensidade é de aproximadamente 0,05 Tesla. Para uma noção da intensidade desse campo, pode-se

compará-lo com a intensidade do campo magnético terrestre nos polos, que é aproximadamente 0,06 Tesla.

Figura 4.4 - Cultura de células levitando na superfície ar-líquido.

Fonte NANO3D (90)

4.1.3 Método de levitação magnética 6 poços

O método de levitação consiste da magnetização das células, seguida da levitação das mesmas através do uso de um arranjo com 6 magnetos de neodímio, que pode ser visualizado na Figura 4.5(A). A montagem do sistema consiste da transferência de meio contendo células magnetizadas para os poços da placa de 6 poços de baixa adesão (Corning® - Modelo 3471, EUA) ilustrada na Figura 4.5(B), seguida do posicionamento estratégico de um arranjo de magnetos de neodímio sobre a placa, como mostra a Figura 4.5(C). O volume ideal de meio para placas de 6 poços é de 2 mL, e a concentração recomendável de células é de $1,6 \times 10^6$ células.mL⁻¹. Portanto, é possível levitar aproximadamente $3,2 \times 10^6$ células por poço, totalizando cerca de $1,9 \times 10^7$ células em uma placa.

Figura 4.5 - (A) Kit para levitação em 6 poços. (B) Montagem do sistema para cultivo das células magnetizadas em placa de 6 poços. (C) Sistema de 6 magnetos baseado no método de levitação magnética.

(a)

Continua

continuação

Fonte: Elaborada pelo autor.

Após o cultivo das células magnetizadas e a montagem do sistema de levitação ilustrado na figura 4.5(C), todo o sistema foi levado para a incubadora. O tempo de levitação neste sistema pode ser estendido por um período de horas até semanas, dependendo do delineamento experimental. A formação de estruturas celulares maiores, de dimensão milimétrica, pôde ser acompanhada por microscopia óptica, adquirindo-se imagens das amostras no início da levitação (t_0), 1 hora depois (t_1), 2 horas depois (t_2), 4 horas depois (t_4), e na sequência, diariamente (a cada 24 horas a partir do início da levitação), por 5 dias (e, portanto, t_{24} , t_{48} , t_{72} , t_{96} e t_{120} , respectivamente). No caso das linhagens utilizadas nesse ensaio, foi verificado que a produção de MEC e a formação de aglomerados de células ocorre a partir de 12 horas.

4.1.4 Método de levitação magnética - 24 poços

A aplicação da TFD em culturas tridimensionais de células Hep G2 foi realizada com o intuito de parametrização da distribuição de D_{th} . O procedimento para o MLM de 24 poços é semelhante ao de 6 poços, exceto pelo formato, tamanho e intensidade dos magnetos, bem como o arranjo espacial dos mesmos. A levitação das células magnetizadas foi então realizada através do uso de um kit para levitação com 24 magnetos de neodímio, ilustrado na Figura 4.6(A). Além disso, é necessária a utilização de uma tampa de isolamento que é posicionada entre as amostras e os magnetos. Acima do arranjo de magnetos foi posicionada a tampa da placa de cultivo e o conjunto foi levado para a incubadora.

Os magnetos têm um furo que permite a passagem da luz do microscópio óptico, e assim se pode monitorar a formação das estruturas multicelulares por imagem (Figura 4.6(C) e (D)).

Figura 4.6 - (A) Kit para levitação em placa de 24 poços. (B) Sistema de placa de 24 poços baseado no método de levitação magnética. (C) Amostras sendo fotografadas no microscópio invertido. (D) Visualização da cultura levitando em placa de 24 poços durante a aquisição de imagens de microscopia.

Fonte: Elaborada pelo autor.

O volume de meio de cultura deve ser adaptado para a célula de interesse; portanto, foram testados volumes de 300 e 400 μL . O número de células também foi adaptado após um ensaio variando-se o número de células por poço. Utilizando-se as células MDA-MB-231, foram cultivadas 15, 30, 60, 125, 250, e 500 mil células por poço, cada grupo em quadruplicata. O número de células por poço adotado para a sequência dos experimentos foi de 100 mil e de 200 mil células por poço.

Na sequência, foram cultivadas as células das linhagens Hep G2 e MDA-MB-231, utilizando o MLM de 24 poços, seguido da aplicação da TFD utilizando-se o PG e luz com comprimento de onda em 630 nm.

4.1.5 Aplicação da TFD

Após o estabelecimento das culturas tridimensionais através do MLM, a TFD foi aplicada. As amostras receberam meio de cultura contendo 10% de SFB e o fotossensibilizador Photogem[®], nas concentrações 50, 25, 12,5, 6,25 e 3,13 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Em seguida, foram incubadas por 24 horas. Depois da incubação, o meio de cultura contendo FS foi descartado, o meio de cultura fresco foi adicionado, e as amostras foram iluminadas. As células foram iluminadas utilizando-se os dispositivos BioTable e LightWell (fabricados no Laboratório de Apoio Tecnológico – LAT – Grupo de Óptica, IFSC, USP, São Carlos), que são dispositivos a base

de LEDs (acrônimo do inglês *Light Emitting Diodes*), e que produzem luz no comprimento de onda centrado em 630 nm e intensidade superficial aferida de 30 mW.cm^{-2} . Adicionalmente, foi confeccionado um conjunto de filtros para a iluminação em diferentes intensidades e fluências de luz, com atenuação de transparência de 0, 50, 65, e 100%, como mostra a figura 4-7(B).

Figura 4.7 – (A) BioTable. (B) Filtros de atenuação (Esquerda para a direita: 0%, 50%, 65%, e 100%).

Fonte: Elaborada pelo autor.

A composição espectral de irradiação é um fator muito importante para a TFD. A BioTable apresenta uma banda de emissão centrada em aproximadamente 630 nm, mas o espectro de emissão apresenta largura a meia altura de aproximadamente 30 nm. As figuras 4.8(A) e (B) ilustram as fontes de luz LightWell, e as figuras 4.8(C) e (D) foram adquiridas no momento da iluminação de amostras obtidas através do MLM em 24 poços.

Figura 4.8 – (A) Fonte de luz LightWell, um dispositivo composto por dispositivos LED (Light Emmitting Diode) emitindo luz com intensidade de 30 mW.cm^{-2} na superfície de iluminação no comprimento de onda centrado em 630 nm. (B) Posicionamento de diversas fontes de luz abaixo da placa de cultivo. (C) Iluminacao de uma cultura para a ativação do FS. (D) Iluminacao da placa de 24 poços contendo culturas tridimensionais submetidas à TFD.

continua

continuação

Fonte: Elaborada pelo autor.

A distribuição espacial da radiação é direcional: os fótons que saem do poço de luz não são coerentes, não estão colimados, por isso, a intensidade de luz foi aferida na região central da fonte de luz, e calibrada para uma intensidade de 30 mW.cm^{-2} . Na sequência de experimentos, utilizou-se uma terceira fonte de luz que consiste de um painel de luz também a base de LEDs (LightPad® - Artograph®, Inc., Delano, MN 55328). As propriedades ópticas foram aferidas utilizando-se o espectrofotômetro USB2000+ Miniature Fiber Optic Spectrometer e o software SpectraSuite (Ocean Optics, Inc., Dunedin, FL, USA 34698). Depois das aferições e dos cálculos, o valor médio da intensidade obtido foi de 7 mW.cm^{-2} . Além disso, o espectro de emissão foi aferido e está representado na figura 4.9.

Figura 4.9 – Espectro de emissão do LightPad® aferido utilizando-se o espectrofotômetro da USB2000+.

Fonte: Elaborada pelo autor.

A luz branca foi utilizada para iluminação das amostras durante a aquisição de imagens fotográficas; pode-se verificar no espectro de iluminação na Figura 4.9 que a luz branca é capaz de excitar as moléculas de PG e por isso também realiza TFD. Por isso, adaptamos um temporizador que, coordenado com um iPod, permitiu que a fluência de luz branca entregue fosse reduzida ao mínimo. Este passo será melhor esclarecido no capítulo seguinte.

4.2 Resultados e discussão

4.2.1 MLM - placa de 6 poços

Para as células Hep G2, pode-se verificar na figura 4.10(A) que após 24 horas de levitação, as células já estão aderindo-se umas às outras, e formando pequenos aglomerados celulares com diâmetro da ordem de 100 μm . Esses aglomerados celulares estão se conectando para formar uma estrutura única. Após 120 horas de levitação, os blocos de células estão cada vez maiores e mais densos, como pode ser verificado na figura 4.10(B). Comparando-se as figuras 4.10(A) e (B), nota-se o aparecimento de regiões mais escuras na imagem, que indicam que a densidade de NS, a quantidade de células e a espessura da cultura nestas regiões é maior que nas regiões mais transparentes. Considerando-se o número inicial de células de $3,2 \times 10^6$ e que as células tumorais em cultivo dobram em quantidade a cada 16 horas, após 120 horas pode-se estimar a população celular em aproximadamente 10^8 células, desconsiderando-se a mortalidade celular.

Figura 4.10 - Microscopia de culturas tridimensionais MLM em placa de 6 poços. (A) Células Hep G2 após o tempo de levitação de 24 horas. Escala – 200 μm (B) Células Hep G2 após o tempo de levitação de 120 horas. Escala – 200 μm .

Fonte: Elaborada pelo autor.

O mesmo fenômeno de agregação celular foi observado nas imagens de microscopia das células MDA-MB-231, como mostram as figuras 4.11(A) e (B). A formação destes blocos

de células é importante para os experimentos seguintes, uma vez que a agregação destas células em blocos favorecerá a impressão dos *dots* e *rings* celulares com auxílio das nanopartículas metálicas (descritos no capítulo 5), acelerando o processo. Nota-se também um aumento na densidade da cultura após o cultivo por 120 horas comparando-se com a densidade da cultura após 24 horas de levitação. Vale salientar que outros métodos de cultivo 3D requerem mais tempo para a formação das culturas, como exemplo, o modelo utilizado por Barbugli, que necessita aproximadamente 12 dias de cultivo para a obtenção de estruturas da ordem de 100 μm de diâmetro médio. (92)

Figura 4.11 - Microscopia de culturas tridimensionais MLM em placa de 6 poços. (A) Células MDA-MB-231 após o tempo de levitação de 24 horas. Escala – 200 μm (B) Células MDA-MB-231 após o tempo de levitação de 120 horas. Escala – 200 μm .

Fonte: Elaborada pelo autor.

As culturas obtidas através do MLM em 6 poços foram utilizadas na sequência de experimentos apresentados no próximo capítulo, utilizando-se o MIM. Foram realizadas aplicações de TFD em amostras obtidas através do MLM de 6 poços. Contudo, para a quantificação do dano causado pelo efeito fotodinâmico, foi necessário dissociar as culturas e cultivá-las novamente em formato de esferoides e/ou anéis para posteriormente realizar o ensaio de citotoxicidade com 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-Yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide (MTT).

4.2.2 MLM - placa de 24 poços

O MLM de 24 poços resultou em culturas com um número menor de células e com morfologia diferente. As culturas de células Hep G2 obtidas por este método têm aspecto escurecido e maior integridade estrutural, o que as torna muito semelhantes ao tecido tumoral *in vivo*. O MLM apresenta boa reprodutibilidade, como pode-se verificar na figura 4.12(A) e (B).

Figura 4.12 - (a) Imagem macroscópica da placa de cultivo de 24 poços contendo culturas de células Hep G2 após 120 horas de levitação obtidas da face superior da placa de cultivo, sem o magneto e a tampa da placa. (b) Imagem de microscopia de uma cultura tridimensional de Hep G2 após 120 horas de levitação (escala: 200 μm).

Fonte: Elaborada pelo autor.

A sequência de imagens apresentadas das figuras 4.13(A)-(H) ilustra como se deu a formação das culturas tridimensionais de células Hep G2. Pode-se notar que, ao longo do tempo, a interação célula-célula e a produção de MEC se intensificam. Após 182 horas de cultivo, as células formam um tecido *in vitro* com características que mimetizam o tecido tumoral hepático.

