UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS

CAROLINA DE PAULA CAMPOS

Investigação da terapia fotodinâmica em culturas 3D de tumor
de mama crescidas pelo método de levitação magnética

São Carlos
2019

CAROLINA DE PAULA CAMPOS

Investigação da terapia fotodinâmica em culturas 3D de tumor
de mama crescidas 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 Doutora em
Ciências.

Área de concentração: Física
Aplicada
Opção: Física Biomolecular
Orientadora: Prof^a. Dr^a. Cristina
Kurachi.

Versão Corrigida

(Versão original disponível na Unidade que aloja p Programa)

São Carlos
2019

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

Campos, Carolina de Paula

Investigação da terapia fotodinâmica em culturas 3D de tumor de mama crescidas pelo método de levitação magnética / Carolina de Paula Campos; orientadora Cristina Kurachi - versão corrigida -- São Carlos, 2019.

91 p.

Tese (Doutorado - Programa de Pós-Graduação em Física Aplicada Biomolecular) -- Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2019.

1. Terapia fotodinâmica. 2. Modelo 3D. 3. Câncer de mama. 4. Microespectroscopia Raman. I. Kurachi, Cristina, orient. II. Título.

Aos meus pais e namorada,
com todo meu amor, admiração e gratidão pelo confortante apoio,
paciência e enorme carinho durante o desenvolvimento deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Ana Maria e Horigenes, cujos esforços, apoio e amor imensuráveis me trouxeram onde me encontro hoje, tanto profissional quanto pessoalmente. Vocês são meus exemplos. Amo vocês.

À Prof. Dra. Cristina Kurachi que me orientou, ensinou, acalmou e apoiou durante esses anos. Muito obrigada pelo carinho e por me ajudar a crescer.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de doutorado e apoio financeiro ao projeto.

Ao Instituto de Física de São Carlos e Grupo de Óptica, pela oportunidade de realizar esse trabalho com uma estrutura e profissionais de alta qualidade.

À Dra. Natalia M. Inada, por ter me tratado como sua aluna, me guiando nesse caminho e contribuindo nesse projeto com seu valioso conhecimento.

À minha namorada, Laís, por sempre estar ao meu lado para me incentivar, me inspirar, me motivar e me apoiar. Sem a sua companhia e amor esse caminho teria sido muito mais difícil.

Aos amigos e colegas de trabalho, Ievgeniia, Hilde, Paula e Ramon que me ajudaram diretamente, tornando esse trabalho mais rico com suas valiosas contribuições.

Ao Prof. Dr. Vanderlei Bagnato, pelo acompanhamento do trabalho e disponibilidade de ajuda sempre e por proporcionar através do grupo o melhor laboratório e equipamentos para desenvolvimento desse trabalho.

Às amigas e melhores colegas de trabalho, Ilaiáli, Clara e Giulia, que inúmeras vezes me doaram seu tempo para discussões de problemas, resultados e protocolos, para conversas motivacionais e para ajudar com experimentos. A contribuição de vocês foi essencial. Obrigada por tudo sempre.

À toda minha família, pelo amor e torcida que distância nenhuma é capaz de barrar, em especial à minha irmã que sempre me motivou para ser a pessoa “inteligente que passou na USP” que ela vê em mim.

À minha família de São Carlos, Ila, Uru, Laís, Thomás, Bramorski, Clara, Vito, Giu, Paula Maria e Kelly Cris, pela amizade, carinho e apoio, por sempre me proporcionarem momentos incríveis e por estarem sempre comigo para comemorar minhas conquistas.

Aos amigos do Laboratório de Biofotônica, por sempre tornarem o ambiente de trabalho um lugar agradável, pelo conhecimento compartilhado e pela disponibilidade para ajudar com situações do dia a dia, em especial Michelle, Didi, Hilde e Clóvis, pessoas queridas com as quais aprendi muito e pelas quais tenho enorme admiração.

Aos meus gatos, Maze e Luci, que entraram na minha vida na reta final desse ciclo e tornaram o meu despertar pela manhã muito mais agradável e meus dias mais cheios de amor e risadas.

Ao USPSC Student Chapter e seus membros, por terem contribuído para o meu crescimento pessoal e social, permitindo que eu aplicasse minha criatividade e desenvolvesse minhas habilidades de liderança e organização.

Às meninas do Futsal Feminino do CAASO, que tornaram minhas noites de segunda e quarta mais divertidas e minhas semanas menos estressantes, em especial à Bretas e Bragança, amigas da quadra para vida.

À Deus, por último, mas não menos importante, por alimentar meu coração com amor, fé e serenidade em todos os momentos da minha vida.

RESUMO

CAMPOS, C. P. **Investigação da terapia fotodinâmica em culturas 3D de tumor de mama crescidas pelo método de levitação magnética**. 2019. 91 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2019.

O câncer de mama é a segunda maior causa de morte em mulheres em todo o mundo. Nas últimas décadas, a terapia fotodinâmica (TFD) tem sido investigada em estudos clínicos como uma alternativa minimamente invasiva para recidivas em pele na parede torácica após mastectomia. Para entender os efeitos da TFD em tumores sólidos, estudos *in vitro* em modelos que mimetizem a morfologia e ambiente natural de ocorrência do tumor são essenciais. Nesse contexto, existem modelos de cultura tridimensional (3D), como o método de levitação magnética (MLM) que permite a formação de esferoides da ordem de milímetros em poucos dias. Os objetivos deste trabalho foram caracterizar o crescimento dos tumores no MLM com MCF-7, uma linhagem de células de câncer de mama, investigar citotoxicidade e distribuição dos fotossensibilizadores (FS) nesse modelo, avaliar os efeitos da TFD nas culturas 3D milimétricas *in vitro* e em modelo de membrana corioalantóica (CAM). A protoporfirina IX (PpIX) e um derivado de clorina e6 (PDZ) foram utilizados nas investigações de citotoxicidade e distribuição. Os protocolos de TFD foram realizados com PDZ ativado por baixas fluências de luz (1, 3 e 4 J/cm²), para obtenção de tumor remanescente, entregues por uma fonte de luz emitindo em 660 nm. Nossos resultados mostraram que com o MLM foi possível gerar tumores do tamanho de interesse (2,39 ± 0,04 mm de diâmetro aparente médio) e foi observado que a PpIX não foi distribuída por todo tumor nos parâmetros analisados. Já o PDZ se distribuiu homogeneamente por todo tumor na concentração de 100 µg/mL e com 50 µg/mL foi possível reproduzir uma distribuição heterogênea do FS como ocorre *in vivo*. Protocolos de TFD com baixa fluência de luz foram padronizados para gerar baixa taxa de morte e destruição parcial dos tumores. Nos protocolos de uma sessão de 3 J/cm² e 3 sessões de 1 J/cm², a microspectroscopia Raman identificou sinais de apoptose a curto prazo e dano na matriz extracelular a longo prazo. Nossos resultados demonstraram possíveis efeitos da TFD em tumores sólidos quando há presença de tumor remanescente. Acreditamos que esses resultados podem auxiliar futuros estudos referentes à resistência de tumores à TFD, aumento

de agressividade e metástase. Os testes em CAM foram inconclusivos, mas sugerem a possibilidade de interação do tumor com a membrana.

Palavras-chave: Terapia fotodinâmica. Modelo 3D. Câncer de mama. Microespectroscopia raman.

ABSTRACT

CAMPOS, C. P. **Investigation of photodynamic therapy in 3D cultures of breast tumor grown by the magnetic levitation method**. 2019. 91 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2019.

Breast cancer is the second leading cause of death in women around the world. In the last decades, Photodynamic Therapy (PDT) has been investigated in clinical studies as a minimally invasive alternative for chest wall recurrence after mastectomy. To understand the effects of PDT on solid tumors, *in vitro* studies on models that mimic the morphology and natural environment of the tumor are essential. In this context, there are three-dimensional (3D) culture models, such as the magnetic levitation method (MLM) that allows formation of millimetric tumors in few days. The purpose of this work were to characterize the growth of MLM tumors with MCF-7, a breast cancer cell line, to investigate cytotoxicity and distribution of the photosensitizer (PS) in the model, to evaluate the effects of PDT on millimetric 3D cultures *in vitro* and in a model of chorioallantoic membrane (CAM). Protoporphyrin IX (PpIX) and a chlorin e6 derivative (PDZ) were used for the cytotoxicity assay and distribution investigations. The PDT protocols were performed with PDZ activated by low fluences of light (1, 3 e 4 J/cm²), aiming to obtain a remaining tumor, delivered by a light source emitting at 660 nm. Our results showed that with the MLM it was possible to generate tumors of interest size (2.39 ± 0.04 mm of mean diameter). PDZ was homogeneously distributed throughout the tumor at a concentration of 100 µg/mL, and at 50 µg/mL it was possible to reproduce a heterogeneous distribution of the PS as seen *in vivo*. Low-fluence PDT protocols were standardized to generate death rate and partial destruction of tumors. After the protocols of one session of 3 J/cm² and 3 sessions of 1 J/cm², Raman microspectroscopy identified signs of apoptosis in short-term and extracellular matrix damage in long-term. Our results demonstrated some possible effects of PDT on solid tumors when there is presence of tumor remaining. We believe that these results may support future studies regarding tumor resistance to PDT, increase of aggressiveness and metastasis. The CAM tests were inconclusive, but there is a possibility of tumor-to-membrane interaction.

Keywords: Photodynamic therapy. 3D model. Breast cancer. Raman
microspectroscopy

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2D	Bidimensional
3D	Tridimensional
ALA	Ácido aminolevulínico
CAM	Membrana Corioalantóica
ED	Desenvolvimento Embrionário
EROs	Espécies Reativas de Oxigêni
FS	Fotossensibilizador
MCF-7	Linhagem celular de adenocarcinoma mamário humano
MEC	Matrix Extracelular
MIM	Método de Impressão Magnética
MIO	Nanopartículas de Óxido de Ferro Magnético
MLM	Método de Levitação Magnética
MTT	Teste de viabilidade celular (Brometo de Tiazolil Azul Tetrazólio)
NpAu	Nanopartículas de Ouro
NS	Nanoshuttle
PDZ	Photodithazine
PpIX	Protoporfirina IX
PZ	Potencial Zeta
tCAM	Modelo Tumor-Membrana Corioalantóica
TEM	Microscopia Eletrônica de Transmissão
TFD	Terapia Fotodinâmica

SUMÁRIO

1	<u>INTRODUÇÃO.....</u>	<u>15</u>
1.1	TUMOR DE MAMA.....	16
1.2	TERAPIA FOTODINÂMICA	16
1.3	CULTURAS 3D	18
1.3.1	MÉTODO DE LEVITAÇÃO E IMPRESSÃO MAGNÉTICA	20
1.4	TERAPIA FOTODINÂMICA E O CÂNCER DE MAMA	22
1.4.1	ESTUDOS CLÍNICOS.....	22
1.4.2	ESTUDOS <i>IN VITRO</i>	23
1.5	MICROESPECTROSCOPIA RAMAN	24
1.6	ESTUDOS <i>IN OVO</i>	26
2	<u>OBJETIVOS</u>	<u>27</u>
3	<u>MATERIAIS E MÉTODOS</u>	<u>29</u>
3.1	ENSAIOS <i>IN VITRO</i>	29
3.1.1	CULTURA CELULAR	29
3.1.2	CARACTERIZAÇÃO DO CRESCIMENTO DOS TUMORES	29
3.1.3	TESTES DE CITOTOXICIDADE NO ESCURO	30
3.1.4	ANÁLISE DE DISTRIBUIÇÃO DOS FS	30
3.1.5	TERAPIA FOTODINÂMICA	31
3.1.6	TESTES DE VIABILIDADE	33
3.1.7	MICROESPECTROSCOPIA RAMAN	33
3.1.8	CARACTERIZAÇÃO DO NANOSHUTTLE APÓS A TFD	34
3.2	ENSAIOS <i>IN OVO</i>	35
3.2.1	OVOS.....	35
3.2.2	CARACTERIZAÇÃO DO MODELO	36
4	<u>RESULTADOS E DISCUSSÃO</u>	<u>37</u>
4.1	CARACTERIZAÇÃO DO CRESCIMENTO DOS TUMORES	37
4.2	CITOTOXICIDADE NO ESCURO E DISTRIBUIÇÃO DA PPIX	42
4.3	CITOTOXICIDADE NO ESCURO E DISTRIBUIÇÃO DO PDZ	48
4.4	TERAPIA FOTODINÂMICA COM PDZ.....	52
4.4.1	PROTOCOLO 1	52
4.4.2	PROTOCOLO 2	53
4.4.3	PROTOCOLO 3	54
4.4.4	PROTOCOLO 4	55
4.4.5	PROTOCOLO 5	60
4.4.6	PROTOCOLO 6	61
4.4.7	DISCUSSÃO DOS EFEITOS DA TFD	67

4.5	CARACTERIZAÇÃO DO NS APÓS A TFD	70
4.6	INTERAÇÃO DO TUMOR COM A CAM	77
5	<u>CONCLUSÃO</u>	<u>81</u>
	<u>REFERÊNCIAS.....</u>	<u>83</u>
	<u>ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa.....</u>	<u>91</u>

1 INTRODUÇÃO

O câncer de mama é o tipo mais diagnosticado e comparado com outros tipos de câncer representa a principal causa de morte de mulheres no mundo todo. Esse tipo de câncer correspondeu a 11,6% (2,09 milhões) do total de novos casos e a 14% (627 mil) dos óbitos totais relacionados à doença em 2018.(1) No Brasil, de acordo com o Instituto Nacional de Câncer, para o ano de 2018 eram esperados 59.700 novos casos de câncer de mama, sendo este o tipo de câncer mais frequente nas mulheres depois do câncer de pele não melanoma. (2)

Os tratamentos convencionais adotados para o câncer de mama são cirurgia, quimioterapia, radioterapia e hormonoterapia. No entanto, esses tratamentos estão associados à efeitos colaterais que causam grande desconforto aos pacientes. Dessa forma, a introdução de novos medicamentos e tratamentos aliados ao diagnóstico precoce tem aumentado a taxa de sobrevida dessa doença. Dentro deste cenário, novas técnicas como a terapia fotodinâmica (TFD) têm sido investigadas para o tratamento do câncer de mama. Estudos clínicos mostram que a TFD proporciona boa eficiência contra tumores cutâneos primários e sugerem a sua eficácia na diminuição de recorrências do tumor de mama. (3–5) Dessa forma, a TFD tem sido estudada como um tratamento complementar ou mesmo alternativo para o tratamento de tumores de mama.

Os bons resultados observados nos estudos clínicos motivam estudos de base, necessários para o completo entendimento da TFD em tumores sólidos, a nível molecular e celular, assim como o desenvolvimento de protocolos mais eficientes. Para tal finalidade, investigações *in vitro* em modelos tridimensionais (3D) têm sido conduzidas com diversas linhagens tumorais e em diferentes culturas 3D. Esses modelos são capazes de reproduzir características dos tumores sólidos que permitem elucidar uma resposta *in vivo* com maior precisão quando comparadas ao modelo bidimensional (2D) tradicionalmente adotado. O primeiro passo para entender efeitos como resistência à TFD, metástase e alteração da agressividade tumoral é entender os mecanismos de ação da terapia em tumores 3D com relação às alterações morfológicas e bioquímicas no tumor remanescente.

1.1 Tumor de mama

O câncer de mama é considerado uma doença heterogênea com relação a seus aspectos clínicos e morfológicos. Ele pode ser dividido em dois grupos principais: os carcinomas e os sarcomas. Carcinomas são tumores que tem origem epitelial, em células que revestem os lóbulos e dutos terminais responsáveis pela produção do leite. Enquanto os sarcomas compreendem a grande maioria dos casos de câncer da mama, os sarcomas são raros. Esse tipo de tumor surge a partir dos componentes do estroma (tecido conjuntivo) da mama, e incluem o tumor filóide e angiosarcoma. (6) O microambiente do tumor de mama é composto por uma ampla seleção de tipos celulares distintos, como células imunes, fibroblastos, células endoteliais e adipócitos, além da matriz extracelular (MEC). A MEC é uma rede molecular altamente dinâmica e complexa que envolve as células dentro dos tecidos. Na sua composição estão incluídas proteínas que contribuem para a estrutura e função, como colágenos, fibronectina, lamininas, glicosaminoglicanos e proteoglicanos, proteínas matricelulares e enzimas de remodelação da MEC. (7)

O tratamento indicado para o câncer de mama depende do tipo e do estágio do câncer. O mais comumente realizado é a cirurgia conservadora de mama (remoção parcial da mama) ou mastectomia (remoção total da mama). Há casos nos quais é necessária a associação de terapias para aumentar a efetividade do tratamento. (8) No entanto, mesmo após esses procedimentos existe a possibilidade do paciente apresentar recidiva tumoral. As recorrências de tumores da mama após mastectomia representam um desafio terapêutico com poucas opções de tratamento. Se a doença está localizada, a excisão cirúrgica pode ser aplicada. No entanto, estas lesões frequentemente são difundidas por toda a parede torácica ou envolvem tecido fortemente irradiado. Dessa forma, há interesse em formas alternativas de tratamento que se adequem às particularidades da doença.

1.2 Terapia Fotodinâmica

A TFD é uma técnica minimamente invasiva que consiste da ação combinada de três fatores: luz, uma molécula fotossensível e oxigênio molecular. A luz de comprimento de onda apropriado excita essa molécula, chamada fotossensibilizador (FS), o levando para um estado excitado singlete. Após a transição, o FS pode

retornar ao seu estado fundamental por emissão de fluorescência ou calor, mas também pode passar por um cruzamento intersistemas indo para um estado excitado tripleto. Nesse estado, o FS pode interagir com o oxigênio molecular por transferência de cargas gerando espécies reativas de oxigênio (EROs) – reação tipo I, ou por transferência de energia gerando oxigênio singleto – reação tipo II. Esses produtos finais são altamente citotóxicos e podem levar à morte celular por apoptose ou necrose (Figura 1). (9) Como a reação fotodinâmica é principalmente decorrente da ação de EROs, todas as biomoléculas são alvos potenciais da TFD. O alvo celular e consequentemente, o tipo do dano induzido serão decorrentes essencialmente da interação e localização do FS.

Figura 1 - Ilustração esquemática da TFD. CIS: Cruzamento Intersistema, EROs: Espécies Reativas de Oxigênio.

Fonte: Elaborada pela autora

Para a terapia atingir seu objetivo, é preciso que alguns requisitos mínimos sejam cumpridos. Um dos requisitos para o sucesso da terapia é que o FS utilizado apresente características como, por exemplo, um substancial rendimento quântico do estado tripleto levando a uma boa produção de EROs após a irradiação. Os FS são substâncias químicas, comumente moléculas heterocíclicas, que mediante absorção de luz induzem alteração química a outra entidade. (10) Como a maioria dos FS é administrada por via intravenosa, é importante que apresentem certas propriedades específicas como: ser solúvel e estável em pH fisiológico. Além disso, o FS deve apresentar seletividade pelas células cancerígenas, ter tempo de incubação pequeno preferencialmente, não ser tóxico no escuro e ter alta absorção na região entre 600 nm e 1200 nm. (9, 11) Esse intervalo de comprimento de onda, chamado de janela terapêutica, reflete a capacidade de penetração da luz em tecidos.

biológicos. Isso ocorre porque cromóforos presentes no tecido apresentam menor absorção nessa região espectral, como a hemoglobina que possui alta absorção em intervalos inferiores a 600 nm e a água cuja absorção é acentuada acima de 1150 nm. (9) Com relação aos tecidos biológicos, em geral comprimentos de onda que atinjam maiores profundidades são mais desejados para a realização da terapia. Dessa forma, FS que tenham pico de absorção na região do vermelho e infravermelho são mais visados para a terapia. Os FS podem ser classificados e separados em grupos de acordo com sua estrutura química. Dois dos principais são o grupo das porfirinas e o das clorinas. Dentro do primeiro grupo encontramos os derivados de hematoporfirinas, o Photofrin e o ALA (pró fármaco do FS Protoporfirina IX – PpIX). Já no grupo das clorinas, os FS mais conhecidos são m-tetrahydroxyphenylchlorin (m-THPC – Temoporfin ou Foscan) e a clorina e6 que na forma de sal é comercializada como Photodithazine (PDZ). (12)

Os efeitos antitumorais da TFD derivam de três mecanismos relacionados entre si: efeitos citotóxicos diretos à célula tumoral, dano à vasculatura do tumor e indução de uma reação inflamatória levando à imunidade sistêmica. A contribuição de cada um desses mecanismos depende do tipo e dose do FS utilizado, tempo entre administração do FS e aplicação da luz (tempo de incubação), fluência e irradiância da luz, oxigenação do tumor e talvez variáveis ainda não identificadas. (13) Dessa forma, a determinação de um protocolo eficiente para cada tipo de tumor depende da investigação de diversas combinações dos fatores envolvidos. Além disso, o completo entendimento dos efeitos da TFD em tumores sólidos ainda não foi alcançado, então estudos que buscam entender a resposta do tumor de mama à ação fotodinâmica também são essenciais para a definição de um protocolo.

1.3 Culturas 3D

Culturas 2D, tradicionalmente utilizadas em ensaios *in vitro*, são capazes de fornecer um modelo que pode gerar informações preliminares na investigação de uma terapia. No entanto, elas claramente não recriam a complexidade de um tecido tumoral *in vivo*. O cultivo em monocamada apresenta características como limitada sinalização célula-célula e célula-MEC devido ao seu crescimento bidimensional. Esses sinais são essenciais para diversos processos celulares como a diferenciação, migração, proliferação, sobrevivência, além de outras funções

celulares. (14) Dessa forma, as diferenças estruturais e funcionais geram respostas diferentes em modelos 2D e 3D quando submetidos a abordagens terapêuticas, como a TFD. Alguns estudos mostraram que quando o mesmo protocolo TFD é aplicado em modelos 2D e 3D, diferenças na viabilidade celular são observadas. (15–17) Em 2015, Yang e colaboradores utilizaram um sistema microfluídico para uma co-cultura 3D de MCF-7 com células estromais de tecido adiposo em comparação a um modelo 2D para investigar a TFD com ALA. Como resultado, os autores observaram que o modelo microfluídico apresentou maior resistência à terapia. (18) A divergência nos resultados da TFD sugere que a predição de respostas clínicas baseadas em testes *in vitro* 2D muitas vezes é imprecisa. Nos últimos anos diferentes técnicas de cultura de células 3D têm surgido para atender à necessidade de modelos que se assemelham ao tecido natural para prever eventos *in vivo*. (19) Os modelos 3D têm o potencial de imitar melhor o microambiente tumoral *in vivo*, permitindo investigações mais precisas dos efeitos da TFD.

Além das células tumorais, o microambiente tumoral é composto pelo estroma que compreende todos os outros componentes como fibroblastos, células endoteliais, células imunes e MEC. (7) A matriz é um componente vital para a organização de tecidos em organismos multicelulares. Modelos 3D permitem que as interações célula-célula e célula-MEC aconteçam, se assemelhando com a morfologia do tumor *in vivo*. Os componentes celulares são aderidos à MEC e entre si através de proteínas de adesão celular que permitem ancoragem, sobrevivência, proliferação e migração. Existem quatro superfamílias principais de proteínas de adesão celular: integrinas, selectinas, imunoglobulinas e caderinas. As integrinas são glicoproteínas que modulam a adesão das células à MEC via interação com componentes como colágeno, fibronectina e laminina. As caderinas são glicoproteínas transmembranas que se configuram em junções para conectam células adjacentes do mesmo tipo. (20) Para se estudar os efeitos da TFD é importante que esse microambiente seja recriado para que a resposta da terapia também seja avaliada em condições complexas onde o dano causado pode ser diretamente às células e também à MEC.

1.3.1 Método de Levitação e Impressão Magnética

Dentre os modelos 3D, o modelo magnético se destaca por ser uma metodologia relativamente econômica, rápida e simples. Com esse modelo é possível formar culturas 3D em poucas horas (aproximadamente 16 h), formar esferoides numa ampla faixa de micrômetros a alguns milímetros e sintetizar matriz extracelular durante sua formação, como demonstrado através do acompanhamento na produção de proteínas como colágeno, fibronectina e laminina. (21–23)

Através do uso de ímãs e células magnetizadas, o modelo de levitação magnética (MLM) e o modelo de impressão magnética (MIM) são capazes de produzir culturas 3D de diferentes tamanhos em poucos dias. Para a construção desse modelo, inicialmente a linhagem celular de interesse é cultivada em monocamada, e é incubada com um hidrogel comercializado como NanoShuttle™ (NS) (Nano3D Biosciences, Houston, TX, EUA). (23) O hidrogel é composto por nanopartículas de ouro (NpAu) com diâmetro de 50 ± 8 nm, nanopartículas de óxido de ferro magnético (MIO; Fe_3O_4 , magnetita) cujo tamanho varia de ~10 a 100 nm e bacteriófago (fago) derivado do vírus M13, funcionalizado com um peptídeo para ligar integrinas α_v (Figura 2a). O hidrogel é um agregado das NpAu e das NpMIO, que possuem carga negativa em solução aquosa (pH 6), e que, portanto, são atraídas pelas cargas positivas do fago (Figura 2a) formando uma microestrutura estabilizada por interações eletrostáticas que se assemelham a hidrogéis NpAu-fago sem NpMIO (Figura 2b). (24) O NS interage eletrostaticamente com a membrana celular e também pode ser internalizado, e após aproximadamente oito dias de cultivo é liberado na matriz extracelular. (23) Essa solução é biocompatível, não afeta a proliferação, viabilidade e metabolismo celular, não interfere no estresse oxidativo e não se liga a receptores específicos. (22,25–27) Após a incubação, as células são plaqueadas em placas multipoços de baixa aderência e as placas de ímãs de neodímio são posicionadas acima (no caso do MLM) ou abaixo (no caso do MIM) da placa. Em poucos minutos, o campo magnético une as células formando o tumor que cresce adjacente à interface ar-meio de cultura, no caso do MLM e no fundo do poço, no caso do MIM (Figura 2c e d). (27)

Figura 2 - a. Esquema da composição do NS. NpAu: nanopartículas de ouro, MIO: Óxido de ferro magnético, pIII e pVIII: proteínas do capsídeo do fago. Fonte: adaptada de SOUZA (23). b. Microscopia eletrônica de transmissão (TEM) de hidrogel NpAu-fago sem NpMIO. Barra de escala: 500 nm, barra de escala do inset: 200 nm Fonte: adaptada de SOUZA (24). c. Esquema do método de levitação magnética (MLM). d. Esquema do método de impressão magnética (MIM).

Fonte: Elaborada pela autora.

As formações multicelulares crescidas com esse modelo exibem organização celular similar a modelos xenográficos e suportam co-cultura de diferentes linhagens, como reportado por Souza e colaboradores com o crescimento celular de glioblastoma e adenocarcinoma de mama humanos. (21,28) O estudo da co-cultura de adenocarcinoma mamário humano com fibroblastos identificou no modelo 3D a formação de uma cápsula fibrosa que é encontrada no tumor *in vivo*. (21) Além disso, os esferoides têm tamanhos que variam de dezenas de micrômetros a alguns milímetros. Isso facilita a investigação de tumores sólidos que vão de milímetros a centímetros de diâmetro. Portanto, com o modelo magnético é possível a obtenção de tumores semelhantes aos encontrados no organismo, e dessa forma sua

utilização na investigação da TFD proporciona maior precisão de prever comportamentos esperados *in vivo*.

1.4 Terapia Fotodinâmica e o câncer de mama

Terapias eficazes não invasivas para câncer de mama que reduzam a alta taxa de mortalidade associada à doença e também melhorem a qualidade de vida dos pacientes ainda não foram alcançadas. A TFD é um método alternativo minimamente invasivo que vem sendo aplicada em estudos clínicos e pré-clínicos para o tratamento de vários tipos de câncer como o câncer de pele, de mama e de cabeça e pescoço. (29–31) Nos últimos anos, o potencial da TFD para o tratamento do tumor de mama tem sido investigado isoladamente e em combinação com outras abordagens terapêuticas.

1.4.1 Estudos Clínicos

Grande parte dos estudos clínicos investiga a aplicação da TFD para casos de metástase após a cirurgia. A recorrência do câncer de mama frequentemente acontece na pele e em tecidos moles da parede torácica abrangendo grandes áreas. Remoção cirúrgica (quando aplicável), radioterapia específica do local ou ambos são os procedimentos comuns utilizados para o tratamento da metástase na parede torácica. No entanto, cerca de metade dos pacientes não obtém controle tumoral adequado com essas terapias. (32) Dessa forma, a TFD por ser facilmente aplicada em grandes áreas, apresentar danos seletivos para tumores e ainda por apresentar mínimos efeitos colaterais é altamente promissora como uma alternativa no tratamento desses casos.

Na literatura, podemos encontrar estudos de diferentes protocolos de TFD que mostraram uma resposta satisfatória para o tratamento de recorrências. (4-5,33-34) Cuenca e colaboradores utilizaram Photofrin em baixa dose (0,8 mg/Kg) e observaram resposta completa em 64% dos pacientes em 6 meses de acompanhamento pós TFD. Todos os pacientes apresentaram necrose inclusive em lesões maiores que 2 cm de espessura. Também observaram regressão de lesões fora do campo de tratamento, sugerindo uma resposta imune na região. (4) Além das porfirinas, foram realizados estudos com clorinas como o estudo de Wyss e

colaboradores que explorou diferentes doses de m-THPC (Foscan®) (0,1 e 0,15 mg/Kg) e tempos de incubação (48 e 96 h, respectivamente). Eles obtiveram resposta completa de todos os pacientes em ambos os protocolos após 8 a 10 semanas. (5) Em seu estudo publicado em 2014, Morrison e colaboradores trataram seus pacientes com porfirina sódica e após 48 h de incubação, realizaram o TFD com baixa fluência de luz continuamente por 24 h. Eles observaram resposta total ou parcial em 67% dos pacientes. Assim como Cuenca, casos de regressão de nódulos fora da zona de tratamento foram detectados. (33) Nesse mesmo ano, um estudo combinando radioterapia com TFD usando ALA mostrou que no grupo tratado com a combinação de terapias, mais indivíduos apresentaram resposta clínica em menor tempo quando comparados ao grupo de radioterapia sozinha. (34)

Ao mesmo tempo que esses estudos demonstram o grande potencial da TFD, eles levantam um ponto importante: tumores remanescentes. Como em alguns casos se observa um tratamento incompleto, há presença de uma massa tumoral remanescente após a realização da terapia. Esse fato revela a necessidade de se levar em consideração os possíveis efeitos da terapia no tumor remanescente como por exemplo resistência e aumento de agressividade.

1.4.2 Estudos *in vitro*

Os estudos *in vitro* têm o objetivo de investigar a resposta das células à TFD e ampliar o conhecimento das ações dessa terapia em diferentes aspectos. Esses estudos podem ser divididos em duas frentes: protocolos e mecanismos/efeitos. A frente protocolos está relacionada a busca por máxima eficácia da terapia para diferentes tipos tumorais. As investigações envolvem o desenvolvimento de novos protocolos, criação e validação de novos FS com propriedades otimizadas com relação a entrega, localização, seletividade e citotoxicidade. A frente mecanismos/efeitos investiga a resposta do tratamento em relação a mecanismos de morte, viabilidade celular, proliferação e resistência, alterações na MEC, dentre outros.

Na literatura, a maior parte dos estudos *in vitro* relata investigações compreendendo principalmente a frente de protocolos. Com relação à tumores de mama, Feuerstein e colaboradores investigaram a ação fotodinâmica de um derivado de ALA, o AlaAcBu em cultura 2D de células de adenocarcinoma mamário,

MCF-7. (35) Eles observaram que nas células com AlaAcBu houve maior acúmulo de PpIX comparadas com as com ALA. Além disso, a TFD foi eficientemente capaz de causar morte nas células tumorais. Depois de 4 h do tratamento, observaram redução da atividade enzimática mitocondrial, detectaram necrose por extravasamento de LDH e baixo número de células viáveis após 48 h. Em outro estudo também em cultura 2D de MCF-7, outros pesquisadores investigaram um FS derivado de clorofila, o CPD4. (36) Após a TFD, identificaram por citometria de fluxo que a razão de células apoptóticas aumentou significativamente de forma dose dependente. Descobriram que o CPD4 se localizou principalmente nas mitocôndrias e que após o tratamento houve uma diminuição do potencial de membrana mitocondrial, o que pode ter iniciados rotas de apoptose na MCF-7.

Mais voltado para a frente de mecanismos/efeitos, Aggarwal e colaboradores investigaram TFD de baixa fluência (45 a 540 mJ / cm²) usando dois FS com localização nas mitocôndrias (monoácido derivado de benzoporfirina A, BPD) e nos lisossomos (N-aspartil clorofluoreto e6, NPe6) incubados por 1 h. (37) A investigação foi realizada no modelo 3D de MAME (do inglês, Mammary Architecture and Microenvironment Engineering) das linhagens celulares SUM149 e MDA-MB-231. Quando 22,5 mJ/cm² foi entregue para ativar a NPe6 (660 nm) e depois o BPD (690 nm), eles observaram caspase-3 ativada e mudanças na morfologia nuclear dentro de 24 h após a TFD concluindo que a apoptose foi o mecanismo de morte celular. Recentemente, Olsen e colaboradores publicaram um estudo sobre o desenvolvimento de resistência à TFD por linhagens tumorais de mama elucidando os possíveis mecanismos envolvidos. (38) As linhagens MA11, MCF-7 e MDA-MB-231 foram investigadas em culturas 2D após 3 sessões de TFD com sulphonated meso-tetraphenylchlorin (TPCS2a) entregando 2,43J/cm² ou com Pheophorbide (PhA), entregando 0,81 J/cm². Eles observaram que a resistência da MA11 a PhA-TFD foi devido ao aumento da expressão da bomba de efluxo ABCG2 e que as células resistentes a TPCS2a-TFD adquiriram uma capacidade maior de proliferação e que a p38 MAPK perdeu sua função mediadora de morte nessas células.

1.5 Microespectroscopia Raman

O princípio físico da Microespectroscopia Raman é o espalhamento inelástico da luz, conhecido como efeito Raman. A espectroscopia Raman se baseia na

interação não destrutiva da luz com a matéria, na qual um fóton de luz interage com uma amostra, produzindo radiação dispersa de energia diferente do fóton incidente. Quando a energia do fóton espalhado é menor que a do incidente o fenômeno é conhecido com Stokes-Raman e quando é maior, Anti-Stokes-Raman e essa diferença de energia é devido a uma mudança no estado vibracional da molécula investigada. A perda (ou ganho) de energia do fóton espalhado corresponde à diferença na energia do estado vibracional inicial e final das moléculas envolvidas. O espectro Raman é um gráfico das intensidades de energia espalhadas pelas diferenças de energia observadas entre fóton incidente e espalhado, representadas pela diferença do número de onda (inverso do comprimento de onda, cm^{-1}) em relação à frequência incidente. Essa diferença de frequência é conhecida como Raman shift (desvio Raman) e é único para cada molécula, representando ligações químicas específicas. (39)

Dessa forma, a microespectroscopia Raman é um poderoso método óptico, que pode ser aplicado a várias amostras orgânicas e inorgânicas para determinar sua composição química e alterações que ocorrem na amostra durante um determinado procedimento. O espectro Raman de cada molécula é único, o que torna possível identificar moléculas em uma mistura, ou em um tecido biológico, e determinar sua conformação e estado. (40–42) A microespectroscopia Raman pode ser empregada no estudo de amostras de células sem usar marcadores para, por exemplo, visualizar a localização de ácidos nucleicos (43), proteínas e lipídios (44), distinguir entre células normais e cancerígenas (45) e monitorar a entrega de medicamentos na célula. (46) O uso de técnicas espectroscópicas para aplicações biológicas aumentou nos últimos anos. Em particular, para a área de diagnósticos de câncer, essas técnicas estão trazendo novas possibilidades para estudos clínicos e pré-clínicos. A espectroscopia Raman tem um grande potencial para detecção e compreensão desta doença, bem como para a caracterização da resposta ao tratamento em nível molecular. (39,47) No entanto, pesquisas *in vitro* em modelos 3D ainda são escassas e considerando investigações da TFD, nenhum estudo foi publicado até o momento. Portanto, no presente estudo, esta técnica foi utilizada para rastrear alterações bioquímicas associadas aos mecanismos de morte celular (apoptose e necrose) para identificar o tipo de morte após a TFD, danos em componentes celulares e matriciais, bem como outras divergências bioquímicas.