O número de células inicial de cada amostra foi de 2×10^5 células para um volume de meio de cultura de 400 mL. Na figura 4.13(A), se pode notar como a morfologia das células em suspensão difere da morfologia daquelas cultivadas em monocamada. Após 2 horas de levitação, pode-se observar a interação célula-célula e a formação dos primeiros aglomerados celulares, como visto na figura 4.13(B). Após 24 horas, a interação dos aglomerados de células começa a formar uma estrutura que se assemelha a uma rede, como mostra a figura 4.13(C). Na sequência, as lacunas presentes na cultura começam a se fechar, como resultado do crescimento celular, como mostra a figura 4.13(D-F). Na figura 4.13(G), a cultura apresenta um formato de disco com diâmetro da ordem de 3 mm. Apesar disso, não foi possível através das imagens de microscopia óptica determinar a espessura das culturas. Na figura 4.13(H) pode-se notar que houve uma alteração na morfologia da cultura, a qual ocorreu no momento da troca do meio de cultura. Para realizar a troca, o conjunto de magnetos é posicionado abaixo da placa de cultivo, e as culturas são ancoradas no fundo da placa, para que o meio de cultivo seja substituído pelo meio fresco. No momento da ancoragem das culturas, pode acontecer uma dobra (ou seja, as placas formadas pela cultura dobram-se sobre si mesmas) e, por isso, ao retomar a levitação a cultura apresenta espessura maior.

Desconsiderando-se a morte celular e a necrose que pode ter surgido no interior das culturas por falta de nutrientes, pode-se estimar o crescimento da população celular durante esse período. Sendo assim, após 182 horas de cultivo, com reposição de meio de cultura a cada

48 horas, as culturas atingiram uma população da ordem de 10^7 células por amostra, e diâmetro médio de 5 mm. As imagens a seguir mostram como a densidade e a integridade da cultura aumentam com o tempo. Pode-se notar regiões mais densas, e regiões nas quais existe uma maior concentração de NS.

Figura 4.13 - Microscopia das culturas tridimensionais de células Hep G2 obtidas pelo método de levitação. (A) t_0 . (B) t_2 . (C) t_{18} . (D) t_{41} . (E) t_{65} . (F) t_{90} . (G) t_{134} . (H) t_{182} . Escala de 200 μm .

Continua

continuação

Fonte: Elaborada pelo autor.

A levitação das células MDA-MB-231 também resultou em culturas tridimensionais com características importantes de tecidos, embora o processo de formação tenha sido diferente daquele para as células Hep G2. Na figura 4.14(A), observa-se o início da levitação e o agrupamento das células no centro do campo magnético. Nota-se aí a heterogeneidade morfológica das células MDA-MB-231, que variam em tamanho e formato. A formação da cultura celular unitária se dá após o período de 41 horas, mais devagar que a formação das culturas de Hep G2. Além disso, o fechamento dos espaços vazios no interior da cultura acontece mais cedo, em 41 horas, como mostra a figura 4.14(E). Em seguida, a cultura aumenta em tamanho e em número de células, e mantém a integridade física. Nota-se um aumento na densidade da cultura após 65 horas de cultivo, o que pode ser observado nas figuras 4.14(F-H).

Figura 4.14 - Microscopia das culturas tridimensionais de células MDA-MB-231 obtidas pelo MLM. (A) t_0 . (B) t_2 . (C) t_{18} . (D) t_{41} . (E) t_{65} . (F) t_{90} . (G) t_{134} . (H) t_{182} . As imagens (A)-(H) contêm uma barra de escala de 1 mm, enquanto as imagens (I)-(P) apresentam barras de escala de 200 μm e tempo de levitação de sua respectiva imagem à esquerda.

continua

continuação

Fonte: Elaborada pelo autor.

Além das diferenças entre as culturas de células Hep G2 e as células MDA-MB-231 no que diz respeito aos tempos de aglomeração, de início da interação célula-célula e da formação da cultura tridimensional unitária, observa-se que existe uma diferença na densidade

das culturas desses dois tipos celulares: a cultura de Hep G2 apresenta a maior densidade de células e mais MEC que a cultura de MDA-MB-231. Uso de técnicas como o MLM expande as possibilidades do estudo de culturas celulares como uma primeira aproximação para efeitos de toxicidade e de cinética de medicamentos, bem como de acoplamento de luz em volumes teciduais. As culturas de célula por adesão padrão apresentam menor capacidade de formar volumes celulares mais expressivos, tornando-se efetivamente camadas de células que basicamente permitem avaliar o efeito isolado do teste em questão sobre a constituição celular. Enquanto a associação de efeitos e elementos próprios da agregação celular, como a formação substancial de MEC e a formação de multicamadas celulares num volume semelhante ao que se observa no fenômeno dos biofilmes, e que são muito semelhantes à formação tecidual por si só, ficam em segundo plano nestas culturas. Neste sentido, o MLM amplia os graus de liberdade de deslocamento celular, conferindo liberdade de movimento de modo que as células podem se aproximar mais umas das outras, ampliando a superfície de contato de uma célula exposta a outra, e estimulando os efeitos induzidos por contato de modo a facilitar a formação de volumes semelhantes aos teciduais, e criando simulacros melhores dos tecidos. Além disso, tais modelos permitem que as células recebam nutrientes de forma mais efetiva e minimiza as perdas de células pelo sobrenadante durante a troca de meio, que são limitações características das técnicas mais comuns.

4.2.3 Resultado da TFD

Após o estabelecimento das culturas tridimensionais e da aplicação da TFD, foi possível verificar alguns efeitos da ação fotodinâmica através das imagens de microscopia. Nas figuras 4.15(A) e (B), pode-se comparar a cultura controle com a tratada com TFD, e observar o efeito fotodinâmico após 24 horas da iluminação. O dano oxidativo causou a quebra e a fragmentação das culturas tridimensionais de células Hep G2, e formou aglomerados de diferentes tamanhos - desde agrupamentos micrométricos até estruturas milimétricas. Nas figuras 4.15(C) e (D), a diferença entre a região periférica da cultura do grupo controle e tratado pode ser observada com mais detalhes, e a fragmentação da cultura fica ainda mais evidente. Foi verificado anteriormente que a captação do PG por uma população de células Hep G2 em monocamada é heterogênea, neste caso, em que as células formam uma estrutura tridimensional, deve-se acrescentar a barreira criada pela MEC, o que reduz a disponibilidade de moléculas de FS no interior da cultura.

Figura 4.15 - Culturas tridimensionais de células Hep G2: (a) Antes da aplicação da TFD (240 horas de levitação) (b) 24 horas após a aplicação da TFD. Escala 1mm. (c) Antes da aplicação da TFD (240 horas de levitação) (d) 24 horas após a aplicação da TFD. Escala 200 μ m.

Fonte: Elaborada pelo autor.

A levitação com placa de 24 poços gera uma cultura tridimensional, com diâmetro de aproximadamente 4 mm e espessura indeterminada. Após a aplicação da TFD, as células perdem aderência, começam a se dissociar e a cultura perde integridade. Como uma fração de células ainda contém nanopartículas e, por isso, está sob o efeito do campo magnético, as células são mantidas ancoradas no centro do poço, na superfície ar-líquido. Contudo, não se pode afirmar qual é a fração de células mortas ou vivas e, portanto, não se pode quantificar o dano da ação fotodinâmica.

No caso das culturas de células MDA-MB-231, nota-se também a perda da integridade e a dissociação dos aglomerados de células, como pode ser observado comparando-se as figuras 4.16(A) e (B). Pode-se verificar mais detalhadamente esse efeito de dissociação causado pela TFD nas figuras 4.16(C) e (D). As células do grupo controle continuam agregadas, enquanto as células do grupo tratado com TFD estão levitando próximas umas às outras mas perderam adesão.

Figura 4.16 – Culturas tridimensionais de células MDA-MB-231: (a) Antes da aplicação da TFD (240 horas de levitação) (b) 24 horas após a aplicação da TFD. Escala 1 mm. (c) Antes da aplicação da TFD (240 horas de levitação) (d) 24 horas após a aplicação da TFD. Escala 200 μ m.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Após 24 horas da iluminação as culturas foram dissociadas mecanicamente, sendo uma parte das células utilizada para a impressão das culturas nos formatos de esferóide e anel, e a outra parte tendo permanecido sob o efeito do campo magnético, que crescia continuamente. Observe na figura 4.17(A) como as culturas de células Hep G2 restabeleceram a estrutura tridimensional após a aplicação da TFD. Na figura 4.17(B) pode-se verificar que as células do grupo controle também formam novamente a cultura tridimensional.

Figura 4.17 - (A) Cultura tridimensional de células Hep G2 após de aplicação da TFD e recrescimento, totalizando 640 horas de cultivo. (b) Grupo controle, tempo de cultivo de 640 horas. Escala: 1 mm.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Comparando-se as culturas dos diferentes tipos celulares, pode-se concluir que as células Hep G2 obtidas por MLM por mais de 185 horas formaram uma estrutura celular densa e que ofereceu mais resistência ao dano causado pela TFD. É notável como as células Hep G2 retomaram o crescimento, e restabeleceram a cultura semelhante ao grupo controle. Enquanto isso, no caso das células MDA-MB-231 a integridade da cultura não foi restabelecida, como pode ser verificado através da comparação entre as imagens apresentadas nas figuras 4.18(A) e (B).

Figura 4.18 - (A) Cultura tridimensional de células MDA-MB-231 após de aplicação da TFD e recrescimento, totalizando 640 horas de cultivo. (b) Grupo controle, tempo de cultivo de 640 horas. Escala: 1 mm.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Através das imagens de microscopia das amostras de Hep G2 e MDA-MB-231, pode-se concluir que houve efeito citotóxico mas, não foi possível quantificar o dano apenas avaliando-se as imagens. Porém, o método de levitação foi conjugado com um ensaio de citotoxicidade qualitativo. Utilizou-se o ensaio com a Calceína AM associada ao homodímero-1 de etídio (EthD-1) seguido da aquisição de imagens de microscopia de fluorescência. O MLM pode ser considerado quantitativo quando conjugado com o ensaio de MTT. Para obtenção de resultados com relevância estatística nestes ensaios de citotoxicidade é necessária uma amostragem triplicada para cada grupo. Para isso, foi preciso fragmentar as culturas mecanicamente, dividi-las em alíquotas, e reconstruir a cultura tridimensional através do MIM, que será apresentado no capítulo 5.

De uma maneira geral, a terapia fotodinâmica com os parâmetros de tratamento empregados não resultou em uma destruição completa dos tumores crescidos com a MLM. O dano mais evidente, para ambas as culturas, foi observado nas margens dos tumores, evidenciando que os componentes importantes da reação fotodinâmica, i.e. fotossensibilizador, luz e oxigênio, estavam presentes em maiores quantidades na superfície da cultura, em

comparação às outras regiões tumorais. Esse comportamento já era esperado, uma vez que, principalmente no que se refere à distribuição do fotossensibilizador, a disponibilidade dos três elementos é maior nas superfícies externas do tumor que estão em contato direto com o meio de cultura. Em comparação à cultura monocamada, nem todas as células tumorais do modelo MLM possuem total disponibilidade do fotossensibilizador, isso é presente apenas para aquelas que estão na superfície. A chegada do fotossensibilizador nas regiões internas do tumor depende da difusão e permeação das moléculas pelas células que constituem o tecido e pela MEC. Ainda não foi feito um estudo da cinética e da distribuição do fotossensibilizador nesse tipo de modelo, mas os resultados apresentados, demonstram que a distribuição do fotossensibilizador não foi uniforme em todo o tumor.

Considerando a distribuição da luz na região de 630 nm, existe uma atenuação da luz em função do caminho dos fótons em direção ao centro do tumor. Para os parâmetros de irradiância e fluência empregados, a dose limiar foi atingida em todo o volume tumoral. A difusão das moléculas do FS pode ser a resposta para o fato de que no centro das culturas as células ainda estavam viáveis, isso indica uma efetiva difusão dos nutrientes, inclusive do oxigênio, mas não do FS.