1.6 Estudos in ovo

A investigação da TFD é feita em modelos que vão desde o 2D até o modelo animal, ou seja de um modelo com menor até um com maior complexidade. Dessa forma é possível entender os efeitos da terapia com a influência de poucos parâmetros inicialmente e em seguida aumentar a complexidade do modelo com o objetivo de prever os efeitos da TFD no seu uso clínico. Entre a investigação em modelos 3D e em um organismo animal completo, é possível introduzir no tumor 3D o fator vasculatura através do modelo de membrana corioalantóica (CAM, do inglês, *chorioallantoic membrane*). A CAM é uma membrana de ovos de galinha e é utilizada com um modelo bem estabelecido para estudos de angiogênese e a ação de compostos no endotélio vascular. A CAM é a fusão do alantóide - responsável pela respiração - e do cório - membrana que envolve o embrião e suas estruturas. Essa membrana se posiciona embaixo da casca porosa e é altamente vascularizada. (48) Esse modelo apresenta vantagens como um acesso facilitado aos vasos sanguíneos e ao embrião, além de ser um método simples e barato. (49,50) Além disso, ele não causa dor, uma vez que os receptores de dor só são desenvolvidos a partir do seu 14º dia de desenvolvimento do embrião (ED – do inglês, *embryo development*). Portanto, os estudos são feitos entre os ED 11 e 14, período em que os vasos sanguíneos estão em tamanho adequado, sem causar qualquer sofrimento ao embrião. Por isso, em muitos países, esse método é considerado alternativo ao uso de animais. (51)

Alguns estudos de TFD têm utilizado o modelo de CAM para avaliar o dano vascular causado pela terapia e também para avaliar a sua resposta em tumores formados a partir de células inseridas diretamente na membrana vascularizada. (52–55) Dessa forma, se o ovo de galinha fornece um ambiente favorável ao crescimento celular, o tumor 3D por levitação magnética pode ser transferido para a CAM dando origem ao modelo tumor-CAM (tCAM). Com isso é possível reproduzir um modelo experimental de tumor de mama vascularizado com acesso facilitado, permitindo a análise direta dos efeitos terapêuticos da TFD.

2 OBJETIVOS

Objetivo Geral

- Avaliar os efeitos da TFD com baixas fluências em tumores 3D da linhagem de adenocarcinoma mamário crescidos com o modelo de levitação magnética

Objetivos específicos

- Caracterizar o crescimento dos tumores de diferentes tamanhos com o modelo magnético;
- Avaliar a distribuição de diferentes FS como PpIX, PDZ e ALA nos tumores 3D;
- Determinar um protocolo de TFD com fluências de 1 a 4 J/cm² para obter tumor remanescente;
- Avaliar as alterações bioquímicas e morfológicas dos tumores após a TFD, em sessão única e três sessões, de baixa fluência;
- Investigar a interação dos tumores crescidos com o modelo magnético no modelo tCAM;

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Ensaios *in vitro*

3.1.1 Cultura celular

Neste trabalho foi utilizada a linhagem de adenocarcinoma de mama humano, MCF-7 (ATCC, Manassas, VI, EUA). O cultivo foi feito em meio RPMI-1640 (Cultilab, Campinas, SP, Brasil) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e 0,1% de penicilina/estreptomicina. As culturas foram mantidas em estufa incubadora umidificada a 37°C e 5% de CO₂. As culturas de levitação magnética foram feitas em placas de baixa aderência de 6, 24 e 96 poços (Corning®) como reportado por Haisler e colaboradores. (27) As células foram cultivadas em garrafas de 25 cm² até atingir 80% de confluência e foram magnetizadas com Nanoshuttle™-PL (Nano3D Biosciences, Houston, TX, EUA) na proporção inicial recomendada pelo fabricante de 1 µL para cada 10⁴ células (considerada aqui 100%) e também com 25, 50 e 115% dessa concentração por 16 h. As quantidades de células adicionadas nas placas de 6, 24 e 96 poços foram da ordem de 10⁶, 10⁵ e 10⁴ células por poço, respectivamente. Após a adição das células, placas de 6, 24 e 96 ímãs foram introduzidas acima (placas de 6 e 24 ímãs) ou abaixo (placa de 96 ímãs) das placa multipoços. A placa de 96 ímãs foi utilizada por 24 h sendo removida após esse período em todas as investigações. As placas de 6 e 24 poços foram mantidas durante todos os dias para caracterização do crescimentos dos tumores e removidas no dia da incubação com FS para os experimentos de TFD. No caso do protocolo 6 de TFD (seção 3.1.5) a placa de ímã foi reintroduzida após as sessões de TFD e removidas sempre antes de cada incubação com FS.

3.1.2 Caracterização do crescimento dos tumores

Para caracterizar o crescimento dos tumores nas diferentes placas, imagens do seu desenvolvimento em função do tempo foram feitas com um microscópio invertido Axio Observer.Z1 (Carl Zeiss, Alemanha) no aumento de 50, 80 e 100x para as placas de 6, 24 e 96 poços respectivamente. A padronização das informações de tamanho dos tumores foi feita utilizando um valor de diâmetro

aparente, que foi calculado pela média dos dois diâmetros do plano da imagem registrada, para 6 tumores de cada placa. Os valores dos diâmetros foram coletados pelo software ImageJ a partir das imagens de crescimento dos tumores e o valor médio e seu desvio foram calculados pelo software OriginPro 9.0 (Originlab Corp. Northampton, MA, EUA).

3.1.3 Testes de citotoxicidade no escuro

O primeiro FS testado foi a PpIX (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) e os ensaios foram feitos para determinação do intervalo de concentrações adequado para realização da TFD. A partir de uma concentração estoque de 1 mg/mL em dimetil sulfoxido (DMSO - Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), foram testadas concentrações de 0,01 a 200 µg/mL diluídas em meio de cultura suplementado e sem vermelho de fenol com tempos de incubação de 24 h. Para o PDZ (Veta Grand Co., Moscow, Russia) foram investigadas concentrações entre 50 e 100 µg/mL diluídas em meio de cultura suplementado e sem vermelho de fenol, com tempo de incubação de 24 h. A viabilidade foi medida através do teste de MTT descrito na seção 4.1.6.

3.1.4 Análise de distribuição dos FS

A investigação da distribuição foi feita através de imagens de microscopia confocal e imagens de fluorescência das lâminas feitas a partir do crio-seccionamento dos tumores. As imagens foram obtidas no Microscópio Confocal Zeiss (Alemanha, modelo LSM 780 invertido) com excitação em 800 nm por dois fótons com um laser Ti:Safira (690-1050 nm). Foi feito uma varredura em z (z-stack, em inglês) a partir da superfície com passos de aproximadamente 30 µm. A distribuição da PpIX foi investigada em tumores crescidos em placas de 96 e 24 poços, com a concentração de 1 µg/mL por 20 h. A distribuição do PDZ foi investigada em tumores crescidos em placa de 24 poços, incubados com 75 µg/mL por 24 h.

Para a análise por crio-seccionamento, os tumores crescidos em placas de 24 poços foram incubados com 50 µg/mL de PpIX por 6 h e 50, 75 e 100 µg/mL de PDZ por 24 h. Após a incubação com os FS, os tumores foram imersos em Tissue-Tek®

O.C.T. (Sakura Finetek USA INC, EUA), um líquido preservador para cortes congelados, e em seguida foram inseridos em nitrogênio líquido. As lâminas foram feitas com cortes de 50 µm de espessura varrendo toda extensão do tumor. O Microscópio de Fluorescência (Axio Observer.Z1 – Zeiss, Alemanha) foi utilizado para fazer as imagens das secções logo após o seccionamento. Para ambos os FS, a excitação utilizada foi em 350 ± 30 nm com coleta acima de 400 nm. As imagens foram processadas com rotinas personalizadas do MATLAB (MathWorks Inc) para melhoramento de contraste e para quantificar a fluorescência do PDZ. O parâmetro densidade relativa média de PDZ no esferoide (ρ_E) foi definido pela soma da contribuição do vermelho (fluorescência do PDZ) de todos os pixels na secção (R), normalizada pela soma da contribuição do verde (fluorescência natural das células) de todos os pixels na secção (G). Essa taxa representa a quantidade de FS por volume interrogado na secção. Logo, densidade relativa média de FS no esferoide (ρ_E) é dada pela soma dos valores de R de todas as secções dividido pela soma dos valores de G de todas as secções, segundo a equação:

$$\rho_E = \sum^{secções} \frac{\sum R}{\sum G} \quad 1$$

3.1.5 Terapia Fotodinâmica

Diferentes protocolos de TFD foram realizados com o PDZ incubado por 24 h. As concentrações utilizadas foram 50 e 75 µg/mL e a incubação foi feita entre os dias 6 e 11 de crescimento dos tumores. Após a incubação, os tumores foram lavados com PBS e foi adicionado aos poços meio de cultura RPMI sem vermelho de fenol, com troca a cada 2 dias. A fonte de luz utilizada foi uma *Biotable®*, dispositivo desenvolvido pelo Laboratório de Apoio Técnico (LAT, Instituto de Física de São Carlos, USP) que contém 24 LEDs que proporcionam iluminação homogênea na placa multipoços. A excitação foi feita em 660 nm e diferentes fluências de 1, 3 ou 4 J/cm² foram entregues a uma irradiância de 30 mW/cm² em 1 ou 3 sessões. Foram feitas imagens de campo claro, teste de viabilidade e medidas de microespectroscopia Raman após a TFD. A Tabela 1 resume os protocolos na ordem em que foram investigados e a Figura 3 mostra a linha temporal dos eventos.

Tabela 1 - Descrição dos protocolos de TFD adotados.

Protocolo	Incubações		Irradiação		Ímã pós TFD	Viabilidade		Tempo da imagem (h)	Tempo da medida Raman (h)
	Nº	[FS] (µg/mL)	Sessões	Fluência (J/cm ²)		Teste	Tempo pós TFD (h)		
1	1	75	1	4	Não	MTT	48	48	-
2	1	50	1	4	Não	MTT	24	24	-
3	1	50	1	4	Não	-	-	-24, 24, 48, 96, 120 e 192	-
4	1	50	1	3	Não	MTT	24	24	24 e 96
5	3 (a cada 48h)	50	3 (a cada 48h)	1	Não	MTT	24 (pós TFD1 e TFD3)	24 (pós TFD1, TFD2 e TFD3)	-
6	3 (a cada 48h)	50	3 (a cada 48h)	1	Sim	Citometria	24 (pós TFD3)	24 e 96 (pós TFD3)	24 e 120

Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 3- Linha temporal dos experimentos de TFD.
Fonte: Elaborada pela autora.

3.1.6 Testes de viabilidade

Para quantificar as células vivas nos testes de citotoxicidade e após a TFD, foi utilizado o ensaio colorimétrico MTT (Brometo de Tiazolil Azul Tetrazólio, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). A reação que ocorre é a conversão desse sal de tetrazol que possui coloração amarelada em cristais de formazan, de coloração violeta. Logo, ao se quantificar a absorbância do formazan (em 570 nm), temos uma medida relacionada à quantidade de células viáveis. Os esferoides foram dissociados fisicamente por pipetagem e quimicamente por tripsinização e, em seguida, as células foram incubadas com MTT por 4 h. O solvente DMSO (dimetilsulfóxido) foi adicionado aos poços para dissolver os cristais de formazan e a absorbância do formazan foi quantificada. Os valores de absorbância foram normalizados pelos grupos controle e apresentados em gráficos utilizando o software OriginPro 9.0.

No protocolo 6, a viabilidade celular foi quantificada por citometria de fluxo (Accuri c6, BD biosciences) usando o kit de ensaio de viabilidade celular live/dead (Thermofisher). As células foram incubadas com os corantes Resazurina e Sytox Green de acordo com as instruções do produto. Células vivas metabolizam a Resazurina em um produto que possui fluorescência vermelha (587 nm) e as células necróticas e apoptóticas tardias têm seu DNA corado com Sytox Green que possui uma fluorescência verde (523 nm). Foram preparadas amostras com os grupos controle vivo (sem FS e luz), luz (só irradiado), FS (só PDZ), TFD (FS e luz) e controle morte (induzido com 25% DMSO). As distribuições de células vivas, mortas e não marcadas foram apresentadas em gráficos dos canais PE e FITC que detectam a fluorescência da Resazurina e Sytox Green, respectivamente, produzidos pelo software do citômetro. A quantificação dessas células foi plotada em um gráfico de barras utilizando o software Origin Pro 9.0.

3.1.7 Microespectroscopia Raman

O espectro Raman dos esferoides foi medido 24 e 96 h após a TFD no protocolo 4 e 24 e 120 h após a TFD no protocolo 6. Os esferoides foram transferidos para uma placa de poço único contendo meio RPMI sem vermelho de fenol e as medições foram realizadas no microscópio WITec Alpha 300 RAS (WITec, Ulm,

Alemanha). O comprimento de onda de excitação foi de 785 nm e a faixa de detecção foi de 100 - 3200 cm^{-1} . Os espectros foram coletados com ampliação de 63x na objetiva (Zeiss, Jena, Alemanha) e foram registrados com tempo de integração de 120 s e 5 acumulações para cada espectro. Os perfis obtidos foram processados usando os softwares WITec ProjectFOUR e Origin Pro 9.0.

3.1.8 Caracterização do Nanoshuttle após a TFD

Para investigar a interferência do NS na resposta à terapia, as propriedades térmicas, estruturais e bioquímicas do NS foram avaliadas após diferentes fluências de luz na presença e ausência de FS. Foram preparadas soluções contendo 10% de NS em meio RPMI sem vermelho de fenol com ou sem 50 $\mu\text{g/mL}$ de PDZ, iluminados com irradiância de 30 mW/cm^2 entregando 1, 3 ou 20 J/cm^2 para análise de potencial zeta (PZ) e microscopia eletrônica de transmissão (TEM) e iluminados com irradiância de 50 mW/cm^2 entregando 34 J/cm^2 para análise de temperatura (tabela 2).

Tabela 2 - Resumos das condições e análises feitas para a caracterização do Nanoshuttle

Condições	Composição	Fluência (J/cm^2)	Análise
1	Água + NS	0	PZ, absorbância
2	Meio + NS	1	PZ
3	Meio + NS + PDZ		PZ
4	Meio + NS		PZ
5	Meio + NS + PDZ	3	PZ
6	Meio + NS		PZ
7	Meio + NS + PDZ		PZ, TEM
8	Meio + NS	20	
9	Meio + NS + PDZ		
10	Meio + PDZ		
11	Meio	0 – 34	Temperatura

Fonte: Elaborada pela autora.

A absorbância do NS foi medida em um espectrofotômetro Thermo Scientific™ Multiskan™ GO (Thermo Fisher Scientific Oy, Finlândia) nos comprimentos de onda do espectro visível. Foram preparadas amostras com 25% de NS em PBS e em meio RPMI suplementado com 10% de SFB. As medidas de PZ que quantificam a carga das nanopartículas foram feitas em um espectrofotômetro Malvern Nano-ZS Z590 (Malvern Instruments, Reino Unido). Após a irradiação, o NS das amostras 1 a 7 foi separado do meio de cultura através do uso de ímãs, em seguida foi resuspendido em 800 µL de água para realização das medidas. As amostras 1 e 7 foram utilizadas para as imagens de TEM. Uma gota de 10 µL das amostras foi colocada sobre *grids* de cobre (400 *mesh*) que foram mantidos em temperatura ambiente até que a parte líquida secasse e em seguida o material foi encaminhado para análise. As medidas de temperatura foram feitas com um termopar acoplado a um conversor de temperatura USB (NI USB-TC01, National Instruments, Estados Unidos). As amostras 8 a 11 foram colocadas na placa de 24 poços e foram irradiadas com uma Biotable centrada em 660 nm e irradiância de 50 mW/cm². As medidas de temperatura foram gravadas a cada segundo durante todo o tempo de iluminação e os gráficos foram feitos utilizando o software Origin Pro 9.0.

3.2 Ensaios *in ovo*

3.2.1 Ovos

A utilização de ovos para este estudo foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto de Física de São Carlos (CEUA/IFSC, protocolo 01/2017). Os ovos foram mantidos em bandejas de ovos dentro de uma estufa à 37,7° C. Tumores da ordem de milímetros crescidos em placa de 24 poços foram introduzidos na CAM após 5 dias de crescimento no 4º dia de desenvolvimento do ovo. O tempo de interação foi de 10 dias e no 14º dia de ED o resultado foi avaliado e os ovos congelados por 24 h à temperatura de -20° C para serem descartados em lixo branco e posteriormente incinerados por empresa especializada e contratada pelo IFSC.

3.2.2 Caracterização do modelo

Em paralelo aos estudos *in vitro*, a primeira investigação *in ovo* foi para avaliar a interação do tumor com a CAM. Os tumores crescidos em placa de 24 poços foram adicionados à membrana com o auxílio da caneta magnética no 4º dia do ED e deixados interagir por 10 dias. No 14º dia, para investigar a interação do tumor com os vasos, foram feitas imagens de luz branca do tCAM no ovo com uma câmera USB Digital Microscope® (AVANTGARDE, China). Além disso, uma área de aproximadamente 1 cm² do tCAM foi removida com auxílio de uma tesoura e a parte voltada para o interior foi também fotografada para identificação de interações dos vasos com o tumor. Além disso, para verificar se o tumor estava vivo, uma solução de ALA 10% (p/v) em meio de cultura RPIM-1640 foi adicionada ao tCAM e a formação da PpIX, que só ocorre em células viáveis, foi verificada através de imagens de fluorescência. Um controle *in vitro* incubado com ALA também foi feito e acompanhado por imagem. Essas imagens foram feitas utilizando o Velscope® (VELSCOPE, EUA), um equipamento evidenciador que ilumina entre 400-460 nm acoplado a uma câmera CCD Pixelfly (PIXELFLY QE – PCO, Alemanha).

Além do controle, uma investigação complementar *in vitro* foi realizada. Concentrações mais baixas de ALA foram avaliadas e a formação de PpIX foi medida por espectroscopia de fluorescência. Foram utilizadas as concentrações de 10 mM (0,1%) e 50 mM (0,5%) e a formação de PpIX foi acompanhada de 1 a 8 h e em 24 h após a incubação. As medidas do espectro de fluorescência foram realizadas por um sistema de diagnóstico portátil contendo um laser centrado em 408 nm; uma fibra bifurcada (tipo 'y') para entrega da excitação e coleta da emissão; um suporte para filtro; um espectrofotômetro (USB 2000, Ocean Optics, EUA) e um computador para a utilização do software (OOIBase, Ocean Optics, EUA).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Caracterização do crescimento dos tumores

Para definir a melhor configuração para os experimentos de TFD, o crescimento dos tumores foi analisado em placas de 6, 24 e 96 poços. As formações dos tumores, apesar de chamados de esferoides, não apresentaram morfologia completamente esférica em placa de 6 e 24 poços. O formato adquirido no crescimento nessas placas possui 2 diâmetros maiores, no plano das imagens (plano xy), e uma altura menor, na direção perpendicular a esse plano (dimensão z). Em placa de 96 poços, os tamanhos nas três dimensões foram da mesma ordem. Um diâmetro médio foi calculado como descrito na seção 3.1.2 para fazer referência ao tamanho observado dos tumores.