Com o presente protocolo de MLM, foi possível observar uma destruição parcial do tumor, mas não se pode afirmar qual a taxa de morte celular induzida. A observação que pode ser feita é a de que existiu um dano suficiente para uma desagregação tecidual periférica, resultante de um dano na MEC e nas células. Casas e colaboradores demonstraram em seus estudos de citotoxicidade *in vitro*, que a ação fotodinâmica da combinação ácido aminolevulínico (ALA), que é o precursor da protoporfirina IX (PpIX), com luz em 630 nm, causou danos às estruturas de adesão célula-célula e o citoesqueleto celular. Reduzindo assim o poder metastático de células de adenocarcinoma mamário LM3, culturas em monocamada. (92)

Uma propriedade importante dos FS avaliada nesse estudo é a emissão de fluorescência. Sabe-se que no tecido é possível medir a intensidade de fluorescência tecidual e verificar a presença das moléculas do FS no tecido, o aumento ou diminuição da concentração das mesmas. Esta é uma medida da intensidade média de fluorescência, e como foi demonstrado no cap. 3, mesmo uma cultura de uma mesma linhagem celular capta o PG de forma heterogênea. Para uma cultura tridimensional, que é composta por um aglomerado de células ligadas à MEC pode-se esperar que esse fenômeno de heterogeneidade seja ainda mais evidente. Portanto, a entrega do FS ao tecido alvo pode ser um fator limitante durante a aplicação da

TFD, e acarretar a recidiva tumoral. O desenvolvimento de um método capaz de realizar tal medida representaria um avanço no entendimento da resistência tumoral à TFD.

As culturas de células Hep G2 obtidas através do MLM apresentaram morfologia muito semelhante com o tecido hepático tumoral. A dimensão milimétrica dessas culturas permite que aspectos importantes do tecido tumoral seja mimetizado. Nos estudos de Chan et al., foi verificado que culturas celulares 3D tem menor capacidade de incorporação do FS ftalocianina sulfonada (AICIPc), quando comparadas com as células em monocamada e, portanto, doses maiores de luz são necessárias para o mesmo efeito fotodinâmico. (92) Resultados do estudo de Barbugli, também mostram tal efeito em esferoides da ordem de 100 μm de diâmetro das linhagens WM1617 (melanoma) e CCD27SK (fibroblastos de derme) utilizando dose de luz de 700 mJ.cm^{-2} e o FS ftalocianina hidrofóbica (AICIPc) lipossomal (91)

Paula e Chan observaram a redução dos esferoides tratados com AICIPc com relação ao grupo controle utilizando doses de luz da ordem de $0,7 \text{ J.cm}^{-2}$. (91, 93) Os resultados obtidos com o PG demonstram a necessidade de fluência de luz da ordem de 40 J.cm^{-2} para que o efeito fotodinâmico promova morte celular nas culturas 3D obtidas pelo MLM.

5 Dosimetria da TFD utilizando-se culturas 3D obtidas pelo MIM

O método de impressão celular magnética é utilizado para formação de culturas tridimensionais através da montagem de aglomerados celulares contendo NS. Sob o efeito do campo de magnetos posicionados na base da placa de cultivo, as células são atraídas para o fundo do poço de cultivo, e se posicionam de acordo com a geometria do magneto utilizado. A impressão dessas culturas pode ser feita em placas de 6, 24 ou 96 poços; a vantagem em se utilizar a placa de 96 poços é a grande quantidade de amostras que são obtidas. Outra vantagem é a boa reprodutibilidade e o tempo de experimentação, sendo possível obter resultados de citotoxicidade de uma placa contendo 96 amostras de culturas tridimensionais em um período de 48 horas a partir do momento de incubação das células com NS. (67) Os componentes do sistema BiO Assay™ pode ser visualizado na figura 5.1.

Figura 5.1 – Componentes do sistema para testes de citotoxicidade BiO Assay.

Fonte: NANO3D (90)

5.1 Metodologias

5.1.1 Métodos de impressão magnética

Inicialmente, utiliza-se o MLM para levar as células que se deseja investigar por no mínimo 24 horas. A levitação promoverá a interação celular e a produção de MEC. O tempo de levitação deve ser adaptado para cada experimento; para os ensaios com TFD em placas de 6 poços, o tempo de levitação foi de 24 horas, e para aqueles com placas de 24 poços, o tempo

de levitação foi de 14 dias. Após a levitação, foi feita a dissociação mecânica das culturas obtidas através do MLM. Em seguida, as culturas são dissociadas utilizando o método mecânico, com uma pipeta. A contagem e a manipulação das células em solução devem ser realizadas cuidadosamente com relação à homogeneização. O resultado é uma solução contendo agrupamentos celulares de diversos tamanhos e, por isso, considera-se os que são utilizados para montar os esferóides e anéis. O volume de meio contendo os blocos celulares é dividido em alíquotas transferidas para uma placa de 96 poços de baixa adesão. As nanopartículas utilizadas causam escurecimento das células e por isso os *Dots* e *Rings* formados aparecem como pontos pretos ao serem fotografados pelo iPod.

Figura 5.2 – (A) Acoplamento da placa de cultivo de 96 poços no arranjo de magnetos para a geração de anéis. (B) Os pontos pretos indicados pela seta preta são os anéis formados pela MIM após uma hora de padronização. (C) Acoplamento da placa de cultivo de 96 poços no arranjo de magnetos para a geração de esferóides. (D) Os pontos pretos indicados pela seta preta são os esferóides formados pela MIM após uma hora de padronização.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Um arranjo de magnetos de neodímio é posicionado abaixo da placa de cultura. Existem dois tipos de arranjos de magnetos, o arranjo para impressão de esferóides (do inglês, *Dots*), e o arranjo para impressão de anéis (do inglês, *Rings*), que podem ser visualizados nas figuras 5.2(A) e (C). Para cada tipo de célula e experimento, o número de células deve ser adaptado, bem como o tempo de padronização, que é o tempo pelo qual o arranjo de magnetos é mantido em contato com a placa de cultura, para a formação das estruturas nas culturas que estão apresentadas nas figuras 5.2(B) e (D).

O tempo de impressão, que é o tempo que o arranjo de magnetos permanece acoplado à placa de cultivo, varia de 15 minutos até 1 hora, dependendo do tipo celular utilizado. Utilizando o MIM, pode-se obter amostras com diâmetro médio igual ao diâmetro do magneto utilizado, no caso dos *Dots* é de 1 mm, o que garante a reprodutibilidade dos experimentos. As

culturas recebem o composto que está sendo testado durante sua impressão, ou depois da formação das mesmas, dependendo do experimento.

5.1.2 *BiO Assay*

O sistema utilizado para o MIM foi o BiO Assay™ kit para 96 poços (Nano3D Biosciences, Inc., Houston, TX, USA) e as linhagens celulares utilizadas foram a Hep G2, a MDA-MB-231 e a HPF. As imagens foram adquiridas utilizando-se um iPod (iPod touch, 32 GB, Apple Computer, Cupertino, CA) que é posicionado dentro de uma caixa de policarbonato n3Dock (Nano3D Biosciences, Inc., Houston, TX, EUA). Além disso, também compõem o sistema uma lente de Fresnel de material plástico e uma fonte de iluminação de luz branca, o LightPad (LightPad A920, Artograph Inc., Delano, MN).

As imagens foram adquiridas pelo iPod através de um aplicativo para aquisição das imagens. Neste aplicativo, primeiro cria-se uma pasta de identificação do experimento, em seguida ajusta-se o número de imagens que serão adquiridas, o intervalo entre as aquisições. Por fim, a fonte de luz LightPad foi posicionada acima da placa de cultivo e o experimento foi iniciado. Na Figura 5.3 pode-se observar o sistema montado.

Figura 5.3 – n3Dock sistema de aquisição de imagens utilizando um iPod.

Fonte: NANO3D. (90)

As imagens foram em seguida analisadas utilizando-se um programa desenvolvido na empresa Nano3D Biosciences. O primeiro passo foi criar uma imagem que seria utilizada como máscara ou imagem de fundo, utilizando-se o programa de edição de imagens Gimp, que pode ser obtido gratuitamente no site: www.gimp.org. A imagem de fundo de um dos ensaios com esferoides pode ser visualizada na figura 5.4.

Figura 5.4 – Imagem de fundo utilizada para o processamento dos resultados do BiO Assay.

Fonte: Elaborada pelo autor.

No próximo passo criou-se uma pasta contendo os arquivos necessários para o funcionamento do programa, a pasta contendo as imagens obtidas com o BiO Assay, e a imagem de fundo. O programa utiliza a imagem de fundo para que somente as regiões que contém um esferoide sejam analisadas. O processamento também inclui o aumento do contraste das regiões de interesse (ROI, do inglês *regions of interest*), a aferição da área do esferoide, e a extração de parâmetros referentes a coloração do meio de cultura (HSV, do inglês *hue, saturation and value*). A extração dos dados é realizada para cada uma das imagens, resultando em informação temporal. Após o ensaio com o BiO Assay, foram realizados testes utilizando-se o MTT e a microscopia de fluorescência com marcação de Calceína-AM e homodímero-1 de etídio.

5.1.3 Análise dos dados

As curvas de dose e resposta de cada ensaio foram ajustadas para a função sigmoide (através do software OriginPro®) e, a partir destas, os IC₅₀ foram calculados. Um detalhe importante é o ajuste do eixo X, que representa as concentrações do composto utilizadas para a escala logarítmica, e por isso os grupos controle não são representados por zero, mas sim por 10⁻².

5.1.4 Agentes quimioterápicos, químicos e fotossensibilizador

Visando a comparação das diferentes terapias anticâncer quanto à resistência celular tumoral, utilizou-se no teste de citotoxicidade a TFD com o PG; o agente quimioterápico Doxorubicina (Adriamycin®) que apresenta 5% de biodisponibilidade por meio da administração oral, age por meio da interação com a enzima Topoisomerase II, e também da geração de radicais livres dentro das células; o agente quimioterápico Paclitaxel (Taxol®) que tem 6,5% de biodisponibilidade, e age por meio da interação com os microtúbulos impedindo a divisão celular; e o composto orgânico Dodecil sulfato de sódio (SDS, do inglês *Sodium dodecyl sulfate*) que está presente em diversos produtos de higiene e limpeza. As concentrações utilizadas para cada agente estão presentes na Tabela 5.1.

Tabela 5.1 - Concentrações dos agentes testados no ensaio de citotoxicidade com o BiO Assay. Concentrações dos agentes utilizadas no ensaio de citotoxicidade em células MDA-MB-231, contendo $1,5 \times 10^5$ células por esferóide, amostras em triplicata. O tempo de impressão foi de 1 hora.

Doxo (μM)	Taxol (μM)	SDS (μM)	PG ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)
50	10	625	100
25	1	312,5	50
12,5	10^{-1}	156,25	25
6,25	10^{-2}	78,5	10
$6,25 \times 10^{-1}$	10^{-3}	39,25	5
$6,25 \times 10^{-2}$	10^{-4}	19,625	2,5
$6,25 \times 10^{-3}$	10^{-5}	9,813	1
PBS	DMSO 1%	PBS	PBS

Fonte: Elaborada pelo autor.

O tempo de impressão dos esferóides foi de uma hora. A presença dos compostos altera a cor do meio de cultura de maneira bastante expressiva, permitindo o monitoramento da atividade celular.