As figuras 4 e 5 apresentam o crescimento típico observado em placas de 6 poços. Num primeiro teste, 10^6 células foram plaqueadas por poço e o ímã de 6 poços foi utilizado. É possível verificar que apenas após 19 dias os tumores alcançaram um formato coeso atingindo um diâmetro aparente médio de $2,05 \text{ mm} \pm 0,07 \text{ mm}$. Além do tempo excessivo, houve muita perda de células (Figura 4). Para tentar corrigir esses problemas, a placa de ímã de impressão de 96 poços foi utilizada por um dia antes da colocação da placa de 6 ímãs (Figura 5-c). Dessa forma, houve a produção de aproximadamente 10 pequenos esferoides por poço (Figura 5a) com diâmetros de aproximadamente 1,5 mm (Figura 5b), que quando sujeitos ao campo magnético do ímã de 6 poços iniciaram a formação de um esferoide maior (Figura 5c). Dessa forma a perda de células foi drasticamente reduzida formando esferoides de aproximadamente $3,55 \pm 0,07 \text{ mm}$. No entanto, o tempo para definição da morfologia final foi de 17 dias (**Erro! Fonte de referência não encontrada.d**).

Figura 4 - Imagens de campo claro do crescimento de tumores em placa de 6 poços com a placa de 6 ímãs. Barra de escala 2 mm.

Fonte: Elaborada pela autora

Figura 5 - Impressão com a placa de 96 ímãs em placa de 6 poços por 1 dias. a. Imagem da parte inferior da placa de 6 poços. b. Imagem de microscopia de campo claro de um esferoide formado após 1 dia de impressão. c. Momento em que a placa de 6 ímãs (I) foi colocada sobre a placa de 6 poços agrupando os esferoides (círculo tracejado). d. Imagens de microscopia de campo claro do crescimento dos tumores ao longo do tempo, após 1 dia de impressão magnética com placa de 96 ímãs. Barra de escala 2 mm.

Fonte: Elaborada pela autora

O protocolo investigado em seguida foi o de crescimento em placa de 24 poços, na qual foram plaqueadas 10^5 células por poço. Pelas imagens de

microscopia foi observada a formação de tumores de $2,39 \text{ mm} \pm 0,04 \text{ mm}$ com uma morfologia discoide, com exceção dos poços nos quais os tumores dobraram-se sobre si mesmos (Figura 6). Foi possível observar também o escurecimento do tumor com o tempo mostrando que o crescimento ocorreu principalmente na dimensão perpendicular ao plano da imagem (dimensão z) e/ou no aumento da densidade celular. Nesse modelo os tumores se mostraram coesos e foi decidido utilizá-los a partir do 5º dia de crescimento. Além disso, verificou-se que até o 20º dia os tumores permanecem inteiros oferecendo um período de trabalho de 15 dias.

Figura 6 - Imagens de microscopia de campo claro do crescimento de tumores em placa de 24 poços por levitação magnética. Barra de escala 2 mm.

Fonte: Elaborada pela autora

O crescimento em placa de 96 poços foi realizado semeando-se tanto 10^5 quanto 10^4 células por poço. Foi observado que a morfologia dos tumores crescidos nessa placa é mais homogênea quando comparada com a formação das outras placas. Isso ocorre, pois além da área de ação dos ímãs da placa de 96 ser menor do que a dos outros ímãs, o volume dos poços de 96 também restringe o crescimento (Figura 7 e Figura 8). Nesse modelo também é possível observar o crescimento dos tumores no eixo z pelo escurecimento com o tempo. No entanto, quando foi utilizado um número maior de células, para produzir tumores maiores ($1,87 \pm 0,08 \text{ mm}$ – dia 5), no 10º dia de crescimento a maioria dos tumores estava se desfazendo (Figura 7). Isso pode ter ocorrido pela necessidade de troca diária de meio de cultura, uma vez que o conteúdo de meio de cultura comportado pelo poço é baixo (200 μL). Assim, há uma movimentação produzida pela pipetagem que resulta em um constante desequilíbrio do tumor e consequente destruição do tumor.

Essa característica não é desejada, uma vez que esse estudo visou avaliar o comportamento tumoral após a TFD. Dessa forma, ao se iniciar os procedimentos de TFD no 5º dia, haveria apenas 3 dias para acompanhamento. Utilizando-se, no entanto, uma quantidade menor de células por poço (10^4), o tempo de tumor viável é de 15 dias. Neste modelo os tumores gerados atingem tamanhos de $640 \pm 30 \mu\text{m}$ (Figura 8).

Figura 7 - Imagens de microscopia de campo claro do crescimento de tumores em placa de 96 poços por impressão magnética. Os tumores foram semeados com 10^5 células e acompanhados por 10 dias. Barra de escala 2 mm.

Fonte: Elaborada pela autora

Figura 8 - Imagens de microscopia de campo claro do crescimento de tumores em placa de 96 poços por impressão magnética. Os tumores foram semeados com 10^4 células por poço e acompanhados por 23 dias. Barra de escala 1 mm.

Fonte: Elaborada pela autora

Estudos com diferentes modelos 3D mostraram que a resposta da TFD é diferente em culturas bi e tridimensionais. Chen e colaboradores compararam a resposta da TFD na linhagem de câncer de mama T47D crescida

tridimensionalmente em plataforma microfluidica e em monocamada. (16) Com esferoides de 150 μm de diâmetro médio eles observaram que nas mesmas condições de TFD, as células em monocamada apresentam uma taxa de morte maior que em cultura 3D. Utilizando o modelo de formação de esferoides multicelulares, Imamura comparou a ação de drogas antitumorais nas linhagens T47D e MCF-7. (56) Para a primeira linhagem ele obteve esferoides coesos entre 200 e 300 μm e observou uma maior resistência às drogas testadas. Já para a MCF-7, ele observou um resultado similar para as culturas 2D e 3D pois as formações 3D dessa linhagem não estavam coesas. O modelo magnético utilizado neste trabalho mostra a formação de esferoides coesos de tamanho similares e maiores que os encontrados na literatura. Dessa forma, os efeitos da TFD poderão ser avaliados em tumores com tamanhos similares aos encontrados em estágios iniciais em mama humana. Baseado nesses resultados, o modelo em placa de 24 poços com 10^5 células e de 96 poços com 10^4 células foram escolhidos para seguir os experimentos.

Além da investigação de tamanhos dos tumores, a concentração de NS utilizada na magnetização das células também foi investigada. A concentração sugerida para a formação dos tumores pelo modelo magnético é de 8 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de área de cultivo. (27) No entanto, a recomendação é de que se busque a adaptação, pois a concentração necessária pode variar com a linhagem celular utilizada. Apesar de essa concentração ter funcionado para a MCF-7, técnicas ópticas como a microscopia confocal são um desafio pelo fato de as NS apresentarem uma coloração escura. Dessa forma, concentrações de 25 e 50% da sugerida foram testadas em placa de 24 poços com 10^5 células. A Figura 9 mostra o quinto dia do crescimento dos tumores e é possível observar que eles começaram a se desfazer, principalmente os que continham 25% de NS. Dessa forma, optou-se por manter a concentração sugerida para todos os experimentos. No entanto, os tumores com 50% de NS que ainda estavam coesos foram utilizados para teste de distribuição de PpIX com análise por microscopia confocal (visando minimizar o espalhamento causado pelo NS) e os resultados estão apresentados na próxima seção (seção 4.2).

Figura 9 - Imagens de microscopia de campo claro do crescimento de tumores com quantidades menores de nanopartículas magnéticas (NS): 25% e 50% acompanhado no quinto dia de crescimento. Os “x” em vermelho marcam os tumores que começaram a se desfazer. Barra de escala 2 mm.

Fonte: Elaborada pela autora

4.2 Citotoxicidade no escuro e distribuição da PpIX

Os primeiros parâmetros investigados com os tumores já padronizados foram a citotoxicidade e a distribuição dos FS no interior do tumor. O primeiro FS utilizado foi a PpIX, uma molécula endógena da família das porfirinas que deu origem aos FS de primeira geração. Nos ensaios de viabilidade não foi observada diferença significativa das diferentes concentrações com relação aos controles (Figura 10). Aggelidou et al. observou a citotoxicidade no escuro de 4 $\mu\text{g/mL}$ de PpIX incubada por 3h em culturas 2D de MCF-7 e relatou uma diminuição de 25% na viabilidade celular. (57) Nas concentrações de mesma ordem (1 e 10 $\mu\text{g/mL}$) incubadas por 24 h testadas na presente tese não foi observado morte provavelmente por se tratar de um tumor 3D, logo as células estão menos expostas ao FS. No entanto, os desvios entre as replicatas, representados pelas barras de erro, foram grandes. Isso ocorreu devido à dificuldade de desfazer os tumores para o teste de MTT. Esse ensaio colorimétrico é comumente utilizado em ensaios 2D e se baseia na medida de absorbância para avaliar a viabilidade. Utilizá-lo no modelo 3D exige a adição do passo de desfazer os tumores. Adaptações para o MTT, assim como para outras técnicas que apresentam limitações em modelos 3D ainda estão sendo estudadas e validadas. Assim, nesse experimento o MTT não se distribuiu homogeneamente para todas as células e consequentemente a formação de formazan variou bastante dentro de alguns grupos. Esse comportamento é decorrente da formação da matriz extracelular que promove a interação entre as células aumentando a coesão do

tumor. Apesar de gerar essa limitação no uso do MTT, a coesão é essencial para a morfologia do esferoide. Além disso, a linhagem MCF-7 tem a característica de formação de grumos mesmo em monocamada, podendo assim contribuir para a dificuldade de desfazer o tumor. De uma maneira geral, as diversas concentrações testadas de PpIX não resultaram em importantes valores de citotoxicidade, sem diferença estatística devido à grande variância entre as replicatas.

Figura 10 - Citotoxicidade no escuro da protoporfirina IX no tumor para as concentrações de 0,01 a 0,5 µg/mL (a), de 0,1 a 20 µg/mL (b) e de 20 a 200 µg/mL (c).

Fonte: Elaborada pela autora

A partir dos resultados de citotoxicidade, foram escolhidas algumas concentrações de PpIX para a investigação em microscopia confocal da distribuição desse FS nos tumores. No primeiro ensaio, tumores crescidos em placas de 96 e 24 poços com 50% de NS foram incubados com 1 µg/mL e PpIX por 20 h. Após o tempo de incubação, as amostras foram imageadas. Tanto nos tumores maiores quanto

nos menores foi observado que a fluorescência da PpIX registrada na imagem vem principalmente da superfície dos tumores (Figura 11 e Figura 12). Para a mesma concentração e tempo de incubação, a penetração da PpIX foi maior nos tumores menores do que nos tumores maiores. No entanto, pode ser observado na Figura 12, há 4 regiões em diferentes profundidades que apresentam apenas autofluorescência, mostrando que a PpIX não está presente nessas regiões. O que poderia se esperar era uma área mais no interior sem a presença do FS e a partir desta área até a periferia, a presença do FS. No entanto, o que foi observado mostra que a PpIX não teve essa distribuição, tendo se difundido de forma não simétrica para regiões mais centrais deixando “buracos” em regiões mais externas sem sua presença (Figura 12). Nos tumores maiores (Figura 11), foi observada uma distribuição mais espalhada, porém também não homogênea, com a presença de regiões não fotossensibilizadas (Figura 11c).

Nesses experimentos também foi observado que a partir de certa profundidade (277 μm para os tumores maiores e 360 μm para os menores) a autofluorescência não é mais captada. Esse resultado pode ser devido à limitação do modelo magnético de ser analisado por essa técnica óptica, uma vez que as NS deixam o tumor com alto espalhamento da radiação no espectro visível. De maneira geral, a microscopia confocal pode auxiliar na determinação da distribuição de FS em uma região superficial do tumor. Uma vez que a morfologia dos tumores em cada poço tem certa variação, é importante saber como se dá a distribuição do FS em cada caso para associar com a resposta da TFD e entender como um tumor de dimensões milimétricas responde ao tratamento. A microscopia confocal permite uma análise rápida e minimamente invasiva para tal propósito.

Figura 11 - Imagens de z-stack por microscopia confocal em tumores crescidos por 5 dias em placa de 24 poços e incubados com 1 $\mu\text{g/mL}$ de PpIX por 20 h. Em verde está representada a autofluorescência do tumor e em vermelho, a fluorescência da PpIX. Concentração de NS utilizada foi 50% da recomendada. No canto superior esquerdo está indicada a distância na dimensão z, dimensão perpendicular ao plano da imagem. Barra de escala 500 μm .

Fonte: Elaborada pela autora

Figura 12 - Imagens de z-stack por microscopia confocal em tumores crescidos por 5 dias em placa de 96 poços e incubados com 1 $\mu\text{g/mL}$ de PpIX por 20h. Em verde está representada a autofluorescência do tumor e em vermelho, a fluorescência da PpIX. Concentração de NS utilizada foi 50% da recomendada. No canto superior esquerdo está indicada a profundidade da imagem. Barra de escala 500 μm .

Fonte: Elaborada pela autora

Além da microscopia confocal, a distribuição foi investigada pelo método de crio-seccionamento seguido por microscopia de fluorescência, para minimizar o efeito altamente absorvedor das nanopartículas ferromagnéticas. Foi observado que a PpIX se localizou apenas nas camadas mais externas dos tumores maiores (Figura 13) corroborando com o encontrado pelas imagens de confocal. Apesar de esse experimento ter utilizado uma concentração maior que no teste para o confocal, é possível que o tempo de incubação do FS não tenha sido suficiente para gerar uma distribuição no interior do tumor. No entanto, a distribuição superficial pareceu ser mais homogênea do que a observada nas imagens de microscopia confocal com concentrações mais baixas e tempo de incubação mais longo. Nesse modelo, é esperado que o FS atinja regiões mais internas através de difusão no interior do tumor, uma vez que ele não possui vascularização. Então a distribuição para essas partes é limitada pela difusão que depende do volume do tumor e também do FS e seu tempo de incubação. Outro fato observado foi que, assim como na Figura 13, a superfície superior de todos os cortes apresentou apenas autofluorescência, observada em verde. Isso ocorreu, pois durante a incubação com PpIX o tumor estava sob o campo magnético do ímã, e consequentemente levitando na interface ar-meio de cultura. Dessa forma, a parte voltada para o ar não esteve em contato com a PpIX disponível no meio. Essa observação evidenciou a necessidade de realizar a incubação sem a presença da placa de ímãs.

O método de crio-seccionamento se destacou pela clareza de informação, uma vez que é possível identificar com precisão a localização do FS em cada secção, e varrer toda a extensão do tumor sem que haja a limitação proveniente das NS. Embora não tenha sido realizado crio-seccionamento de tumores crescidos em placa de 96 poços, acredita-se que o pequeno tamanho dificulte o controle da posição do tumor no momento do congelamento e do corte das secções. No entanto, o uso de microscopia confocal para esse tamanho de tumor se mostrou eficaz para a primeira metade do esferoide, destacando a distribuição do FS. Enquanto a técnica de crio-seccionamento apresenta a vantagem de varredura sem interferência das NS, a microscopia confocal é uma medida mais rápida e permite a utilização do mesmo esferoide em investigações posteriores.

Figura 13 - Imagem de microscopia de fluorescência de uma secção do tumor após 6 h de incubação com 50 $\mu\text{g/mL}$ de protoporfirina IX. Barra de escala 400 μm . Secção de 50 μm . Em verde está representada a autofluorescência do tumor e em vermelho a fluorescência da PpIX.

Fonte: Elaborada pela autora

Em geral, as duas técnicas empregadas para avaliação da distribuição do FS mostraram uma distribuição heterogênea com maior concentração da PpIX na superfície dos tumores maiores (placa de 24 poços). Mesmo em tumores pequenos (640 μm de diâmetro aparente e 400 μm de espessura), onde os processos de difusão do FS provavelmente não seriam limitantes, a distribuição da PpIX não ocorreu de maneira homogênea. Isso demonstra que mesmo em sistemas mais simples *in vitro* em comparação a um tumor crescido *in vivo*, os mecanismos de difusão, internalização e concentração apresentam influências de diversas variáveis. Essa heterogeneidade na distribuição da PpIX também foi observada com o Photogem, FS também da família das porfirinas, em estudos com modelo 3D de melanoma (58) e em fígado de ratos. (59) Se por um lado as características hidrofóbicas desses FSs facilitam sua mobilidade entre os lipídeos da membrana celular, por outro, elas dificultam a sua distribuição no meio hidrofílico que é a MEC. Isso pode explicar em parte o perfil de distribuição periférica observado, no entanto, as formações tumorais também influenciam nesse processo. Na literatura, a maioria dos protocolos de TFD utilizando a PpIX como FS, utiliza o ALA como precursor e não diretamente a PpIX.(18,35,60) Isso ocorre pois ela apresenta uma baixa solubilidade em água, dificultando a produção de fármacos. Apesar disso, optamos pela utilização da PpIX e não pelo ALA para efeito de comparação com direta com o PDZ.

4.3 Citotoxicidade no escuro e distribuição do PDZ

Assim como para a PpIX, a citotoxicidade e a distribuição do PDZ nos tumores também foram investigadas. Foi observado que a viabilidade do tumor nas três concentrações foi similar ao controle (Figura 14). Vale ressaltar que no ensaio de MTT, macroscopicamente esses tumores se desfizeram por completo, favorecendo a distribuição das células por toda a solução. As três concentrações testadas não foram citotóxicas comparadas ao controle, apresentando valores com uma tendência para maior viabilidade. Isso pode ter ocorrido pois uma das três amostras do controle apresentou um valor baixo de viabilidade, deslocando a média para um valor mais baixo. Além disso, como foi mencionado na seção anterior, o MTT é uma técnica limitada para culturas 3D pela dificuldade de desagregação dos tumores gerando uma variabilidade muito grande na leitura da absorbância do formazan. Na literatura, a citotoxicidade no escuro do PDZ para células de melanoma murino em monocamada foi relatada. (61) Os autores observaram uma diminuição de aproximadamente 15% e 35% na viabilidade celular quando as células foram incubadas com 50 µg/mL e 100 µg/mL, respectivamente, por 1 h. Novamente, as mesmas concentrações que apresentam certa citotoxicidade em 2D, podem não causar nenhuma em culturas 3D por se tratar de uma cultura mais robusta e com menor acesso ao FS. Um outro estudo relatou que as concentrações de 50, 10 e 200 µg/mL de PDZ incubadas por 1 h em culturas 2D de gliosarcoma não foram citotóxicas no escuro. (62) Como esperado, além do modelo de cultura (2D ou 3D) a linhagem celular também é um fator que influencia nos resultados.

Para investigar primeiramente por crio-seccionamento a distribuição no interior dos tumores, as concentrações de 50, 75 e 100 µg/mL foram utilizadas. Enquanto na maior concentração, o FS se apresentou distribuído de forma homogênea em toda massa tumoral, nas menores, o FS ficou localizado principalmente na superfície do tumor (Figura 15b, c e d). Nas regiões de coloração amarela da Figura 15b-c há presença de FS, pois o amarelo indica a sobreposição da autofluorescência (verde) e fluorescência do PDZ (vermelho). Já nas regiões onde a coloração é mais avermelhada, tem-se a predominância de PDZ, indicando uma concentração maior do FS. Nesse experimento os tumores se apresentaram menos coesos, o que é observado pela formação mais ramificada (evidente nas secções – Figura 15). Nesse caso, a distribuição para o interior do tumor pode ter

vido facilitada. No entanto, comparando as três concentrações, o grupo incubado com 50 µg/mL apresentou pouca penetração do PDZ na extremidade (corte menor Figura 15b). Isso mostra que as concentrações de FS influenciaram mais na distribuição do que a morfologia.

Figura 14 - Citotoxicidade no escuro do Photodithazine.
Fonte: Elaborada pela autora

Figura 15 - Imagens de fluorescência das crio-seções dos tumores incubados com PDZ por 24 h. Foram escolhidas 7 seções de uma extremidade à outra do tumor com a distância entre elas sendo aproximadamente iguais. a. Controle, b. Incubado com 50 µg/mL de PDZ, c. Incubado com 75 µg/mL de PDZ e d. 100 µg/mL de PDZ. Barra de escala 1 mm.

Fonte: Elaborada pela autora

A quantidade relativa do FS nos tumores incubados com 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$ foi quantificada através das Equações 1. A Figura 16 mostra o ρ_E e o desvio padrão para cada grupo. Como esperado, o grupo incubado com 100 $\mu\text{g/mL}$ apresentou a maior densidade relativa média de PDZ ($5,6 \pm 1,6$) distribuída em todo o volume esferoide. Somando-se todas as contribuições do grupo incubado com 50 $\mu\text{g/mL}$, a densidade relativa média da PDZ foi de $1,8 \pm 0,5$ e essa distribuição do FS não foi homogênea.

Figura 16 - Densidade relativa de PDZ nos esferoides controle e incubados com 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$.
Fonte: Elaborada pela autora.

Utilizando a concentração intermediária (75 $\mu\text{g/mL}$) foram feitas imagens por microscopia confocal. A Figura 17 mostra algumas imagens do *z-stack* de um tumor e nela podemos observar uma distribuição mais homogênea do PDZ. Nesses tumores foi utilizada uma concentração maior de NS (1,15 vezes) e consequentemente a penetração da luz para o *z-stack* foi menor, com a última imagem feita em 261 μm (Figura 17f). No entanto, nos primeiros 200 μm , a distribuição do PDZ foi mais homogênea quando comparada à PpIX (Figura 11). Isso já era esperado, uma vez que esse FS é mais hidrofílico que as porfirinas e

consequentemente tem sua permeação pela MEC facilitada. (63) Outra vantagem do PDZ sobre a PpIX é que ele é um FS derivado de clorina e6 e esta molécula apresenta um rendimento quântico de geração de oxigênio singlete maior que muitos FS, incluindo porfirinas (64). Dessa forma, o PDZ apresenta uma atividade fotodinâmica maior que as porfirinas sendo mais indicado para os estudos de TFD, especialmente em tumores sólidos (63).

Figura 17 - Imagens de z-stack por microscopia confocal em tumores crescidos por 10 dias em placa de 24 poços e incubados com 75 $\mu\text{g/mL}$ de PDZ por 24 h. Em vermelho está representada a fluorescência do PDZ e em amarelo a sobreposição da autofluorescência (verde) e da fluorescência do PDZ. Concentração de NS utilizada foi 115% da recomendada. No canto superior esquerdo está indicada a distância na dimensão z, dimensão perpendicular ao plano da imagem. Barra de escala 1 mm.

Fonte: Elaborada pela autora

O PDZ numa aplicação *in vivo* é administrado por injeção intravenosa, logo o FS é transportado pelo sangue e antes de atingir o tecido do tumor, ele tem que difundir entre a parede do vaso sanguíneo e as células tumorais. As células que estão próximas a um vaso estarão em contato com uma concentração mais alta de FS do que aquelas que estão no núcleo do tumor sólido. O FS será entregue às células centrais somente através da difusão passiva através da MEC. Como resultado, um tumor sólido apresenta uma distribuição heterogênea do FS, ou seja, um gradiente de concentração, ambiente semelhante ao que foi observado nos esferoides. Considerando que a distribuição heterogênea do FS é mais semelhante

à que ocorre *in vivo*, as concentrações de 50 e 75 µg/mL foram utilizadas para investigar os efeitos da TFD em tumores 3D.

4.4 Terapia fotodinâmica com PDZ

4.4.1 Protocolo 1

O primeiro ensaio de TFD foi realizado com o protocolo 1 (75 µg/mL e 4 J/cm²). Quarenta e oito horas após a TFD, apesar do teste de viabilidade não ter indicado morte, alguns tumores (n=3/6) se desmancharam (Figura 18). Para que o protocolo de múltiplas sessões fosse realizado, era necessário que após a primeira sessão pequenos danos ocorressem. Por esse motivo decidiu-se continuar os experimentos com 50 µg/mL, que além de ter uma distribuição heterogênea semelhante à observada em tumores *in vivo*, permitiria a realização de mais sessões de TFD sem destruição precoce do tumor.

Figura 18 - TFD com 75 µg/L de PDZ. a. Imagens de campo claro de esferoides representativos do grupo controle e 24 h pós TFD. Barra de escala: 1 mm. b. Teste de viabilidade.

Fonte: Elaborada pela autora

Importante ressaltar, que apesar de não haver diferença estatisticamente significativa, foi observado um aumento do número de células viáveis após a TFD. O MTT é uma técnica bastante empregada para a quantificação de células viáveis, principalmente para a avaliação de resposta a terapias em cultura monocamada. Seu uso não é comum em culturas 3D devido ao alto grau de agregação das células. No presente estudo, em alguns casos onde os tumores não se desfizeram apenas com ação mecânica, foi necessária uma adaptação. Para a realização do teste MTT,

inicialmente a cultura celular foi tratada quimicamente para promover a lise das interações entre as membranas celulares, resultando na obtenção das células individuais. No caso dos tumores 3D, essas interações são bem mais complexas e mecanicamente mais fortes, uma vez que a MEC foi produzida. Desta maneira, o processo de desagregação e obtenção das células isoladas é mais difícil e com resultado mais heterogêneo.

Nesse protocolo os tumores foram desfeitos apenas mecanicamente pois foi suficiente para desfazer macroscopicamente os tumores. Em função dos parâmetros empregados na TFD, objetivando uma resposta parcial de tratamento, observamos que o efeito inicial da ação fotodinâmica no modelo tumoral 3D ocorre em MEC, resultando na desagregação tumoral em ilhotas tumorais de diversos tamanhos e de células isoladas. Comparado com os tumores do grupo controle, os tumores tratados com TFD sofreram uma desagregação, com os danos induzido na MEC, o que provavelmente resultou na maior quantidade final de células isoladas para o teste do MTT e, conseqüente, maior porcentagem de células viáveis.

4.4.2 Protocolo 2

Após a aplicação do protocolo 2 ($50 \mu\text{g/mL}$ e 4 J/cm^2) foi observada uma perda de coesão e uma fragmentação parcial dos tumores após 24 h da aplicação de luz (Figura 19). Isso é observado pelo aumento da área superficial do tumor 4 e pelo orifício no centro do tumor 3 (Figura 19a). Foi observado que o grupo controle também apresentou uma perda de coesão, no entanto nesse grupo foi menos intensa que no tratado (Figura 19a, tumores 1 e 2). Isso provavelmente ocorreu, pois ao serem realizados procedimentos de lavagem, a movimentação resulta em um distúrbio mecânico dos tumores. Além disso, a partir do momento da incubação a placa de ímã é retirada e a ausência do campo magnético agindo sobre o tumor pode ter causado uma redução mínima de coesão. O teste de viabilidade neste protocolo foi adaptado para desfazer os tumores química e mecanicamente. O gráfico mostra que houve morte no grupo tratado quando comparado com o grupo controle que foi somente iluminado (sem presença de FS)(Figura 19b). O resultado indica que houve aproximadamente 23% de morte celular. Dessa forma, nessa investigação inicial, os parâmetros escolhidos para a TFD se mostraram adequados

para os objetivos do presente estudo, pois causaram pouca morte e mantiveram grande parte da formação tumoral.

Na tentativa de utilizar o crioseccionamento após a terapia para investigação dos efeitos em todo volume do tumor, alguns tumores foram colocados no gel de congelamento. No entanto, como a TFD danificou a coesão dos tumores, ao introduzir o gel sobre os tumores, eles se desfizeram inviabilizando o uso dessa técnica para uma análise volumétrica (Figura 19c). Esse comportamento demonstrou o efeito da TFD na ruptura da arquitetura tecidual do tumor.

Figura 19 – a. Imagens de microscopia de campo claro dos tumores 24 h antes e 24 h depois da TFD para o grupo controle (1 e 2) e para o grupo tratado (3 e 4). Barra de escala: 1 mm. b. Teste de viabilidade do grupo controle e tratado com protocolo 2. c. Forma para crioseccionamento com tumores imersos em Tissue-Tek.

Fonte: Elaborada pela autora

4.4.3 Protocolo 3

O protocolo 3 reproduziu a mesma concentração de FS e fluência de luz do protocolo 2 (50 µg/mL e 4 J/cm²), porém foi realizado para o acompanhamento da

evolução dos tumores após a TFD. Na Figura 20 são mostrados 3 tumores de cada grupo, 1 dia antes da terapia e 1, 2, 3, 5 e 8 dias depois. Nesse experimento a formação dos tumores não foi tão homogênea quanto nos anteriores como pode ser observado nos tumores 1 a 6 antes da iluminação (Figura 20). No grupo controle, como no experimento anterior, foi observada uma leve perda de coesão evidenciada pelo aumento da área (tumores 1 a 3) ao longo dos 8 dias de observação. Novamente, isso pode ter ocorrido devido à preparação para a terapia (incubação e lavagens) e também pela ausência da placa de ímãs. No grupo da terapia, também observamos uma perda de coesão, no entanto ela foi mais intensa para tumores desse grupo (tumores 4 e 6). No caso de tumores mais empacotados a fragmentação foi menor (tumor 4) ou ausente (tumor 5). Esse experimento demonstrou que dentro de 8 dias após a TFD a maioria dos tumores permaneceu em grande parte íntegra possibilitando a aplicação de múltiplas sessões de TFD.

Figura 20 - Imagens de microscopia de campo claro dos tumores 24 h antes e 1, 2, 3, 5 e 8 dias após a TFD para o grupo controle (1 a 3) e grupo tratado (4 a 6). Barra de escala: 1 mm.
Fonte: Elaborada pela autora

4.4.4 Protocolo 4

Podemos observar na Figura 21 que os tumores antes da terapia estão menos densos (células menos “empacotadas”). Devido a essa variação na formação dos tumores, uma nova fluência de luz (3 J/cm^2) foi testada no protocolo 4. O objetivo desse experimente foi utilizar a microespectroscopia Raman para investigar alterações bioquímicas e mecanismos da TFD no tumor 3D. Analisando os efeitos macroscópicos na morfologia dos tumores, pudemos observar fragmentação e perda de coesão (Figura 21– tumores 3 e 4). Apesar desse dano ter ocorrido, não foi detectada morte celular com o teste de MTT (Figura 21b). Nesse caso, os tumores foram desfeitos apenas mecanicamente e novamente, apesar de não haver diferença estatística, um aumento do número de células viáveis foi observado no grupo TFD, o que provavelmente ocorreu em função da melhor desagregação tumoral pela terapia. Para entender os efeitos da TFD, espectros Raman dos tumores 24 h antes e 24 h e 120 h depois foram coletados.

Figura 21- a. Imagens de microscopia de campo claro dos tumores 24 h antes e 24 h após a iluminação nos grupos controle (1 e 2) e TFD (3 e 4). Barra de escala: 1 mm. b. Teste de viabilidade dos grupos controle e TFD.

Fonte: Elaborada pela autora

Diferentes tipos de espectros Raman foram coletados do grupo controle no dia 5 de crescimento (Figura 21). As nanopartículas de ouro usadas para formar o tumor funcionam como nanopartículas SERS (Surface-Enhanced Raman Scattering) e resultaram em um aumento significativo do sinal Raman das células. Os espectros Raman foram coletados de pontos diferentes do esferoide e os perfis espectrais típicos são mostrados na Figura 22a. Quando comparados aos espectros de algumas organelas celulares e biomoléculas individuais da literatura, regiões espectrais observadas puderam ser identificadas como provenientes de núcleo, citosol e membrana celular/MEC(Figura 22a). (65,42) A região espectral que foi identificada como Área 1, mostra bandas Raman tipicamente associadas a ácidos nucleicos ($719, 1124, 1265, 1346, 1439$ e 1655 cm^{-1}) que podem ser encontrados no núcleo. (42) A região identificada como Área 2 apresenta bandas da actina e formato do espectro do citoesqueleto, estrutura localizada no citosol.(65) A terceira região espectral contém picos Raman dos aminoácidos glicina (562 e 1158 cm^{-1}) e prolina ($850, 903, 952$ e 1174 cm^{-1}), que são os aminoácidos mais abundantes do colágeno. (42,66) Essa molécula é uma proteína comum da MEC e foi identificada em esferoides de células de câncer de mama cultivadas pelo MLM. (21) Além disso, foi identificada uma banda em 1740 cm^{-1} que pode ser associada à fibronectina, outra proteína de MEC. (21,67) Bandas características de lipídios (2850 e 2878 cm^{-1}), moléculas que formam a membrana celular, também foram identificadas (44).

Os espectros coletados 24 e 96 h após a terapia são significativamente diferentes de qualquer um dos espectros do grupo controle (Figura 22b). Devido aos altos níveis de fluorescência natural das células, foi tecnicamente desafiador coletar espectros de diferentes compartimentos celulares, como no caso dos tumores do grupo controle. Medidas realizadas 24 h após a terapia mostraram o aparecimento de vários picos ($752, 1312, 1350$ e 1581 cm^{-1}) são associados ao citocromo C, uma proteína sinalizadora de apoptose (Figura 22b). (68) Isso mostra que apesar do teste de viabilidade por MTT não ter detectado morte, em 24 h havia sinalização da via de morte por apoptose. O sinal de Raman também foi utilizado por Veloso e colaboradores para detectar um mecanismo morte após a TFD, no caso a necrose. (69) Os autores investigaram uma linhagem de tumor de mama de camundongos (4T1) em cultura 2D após a terapia com cloroaluminofthalocianina, irradiando uma fluência considerada alta para monocamadas (10 J/cm^2). Eles observaram um aumento de intensidade no sinal de proteínas (456 (Phe), 608 (Phe), 846 (Tyr), 1003

(Phe), 1030 (Phe) e 1500 (Phy) cm^{-1}) e diminuição de lipídeos (593, 718, 973, 1051, 1231 e 1434 cm^{-1}) 24 h após a terapia. Embasados por resultados da literatura, eles concluem que esse comportamento acontece em morte por necrose enquanto que o oposto (diminuição de proteínas e aumento de lipídeos) ocorre em casos de apoptose. Em um primeiro momento não observamos sinais dessas moléculas, o que pode indicar um estágio bem inicial do processo de morte. Já o espectro coletado 96 h após a TFD evidenciou picos que podem estar associados à ligação dissulfeto da fibronectina (520 cm^{-1}) (70,71) colágeno (725 e 2929 cm^{-1}) (66), glicina (928, 1340 e 1442 cm^{-1}) (42), prolina (1043, 1082, 1211, 1238 e 1265 cm^{-1}) (42) e lípidos (1265, 1299, 1442, 1657, 1739 e 2850 cm^{-1}) (44) (Figura 22b). Bhattacharjee e colaboradores também observaram aumento do sinal Raman de proteínas, principalmente colágeno (874, 1248, 1260, 1452, 1668 cm^{-1}) após a TFD em tumor de mama *in vivo*. (72) Aumento do sinal Raman de lipídeos foi observado em células apoptóticas de câncer de pulmão *in vitro* (73) e corrobora com os resultados obtidos no nosso estudo. Vale ressaltar que analisamos apenas o aparecimento e desaparecimento de picos, porém a intensidade poderá gerar mais informações.

Tabela 3 – Bandas Raman encontradas nos tumores controle e depois da TFD no protocolo 3 e moléculas associadas a elas.

Bandas encontradas (cm^{-1})	Moléculas	Referência
719, 1124, 1265, 1346, 1439 e 1655	Ácidos Nucléicos	42
	Actina	65
562, 928, 1158, 1340 e 1442	Glicina	42, 66
850, 903, 952, 1043, 1082, 1174 1211, 1238, 1265 e 1442	Prolina	42, 66
520, 1740	Fibronectina	21, 67, 70, 71
1265, 1299, 1442, 1657, 1739, 2850 e 2878	Lipídeos	44
752, 1312, 1350 e 1581	Citocromo C	68
725 e 2929	Colágeno	66

Fonte: Elaborada pela autora

Figura 22 - a. Espectros Raman do grupo controle no quinto dia de crescimento dos tumores em 3 pontos diferentes onde foram identificados picos de ácidos nucleicos (Área 1), de actina (Área 2) e de lipídeos e proteínas da MEC (Área 3) b. Espectros Raman do grupo TFD, 24 h e 96 h depois da terceira sessão.