5.1.5 Ensaios de citotoxicidade

5.1.5.1 Ensaio de viabilidade celular utilizando-se os marcadores fluorescentes Calceína AM e o homodímero-1 de etídio

O ensaio de citotoxicidade celular utilizado neste experimento combina a Calceína AM e o homodímero-1 de etídio (LIVE/DEAD®, Biotium, Inc., Hayward, CA, EUA). O procedimento é rápido e prático: a primeira etapa é a tripla lavagem das culturas com PBS. O

arranjo de magnetos é posicionado na base da placa de cultivo ancorando as culturas, o que mantém a integridade da cultura e facilita a adição e a retirada das soluções. Em seguida, adiciona-se 50 µl da solução, que é o volume necessário para recobrir a cultura, e incuba-se por 2 horas. Durante esse período, a atividade das esterases do meio intracelular converte as moléculas de Calceína AM em sua forma fluorescente, enquanto o homodímero-1 de etídio marca os ácidos nucleicos das células que perderam a integridade de sua membrana. A análise por fluorescência baseia-se na detecção simultânea de células vivas e mortas que estejam marcadas. Pode ser realizada utilizando-se a citometria de fluxo, os medidores de fluorescência em microplacas, e a microscopia de fluorescência. No estudo em questão, utilizamos microscopia de fluorescência para avaliar a viabilidade de esferoides de células das linhagens MDA-MB-231 e HPF submetidas a uma aplicação de TFD. Neste experimento, a adição do FS foi realizada durante a impressão dos esferoides, garantindo desta forma que houvesse FS disponível para as células do interior do esferoide. A iluminação foi realizada continuamente utilizando-se o LightPad no BiO Assay, e a fluência de luz aplicada foi de aproximadamente 600 J.cm⁻². Porém, se considerarmos o espectro de absorção do PG e o espectro de emissão do LightPad, a dose de luz absorvida apresenta valor aproximado de 60 J.cm⁻². O efeito fotodinâmico foi comparado com o efeito dos quimioterápicos Doxo e Taxol, e o produto químico SDS.

5.1.5.2 Ensaio de MTT

O MTT é um ensaio colorimétrico utilizado para medir a atividade metabólica de células. Depois de lavadas 3 vezes com PBS, e de serem incubadas por 2 horas com o MTT para formação do formazan, as células são dissolvidas e a viabilidade celular é aferida. A medida é realizada utilizando-se um medidor de absorbância UV-visível de microplacas SpectraMax® (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EUA), medindo nos comprimentos de onda 570 nm e 690 nm. A viabilidade das culturas é determinada através da razão entre essas duas medidas comparando-se os grupos tratados com o grupo tratado. Cada tipo de célula e cada estoque de MTT necessita uma nova padronização; portanto, para determinar a quantidade de células vivas é necessário um grupo controle, que será utilizado para a comparação com os grupos tratados. Mais informações sobre o procedimento para realização do ensaio com MTT se encontra em no ANEXO B.

5.2 Resultados e discussão

5.2.1 BiO Assay

Os resultados obtidos pelo ensaio de aquisição de imagens com o iPod foram extraídos da sequência de imagens adquiridas no BiO Assay. Nas Figura 5.5(A) e (B), estão apresentadas as imagens inicial e final do ensaio com o BiO Assay *Dot* utilizando o fotossensibilizador PG e o LightPad como fonte de luz. Visualmente não é possível verificar a mudança do tamanho de alguns esferoides, pois é um fenômeno sutil para algumas amostras. Indicados com setas pretas estão alguns dos que podem ser percebidos apenas a olho nu. O que fica evidente nestas imagens é a alteração da coloração do meio de cultivo para os grupos controle, e para os grupos tratados com as menores concentrações dos compostos.

Figura 5.5 - (A) Esferoides impressos em placa de 96 poços após uma hora de impressão, imagem inicial do ensaio com o BiO Assay. (B) Após 24 horas de aquisição a imagem final do BiO Assay. As setas pretas indicam algumas das culturas que sofreram maior alteração de tamanho.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Nas figuras 5.6(A) e (B) pode-se visualizar as imagens inicial e final de um ensaio de citotoxicidade da Doxo com o BiO Assay Ring formados a partir das linhagens MDA-MB-231 e HPF. Na Figura 5.6(B), Verifica-se que as células migraram e fecharam o *Ring* após as 24 horas de experimentação. Além disso, os grupos que continham células MDA-MB-231 apresentaram mudança na coloração do meio de cultura. A coloração do meio, mais amarelada, indica que nestas amostras as células apresentaram maior atividade de metabolismo anaeróbico.

Figura 5.6 – (A) Imagem inicial do ensaio com o BiO Assay Ring combinando-se duas linhagens celulares. (B) Imagem final do ensaio com o BiO Assay Ring. Setas pretas indicam maiores alterações na coloração do meio e do formato da cultura.

Fonte: Elaborada pelo autor.

O meio de cultura não é absorvedor na janela biológica, a adição do vermelho de fenol dá a coloração ao meio de cultura, e a cor do mesmo depende do pH. Ao meio de cultura são adicionados sais, componentes importantíssimos por atuarem no processo de tamponamento, mantendo o pH estável em torno do valor 7,4, que é o pH fisiológico. Na figura 5.7 se pode observar a alteração da cor do meio dos grupos controle, enquanto os grupos tratados com TFD nas concentrações mais altas não apresentam alteração de cor.

Figura 5.7 – (A) Início do ensaio com o BiO Assay na n3d Dock, 24 horas após a TFD. (B) Após o ensaio com o BiO Assay (24 horas de duração), aproximadamente 60 horas após a TFD, não houve migração, mas houve alteração do pH do meio para os grupos controle, causado pelo acentuado metabolismo celular anaeróbico.

Fonte: Elaborada pelo autor.

A capacidade de tamponamento, contudo, tem limite; num dado momento a quantidade de metabolitos se torna suficiente para promover a alteração do pH, o que pode ser verificado no ensaio utilizando o BiO Assay *Dot* para células MDA-MB-231 com variação do número de células para cada grupo.

Outra propriedade avaliada nesta sequência de experimentos é a migração celular nas culturas 3D. Na figura 5.8, observa-se como os esferóides das células MDA-MB-231 tem seu diâmetro reduzido após 24 horas, na ausência de qualquer composto citotóxico, apenas recebendo meio de cultura. Isso pode ser observado neste ensaio no qual não foi utilizado agentes citotóxicos. Para os ensaios com TFD não foi observada qualquer tipo de migração celular para os grupos tratados.

Figura 5.8 – (A) Imagem de esferóides de células MDA-MB-231, com diferentes números de células (triplicata), no início do ensaio com o BiO Assay. (B) Imagem dos mesmos esferóides após 24 horas no final do ensaio (triplicata). A quantidade de células por amostra foi de 200, 150, 100, 50 e 25 mil células. A seta vermelha indica as bolhas que se formaram durante o processo do MIM.

Fonte: Elaborada pelo autor.

O processamento das imagens possibilitou o monitoramento do parâmetro *Hue* no tempo, como apresentado na figura 5.9. Pode-se notar uma brusca alteração deste parâmetro entre 5 e 10 horas para o grupo com 200 mil células, e entre 10 e 17 horas para o grupo contendo 150 mil células.

Figura 5.9 – Monitoramento do parâmetro *Hue* no tempo através do processamento das imagens obtidas no BiO Assay Dot. O número de células utilizadas foi de 200, 150, 100, 50, e 25 mil células por amostra. Este resultado representa a média da medida das três amostras triplicadas.

Fonte: Elaborada pelo autor.

O *Hue* é um parâmetro de cor e pode ser medido para cada imagem, de cada amostra – ou seja, pode-se monitorar o momento em que a capacidade de tamponamento é superada, fazendo com que o pH do meio varie, a cor se altere, e a variação do parâmetro *Hue* seja aferida. Em contrapartida, quando o dano causado pela TFD afeta o metabolismo celular, o pH da solução se mantém estável, não tendo sido verificada alteração de cor do meio.

Os gráficos do parâmetro *Hue* demonstram o tempo e a taxa em que ocorre a mudança de cor do meio. Esta mudança de cor está diretamente relacionada à diminuição do pH do meio, se o meio se torna amarelo, é porque está mais ácido. O aumento da acidez é um fenômeno que pode ser utilizado para o monitoramento do metabolismo anaeróbico das células tumorais.

Existe uma explicação para este processo de acidificação, e é chama efeito Warburg. Otto Warburg, ganhador do prêmio Nobel pelos estudos do metabolismo celular tumoral, descobriu um fenômeno mutagênico que ocorre nas células tumorais e que promove uma alteração na via metabólica celular. As células tumorais realizam respiração celular anaeróbica, mesmo na presença de oxigênio, e que resulta na produção de ácido lático a partir do Piruvato. Isso acontece porque as células tumorais passam a produzir mais enzimas Piruvato quinase M2 (PK-M2), que favorecem a via metabólica anaeróbica. Naturalmente as células que necessitam rápida recuperação energética (células musculares e neurônios) produzem a enzima Piruvato quinase M1 (PK-M1). Enquanto outros tipos celulares produzem em maior quantidade a enzima Piruvato quinase L, R (PK-L,R) que promove a respiração aeróbica. Nas células tumorais, a produção da PK-M2 favorece o metabolismo anaeróbico contínuo, e apesar desta via metabólica ter rendimento reduzido quando comparado com a via aeróbica, é essa produção de energia que sustenta a divisão celular descontrolada e contínua. O ácido lático, um dos produtos

da reação anaeróbica, se acumula nas células e em seguida é liberado no meio. Ao passo que a concentração de ácido láctico aumenta, o pH do meio de cultura diminui, ou seja, o meio se torna mais ácido e, por conter vermelho de fenol, tem sua coloração alterada, de vermelho para amarelo. (29)

Figura 5.10 – Gráficos que representam o percentual de alteração do parâmetro *Hue* para cada uns dos grupos submetidos à TFD com relação ao valor de *Hue* inicial. O resultado apresentado é o valor médio da triplicata. As setas pretas apontam para o gráfico do grupo tratado com a 3,13 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

Na figura 5.10 nota-se que os grupos controle são os primeiros a causar a alteração do parâmetro *Hue*, e portanto, contém mais células metabolizando a glicose e produzindo ácido láctico. Por outro lado os grupos que receberam FS nas concentrações menores demoram mais tempo para causar o mesmo efeito. E aqueles grupos que receberam o PG acima da concentração $12,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ não foram capazes de metabolizar o suficiente para causar o que chamamos de decaimento do *Hue*. Quando comparamos os grupos tratados com diferentes intensidades e doses de luz (figura 5.10(A)-(D)) pode-se notar um atraso no decaimento do *Hue*. Além disso, a inclinação dos gráficos do *Hue* pode ser utilizada para o delineamento de uma curva de dose resposta, e portanto pôde ser utilizada na obtenção do IC_{50} do PG para as intensidades e doses de luz testadas.

Chama a atenção o fato de que para alguns casos, há "inversões" temporárias na tendência dos valores do *Hue*, como se nota de forma expressiva na Figura 5.10(B), entre aproximadamente 5-10 horas. Isso acontece por conta do próprio sistema, cujo arranjo faz com que a quantidade de luz que entra na amostra sofra alterações quando a porta do equipamento for aberta para verificação das células, o que ocasionalmente precisa acontecer para o monitoramento adequado do processo. Contudo, um decaimento mais importante pode ser observado ao longo do processo, e a escolha feita em analisar a variação do *Hue* apenas entre o valor inicial e o final foi feita exatamente para minimizar o efeito destas interferências.

Outro parâmetro de cor que pode ser utilizado é a saturação da imagem. Através do monitoramento da saturação da cor do meio de cultura, e comparando-se com a saturação na imagem inicial, é possível extrair curvas de dose resposta representativas em relação a taxa de metabolismo anaeróbico das culturas 3D. O valor da inclinação do gráfico de variação da saturação da cor do meio foi extraído dos gráficos de monitoramento no tempo para cada um dos grupos, tomando como referência o ponto inicial ($t = 0 \text{ h}$) e o final do ensaio ($t = 90 \text{ h}$) com o BiO Assay. A figura 5.11 apresenta um gráfico com valores de inclinação do gráfico de saturação.

Figura 5.11 – Inclinação do gráfico de variação do parâmetro Saturação da imagem no tempo para os grupos contendo 200, 150, 100, 50, 25 mil células.

Fonte: Elaborada pelo autor.