Fonte: Elaborada pela autora

4.4.5 Protocolo 5

Nesse protocolo a fluência de 3 J/cm^2 foi separada em 3 sessões de 1 J/cm^2 com iluminações a cada 48 h. Os efeitos macroscópicos foram avaliados 24 h após cada sessão e a viabilidade celular após a primeira e a terceira sessões (Figura 23). Analisando as imagens de microscopia de campo claro, podemos observar que após a primeira sessão, os tumores do grupo TFD estão semelhantes ao controle (Figura 23a). Em ambos os grupos parece ter ocorrido uma perda de densidade celular, possivelmente devido à manipulação. Após a segunda sessão já foi possível observar aparecimento de buracos e pequenos fragmentos de tumor espalhados pelo poço nos tumores do grupo TFD e após a última sessão de TFD, a completa fragmentação dos tumores. Logo, nesse protocolo, a cada sessão os danos foram se acumulando e 24 h após a última sessão, todos os esferoides foram completamente dissociados. Tanto após a primeira sessão quanto após a última sessão de TFD, a viabilidade celular avaliada pelo teste MTT (tumores desfeitos apenas mecanicamente) foi semelhante entre o grupo controle e o TFD, sugerindo que a terapia, nos parâmetros empregados, pode ter danificado principalmente a MEC e as proteínas de adesão celular, mas não induziu a morte celular, no tempo de avaliação após 24 h (Figura 23b).

É importante salientar que mesmo os tumores do grupo controle, após o período final de avaliação (11 dias de crescimento) já apresentaram uma grande diminuição da viabilidade celular. Nesse modelo tumoral, não existe a vascularização, assim a nutrição celular advém somente pela difusão. Com o crescimento da população celular e o desenvolvimento progressivo da MEC, o tumor se torna mais compacto e sólido, dificultando a difusão dos nutrientes e do oxigênio, resultando em um máximo de crescimento e posterior aumento de morte celular. Vale ressaltar, que os parâmetros empregados de TFD resultaram principalmente em desagregação tumoral, mesmo quando a fluência total de 3 J/cm^2 foi entregue em 3 sessões.

Figura 23 - a. Imagens de microscopia de campo claro 24 h antes e 24 h depois de cada sessão de irradiação para o grupo controle (1 e 2) e grupo TFD (3 e 4). Barra de escala: 1 mm. b. Teste de viabilidade dos grupos controle e TFD 24 h após a primeira e terceira sessões.

Fonte: Elaborada pela autora

4.4.6 Protocolo 6

Uma vez que no protocolo 5 foi observado fragmentação sem morte celular, o protocolo 6 reproduziu o anterior com a adição da placa de ímãs após cada sessão para manter a sustentação dos esferoides simulando a sustentação que acontece *in vivo* com o tecido adjacente ao tumor. E além disso, a viabilidade foi quantificada por citometria de fluxo, uma técnica que apresenta maior sensibilidade e especificidade

de resposta. Foram investigados os grupos controle, luz (somente irradiado), FS (somente FS) e TFD (FS e irradiação). As imagens de microscopia mostram que os grupos luz (1 e 2) e controle (5 e 6) tiveram comportamentos parecidos onde os tumores permaneceram íntegros até 96 h após a irradiação (Figura 24). Já os grupos FS e TFD apresentaram alterações como diminuição da coesão juntamente com a densidade em 24 h e fragmentação em 96 h (Figura 24 - 3, 4, 7 e 8). O dano observado no grupo FS não era esperado uma vez a concentração de 50 µg/mL não se mostrou citotóxica. No entanto, 3 incubações espaçadas de 48 h foram realizadas e apesar do consumo pela TFD e do processo de efluxo do PDZ, pode ter havido um acúmulo do FS, gerando uma concentração citotóxica, como demonstrado pela viabilidade celular do grupo controle 3 (Figura 23). Um estudo em cultura 2D de MCF-7 mostrou que a clorina e6 atingiu saturação após 4 h de incubação na concentração de 1 µg/mL. (74) Quando incubada por 3 h, a concentração de clorina nas células foi reduzida pela metade em apenas 1 h. Num modelo 3D, a complexidade da estrutura do tumor torna o processo de efluxo mais lento, o que nos leva a acreditar que é possível que tenha ocorrido um acúmulo de FS. Além da perda por citotoxicidade, a manipulação da placa não foi feita completamente no escuro, logo é possível que a iluminação ambiente e também a fonte do microscópio utilizada para fazer as imagens tenham excitado o FS, produzindo ação fotodinâmica. Após 96 h da última irradiação os tumores do grupo TFD (3 e 4) apresentaram um grau de fragmentação mais alto que do grupo FS (7 e 8), mostrando que a TFD causou um dano estrutural nos tumores desse grupo, porém não se pode atribuir o dano geral à TFD.

Os resultados de viabilidade por citometria de fluxo 24 h após a última sessão de TFD mostraram que novamente o grupo luz e controle apresentaram porcentagens semelhantes de células vivas e mortas assim como o grupo FS e TFD (Figura 25). Os gráficos da Figura 25a-e mostram a distribuição das células vivas (quadrante superior esquerdo), mortas (quadrantes superior e inferior direito) e não marcadas (quadrante inferior esquerdo) e em f estão as porcentagens que essas células representam em cada grupo. Vale ressaltar que foi observada grande quantidade de células mortas mesmo no grupo controle, mostrando duas possibilidades: i) presença de células mortas no interior do tumor por acesso dificultado aos nutrientes e ii) dano gerado pelo procedimento para desagregar os tumores (desmanche mecânico e tripsinização). Além disso, aproximadamente 10%

do total de cada grupo foram células não marcadas. Sendo assim, o grupo TFD apresentou aproximadamente 25% a mais de morte celular que o grupo controle. Apesar dessa taxa, a estrutura dos tumores apresentou alta coesão 24 h após o final da TFD comparado ao controle. Dessa forma, podemos concluir que o ímã contribuiu para a manter a coesão dos tumores por mais tempo e também que no grupo TFD do protocolo 5 provavelmente ocorreu mais morte do que no controle, diferente do que mostrou o teste de MTT (Figura 23b).

Figura 24 - Imagens de microscopia de campo claro dos grupos luz (1 e 2) e TFD (3 e 4) com 1 e 4 dias após a terceira iluminação e grupos Controle (5 e 6) e FS (7 e 8) nos mesmos tempos. Barra de escala: 1 mm.

Fonte: Elaborada pela autora

Figura 25 - Viabilidade celular medida por citometria de fluxo. Os gráficos a-e são quantificações dos canais de leitura da Resazurina (PE) e Sytox Green (FITC) e mostram a distribuição das células vivas (quadrante superior esquerdo), mortas (quadrantes superior e inferior direito) e não marcadas (quadrante inferior esquerdo) nas amostras que foram duplamente marcadas (amos marcadores). Em f estão as porcentagens de células vivas, mortas e não marcadas para os grupos controle (ctrl), luz, FS e TFD referentes aos gráficos a-e.

Fonte: Elaborada pela autora

Sabendo que a TFD gerou dano estrutural, que reflete dano na MEC e em proteínas de adesão, e também morte celular, a microespectroscopia Raman foi utilizada para identificar as alterações bioquímicas envolvidas nesses processos. Para tentar coletar mais informações, uma série de 4 espectros foi medida em cada tempo e as bandas encontradas estão listadas na tabela 4. Vinte e quatro horas após a terceira sessão de TFD, picos na região de 2850-2880 cm^{-1} , associados a lipídeos (66) e picos em 1265, 1439 e 1655 cm^{-1} , tipicamente associados à ácidos nucléicos (42), quase desaparecem, sugerindo danos à membrana e condensação da cromatina (Figura 26a). Também foi notado o aparecimento de vários picos que podem estar associados à p53, proteína intrinsecamente desordenada (833, 847, 1136, 1153, 1433, 1606 cm^{-1}) (75,76) e à fosfatidilserina (525 e 733 cm^{-1}) (77). Outra característica observada em alguns espectros foi um aumento significativo do pico em torno de 502-506 cm^{-1} , que pode estar associado à ligação dissulfeto da fibronectina (70-71), podendo indicar maior exposição da MEC, sugerindo “desempacotamento” dos tumores. Os espectros Raman coletados após 120 h mostraram um aumento de intensidade significativo nos picos associados aos aminoácidos aromáticos fenilalanina (363, 951, 1156 e 1351 cm^{-1}), tirosina (431 e 1214 cm^{-1}) e triptofano (594, 768, 1102 , 1278, 1310 e 1486 cm^{-1}) (Figura 26b), o que pode significar uma maior exposição desses aminoácidos hidrofóbicos e, portanto, sugerindo a perda da estrutura terciária das proteínas. (42)

Tabela 4 – Bandas Raman encontradas nos tumores após a TFD do protocolo 6 e moléculas associadas a elas.

Bandas encontradas (cm^{-1})	Moléculas	Referência
833, 847, 1136, 1153, 1433, 1606	p53	75, 76
525 e 733	Fosfatidilserina	77
502-506	Fibronectina	70, 71
363, 951, 1156 e 1351	Fenilalanina	42
431 e 1214	Tirosina	42
594, 768, 1102 , 1278, 1310 e 1486	Triptofano	42

Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 26 - Espectros Raman dos esteroides 24h (a) e 120 h (b) após a terceira sessão de TFD. Cada espectro representa uma medida feita em um ponto diferente do tumor.

Fonte: Elaborada pela autora

4.4.7 Discussão dos efeitos da TFD

Para induzir somente dano parcial evitando o tratamento completo dos esferoides, optou-se por baixas fluências de luz para a terapia (1 e 3 J/cm²). Portanto, o tumor remanescente foi investigado para a caracterização das alterações bioquímicas e estruturais induzidas pela TFD. Alterações bioquímicas associadas à MEC, membrana e mecanismo de morte celular foram observadas após a TFD.

Na literatura já foi reportado que fatores como linhagem celular, localização do FS e fluência de luz influenciam na determinação de se a morte celular ocorre por apoptose ou necrose. (78) Aggarwal e colaboradores investigaram TFD com baixa fluência (45 a 540 mJ/cm²) usando dois FS incubados por 1 h, o derivado de benzoporfiririna monoácido A (BPD) para atingir mitocôndrias e a N-aspartil clorina e6 (NPe6) para lisossomos. (37) O modelo tumoral utilizado foram estruturas de Engenharia da Arquitetura Mamária e Microambiente (MAME) das linhagens celulares SUM149 e MDA-MB-231. Quando duas fluências de 22,5 mJ/cm² foram entregues para ativar primeiramente a NPe6 (660 nm) e depois o BPD (690 nm), eles observaram caspase-3 ativada e mudanças na morfologia nuclear dentro de 24h após a TFD concluindo que apoptose foi o mecanismo de morte celular. No presente estudo, os espectros Raman 24 h após a TFD no protocolo 4 identificaram a presença de citocromo C (Figura 22), uma proteína sinalizadora que é liberada no citosol pelas mitocôndrias e desencadeia a via apoptótica. (78) Isso indica que a TFD com 3 J/cm² induziu morte por apoptose nas culturas 3D. Nos espectros Raman dos tumores do protocolo 6 foi observado ausência de picos de ácidos nucleicos e lipídeos. Isso pode indicar condensação de cromatina e dano na membrana, respectivamente, o primeiro é um efeito presente no processo de apoptose e o segundo, na necrose. No entanto, a ruptura da membrana também é característico de necrose secundária em células apoptóticas e esse tipo de morte já foi observado em células após a TFD. (79, 80) Uma vez que a fluência utilizada nesse trabalho foi baixa, acredita-se que a TFD não tenha induzido necrose diretamente. Sendo assim, a TFD com 3 sessões de 1 J/cm² também mostrou sinais de que apoptose ocorreu.

A morfologia dos esferoides analisada 24 h após o protocolo 4 mostrou que a TFD induziu danos estruturais que levaram à fragmentação ou “desempacotamento” do esferoide (Figura 21). Esse efeito também foi observado nos protocolos 5 e 6, 24h após a última sessão de irradiação (Figura 23a e 24). Jung e colaboradores

também observou este fenômeno após EtNBS-TFD em uma cultura 3D de câncer de ovário usando Tomografia de Coerência Óptica (OCT). (81) Dois dias após a irradiação de 10 J/cm^2 , eles observaram apoptose e um aumento na razão área-área-volume caracterizando o “desempacotamento”. Sabendo que tanto a apoptose quanto a necrose causam ruptura estrutural e fragmentação devido à perda e adesão entre as células, eles concluíram que a fragmentação foi consequência da apoptose. Em contrapartida, Galaz e colaboradores investigaram os efeitos do ZNPC-lipossoma-TFD em culturas 2D de queratinócitos, em particular, na E-caderina, uma glicoproteína transmembrana que medeia a adesão célula-célula. Eles constataram uma desorganização do complexo de adesão da E-caderina seguida do dano mitocondrial apoptótico. (82) Concluíram que a morte celular ocorreu por meio de um processo apoptótico desencadeado pela perda dos contatos celulares conhecidos como anoikis. Neste caso, a apoptose foi uma consequência da fragmentação, o que significa que a adesão célula-célula foi um alvo direto da TFD em alguns sistemas celulares. No entanto, nos modelos 3D, esse mecanismo de morte pode funcionar de forma diferente das culturas 2D. Do Amaral e colaboradores investigaram vários parâmetros referentes à formação e organização da cultura celular 3D da linhagem MCF-7. (83) Eles observaram que durante os estágios iniciais de crescimento dos esferoides, houve uma intensa atividade da AKT, que é uma molécula relacionada à sobrevivência celular. Eles concluíram que isso pode estar relacionado à resistência ao anoikis e explica porque algumas células são mais preparadas para a perda de adesão ao substrato em culturas 3D. A expressão de AKT em monocamada foi observada ser menor em comparação com estruturas 3D. (83) Portanto, os sinais de apoptose observados no presente estudo podem ter resultado de danos diretos às células.

Para verificar se esses sinais de apoptose levaram à detecção da morte celular 24 h após a TFD, foram realizados testes de viabilidade. No protocolo 4, a viabilidade celular, verificada pelo teste de MTT, do grupo TFD foi semelhante ao controle e apresentou tendência a um maior valor médio de viabilidade (Figura 21b). Acreditamos que a desestruturação induzida pela TFD pode ter aumentado o acesso das células ao formazan em comparação ao controle, contribuindo para o valor médio ligeiramente maior. Este resultado sugere que o protocolo 4 não induziu uma morte celular significativa 24 h após a TFD. No protocolo 5, também utilizando MTT, essa ausência de diferença também foi observada, no entanto, no protocolo 6, a

citometria de fluxo mostrou que a viabilidade do grupo TFD foi menor que a do controle. A citometria de fluxo é uma técnica mais sensível que o MTT e isso pode explicar a diferença da viabilidade observada nos protocolos 5 e 6. Considerando então que no protocolo 6 houve morte 24 h após a última sessão, ou seja, 120 h após a primeira sessão, é possível hipotetizar que, no protocolo 4 onde se realizou uma sessão única, morte celular poderia ter sido detectada após um tempo maior que 24 h. Esse comportamento de resposta à TFD com morte tardia já foi relatado na literatura. Zuchowska e colaboradores realizaram uma avaliação a longo prazo da eficácia da TFD em culturas 3D de carcinoma pulmonar e observaram maior taxa de morte celular 5 dias após a terapia. (84) Eles sugeriram que a apoptose pode ter sido o tipo de morte e que os sinalizadores intracelulares de morte excretados pelas células em processo de morte localizadas nas partes externas do esferoide poderiam influenciar a viabilidade das células da parte interna, explicando efeito a longo prazo. O mesmo comportamento pode ter ocorrido nos experimentos deste trabalho, uma vez que os esferoides cultivados neste estudo (diâmetro xy: ~ 2 mm, z: 600 μ m) são maiores que os do estudo mencionado (diâmetro: ~ 350 μ m). No caso do protocolo 6, a citometria de fluxo foi realizada 5 dias após a primeira sessão de TFD (24 h após a terceira) fornecendo tempo para que sinalizações de morte ocorressem e dessa forma apresentando morte no teste de viabilidade (Figura 25f). A detecção por Raman da condensação da cromatina sugerindo apoptose pode ser um efeito tardio da primeira sessão. Vinte e quatro horas após o protocolo 4 foi detectada a presença de citocromo C (indicando morte por apoptose) por microespectroscopia Raman mas não morte por MTT. Nesse caso, é possível que as medidas de Raman tenham sido realizadas em células mais externas do tumor, que já apresentavam morte celular, enquanto que o MTT contabilizou todas as células, tendo maior contribuição de células do interior (mais numerosas que da superfície), que ainda não estavam em processo de morte.

Em tempos mais longos após a TFD, nas análises de Raman fica evidente a desagregação dos tumores devido à detecção de moléculas relacionadas à MEC. Quatro dias após a TFD no protocolo 4, os esferoides apresentaram maior sinal Raman de proteínas como colágeno e fibronectina, aminoácidos como prolina e glicina e também lipídeos. O sinal dessas moléculas, que pode ser encontrado na MEC e na membrana celular, pode indicar a desagregação dessas estruturas, expondo-as para serem detectadas com maior intensidade 96 h após a sessão única

de 3 J/cm². Já nos tumores do protocolo 6, 5 dias após a terceira sessão de TFD (9 dias após a primeira sessão), foi observado o aumento do sinal de aminoácidos hidrofóbicos, geralmente localizados no interior de estruturas proteicas. Isso significa perda de estrutura terciária de proteínas que podem ser provenientes da MEC, membrana celular ou mesmo meio intracelular, e a desagregação observada 4 dias após a TFD (Figura 24, tumores 3 e 4) sugere que principalmente proteínas da MEC tenham contribuído para esse sinal.

4.5 Caracterização do NS após a TFD

O fabricante do NS garante biocompatibilidade do produto tendo mostrado em publicações que ele não afeta a proliferação, viabilidade e metabolismo celular, não interfere no estresse oxidativo e não se liga a receptores específicos. (22, 25–27) No entanto, até o presente momento não existem publicações que relatam a utilização do modelo magnético para investigações envolvendo a TFD. Os efeitos da irradiação sobre o NS e possível interferência dessas partículas na resposta da TFD são ainda desconhecidos. Dessa forma, alguns testes iniciais foram realizados para verificação dos efeitos das fluências de luz utilizadas no presente trabalho a respeito da estrutura das nanopartículas e possíveis efeitos térmicos. Primeiramente, foi observado que o NS promove espalhamento da luz em todos os comprimentos de onda do espectro visível com maior intensidade no azul decaindo em direção ao vermelho (Figura 27). Esse espalhamento é característico da magnetita e devido à sua magnitude pode ter mascarado a absorção das NpAu, que geralmente apresentam um pico na região de 500 nm. Além disso, esse efeito pode explicar também a dificuldade de se registrar imagens na microscopia confocal, uma vez que a penetração da luz incidente e coleta da luz emitida pelo tumor são dificultadas.

Figura 27 - Espectro de absorção do *Nanoshuttle* (NS) em meio e em PBS.
Fonte: Elaborada pela autora

Outra interferência que foi levantada sobre o espalhamento do NS foi a alteração dos resultados de MTT. No entanto, esse teste colorimétrico já foi anteriormente com células contendo NS e não foi reportado funcionamento insatisfatório desse método (85) A contribuição do NS para a absorbância em 570 nm no MTT ocorre para todos os grupos, e uma vez que foi feita uma normalização pelo controle, a comparação interna dos resultados é correta.

Em seguida, foram feitas medidas do NS em solução de meio suplementado com SFB, com e sem PDZ, antes e depois da iluminação. As medidas de potencial zeta e DLS, possibilitaram quantificar a carga superficial e o tamanho do NS, respectivamente, antes e após as amostras serem irradiadas com 1, 3 e 20 J/cm². Foi observado que antes da irradiação o NS diluído em água possuía um zeta negativo de (-19,1 ± 1,3) mV e após as irradiações, esse valor se tornou mais negativo em torno de -24 mV para as amostras irradiadas com 1, 3 e 20 J/cm² que foram armazenadas em 4°C previamente às medidas e menos negativo em torno -15 mV para as amostras irradiadas com 20 J/cm² que permaneceram em temperatura ambiente (Figura 28). O uso mais comum dos valores do PZ é para relacioná-lo com estabilidade de NP em solução. De uma forma simplificada, dispersões de NP com valor de ZP de ± (0 – 10) mV são consideradas altamente instáveis, de ± (10 – 20) mV são relativamente estáveis, de ± (20 – 30) mV são

moderadamente estáveis e maiores que ± 30 mV, altamente estáveis. (86) No entanto, na prática essas definições são mais complexas, pois o PZ promove informações apenas sobre forças eletrostáticas repulsivas e não abrange forças atrativas de van der Waals. Há casos em que as forças de van der Waals se tornam fracas e, então, uma repulsão eletrostática leve refletida por baixo PZ (por exemplo, 10-15 mV) pode ser suficiente para garantir estabilidade. (86) No presente trabalho a amostra controle (PZ = $-19,1 \pm 1,6$ mV) foi considerada como estável, uma vez que o fabricante garante essa estabilidade dentro do prazo de validade. Assim, como o PZ ficou entre -22 e -27 mV para as amostras irradiadas mantidas em 4°C e entre -14 e -17 mV nas mantidas em temperatura ambiente, acredita-se que houve uma certa diminuição na estabilidade do NS mas que a temperatura baixa pode ter devolvido essa estabilidade para o NS. O sinal do PZ reflete o potencial superficial da NP, sendo estas consideradas neutras quando apresentam valores de PZ entre $\pm (0 - 10)$ mV e NP com PZ maiores que 30 mV ou menores que -30 mV são classificadas como altamente catiônicas e aniônicas, respectivamente. (87) Como o NS interage eletrostaticamente com a membrana celular que apresenta um potencial negativo (-20 a -200 mV) espera-se que o PZ do NS seja positivo para favorecer essa interação. (88) No entanto, vários fatores podem interferir no PZ e dentre eles está o pH, que quando está ácido torna o PZ mais positivo e quando está básico, mais negativo. (86) Dessa forma, o sinal do PZ não deve ser relacionado à carga superficial da NP sem que haja um controle dos parâmetros. Se nesse caso o NS apresentar potencial negativo, isso não seria um problema, uma vez que a preferência da membrana celular pode ser apenas parcialmente explicada pelas interações eletrostáticas favoráveis, sendo que NP negativamente carregadas também podem interagir e serem internalizadas pela membrana. (88) Além disso, NP negativas duram mais em sistemas biológicos comparadas às positivas, que são mais facilmente degradadas, isso pode ser um fator que influencie na opção por carga negativa. É importante ressaltar que as interações de carga com a membrana é um fenômeno muito complexo e apenas alguns pontos são mencionados aqui. De uma forma geral, esses experimentos apresentaram apenas informações iniciais e é necessária a repetição com controle de parâmetros tais como pH, amostras em água e em meio de cultura e temperatura para que o PZ possa ser confirmado. No entanto, no caso dos tumores investigados com a TFD, o NS está dentro do tumor

quando o protocolo é realizado, dessa forma essas alterações do PZ não influenciariam na internalização do NS.

Figura 28 - Potencial Zeta das amostras de NS controle, irradiadas com 1 J/cm^2 com e sem PDZ, irradiadas com 3 J/cm^2 com e sem PDZ e irradiadas com 20 J/cm^2 com e sem PDZ armazenadas em temperatura de 40°C e temperatura ambiente (*).
Fonte: Elaborada pela autora

Para visualizar o efeito da TFD com 20 J/cm^2 na estrutura do NS, imagens de TEM foram realizadas com a amostra (que foi mantida em temperatura ambiente). As imagens da Figura 29 mostram a microestrutura do hidrogel antes (grupo controle) e depois da irradiação na presença de FS (grupo TFD). Apesar de não ser possível diferenciar as NpAu e as NpMIO, foram encontradas nanopartículas com diâmetro de 167 nm (Figura 29f) que diferem dos maiores tamanhos esperados para as NpMIO (até 100 nm) e para as NpAu ($50 \pm 8 \text{ nm}$).⁽²³⁾ Não foram observadas diferenças estruturais significativas entre a amostra controle e a amostra TFD, mostrando que a ação fotodinâmica parece não interferir na estrutura do NS. Dessa forma, acredita-se que durante a TFD nos tumores, também nenhuma alteração estrutural é causada ao NS, e consequentemente nenhum estresse celular seria causado por esse motivo.

Nas imagens de microscopia foi observada uma variedade de tamanhos dos agregados tanto na amostra controle quanto na TFD (Figura 29a,b,d,e). Foi possível observar que tanto o grupo controle quanto o TFD apresentaram agregados com tamanhos de 1 a alguns μm (Figura 29). Com o passar do tempo, esses agregados podem aumentar de tamanho se a solução se tornar instável. O fabricante garante 4 anos de estabilidade do NS a partir da data de fabricação e neste trabalho todos os experimentos foram feitos dentro deste período. No entanto, em alguns momentos deste trabalho durante algumas incubações, o NS de alguns frascos não se acumulou homogeneamente nas células e consequentemente os tumores não se formaram corretamente (Figura 30). Esse resultado sugere que o NS pode ter se tornado mais instável mesmo dentro da validade, causando uma agregação do hidrogel, o que pode ter diminuído sua interação com as células.

Figura 29 - Imagens de microscopia eletrônica de transmissão (TEM) do Nanoshuttle antes da TFD (a-c) e depois da TFD com 20 J/cm^2 e $50 \mu\text{g/mL}$ de PDZ (d-f).

Fonte: Elaborada pela autora

Figura 30 - Exemplos de tumores mal formados entre 5 e 9 dias.
Fonte: Elaborada pela autora

Além da investigação estrutural, foi investigada a possibilidade do NS apresentar propriedades térmicas diante da irradiação. Foram preparadas amostras de NS com e sem PDZ em meio de cultura e a temperatura dessas amostras foi medida individualmente em triplicata durante a irradiação de 34 J/cm^2 . Foi observado que ao final da entrega da luz, a temperatura do meio aumentou aproximadamente $3,3^\circ\text{C}$. A temperatura inicial das amostras variaram de 23 a 25°C , logo ao final da irradiação a temperatura do meio variou de $26,3$ a $28,3^\circ\text{C}$. As amostras de meio contendo NS e NS com PDZ aumentaram menos de $0,5$ e 1°C , respectivamente, comparadas à amostra contendo somente meio (Figura 31). Ao final dos 11 min da irradiação, a maior temperatura atingida estava entre $27,7$ e $29,3^\circ\text{C}$. Essas temperaturas não representariam riscos para células uma vez que são mantidas a 37°C . Caso a temperatura inicial fosse essa, alterações de 1°C já seriam significantes, no entanto, os experimentos de TFD também foram realizados em temperatura ambiente e além disso, essas diferenças de temperatura são nulas em curtos tempos de irradiação como os utilizados neste trabalho (20 s (1 J/cm^2) e 60 s (3 J/cm^2)).

Figura 31 - Diferença de temperatura das amostras de meio RMPI (preto), meio e PDZ (vermelho), meio e NS (verde) e meio, PDZ e NS (azul) irradiadas com 34 J/cm^2 . Inset: Aumento da região de 15 a 60 s de irradiação equivalendo a 1 e 3 J/cm^2 .

Fonte: Elaborada pela autora

Esse resultado sugere que não houve indução de hipertermia pelo NS com as fluências de luz utilizadas, portanto o efeito da TFD nos tumores não teve interferência desse fenômeno. Além disso, esse aumento de temperatura não resultaria nos efeitos observados na MEC e consequente desagregação tumoral, uma vez que para induzir efeitos térmicos em biomoléculas organizadas em arquitetura tecidual, a variação térmica deveria ser superior. (89) De uma maneira geral, a partir desses resultados apresentarem modificações no NS com a adição do PDZ e irradiação, não parece existir uma interação ou alteração efetiva da TFD. O possível efeito hipertérmico do NS foi descartado, sendo que esse resultado corrobora com a ausência de efeitos significativos nos tumores do grupo tratado somente com luz.

4.6 Interação do tumor com a CAM

Em paralelo com os testes *in vitro*, foi realizado um ensaio para verificar a interação dos tumores com a CAM. Após 10 dias de interação, a membrana na região do tCAM foi fotografada e em seguida retirada para registro da parte interna (Figura 32). As imagens mostraram que alguns tumores foram isolados pela CAM, enquanto outros pareciam ter iniciado uma interação com os vasos sanguíneos (Figura 32b). Para analisar essa possível interação mais diretamente sem remover o tCAM, foram feitas incubações com o ALA. A Figura 33 mostra o acompanhamento da produção de PpIX por 20 h no modelo tCAM (figuras maiores) e no controle *in vitro* (*inset*). Pelas imagens foi possível observar que não houve produção de PpIX pelos tumores tanto *in ovo* quanto *in vitro*.

Figura 32- Introdução do tumor gerado *in vitro* pelo MLM na CAM gerando o modelo tCAM. a. Introdução do tumor no quarto dia de desenvolvimento (ED 4) e remoção no décimo quarto dia (ED 14). b. Imagens do tCAM no décimo quarto dia no ovo (a esquerda) e removido do ovo mostrando a região interna.

Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 33 - Imagens de fluorescência do tumor após incubação com ALA 10% na CAM (imagens maiores) e *in vitro* (inset). Verde: autofluorescência, vermelho-fluorescência da PpIX.

Fonte: Elaborada pela autora

A não produção de PpIX pelo tCAM pode ser decorrente do isolamento do tumor pela membrana. Esse isolamento ocorre em alguns ovos e é uma limitação desse modelo. No entanto, não houve produção da PpIX também *in vitro* e o motivo foi o baixo pH que pode ter matado os tumores e/ou dimerizado o ALA que consequentemente não era convertido em PpIX. Para contornar esse problema, um teste *in vitro* foi realizado com menores concentrações da solução do ALA para que o pH da solução ficasse mais próximo de neutro. Os espectros de fluorescência acompanhados após a incubação com o ALA são mostrados na Figura 34. Nesse caso, houve formação da PpIX somente nos tumores incubados com ALA 0,1% (10 mM), pois o pH foi de 7,54 (Figura 34-a), que é um valor próximo do pH de meios de cultura (7,2 – 7,4). O motivo desse pH ter aumentado para 7,54 após a adição do ALA – que por ser ácido abaixaria o pH do meio – não foi determinado pois os experimentos foram interrompidos por falta de tumores 3D. A hipótese é que o meio de cultura utilizado nesse experimento apresentava um pH mais básico e tenha caído para 7,54 após a adição do ALA. Nos tumores incubados com ALA 0,5% (50 mM) cujo pH foi de 4,41, não foi observada a fluorescência da PpIX (Figura 34b), apenas a autofluorescência que foi igual à autofluorescência do controle (Figura 34c). Acredita-se que o ALA tenha formado dímeros na concentração de 0,5% devido ao baixo pH. No entanto, a possibilidade de os tumores terem morrido pelo pH ácido só será descartada quando o espectro de fluorescência de um controle negativo for comparado com os da Figura 34, além da confirmação com o teste de MTT.

Outro fator relevante é que dada as características da membrana coriolantóica a distribuição sistêmica do fármaco ocorre, a molécula de ALA facilmente transpassa a membrana e é internalizada nos vasos sanguíneos, sendo

posteriormente entregue sistemicamente pelo sangue. Desta maneira, a produção da PpIX é difusa e ocorre por toda a membrana corioalantóica e inclusive pelo embrião. Já no tumor, a concentração entregue do ALA não é tão eficiente, uma vez que a alimentação sanguínea não foi bem estabelecida, dependendo apenas das moléculas do fármaco difundidas superficialmente. Nesse sentido, seria mais recomendada a entrega do fármaco via endovenosa.

A concentração de ALA inicialmente utilizada (10%) foi baseada em um estudo de ALA-TFD de tumores de melanoma e Ehrlich introduzidos na CAM. (55) No entanto, os experimentos *in vitro* mostraram que a formação de PpIX ocorre quando a concentração de 0,1% (10 mM) é administrada. Estudos de TFD *in vitro* com ALA ou derivados em culturas 2D e 3D utilizam concentrações na faixa de 0,1 a 10 mM. (15,18,90–92) A partir desses resultados, concentrações próximas de 10 mM serão utilizadas nos próximos experimentos em CAM.

Figura 34 - Espectros de fluorescência dos tumores após a incubação com ALA 0,1% (a), 0,5% (b) e sem ALA (c). Excitação em 408 nm.

Fonte: Elaborada pela autora

5 CONCLUSÕES

Nesse trabalho mostramos que o MLM produz tumores milimétricos com certa homogeneidade morfológica e coesão e dessa forma foram adequados para a investigação da TFD. A citotoxicidade e distribuição dos FS investigados (PpIX e PDZ) mostraram que, como esperado, as doses suportadas pela cultura 3D são maiores que as para culturas 2D e que foi possível fotossensibilizar o tumor por completo com 100 µg/mL de PDZ e também criar um padrão heterogêneo como o encontrado *in vivo*.

Determinamos dois protocolos de baixa fluência para gerar tumores remanescentes utilizando a concentração de 50 µg/mL. O primeiro com uma sessão de irradiação com 3 J/cm² e o segundo com 3 sessões espaçadas de 48 h, cada uma com 1 J/cm². Com a microespectroscopia Raman tivemos indícios de que o processo de morte após esses protocolos pode ter sido apoptose. Acreditamos que, após 24 h TFD teve um efeito direto na MEC e também desencadeou a via apoptótica. Já em longo prazo, os danos gerados na matriz foram mais evidentes tanto pela espectroscopia Raman quanto pelas imagens de microscopia de campo claro.

O NS, hidrogel utilizado para magnetizar as células, não apresentou alterações que o tornassem citotóxico após a irradiação, logo concluímos que ele não interferiu nos resultados da TFD nos protocolos investigados. Por fim, os testes iniciais em CAM não foram suficientes para confirmar nem para descartar uma interação do tumor com a CAM. Dessa forma, a continuidade dessa investigação é válida para futuros testes da TFD em um modelo de tumor vascularizado.

De uma forma geral, nossos resultados demonstraram alguns possíveis efeitos da TFD com baixa fluência em tumores sólidos remanescentes. Acreditamos que esses resultados podem auxiliar futuros estudos referentes à resistência de tumores à TFD, aumento de agressividade e metástase.

REFERÊNCIAS

- 1 BRAY, F. et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 68, n. 6, p. 394–424, 2018.
- 2 INSTITUTO NACIONAL DO CANCER. **Câncer de mama**. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-de-mama>>. Acesso em: 28 maio. 2019.
- 3 ALLISON, R. et al. Photodynamic therapy for chest wall progression from breast carcinoma is an underutilized treatment modality. **Cancer**, v. 91, n. 1, p. 1–8, 2001.
- 4 CUENCA, R. E. et al. Breast cancer with chest wall progression: treatment with photodynamic therapy. **Annals of Surgical Oncology**, v. 11, n. 3, p. 322–327, 2004.
- 5 WYSS, P. et al. Photodynamic therapy of locoregional breast cancer recurrences using a chlorin-type photosensitizer. **International Journal of Cancer**, v. 93, n. 5, p. 720–724, 2001.
- 6 AMERICAN SOCIETY OF CANCER. **Types of breast cancers**. Disponível em: <<http://www.cancer.org/cancer/breastcancer/detailedguide/breast-cancer-breast-cancer-types>>. Acesso em: 10 jun. 2016.
- 7 INSUA-RODRÍGUEZ, J.; OSKARSSON, T. The extracellular matrix in breast cancer. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 97, p. 41–55, 2016. doi: 10.1016/j.addr.2015.12.017.
- 8 AMERICAN CANCER SOCIETY. **Surgery for breast cancer**. Disponível em: <<https://www.cancer.org/cancer/breast-cancer/treatment/surgery-for-breast-cancer.html>>. Acesso em: 12 dez. 2017.
- 9 CASTANO, A. P.; DEMIDOVA, T. N.; HAMBLIN, M. R. Mechanisms in photodynamic therapy: part one - photosensitizers, photochemistry and cellular localization. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 1, n. 4, p. 279–293, 2004.
- 10 BERG, K. et al. Porphyrin-related photosensitizers for cancer imaging and therapeutic applications. **Journal of Microscopy**, v. 218, n. 2, p. 133–147, 2005.
- 11 ALLISON, R. R. et al. Photosensitizers in clinical PDT. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 1, n. 1, p. 27–42, 2004.
- 12 ABRAHAMSE, H.; HAMBLIN, M. R. New photosensitizers for photodynamic therapy. **Biochemical Journal**, v. 473, n. 4, p. 347–364, 2016.
- 13 AGOSTINIS, P. et al. Photodynamic therapy of cancer: an update. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 61, n. 4, p. 250–281, 2011.