O tempo de experimento é muito importante, dependendo do momento em que se mede o IC_{50} pode-se obter valores diferentes. Como as imagens foram adquiridas a cada 10 min, é possível então calcular e monitorar o IC_{50} para todos os parâmetros aferidos no tempo. A figura 5.12 apresenta um gráfico do IC_{50} no tempo de experimento, que foi calculado a partir da inclinação do parâmetro *Hue* a cada instante para o grupo tratado com 30 J.cm^{-2} . Nota-se que do início do experimento até 10 horas, o valor do IC_{50} calculado oscilou bastante, isso porque o efeito fotodinâmico ainda não havia sido suficiente para a geração das curvas de dose resposta. Na sequência, o valor calculado de IC_{50} passou a oscilar menos, tendendo ao valor $20 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

Figura 5.12 – Valor do IC_{50} no tempo obtido do através do parâmetro *Hue*.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Adicionalmente, o parâmetro *Value* também pode ser utilizado na obtenção das curvas e dose resposta e do IC_{50} . Na figura 5.13(A) é possível identificar que a inclinação do gráfico do parâmetro *Value* é inversamente proporcional ao número de células, ou seja quanto mais células, menor o *Value*. Na figura 5.13(B) pode-se notar que o parâmetro *Value* é proporcional à concentração de PG utilizada, ou seja, quanto maior a concentração e, portanto, menor o número de células vivas, maior o *Value*.

Figura 5.13 – Gráficos representando a inclinação do parâmetro *Value*. (A) Variando-se o número de células (25, 50, 100, 150 e 200 mil). (B) Dots contendo 150 mil células, submetidos à TFD.

Fonte: Elaborada pelo autor.

O IC_{50} é um parâmetro comumente utilizado para avaliar o potencial de ação que uma droga possui de inibição de células e microrganismos. Utilizando-se o IC_{50} estima-se de maneira razoável a concentração da droga que será testada em estudos *in vivo*. Quando se é preciso eliminar estas células completamente, porém, como é o caso dos tratamentos de tumores, o IC_{50} pode não ser suficiente para uma estimativa razoável que permita garantir a eliminação das células. Nestes casos, é possível utilizar outros parâmetros similares (exemplo: IC_{80} e IC_{95} , que estimam a destruição de 80% e 95% do total de células tratadas, respectivamente). Tais parâmetros permitem uma margem menor de erro na estimativa do efeito, e contribuindo para o entendimento dos mecanismos associados ao recrescimento das células após a aplicação da TFD.

5.2.2 Ensaio com MTT e a comparação dos resultados obtidos com o BiO Assay

Após realizar o ensaio com o BiO Assay as amostras foram utilizadas para o ensaio de MTT. Uma das desvantagens do ensaio com MTT é a perda das amostras, ou seja, após o ensaio

de MTT as amostras devem ser descartadas. Sendo assim, para obter o resultado de citotoxicidade pelo ensaio de MTT para vários intervalos de tempo, o experimento deve ser repetido diversas vezes, aumentando a variabilidade da resposta porque a amostra não pode ser testada mais de uma vez. Uma das vantagens do teste fotográfico é a integridade da amostra, que pode ser utilizada para a Imuno-histoquímica ou outro ensaio de fluorescência. Para o MTT muitas amostras são necessárias por conta das triplicatas, já que depois da medida perde-se as amostras. Nas figuras 5.14(A) e (B) estão apresentados resultados do ensaio BiO Assay *Dot* com as células Hep G2 e o PG, os resultados foram obtidos da mesma amostra. O resultado do MTT forneceu os dados apresentados na figura 5.14(A), a partir dessas curvas obteve-se o IC₅₀ do PG para as diferentes fluências utilizadas. A análise da inclinação do gráfico de variação de *Hue* em função do tempo gerou a curva de dose resposta apresentada na figura 5.14(B). Os dois gráficos apresentam resultados similares.

Figura 5.14 – Gráficos de dose-resposta para o PG obtidos através dos métodos (A) MTT e (B) *Hue* (Colorimétrico); variação do parâmetro *Hue*.

(A)

continua

continuação

(B)

Fonte: Elaborada pelo autor.

A sensibilidade do teste fotográfico e análise do *Hue* foi maior que a do teste com o MTT, no sentido de que traz mais informação sobre o metabolismo e viabilidade celular, pois é um parâmetro que é medido durante 90 horas, enquanto o teste com MTT gera uma curva de dose resposta, sendo necessária uma sequência de experimentos para cada intervalo de tempo. As taxas de redução da viabilidade celular em função da concentração (calculadas pelo coeficiente angular), avaliadas pelo MTT, variam entre aproximadamente 7-16% para o intervalo de fluência entre 30-60 J.cm⁻² (em percentual de redução por µg.mL⁻¹: 60 J.cm⁻²: 6,7; 50 J.cm⁻²: 15,6; e 45 e 30 J.cm⁻²: 11,1). A avaliação pelo *Hue* mostrou que existe uma linha muito mais bem definida: para 30 J.cm⁻², a redução varia aproximadamente 13% por µg.mL⁻¹, enquanto para as doses maiores, ela varia muito bruscamente (cerca de 35% por µg.mL⁻¹). A variação brusca em termos de viabilidade celular observada para o *Hue* pode ser mais prontamente associada ao conceito de dose limiar, dependente da concentração do FS (18-20, 59). O modelo prevê que há uma fluência mínima de luz para destruir as células de um tecido que depende principalmente da concentração de FS. O teste do MTT poderia sugerir que existe uma variação gradual desta dose limiar, o que sugeriria uma variação nos valores de doses limiares e, portanto, uma variabilidade celular quanto à susceptibilidade ao efeito fotodinâmico.

Contudo, o método de análise do *Hue* utilizado sugere que esta variabilidade, se existente, é muito pequena para concentrações de PG bem definidas. Esta observação é um forte indício de que na verdade a variabilidade observada para as células pode estar atrelada à entrega local de FS, ou seja: uma distribuição heterogênea de FS é que acaba induzindo parte das células num tecido a precisarem de uma dose maior de luz para serem destruídas, fazendo parecer que são mais resistentes ao dano quando na verdade a causa desse fenômeno estaria ligado a deficiência na entrega da concentração adequada do FS.

Figura 5.15 - Comparação das curvas de IC_{50} em função da fluência de luz obtidas pelo método do (A) MTT e do (B) *Hue*.

Continua

continuação

(B)

Fonte: Elaborada pelo autor.

A variabilidade da resposta à TFD expressa por essas curvas demonstra o que já havia sido verificado na clínica, o fato de que menos FS implicaria na necessidade de se aplicar mais luz na lesão para a obtenção do efeito desejado, e vice-versa. Observa-se que, no intervalo de fluência onde ocorre a maior taxa de variação (entre 40-50 $\text{J} \cdot \text{cm}^{-2}$), o valor para o MTT fica em torno de -1,1 (em unidades de concentração de PG por dose de luz, isto é, $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ por $\text{J} \cdot \text{cm}^{-2}$), enquanto para o *Hue* fica em torno de -0,7. Portanto, o método do *Hue* mostrou que a variabilidade é menor do que a indicada pelo método do MTT.

Adicionalmente, as culturas Hep G2 e MDA-MB-231 obtidas pelo MLM - 24 poços e submetidas à TFD foram avaliadas utilizando-se o BIO Assay *Dot* e o ensaio de MTT. O resultado do ensaio de MTT está representado na figura 5.16. É notável como o efeito fotodinâmico causou maior dano às células MDA-MB-231, quando comparado com o efeito nas células Hep G2. A diferença na resposta pode estar relacionada com a diferença na densidade e morfologia dessas culturas, como foi demonstrado no cap. 4.

Figura 5.16 – Curvas de dose resposta das células das linhagens Hep Ge e MDA-MB-231 obtidas pelo ensaio com MTT. As culturas foram criadas pelo MLM e submetidas à TFD. Depois de 30 horas da aplicação da TFD foram criados Dots utilizando-se o MIM e em seguida foi realizado o ensaio com MTT.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Por meio do cálculo da inclinação da curva de dose resposta foram calculadas as taxas de redução de viabilidade celular em função da concentração para as duas linhagens celulares, foram obtidos os valores de 0,38 para MDA-MB-231 e de 0,07 para Hep G2. Estes valores demonstram a maior taxa de resposta para as células MDA-MB-231 quando comparadas à taxa de resposta das células Hep G2, apesar de apresentarem valores de IC_{50} aproximados. Esta semelhança mostra a necessidade de se avaliar outros parâmetros, dado que com base unicamente no IC_{50} , seria possível inferir que as respostas são praticamente idênticas. Através da análise desse resultado, pode-se concluir que a perda da integridade das culturas 3D das células MDA-MB-231 pode estar também associada à morte celular causada pela TFD. Para a Hep G2 os grupos tratados com 5 e $12,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ demonstram uma maior resistência desta linhagem, comparando-se com a linhagem MDA-MB-231.

5.2.3 Resultado do ensaio de viabilidade celular utilizando microscopia de fluorescência.

O resultado do teste de viabilidade celular de células MDA-MB-231 combinadas com as células HPF resultou nas imagens apresentadas na figura 5.17. É importante ressaltar que, nessa experiência, o PG esteve presente no meio de cultura durante a impressão dos esferoides,

e a aquisição das imagens no BiO Assay foi feita durante 24 horas, resultando então numa dose de luz entregue de aproximadamente 600 J.cm^{-2} . Considerando-se apenas os comprimentos de onda que podem ser absorvidos pelo PG, a dose de luz que promoveu a TFD foi da ordem de 60 J.cm^{-2} . A grande quantidade de luz e a presença do FS implica que haverá efeito fotodinâmico, e é possível verificar a eliminação total das células tratadas com o PG nas figuras 5.17(B)-(D). Apenas o grupo controle apresenta fluorescência no canal representado pela cor verde, a qual indica a presença de células vivas. A coloração vermelha indica as células mortas, e surge graças à afinidade do homodímero-1 de etídio por ácidos nucleicos.

A combinação dos dois tipos celulares, um de origem tumoral e outro proveniente de um tecido sadio, demonstra claramente que não existe diferença de resposta fotodinâmica quando se tem controle adequado dos agentes da terapia. Pode-se observar alguns pontos verdes indicados pelas setas amarelas nas figuras 5.17(A)-(D), supostamente células que resistiram à ação da TFD. É interessante notar também que alguns dos grupos que receberam as concentrações mais altas em geral não apresentam traços de células sobreviventes, corroborando a ideia de que a eficácia está principalmente associada ao controle dos parâmetros de TFD – se há disponibilidade de FS e de luz, as células serão destruídas.

Figura 5.17 - Imagens de fluorescência de culturas de geometria esférica de células que foram submetidas à ação fotodinâmica. Verde indica as células vivas (Calceína AM), e vermelho as células mortas (etídio homodímero). (A) Cultura de células HPF com 150 mil células por amostra. (B) Cocultura de células das linhagens HPF e MDA-MB-231 (50 e 100 mil células por amostra, respectivamente). (C) Cocultura de células das linhagens HPF e MDA-MB-231 (75 e 75 mil células por amostra, respectivamente). (D) Culturas de células da linhagem MDA-MB-231 (150 mil células por amostra). Setas amarelas indicando algumas células vivas remanescentes.

continua

continuação

Fonte: Elaborada pelo autor.

Além disso, é possível observar que, embora a intensidade do sinal no canal vermelho varie conforme as concentrações de FS utilizadas, as concentrações mais altas sempre parecem indicar uma distribuição mais homogênea das células mortas marcadas, enquanto para as

menores parece haver uma preferência na marcação. Essa heterogeneidade na distribuição das células mortas pode indicar que, para baixas concentrações, a distribuição homogênea de FS seja comprometida dada a baixa disponibilidade do mesmo para as células, o que pode explicar a sobrevivência de células para as menores concentrações.

Essa observação vem ao encontro da questão levantada por este estudo no que diz respeito aos fatores que interferem na "resistência" à TFD, demonstrando que a entrega adequada do FS, mesmo em meios mais controlados e com menos barreiras como as culturas celulares, é fator primordial na homogeneidade e na garantia da destruição celular.