- 14 LEE, G. Y. et al. Three-dimensional culture models of normal and malignant breast epithelial cells. **Nature Methods**, v. 4, n. 4, p. 359–365, 2010.
- 15 ZUCHOWSKA, A. et al. Advanced 3D spheroid culture for evaluation of photodynamic therapy in microfluidic system. **Procedia Engineering**, v. 168, p. 403–406, 2016. doi: 10.1016/j.proeng.2016.11.184
- 16 CHEN, Y.-C. et al. High-throughput cancer cell sphere formation for characterizing the efficacy of photo dynamic therapy in 3D cell cultures. **Scientific Reports**, v. 5, n. 1, p. 12175, 2015.
- 17 DOS SANTOS, A. F. et al. Methylene blue photodynamic therapy induces selective and massive cell death in human breast cancer cells. **BMC Cancer**, v. 17, n. 1, p. 194, 2017.
- 18 YANG, Y. et al. Evaluation of photodynamic therapy efficiency using an in vitro three-dimensional microfluidic breast cancer tissue model. **Lab on a Chip - miniaturisation for chemistry and biology**, v. 15, n. 3, p. 735–744, 2015.
- 19 XU, X.; FARACH-CARSON, M. C.; JIA, X. Three-dimensional in vitro tumor models for cancer research and drug evaluation. **Biotechnology Advances**, v. 32, n. 7, p. 1256–1268, 2014.
- 20 MILLA SANABRIA, L. et al. Direct and indirect photodynamic therapy effects on the cellular and molecular components of the tumor microenvironment. **Biochimica et Biophysica Acta - reviews on cancer**, v. 1835, n. 1, p. 36–45, 2013.
- 21 JAGANATHAN, H. et al. Three-dimensional in vitro Co-culture model of breast tumor using magnetic levitation. **Scientific Reports**, v. 4, p. 6468, 2014. doi: 10.1038/srep06468
- 22 TSENG, H. et al. Assembly of a three-dimensional multitype bronchiole coculture model using magnetic levitation. **Tissue Engineering Part C: methods**, v. 19, n. 9, p. 665–675, 2013.
- 23 SOUZA, G. R. et al. Three-dimensional tissue culture based on magnetic cell levitation. **Nature Nanotechnology**, v. 5, n. 4, p. 291–296, 2010.
- 24 SOUZA, G. R. et al. Networks of gold nanoparticles and bacteriophage as biological sensors and cell-targeting agents. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 5, p. 1215–1220, 2006.
- 25 DAQUINAG, A. C.; SOUZA, G. R.; KOLONIN, M. G. Adipose tissue engineering in three-dimensional levitation tissue culture system based on magnetic nanoparticles. **Tissue Engineering Part C: methods**, v. 19, n. 5, p. 336–344, 2013.
- 26 TSENG, H. et al. A three-dimensional co-culture model of the aortic valve using magnetic levitation. **Acta Biomaterialia**, v. 10, n. 1, p. 173–182, 2014.

- 27 HAISLER, W. L. et al. Three-dimensional cell culturing by magnetic levitation. **Nature Protocols**, v. 8, n. 10, p. 1940–1949, 2013.
- 28 SOUZA, G. R. et al. Three-dimensional tissue culture based on magnetic cell levitation. **Nature Nanotechnology**, v. 5, n. 4, p. 291–296, 2010.
- 29 BUZZÁ, H. H. et al. Photodynamic therapy: progress toward a scientific and clinical network in Latin America. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 13, p. 261–266, 2016. doi: 10.1016/j.pdpdt.2015.08.004.
- 30 BANERJEE, S. M. et al. Photodynamic therapy: inception to application in breast cancer. **Breast**, v. 31, p. 105–113, 2017. doi: 10.1016/j.breast.2016.09.016.
- 31 CIVANTOS, F. J. et al. A review of photodynamic therapy for neoplasms of the head and neck. **Advances in Therapy**, v. 35, n. 3, p. 324–340, 2018.
- 32 SHISHKOVA, N.; KUZNETSOVA, O.; BEREZOV, T. Photodynamic therapy for gynecological diseases and breast cancer. **Cancer Biology & Medicine**, v. 9, n. 1, p. 9–17, 2012.
- 33 MORRISON, S. A. et al. Efficacy and safety of continuous low-irradiance photodynamic therapy in the treatment of chest wall progression of breast cancer. **Journal of Surgical Research**, v. 192, n. 2, p. 235–241, 2014.
- 34 LIU, Y. et al. A pilot randomized clinical study of the additive treatment effect of photodynamic therapy in breast cancer patients with chest wall recurrence. **Journal of Breast Cancer**, v. 17, n. 2, p. 161–166, 2014.
- 35 FEUERSTEIN, T. et al. Modulating ALA-PDT efficacy of multidrug resistant MCF-7 breast cancer cells using ALA prodrug. **Photochemical and Photobiological Sciences**, v. 10, n. 12, p. 1926–1933, 2011.
- 36 QIAO, Z. et al. Inhibition of breast cancer cell proliferation by a newly developed photosensitizer chlorophyll derivative CPD4. **International Journal of Clinical and Experimental Medicine**, v. 8, n. 5, p. 7381–7387, 2015.
- 37 AGGARWAL, N. et al. Photodynamic therapy as an effective therapeutic approach in MAME models of inflammatory breast cancer. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 154, n. 2, p. 251–262, 2015.
- 38 OLSEN, C. E. et al. Development of resistance to photodynamic therapy (PDT) in human breast cancer cells is photosensitizer-dependent: Possible mechanisms and approaches for overcoming PDT-resistance. **Biochemical Pharmacology**, v. 144, p. 63–77, 2017. doi: 10.1016/j.bcp.2017.08.002.
- 39 TALARI, A. C. S. et al. Raman spectroscopy of biological tissues. **Applied Spectroscopy Reviews**, v. 50, n. 1, p. 46–111, 2015.
- 40 BUTLER, H. J. et al. Using Raman spectroscopy to characterize biological materials. **Nature Protocols**, v. 11, n. 4, p. 664–687, 2016.

- 41 SMITH, R.; WRIGHT, K. L.; ASHTON, L. Raman spectroscopy: an evolving technique for live cell studies. **Analyst**, v. 141, n. 12, p. 3590–3600, 2016.
- 42 DE GELDER, J. et al. Reference database of Raman spectra of biological molecules. **Journal of Raman Spectroscopy**, v. 38, n. 9, p. 1133–1147, 2007.
- 43 GHITA, A. et al. Cytoplasmic RNA in undifferentiated neural stem cells: a potential label-free Raman spectral marker for assessing the undifferentiated status. **Analytical Chemistry**, v. 84, n. 7, p. 3155–3162, 2012.
- 44 PALONPON, A. F.; SODEOKA, M.; FUJITA, K. Molecular imaging of live cells by Raman microscopy. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 17, n. 4, p. 708–715, 2013.
- 45 SURMACKI, J. et al. Raman imaging at biological interfaces: applications in breast cancer diagnosis. **Molecular Cancer**, v. 12, n. 1, p. 1, 2013.
- 46 MATTHAUS, C. **Confocal Raman microscopy**. Berlin: Springer, 2011. (Springer series in optical sciences, v. 158)
- 47 ABRAMCZYK, H. et al. Oncologic photodynamic diagnosis and therapy: confocal Raman/fluorescence imaging of metal phthalocyanines in human breast cancer tissue in vitro. **Analyst**, v. 139, n. 21, p. 5547–5559, 2014.
- 48 STATION, C. A. et al. Current methods for assaying angiogenesis in vitro and in vivo. **International Journal of Experimental Pathology**, v. 85, n. 5, p. 233–248, 2004.
- 49 LANGE, N. A new drug-screening procedure for photosensitizing agents used in photodynamic therapy for CNV. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 42, n. 1, p. 38–46, 2001.
- 50 DANI, S. U.; ESPINDOLA, R. A model system for testing gene vector using murine tumor cells on the chorioallantoic membrane of the chick embryo. **Genetics and Molecular Research**, v. 1, n. 2, p. 167–175, 2002.
- 51 JONES, T. A.; JONES, S. M.; PAGGETT, K. C. Emergence of hearing in the chicken embryo. **Journal of Neurophysiology**, v. 96, n. 1, p. 128–141, 2006.
- 52 HAMMER-WILSON, M. J. et al. Photodynamic parameters in the chick chorioallantoic membrane (CAM) bioassay for topically applied photosensitizers. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: biology**, v. 53, n. 1-3, p. 44–52, 1999.
- 53 CAVARGA, I. et al. Photodynamic effect of hypericin after topical application in the ex ovo quail chorioallantoic membrane model. **Planta Medica**, v. 80, n. 1, p. 56–62, 2014.

54 YOON, J. et al. The enhanced anti-cancer effect of hexenyl ester of 5-aminolaevulinic acid photodynamic therapy in adriamycin-resistant compared to non-resistant breast cancer cells. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 44, n. 1, p. 76–86, 2012.

55 BUZZÁ, H. H. **Avaliação da terapia fotodinâmica em um modelo tumoral em membrana corioalantóica**. 2016. 102 p. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2016.

56 IMAMURA, Y. et al. Comparison of 2D- and 3D-culture models as drug-testing platforms in breast cancer. **Oncology Reports**, v. 33, n. 4, p. 1837–1843, 2015.

57 AGGELIDOU, C.; THEODOSSIOU, T. A.; YANNAKOPOULOU, K. Protoporphyrin IX- β -cyclodextrin bimodal conjugate: nanosized drug transporter and potent phototoxin. **Photochemistry and Photobiology**, v. 89, n. 5, p. 1011–1019, 2013.

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

59 VOLLET-FILHO, J. D. et al. Non-homogeneous liver distribution of photosensitizer and its consequence for photodynamic therapy outcome. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 7, n. 3, p. 189–200, 2010.

60 HEMPSTEAD, J. et al. Low-cost photodynamic therapy devices for global health settings: characterization of battery-powered LED performance and smartphone imaging in 3D tumor models. **Scientific Reports**, v. 5, p. 10093, 2015. doi: 10.1038/srep10093.

61 ONO, B. A. et al. Subcellular localization and photodynamic activity of Photodithazine (glucosamine salt of chlorin e6) in murine melanoma B16-F10: an in vitro and in vivo study. In: KESSEL, D. H.; HASSAN, T. (Ed.). **Optical methods for tumor treatment and detection: mechanisms and techniques in photodynamic therapy**. San Francisco: SPIE, 2018. v. 10476, p. 44. doi: 10.1117/12.2283241.

62 FONTANA, L. C. et al. Photodithazine photodynamic effect on viability of 9L/lacZ gliosarcoma cell line. **Lasers in Medical Science**, v. 32, n. 6, p. 1245–1252, 2017.

63 DA SILVA, R. C. **Avaliação da eficiência fotodinâmica de fotossensibilizadores com aplicação em terapia fotodinâmica**. 2007. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2007.

64 NAURECKA, M. L.; SIERAKOWSKI, B. M.; KWAŚNY, M. Spectroscopic properties of second generation photosensitizers for photo-diagnostics and photodynamic therapy. **Laser Technology 2016: Progress and Applications of Lasers**, v. 10159, n. December 2016, p. 101590B, 2016.

65 KLEIN, K. et al. Label-free live-cell imaging with confocal Raman microscopy. **Biophysical Journal**, v. 102, n. 2, p. 360–368, 2012.

66 NGUYEN, T. T. et al. Characterization of type I and IV collagens by Raman microspectroscopy: identification of spectral markers of the dermo-epidermal junction. **Advances in Biomedical Spectroscopy**, v. 7, n. 5, p. 105–110, 2013.

67 STREHLE, M. A. et al. A Raman spectroscopic study of the adsorption of fibronectin and fibrinogen on titanium dioxide nanoparticles. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 6, n. 22, p. 5232–5236, 2004.

68 CAI, J.; YANG, J.; JONES, D. P. Mitochondrial control of apoptosis: the role of cytochrome c. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1366, n. 1-2, p. 139–149, 1998.

69 VELOSO, A. B. et al. SERS Investigation of cancer cells treated with PDT: quantification of cell survival and follow-up. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–12, 2017.

70 MAO, Y.; SCHWARZBAUER, J. E. Fibronectin fibrillogenesis, a cell-mediated matrix assembly process. **Matrix Biology**, v. 24, n. 6, p. 389–399, 2005.

71 RYGULA, A. et al. Raman spectroscopy of proteins: a review. **Journal of Raman Spectroscopy**, v. 44, n. 8, p. 1061–1076, 2013.

72 BHATTACHARJEE, T. et al. In vivo Raman spectroscopy of breast tumors prephotodynamic and postphotodynamic therapy. **Journal of Raman Spectroscopy**, v. 49, n. 5, p. 786–791, 2018.

73 VERRIER, S. et al. In situ monitoring of cell death using Raman microspectroscopy. **Biopolymers**, v. 74, n. 1-2, p. 157–162, 2004.

74 MERLIN, J. L. et al. The multidrug resistance modulator SDZ-PSC 833 potentiates the photodynamic activity of chlorin e6 independently of P-glycoprotein in multidrug resistant human breast adenocarcinoma cells. **International journal of oncology**, v. 22, n. 4, p. 733–739, 2003.

75 SIGNORELLI, S.; CANNISTRARO, S.; BIZZARRI, A. R. Structural characterization of the intrinsically disordered protein p53 using Raman spectroscopy. **Applied Spectroscopy**, v. 71, n. 5, p. 823–832, 2017.

76 DOMENICI, F.; BIZZARRI, A. R.; CANNISTRARO, S. Surface-enhanced Raman scattering detection of wild-type and mutant p53 proteins at very low concentration in human serum. **Analytical Biochemistry**, v. 421, n. 1, p. 9–15, 2012.

77 ERJAVEC, N.; PINATO, G.; RAMSER, K. Raman spectroscopy as a tool for detecting mitochondrial fitness. **Journal of Raman Spectroscopy**, v. 47, n. 8, p. 933–939, 2016.

- 78 ALMEIDA, R. D. et al. Intracellular signaling mechanisms in photodynamic therapy. **Biochimica et Biophysica Acta: reviews on cancer**, v. 1704, n. 2, p. 59–86, 2004.
- 79 ZHANG, Y. et al. Plasma membrane changes during programmed cell deaths. **Cell Research**, v. 28, n. 1, p. 9–21, 2018.
- 80 PANZARINI, E. et al. Rose Bengal Acetate PhotoDynamic Therapy (RBAC-PDT) induces exposure and release of Damage-Associated Molecular Patterns (DAMPs) in human HeLa cells. **PLoS ONE**, v. 9, n. 8, p. 20–22, 2014.
- 81 JUNG, Y. et al. Longitudinal, label-free, quantitative tracking of cell death and viability in a 3D tumor model with OCT. **Scientific Reports**, v. 6, p. 27017, 2016. doi: 10.1038/srep27017.
- 82 GALAZ, S. et al. Loss of E-cadherin mediated cell-cell adhesion as an early trigger of apoptosis induced by photodynamic treatment. **Journal of Cellular Physiology**, v. 205, n. 1, p. 86–96, 2005.
- 83 DO AMARAL, J. B. et al. MCF-7 Cells as a three-dimensional model for the study of human breast cancer. **Tissue Engineering Part C: methods**, v. 17, n. 11, p. 1097–1107, 2011.
- 84 ZUCHOWSKA, A. et al. 3D lung spheroid cultures for evaluation of photodynamic therapy (PDT) procedures in microfluidic Lab-on-a-Chip system. **Analytica Chimica Acta**, v. 990, p. 110–120, 2017.
- 85 TSENG, H. et al. A three-dimensional co-culture model of the aortic valve using magnetic levitation. **Acta Biomaterialia**, v. 10, n. 1, p. 173–182, 2014.
- 86 BHATTACHARJEE, S. DLS and zeta potential - what they are and what they are not? **Journal of Controlled Release**, v. 235, p. 337–351, 2016.
- 87 GABOR, F. Characterization of nanoparticles intended for drug delivery. **Scientia Pharmaceutica**, v. 79, n. 3, p. 701–702, 2011.
- 88 FOREST, V.; POURCHEZ, J. Preferential binding of positive nanoparticles on cell membranes is due to electrostatic interactions: a too simplistic explanation that does not take into account the nanoparticle protein corona. **Materials Science and Engineering C**, v. 70, p. 889–896, 2017.
- 89 NOROUZI, H.; KHOSHGARD, K.; AKBARZADEH, F. In vitro outlook of gold nanoparticles in photo-thermal therapy: a literature review. **Lasers in Medical Science**, v. 33, n. 4, p. 917–926, 2018.
- 90 LAMBERTI, M. et al. Photodynamic therapy potentiates the paracrine endothelial stimulation by colorectal cancer. **Laser Physics**, v. 24, n. 11, p. 115602, 2014.
- 91 NAKAYAMA, T. et al. Dormant cancer cells accumulate high protoporphyrin IX levels and are sensitive to 5-aminolevulinic acid-based photodynamic therapy. **Scientific Reports**, v. 6, p. 36478, 2016. doi: 10.1038/srep36478.

92 TSAI, T. et al. Effect of 5-Aminolevulinic acid-mediated photodynamic therapy on MCF-7 and MCF-7/ADR cells. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 34, n. 1, p. 62–72, 2004.

ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa

**IFSC UNIVERSIDADE
DE SÃO PAULO**
Instituto de Física de São Carlos

Av. Trabalhador são-carlense, 400 / 13566-590
Caixa Postal 369 / 13560-970
São Carlos - SP, Brasil
Fone: +55 16 3373-9758
www.ifsc.usp.br

CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – CEUA/IFSC

Certificamos que o projeto intitulado “**Avaliação da terapia fotodinâmica em tumor 3D de mama: estudos in vitro e in ovo**”, protocolo nº 01/2017, sob a responsabilidade da pesquisadora **Carolina de Paula Campos** e sob supervisão da Profa. Dra. **Cristina Kurachi** – que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) do Instituto de Física de São Carlos (IFSC)**, em reunião de **17/04/2017**.

Finalidade	Pesquisa Científica
Vigência da Autorização	17/04/2017 a 16/04/2018
Espécie/linhagem/raça	Ovos de galinha embrionados
Nº de animais	750
Peso/Idade	14 dias
Sexo	-
Origem	Fazenda – São Carlos

São Carlos, 17 de abril de 2017.

Prof. Dr. Fernando Fernandes Paiva
Presidente
Comissão de Ética no Uso de Animais – IFSC/USP