Algumas das células das culturas formadas apenas com células HPF, tratadas nas concentrações 1, 2,5 e 5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, sobreviveram à ação fotodinâmica. As coculturas de células HPF e células MDA-MB-231 também continham células sobreviventes, porém em menor número. Por fim, as culturas formadas apenas por células da linhagem MDA-MB-231 foram totalmente eliminadas, exceto o grupo controle. Estes resultados indicam que a presença de fibroblastos pode estar relacionada com a resistência da cultura como um todo. Possivelmente, no ambiente tumoral o mesmo fenômeno causaria a sobrevivência de células tumorais, com consequente recrescimento da massa tumoral.

O MIM durante este estudo demonstrou ser uma ferramenta que permite melhor avaliação de estruturas teciduais a nível celular. Pode-se verificar que a MIM permite um maior controle tanto na forma e estrutura quanto no comportamento dos agrupamentos celulares quando comparado com o MLM. Estes modelos de impressão permitem observar de maneira mais clara, e mais semelhante à de um tecido real, como a difusão de FS se dá a partir de um meio. Como as células se organizam e se agrupam num dado ponto, é possível observar como efeitos tais quais a difusão de FS se dão quando existem barreiras físicas criadas pela própria organização celular.

A marcação dos ácidos nucleicos com o EthD-1, de cor vermelha, evidencia a perda da integridade das membranas daquelas células, e morte celular. Nota-se que os grupos tratados com concentrações de PG acima de 5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ apresentam distribuição mais homogênea das células marcadas em vermelho, o que sugere extravasamento celular, liberação do conteúdo citoplasmático e portanto morte por necrose, e destruição da estrutura tridimensional. Em contrapartida, a cultura que continha apenas células HPF apresentaram maior integridade estrutural, nas concentrações 1 e 2,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Vale ressaltar que no tecido estes fenômenos se somam a resposta imunológica e uma série de outros fatores.

Atualmente, o desenvolvimento de modelos tridimensionais de cultura vem sendo alavancado pela crescente proibição do uso de animais, para testes de segurança e eficácia da

indústria cosmética, bem como na diminuição do número de animais, para a experimentação na Universidade e na indústria farmacêutica, por motivos éticos. A utilização de modelos tridimensionais *in vitro* possibilita uma maior aproximação dos resultados obtidos *in vivo* em animais e pacientes humanos.

O processo de cultivo 3D acontece sem a adição e a influência de matriz extracelular (MEC) artificial, e portanto as amostras são mais fidedignas quando comparadas com os modelos que utilizam MEC de origem animal, ou artificial. De acordo com os resultados encontrados, observou-se que as células são capazes de gerar MEC, e se auto agrupar em estruturas 3D em um intervalo tempo de horas de levitação. Além disso, nestes estudos conseguimos avaliar com clareza o comportamento do fotossensibilizador PG estabelecendo parâmetros que nos aproximam de uma dosimetria ideal em TFD.

No futuro a impressão de culturas compostas por diferentes linhagens celulares, e até mesmo células primárias tumorais será desenvolvida, e avaliada como uma ferramenta para o teste de novos FS. Além disso, o sistema de monitoramento em tempo real através da transferência das imagens para a nuvem, possibilitará o ensaio de múltiplas sessões de TFD, e maior automação no processo de obtenção de resultados de citotoxicidade em TFD.

A destruição de células *in vitro* em monocamada é supostamente mais fácil porque elas estão num ambiente hostil, aderidas ao plástico, e todas expostas aos compostos presentes no meio de cultura que as recobre. Em contrapartida, quando se cria uma cultura 3D com grande concentração de células e que produzem MEC, o ambiente se torna mais semelhante ao microambiente tumoral. A difusão de nutrientes, metabólitos, e outros agentes externos e internos, tende a estabelecer um gradiente de concentração, e durante esse processo, surgem diferentes tipos de células. Essas diferenças fenotípicas em uma cultura 3D certamente dependem de diversos fatores, um deles pode ser o fato de que na superfície da cultura a concentração de FS é alta, enquanto no interior da cultura é mais baixa.

Nos estudos introdutórios da $g(D_{th})$ assumiu-se que uma gaussiana modificada pudesse representar uma população celular tumoral qualquer com relação ao seu D_{th} . Os resultados apontam para a existência de tal variação, que representa um novo paradigma na avaliação do potencial de FSs. Os resultados apresentados nesta tese demonstraram que mesmo uma população celular de linhagem, cultivada em monocamada, apresenta captação de PG heterogênea, ou seja, algumas células têm maior capacidade de captar moléculas de PG, outras células captam menor quantidade. Portanto, a captação heterogênea de FS pode ser a causa para fenômenos de seleção de células mais “resistentes” à TFD.

Para a quantificação da $g(D_{th})$ foi necessária a obtenção de dois parâmetros, o valor médio da dose limiar ($\overline{D_{th}}$) e a largura da distribuição ($\sigma(D_{th})$). Nos experimentos com o BiO Assay *Dot* utilizando-se as células Hep G2 demonstrou-se que na verdade a $g(D_{th})$ depende da quantidade de luz aplicada, mas também da concentração do FS. Ou seja, tem-se dois fatores causadores de variação nos valores de D_{th} . Por exemplo, para se causar o efeito fotodinâmico capaz de eliminar 50% das células Hep G2 em cultivo 3D, pode-se aplicar a dose de luz de 60 J.cm⁻² para uma concentração de PG de aproximadamente 8 µg.mL⁻¹, e o mesmo efeito pode ser obtido combinando-se a dose de luz de 30 J.cm⁻² e a concentração de PG de aproximadamente 12 µg.mL⁻¹. Ou seja, concentração baixa de FS necessita mais alta dose de luz para causar o mesmo efeito citotóxico.

Verificou-se que a diferença na densidade das culturas 3D das linhagens Hep G2 e MDA-MB-231, faz com que a primeira seja mais resistente a uma aplicação de TFD, nas mesmas condições. As linhagens MDA-MB-231 e HPF submetidas a uma aplicação de TFD, com disponibilidade de PG no meio de cultivo durante todo o tempo de iluminação, apresentaram baixa resistência à TFD. Observa-se que algumas células sobreviveram ao tratamento, e existe um indicativo de que a presença de fibroblastos HPF represente esta pequena parcela de células que receberam dose de luz inferior ao seu D_{th} . De qualquer forma, para a destruição completa das células seria necessária outra aplicação da TFD, na continuidade deste trabalho será investigada a resposta no tempo de culturas 3D formadas com diversos tipos celulares submetidas a uma série de aplicações com diferentes intervalos de tempo entre as aplicações.

6 CONCLUSÃO

A avaliação qualitativa da captação das moléculas de PG por células Hep G2 por meio do uso da microscopia confocal demonstrou que células de mesma linhagem celular captam diferentes quantidades de moléculas de FS.

Através dos experimentos com citometria de fluxo, foi possível avaliar, quantitativamente, a variação da quantidade de PG captada por células individuais, o que é um indicativo de que a heterogeneidade celular pode estar envolvida no processo de seleção de células durante aplicações de TFD.

Neste estudo também foi estabelecido um modelo tridimensional para estudos de dosimetria em TFD utilizando-se o MLM. Este método ainda pode ser explorado para a formação de culturas tridimensionais combinando diferentes tipos celulares.

Utilizando-se o sistema BiO Assay, foi possível parametrizar a $g(D_{th})$ para células Hep G2 e MDA, e verificar como o IC_{50} do PG pode variar de acordo com a fluência de luz aplicada no procedimento. Além disso, o MIM conjugado com o BiO Assay se mostrou eficiente no monitoramento do metabolismo celular de células tumorais, por meio do processamento das imagens. Foi verificado também como a ação fotodinâmica inibe a migração celular nas culturas obtidas através do MIM.

A investigação da possível existência de células resistentes à ação fotodinâmica utilizando-se o PG indicou que a combinação correta dos agentes que promovem o efeito fotodinâmico garante a eliminação completa das células tumorais. Há casos em que a massa de células é mais densa e dificulta a penetração e a captação de moléculas de FS por todas as células da lesão, o que identifica positivamente uma resistência à ação da TFD. Portanto, a administração inadequada de FS, ou a incapacidade destes em penetrar no tecido tumoral, pode ser indicada com o principal fator causador das recidivas tumorais após a TFD.

REFERÊNCIAS

- 1 KESSEL, D. Components of hematoporphyrin derivatives and their tumor-localizing capacity. **Cancer Research**, v. 42, n. 5, p. 1703-1706, 1982.
- 2 WILSON, B.C. et al. The physics of photodynamic therapy. **Physics in Medicine and Biology**, v. 31, n. 4, p. 327-360, 1986.
- 3 LEUNIG, M. et al. Tumour localisation kinetics of photofrin and three synthetic porphyrinoids in an amelanotic melanoma of the hamster. **British Journal of Cancer**, v. 68, n. 2, p. 225-234, 1993.
- 4 DOUGHERTY, T. J. et al. Photodynamic therapy. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 90, n. 12, p. 889-905, 1998.
- 5 NSEYO, U. O. et al. Photodynamic therapy (PDT) in the treatment of patients with resistant superficial bladder cancer: a long-term experience. **Journal of Clinical Laser Medicine & Surgery**, v. 16, n. 1, p. 61-68, 1998.
- 6 SIERON, A. et al. Photodynamic therapy of premalignant lesions and local recurrence of laryngeal and hypopharyngeal cancers. **European Archives of Oto-Rhino-Laryngology**, v. 258, n. 7, p. 349-352, 2001.
- 7 OVERHOLT, B. F.; PANJEHPOUR, M.; HALBERG, D.L. Photodynamic therapy for Barrett's esophagus with dysplasia and/or early stage carcinoma: long-term results. **Gastrointestinal Endoscopy**, v. 58, n. 2, p. 183-188, 2003.
- 8 MITTON, D.; ACKROYD, R. Photodynamic therapy in oesophageal carcinoma: an overview. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 3, n. 9, p. 839-850, 2004.
- 9 HUANG, Z. A review of progress in clinical photodynamic therapy. **Technology in Cancer Research & Treatment**, v. 4, n. 3, p. 283-293, 2005
- 10 RIGUAL, N. R. et al. Photodynamic therapy for head and neck dysplasia and cancer. **Archives of Otolaryngology--Head & Neck Surgery**, v. 135, n. 8, p. 784-788, 2009.
- 11 SABINO, L. G. et al. Experimental evidence and model explanation for cell population characteristics modification when applying sequential photodynamic therapy. **Laser Physics Letters**, v. 8, n. 3, p. 239-246, 2011.
- 12 GOLDING, J. P. et al. Targeting tumour energy metabolism potentiates the cytotoxicity of 5-aminolevulinic acid photodynamic therapy. **British Journal of Cancer**, v. 109, n. 4, p. 976-982, 2013.
- 13 STEWART, F.; BAAS, P.; STAR, W. What does photodynamic therapy have to offer radiation oncologists (or their cancer patients)??. **Radiotherapy and Oncology**, v. 48, n. 3, p. 233-248, 1998.

- 14 WILSON, B. C.; PATTERSON, M. S. The physics, biophysics and technology of photodynamic therapy. **Physics in Medicine and Biology**, v. 53, n. 9, p. R61-R109, 2008.
- 15 DOLMANS, D. E.; FUKUMURA, D.; JAIN, R. K. Photodynamic therapy for cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 3, n. 5, p. 380-387, 2003
- 16 KINSEY, J. H. et al. Photodynamic effect of hematoporphyrin derivative as a function of optical spectrum and incident energy density. **Cancer Research**, v.41, n.12 pt 1, p. 5020-5026, 1981.
- 17 BUETTNER, G. R.; OBERLEY, L. W. The apparent production of superoxide and hydroxyl radicals by hematoporphyrin and light as seen by spin-trapping. **FEBS Letters**, v. 121, n. 1, p. 161-4, 1980.
- 18 FERRAZ, R. C. et al. Determination of threshold dose of photodynamic therapy to measure superficial necrosis. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 27, n. 1, p. 93-99, 2009.
- 19 FERREIRA, J. et al. Determination of the threshold dose using depth of necrosis measurement. **Proceedings of SPIE**, v. 5695, p. 36-42, 2005. Disponível em: <<http://proceedings.spiedigitallibrary.org/proceeding.aspx?articleid=858904>>. Acesso em 22 set. 2014
- 20 FERREIRA, J. et al. Experimental determination of threshold dose in photodynamic therapy in normal rat liver. **Laser Physics Letters**, v. 4, n.6, p. 469-475, 2007.
- 21 KESSEL, D.; REINERS, J. J. Enhanced efficacy of photodynamic therapy via a sequential targeting protocol. **Photochemistry and Photobiology**, v.90, n. 4, p. 889-895, 2014.
- 22 MROZ, P. et al. Cell death pathways in photodynamic therapy of cancer. **Cancers**, v. 3, n. 2, p. 2516-2539, 2011.
- 23 BUSCH, T.M. Local physiological changes during photodynamic therapy. **Lasers in Surgery and Medicine**, v.38, n.5, p. 494-9, 2006.
- 24 CASTANO, A. P.; DEMIDOVA, T. N.;HAMBLIN, M. R. Mechanisms in photodynamic therapy: part three-photosensitizer pharmacokinetics, biodistribution, tumor localization and modes of tumor destruction. **Photodiagnosis and Photodynamics Therapy**, v. 2, n. 2, p. 91-106, 2005.
- 25 CHANNUAL, J. et al. Vascular effects of photodynamic and pulsed dye laser therapy protocols. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 40, n. 9, p. 644-650, 2008.
- 26 YU, J. L. et al. Heterogeneous vascular dependence of tumor cell populations. **American Journal of Pathology**, v.158, n. 4, p. 1325-1334, 2001.
- 27 WARREN, C. B. et al. Pain associated with aminolevulinic acid-photodynamic therapy of skin disease. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v.61, n. 6, p. 1033-1043, 2009.

- 28 ALLISON, R. R. et al. Photosensitizers in clinical PDT. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 1, n. 1, p. 27-42, 2004.
- 29 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, 2005.
- 30 KAHALEH, M. et al. Unresectable cholangiocarcinoma: comparison of survival in biliary stenting alone versus stenting with photodynamic therapy. **Clinical Gastroenterology and Hepatology**, v.6, n. 3, p. 290-297, 2008.
- 31 KURACHI, C. et al. Clinical experience of PDT in Brazil: a 300 patient overview. **Proceedings of SPIE**, v. 5689, p. 218-226, 2005. Disponível em:<<http://proceedings.spiedigitallibrary.org/proceeding.aspx?articleid=858658>>. Acesso em: 22 set. 2014.
- 32 LEE, Y.; BARON, E. D. Photodynamic therapy: current evidence and applications in dermatology. **Seminars in Cutaneous Medicine and Surgery**, v. 30, n. 4, p. 199-209, 2011.
- 33 MAIER, A. et al. Palliation of advanced esophageal carcinoma by photodynamic therapy and irradiation. **Annals of Thoracic Surgery**, v. 69, n. 4, p. 1006-1009, 2000.
- 34 LEGGETT, C. et al. Photodynamictherapy for unresectable cholangiocarcinoma: a comparative effectiveness systematic review and meta-analyses. **American Journal of Gastroenterology**, v.106, p. S60-S60, 2011.
- 35 MILLA, L. N. et al. Isolation and characterization of squamous carcinoma cells resistant to photodynamic therapy. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 112, n. 9, p. 2266-78, 2011.
- 36 KUSHIBIKI, T.; SAKAI, M.; AWAZU, K. Differential effects of photodynamic therapy on morphologically distinct tumor cells derived from a single precursor cell. **Cancer Letters**, v.268, n. 2, p. 244-251, 2008.
- 37 CASAS, A. et al. Disorganisation of cytoskeleton in cells resistant to photodynamic treatment with decreased metastatic phenotype. **Cancer Letters**, v. 270, n. 1, p. 56-65, 2008.
- 38 CASAS, A. et al. Decreased metastatic phenotype in cells resistant to aminolevulinic acid-photodynamic therapy. **Cancer Letters**, v. 271, n. 2, p. 342-351, 2008.
- 39 BUYTAERT, E.; DEWAELE, M.; AGOSTINIS, P. Molecular effectors of multiple cell death pathways initiated by photodynamic therapy. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1776, n. 1, p. 86-107, 2007.
- 40 CASAS, A. et al. Tumor cell lines resistant to ALA-mediated photodynamic therapy and possible tools to target surviving cells. **International Journal of Oncology**, v.29, n. 2, p. 397-405, 2006.
- 41 KORBELIK, M.; SUN, J.; CECIC, I. Photodynamic therapy-induced cell surface expression and release of heat shock proteins: relevance for tumor response. **Cancer Research**, v. 65, n. 3, p. 1018-1026, 2005.

- 42 CASTANO, A. P.; DEMIDOVA, T. N.; HAMBLIN, M. R. Mechanisms in photodynamic therapy: part two-cellular signaling, cell metabolism and modes of cell death. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 2, n. 1, p. 1-23, 2005.
- 43 SINGH, G. et al. In vitro induction of PDT resistance in HT29, HT1376 and SK-N-MC cells by various photosensitizers. **Photochemistry and Photobiology**, v. 73, n. 6, p. 651-656, 2001.
- 44 SINGH, G. et al. Resistance to photodynamic therapy in radiation-induced fibrosarcoma-1 and chinese-hamster ovary-multi-drug resistant cells-in-vitro. **Photochemistry and Photobiology**, v. 54, n. 2, p. 307-312, 1991.
- 45 LUNA, M. C.; GOMER, C. J. Isolation and initial characterization of mouse tumor cells resistant to porphyrin-mediated photodynamic therapy. **Cancer Research**, v. 51, n. 16, p. 4243-4249, 1991.
- 46 GOMER, C.J. et al. Increased transcription and translation of heme oxygenase in Chinese hamster fibroblasts following photodynamic stress or photofrin II incubation. **Photochemistry and Photobiology**, v. 53, n. 2, p. 275-279, 1991.
- 47 MAYHEW, S. et al. Investigation of cross-resistance to a range of photosensitizers, hyperthermia and UV light in two radiation-induced fibrosarcoma cell strains resistant to photodynamic therapy in vitro. **Photochemistry and Photobiology**, v.73, n. 1, p. 39-46, 2001.
- 48 GROSSWEINER, L. I. PDT light dosimetry revisited. **Journal of Photochemistry and Photobiology B**, v. 38, n. 2-3, p. 258-268, 1997.
- 49 PATTERSON, M. S.; WILSON, B. C; RAFF, R. In vivo tests of the concept of photodynamic threshold dose in normal rat-liver photosensitized by aluminum chlorosulfonated phthalocyanine. **Photochemistry and Photobiology**, v. 51, n. 3, p. 343-349, 1990.
- 50 MCKENZIE, A. L. How may external and interstitial illumination be compared in laser photodynamic therapy? **Physics in Medicine and Biology**, v. 30, n. 5, p. 455-460, 1985.
- 51 BOHMER, R. M.; MORSTYN, G. Uptake of hematoporphyrin derivative by normal and malignant cells: effect of serum, pH, temperature, and cell size. **Cancer Research**, v. 45, n. 11, p. 5328-5334, 1985.
- 52 SHULOK, J. R. et al. Cellular effects of hematoporphyrin derivative photodynamic therapy on normal and neoplastic rat bladder cells. **The American Journal of Pathology**, v. 122, n. 2, p. 277-283, 1986.
- 53 HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646-674, 2011.
- 54 CAIRNS, R. A.; HARRIS, I. S.; Mak, T. W. Regulation of cancer cell metabolism. **Nature Reviews Cancer**, v. 11, n. 2, p. 85-95, 2011.
- 55 CABARCAS, S. M.; MATHEWS, L. A.; FARRAR, W. L. The cancer stem cell niche--there goes the neighborhood? **International Journal of Cancer**, v. 129, n. 10, p. 2315-2327, 2011.

- 56 CAPELLA, M. A.; CAPELLA, L. S. A light in multidrug resistance: photodynamic treatment of multidrug-resistant tumors. **Journal of Biomedical Science**, v. 10, n. 4, p. 361-366, 2003.
- 57 SMITH, L. et al. The analysis of doxorubicin resistance in human breast cancer cells using antibody microarrays. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 5, n. 8, p. 2115-2120, 2006.
- 58 CALZAVARA, F. et al. Esophageal cancer treated by photodynamic therapy alone or followed by radiation-therapy. **Journal of Photochemistry and Photobiology B**, v. 6, n. 1-2, p. 167-174, 1990.
- 59 NELSON, J. S. et al. Use of multiple photosensitizers and wavelengths during photodynamic therapy: a new approach to enhance tumor eradication. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 82, n. 10, p. 868-873, 1990.
- 60 WEST, C. M. Size-dependent resistance of human tumour spheroids to photodynamic treatment. **British Journal of Cancer**, v. 59, n. 4, p. 510-514, 1989.
- 61 STAR, W. M. Light dosimetry in vivo. **Physics in Medicine and Biology**, v. 42, n. 5, p. 763-787, 1997.
- 62 MURRER, L. H. et al. Applicator for light delivery and in situ light dosimetry during endobronchial photodynamic therapy: first measurements in humans. **Lasers in Medical Science**, v. 12, n. 3, p. 253-9, 1997.
- 63 VEENHUIZEN, R. B.; STEWART, F. A. The importance of fluence rate in photodynamic therapy: is there a parallel with ionizing radiation dose-rate effects? **Radiotherapy and Oncology**, v. 37, n. 2, p. 131-5, 1995.
- 64 BLOCH, K. et al. Metabolic alterations during the growth of tumour spheroids. **Cell Biochemistry and Biophysics**, v. 68, n. 3, p. 615-28, 2014.
- 65 HIRSCHHAEUSER, F. et al. Multicellular tumor spheroids: an underestimated tool is catching up again. **Journal of Biotechnology**, v. 148, n. 1, p. 3-15, 2010.
- 66 MICHELSON, S.; LEITH, J. T.; GLICKSMAN, A. S. A technique to analyze the emerging zonality of heterogeneous solid tumors. **Cell and Tissue Kinetics**, v. 20, n. 5, p. 499-506, 1987.
- 67 TIMM, D. M. et al. A high-throughput three-dimensional cell migration assay for toxicity screening with mobile device-based macroscopic image analysis. **Nature Scientific Reports**, v. 3, p. 3000. 2013.
- 68 KRUF, B. I.; GREER, A. Photosensitization reactions in vitro and in vivo. **Photochemistry and Photobiology**, v. 87, n. 6, p. 1204-1213, 2011.
- 69 GE, R. et al. An in vitro and in vivo study of combination therapy with Photogem(R)-mediated photodynamic therapy and cisplatin on mouse cancer cells (CT-26). **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 29, n. 3, p. 155-160, 2011.

70 ETMINAN, N. et al. Heat-shock protein 70-dependent dendritic cell activation by 5-aminolevulinic acid-mediated photodynamic treatment of human glioblastoma spheroids in vitro. **British Journal of Cancer**, v. 105, n. 7, p. 961-969, 2011.

71 DUANMU, J. et al. Effective treatment of chemoresistant breast cancer in vitro and in vivo by a factor VII-targeted photodynamic therapy. **British Journal of Cancer**, v. 104, n. 9, p. 1401-1409, 2011.

72 OHMORI, S. et al. The study of the characteristic of photocytotoxicity under high peak power pulsed irradiation with ATX-S10Na(II) in vitro. **Lasers in Medical Science**, v. 20, n. 2, p. 54-61, 2005.

73 OHMORI, S.; MASUDA, K.; ARAI, T. Characteristics of photocytotoxicity with high peak power pulsed irradiation: comparison of photodynamic therapy with two photosensitizers, photofrin and mono-L-aspartyl chlorin e6 on prostate cancer cell in vitro. Disponível em: <<http://ieeexplore.ieee.org/stamp/stamp.jsp?tp=&arnumber=1616382>>. Acesso em: 22 set. 2014.

74 NIEDRE, M. J. et al. Singlet oxygen luminescence as an in vivo photodynamic therapy dose metric: validation in normal mouse skin with topical amino-levulinic acid. **British Journal of Cancer**, v. 92, n. 2, p. 298-304, 2005.

75 HANLON, J. G. et al. Induction of Hsp60 by Photofrin-mediated photodynamic therapy. **Journal of Photochemistry and Photobiology B**, v. 64, n. 1, p. 55-61, 2001.

76 ADAMS, K. et al. In vivo resistance to photofrin-mediated photodynamic therapy in radiation-induced fibrosarcoma cells resistant to in vitro Photofrin-mediated photodynamic therapy. **Journal of Photochemistry and Photobiology B**, v. 49, n. 2-3, p. 136-141, 1999.

77 WILSON, B. C.; OLIVO, M.; SINGH, G. Subcellular localization of Photofrin and aminolevulinic acid and photodynamic cross-resistance in vitro in radiation-induced fibrosarcoma cells sensitive or resistant to photofrin-mediated photodynamic therapy. **Photochemistry and Photobiology**, v. 65, n. 1, p. 166-76, 1997.

78 EGGER, N. G. et al. Photosensitization of experimental hepatocellular carcinoma with protoporphyrin synthesized from administered delta-aminolevulinic acid: studies with cultured cells and implanted tumors. **Journal of Hepatology**, v. 26, n. 4, p. 913-920, 1997.

79 VONARX-COINSMAN, V. et al. HepG2 human hepatocarcinoma cells: an experimental model for photosensitization by endogenous porphyrins. **Journal of Photochemistry and Photobiology B**, v. 30, n. 2-3, p. 201-208, 1995.

80 DERDA, R. et al. Paper-supported 3D cell culture for tissue-based bioassays. **Proceedings of the National Academy Sciences of the United State of America**, v. 106, n. 44, p. 18457-18462, 2009

81 MINCHINTON, A. I.; TANNOCK, I. F. Drug penetration in solid tumours. **Nature Reviews Cancer**, v. 6, n. 8, p. 583-592, 2006

- 82 SMALLEY, K. S.; LIONI, M.; HERLYN, M. Life isn't flat: taking cancer biology to the next dimension. **In Vitro Cellular & Developmental Biology Animal**. v.42, n. 8-9, p. 242-247, 2006.
- 83 WARBURG, O. On the origin of cancer cells. **Science**, v. 123, n. 3191, p. 309-314, 1956.
- 84 GATENBY, R. A.; GILLIES, R. J. Why do cancers have high aerobic glycolysis? **Nature Reviews Cancer**, v.4, n. 11, p. 891-899, 2004
- 85 LIM, K. et al. Noninvasive measurement of glucose and lactate metabolism of human alveolar bone-derived mesenchymal stem cells using near-infrared spectroscopy. **Tissue Engineering and Regenerative Medicine**, v. 8, n. 6, p. 8, 2011.
- 86 MENEZES, P. F. C. **Estudos espectroscópicos e citotóxicos do Photogem® fotodegradado e dos fotoprodutos formados pela irradiação com laser**. 2006. 155p. Tese (Doutorado) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2006.
- 87 BD BIOSCIENCES. 2014. Disponível em: <<http://www.bdbiosciences.com/br/instruments/facscanto/index.jsp>>. Acesso em 12 set. 2014.
- 88 WHITE, L. et al. Ineffective photodynamic therapy (PDT) in a poorly vascularized xenograft model. **British Journal of Cancer**, v. 57, n. 5, p. 455-458, 1988.
- 89 LEUNIG, A. et al. An in vitro model to study cellular photosensitizer uptake and photodynamic dose-response relationships of tumor cells. **Research in Experimental Medicine (Berl)**, v. 193, n. 6, p. 361-370, 1993.
- 90 NANO3D Biosciences. 2014. Disponível em: <<http://www.n3dbio.com/technical-resources/manuals/>>. Acesso em: 20 set. 2014.
- 91 BARBUGLI, P. A. **Estudo dos efeitos da terapia fotodinâmica na progressão tumoral e em modelos celulares tridimensionais**. 2010. 104 p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto. 2010.
- 92 CASAS, A. et al. Disorganisation of cytoskeleton in cells resistant to photodynamic treatment with decreased metastatic phenotype. **Cancer Letters**, v. 270, n. 1, p. 56-65, 2008.
- 93 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, 1991.
- 94 PUBCHEM Open Chemistry Database. 2014. Disponível em: <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/phenol_red#section=Top>. Acesso em: 15 dez. 2014.
- 95 ATCC® ANIMAL CELL CULTURE GUIDE. 2014. Disponível em: <http://www.atcc.org/~media/PDFs/Culture%20Guides/AnimCellCulture_Guide.ashx>. Acesso em: 15 dez. 2014.
- 96 PHENOL Red. 2014. Disponível em: <<http://joeycordeirophenolred.weebly.com/>>. Acesso em: 15 dez. 2014.

- 97 MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, p. 55-63, 1983.
- 98 BERRIDGE, M.V.; HERST, P.M.; TAN A.S. Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction. **Biotechnology Annual Review**, v. 11, p. 127-152, 2005.
- 99 BERRIDGE, M.V.; TAN, A.S. Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): Subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 303, p. 474-482, 1993.
- 100 MICROSCOPY John Innes Centre. 2014. Disponível em: <https://www.jic.ac.uk/microscopy/more/T5_8.htm>. Acesso em: 15 dez. 2014.
- 101 PAWLEY, J.B. **Handbook of biological confocal microscopy**. 3rd ed. Berlin: Springer, 2006. 988p.
- 102 Biological Imaging Facility - The University of California, Berkeley. 2014. Disponível em: <<http://microscopy.berkeley.edu/courses/tlm/clsm/resolution.html>>. Acesso em: 12 dez. 2014.

ANEXO A – Vermelho de fenol e a coloração do meio de cultura celular

O vermelho de fenol, também conhecido como fenolftaleína ou fenolsulftaleína, é um indicador de pH que apresenta coloração amarela em solução de pH ácido (<6,8) e vermelha em solução de pH básico (>8,4). O vermelho de fenol apresenta fórmula molecular $C_{19}H_{14}O_5S$, peso molecular de 354.4 g/mol, e $pK_a = 7,92$. A estrutura molecular do vermelho de fenol está representada na figura A-1. (94)

Figura A.1 – Estrutura molecular do vermelho de fenol.

Fonte: PUBCHEM (94)

O meio de cultura utilizado no cultivo celular é uma mistura de sais enriquecidos com aminoácidos e outros componentes essenciais para o crescimento celular. No cultivo de células de humanos in vitro é necessário um meio de cultura de pH aproximadamente 7,4. O meio cultivo é transparente e a adição do vermelho de fenol (concentração de 11-15 mg/L) visa torná-lo colorido, para que a mudança na cor permita monitorar a alteração do pH e indicar quando o meio de cultura deve ser trocado. A coloração do meio de cultura e o pH correspondente, estão apresentados na figura A.2.

Figura A.2 – Escala de cores do meio de cultura celular em função do pH do mesmo.

Fonte: Elaborada pelo autor.

O meio de cultivo deve ser trocado no momento em que sua coloração fica amarela. O equilíbrio químico da reação descrita na Figura A.3 se desloca para a esquerda, como consequência do aumento da concentração de metabólitos celulares e decréscimo do pH. (95)

Figura A.3 – Reação química de equilíbrio entre o vermelho de fenol (vermelho em solução de pH básico) e sua forma hidrolisada (amarela em solução de pH ácido).

Fonte: PHENOL (96)

ANEXO B – Ensaio de citotoxicidade utilizando MTT

O método do MTT é útil para a determinação da taxa metabólica da enzima succinato desidrogenase, o correlacionando diretamente a capacidade enzimática de redução das moléculas do sal MTT com a viabilidade celular. A reação acontece dentro das mitocôndrias, mais precisamente na face interna da membrana mitocondrial das células metabolicamente ativas (viáveis). O sal MTT é clivado pela enzima succinato desidrogenase, produzindo cristais de formazan, cuja coloração é azul escura. (97)

Para o caso das culturas tridimensionais apresentadas na mostra a Figura B.1, pode-se notar a diferença na coloração das amostras triplicadas, indo da esquerda para direita em função do número de células por amostra de cada grupo.

Figura B.2 – Imagem de amostras de amostras de culturas de células tumorais humanas submetidas ao teste com o MTT com 4 horas de incubação. Da esquerda para a direita temos grupos com diferentes quantidades de células por amostra, em triplicata.

Fonte: Elaborada pelo autor.

A quantidade de cristais formada é diretamente proporcional ao número de células viáveis. O formazan não é solúvel em meio de cultura, para extraí-lo das células é necessário utilizar o solvente DMSO. Para o caso das culturas tridimensionais apresentadas na mostra a figura B.1, pode-se notar a diferença na coloração das amostras triplicadas, indo da esquerda para direita em função do número de células por amostra de cada grupo. Dessa forma, quanto mais escura a coloração ao final da reação, maior é a viabilidade celular. (97-99)

A redução do MTT cujo produto é o Formazan é uma reação dependente de enzimas oxidoredutases NAD(P)H, dessa forma, células com metabolismo mais lento reduzem menor

quantidade de MTT. Enquanto células de crescimento acelerado, como as células tumorais MDA-MB-231 e a Hep G2, apresentam metabolismo mais rápido e portanto reduzem maior quantidade de MTT. É necessário considerar o metabolismo do tipo celular avaliado, e para determinar quantitativamente a citotoxicidade causada por dado agente é necessário sempre um grupo controle. A reação de redução está apresentada na figura B.1 ilustra a modificação na estrutura da molécula de MTT e a formação do Formazan que ocorre dentro das células.

Figura B.1 – Reação de redução ocorrida nas mitocôndrias.

Fonte: BERRIDGE. (98)

ANEXO C – Princípio físico da microscopia confocal

A Microscopia Confocal é uma técnica utilizada na aquisição de imagens fluorescência de alta resolução, capaz de adquirir imagens de estruturas subcelulares. A técnica foi desenvolvida inicialmente por Marvin Minsky em 1955. O Microscópio Confocal é utilizado para aumentar o contraste da imagem microscópica e construir imagens tridimensionais através da utilização de um orifício de abertura, chamado pinhole, o que permite uma grande definição de imagem em amostras mais espessas que o plano focal. O diagrama na figura C.1 representa o princípio fundamental da técnica de microscopia confocal. (101)

Figura C.1 – Diagrama ilustrativo do princípio básico de aquisição de imagens utilizando o microscópio confocal.

Fonte: MICROSCOPY (100)

Assim como na microscopia de campo aberto, a máxima resolução no plano focal é limitada pelo diâmetro de Airy, consequência do fenômeno de difração. A resolução confocal lateral (d_L) pode ser determinada pela equação C.1. (102)

$$d_L = \frac{0,37\lambda}{NA} \quad \text{Equação C.1.}$$

Na equação C.1, λ é o comprimento de onda da luz coletada e NA é o diâmetro de abertura do pinhole. Os parâmetros do microscópio confocal como a velocidade de escaneamento e o diâmetro do pinhole podem ser ajustados para obtenção da máxima resolução. Caso a amostra apresente baixa emissão de luz, o diâmetro de abertura do pinhole pode ser ajustado para valores maiores que um diâmetro de Airy. Nesse caso, aumentando a intensidade de luz coletada pelo detector e diminuindo a resolução da imagem. (101-102)

Para um dado ajuste dos parâmetros do microscópio confocal de escaneamento a Laser, qualquer variação na intensidade de emissão da amostra será integrada em um valor médio de intensidade para cada voxel (pixel 3-D). O operador do microscópio deve considerar o tamanho dos objetos de interesse para o ajuste apropriado do tamanho do pixel e a distância entre cada plano focal, de maneira que as informações necessárias para a reconstrução tridimensional do objeto em questão sejam adquiridas. Se por um lado estruturas pequenas da amostra não aparecerão com bom contraste na imagem coletada se o voxel for de tamanho maior que a dada estrutura. Por outro lado, se o tamanho do pixel é muito pequeno e a distância entre os planos focais também muito pequena com relação a amostra a ser avaliada, a mesma informação será adquirida com tempo de aquisição mais longo. (101-102)