UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO INTERUNIDADES EM
BIOENGENHARIA
ESCOLA DE ENGENHARIA DE SÃO CARLOS
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
INSTITUTO DE QUÍMICA DE SÃO CARLOS

THAYZ FERREIRA LIMA MORAIS

**Desenvolvimento de modelo de cultura celular tridimensional (3D) e de
plataforma microfluídica de cultura de células para avaliação da viabilidade
celular após terapia fotodinâmica**

**Development of three-dimensional (3D) cell culture model and of microfluidic platform model
for assessing cellular viability after photodynamic therapy**

São Carlos – SP
2018

THAYZ FERREIRA LIMA MORAIS

**Desenvolvimento de modelo de cultura celular tridimensional (3D) e de
plataforma microfluídica de cultura de células para avaliação da viabilidade
celular após terapia fotodinâmica**

VERSÃO CORRIGIDA

(Versão original encontra-se na unidade que aloja
o Programa de Pós-graduação)

Dissertação de mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação Interunidades
em Bioengenharia - Escola de Engenharia de
São Carlos / Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto / Instituto de Química de São
Carlos da Universidade de São Paulo como
parte dos requisitos para a obtenção do título
de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Bioengenharia

Orientadora: Profa. Dra. Janice R. Perussi

São Carlos – SP
2018

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

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Prof. Dr. Sérgio Rodrigues Fontes da
EESC/USP com os dados inseridos pelo(a) autor(a).

M369d	<p>MORAIS, THAYZ FERREIRA LIMA</p> <p>Desenvolvimento de modelo de cultura celular tridimensional (3D) e de plataforma microfluídica de cultura de células para avaliação da viabilidade celular após terapia fotodinâmica / THAYZ FERREIRA LIMA MORAIS; orientadora JANICE RODRIGUES PERUSSI. São Carlos, 2018.</p> <p>Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação Interunidades em Bioengenharia e Área de Concentração em Bioengenharia -- Escola de Engenharia de São Carlos; Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto; Instituto de Química de São Carlos, da Universidade de São Paulo, 2018.</p> <p>1. Cultura Celular 3D. 2. Hipericina. 3. Plataforma Microfluídica. 4. Suporte de Colágeno. 5. Terapia Fotodinâmica. . I. Título.</p>
-------	---

Eduardo Graziosi Silva - CRB - 8/8907

FOLHA DE APROVAÇÃO

THAYZ FERREIRA LIMA MORAIS

Título da dissertação:

**"DESENVOLVIMENTO DE MODELO DE CULTURA CELULAR TRIDIMENSIONAL (3D)
E DE UMA PLATAFORMA MICROFLUÍDICA DE CULTURA DE CÉLULAS PARA
AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR APÓS TERAPIA FOTODINÂMICA"**

DISSERTAÇÃO APRESENTADA AO PROGRAMA DE
PÓS - GRADUAÇÃO INTERUNIDADES EM BIOENGENHARIA
- EESC/FMRP/IQSC DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRA EM CIÊNCIAS
NA ÁREA DE BIOENGENHARIA.

Data da defesa: 26/02/2018

Profa. Dra. Janice Rodrigues Perussi (Orientadora)	Instituto de Química de São Carlos / USP
Assinatura:	Não votante

Profa. Dra. Fernanda de Freitas Anibal	Universidade Federal de São Carlos
Assinatura:	Resultado: APROVADA

Dra. Ana Carolina Urbaczek	
Assinatura:	Resultado: APROVADA

Prof. Dr. Sergio Akinobu Yoshioka	Instituto de Química de São Carlos / USP
Assinatura:	Resultado: APROVADO

Homologado em: 07 / 03 / 18

*À minha amada avó “laiá” por todo seu cuidado
comigo, amor, carinho e dedicação. Nenhuma
palavra seria suficiente para agradecer por todo
o esforço para me proporcionar o melhor.
Continue olhando por mim ai de cima minha
rainha guerreira.*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus por me sustentar e guiar todos os dias.

À Ele toda honra e glória.

À minha orientadora, Prof^a. Dr^a. Janice Rodrigues Perussi, pela valiosa e importante oportunidade que me proporcionou, por entender as minhas dificuldades durante toda essa jornada e por acreditar no meu trabalho. Obrigada pelo incentivo desde o nosso primeiro encontro. Obrigada pelo conselhos profissionais e pelo pessoais também

À CAPES - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – pelo auxílio financeiro concedido.

À FAPESP pelo apoio financeiro por meio do Centro de Pesquisa em Óptica e Fônica (CEPOF).

Aos amigos do grupo de Fotossensibilizadores pelas discussões e pelas risadas nos momentos de descontração.

À Dr^a. Vírginia pelo auxílio no desenvolvimento do suporte de colágeno.

À Marcia, secretária da bioengenharia por se dispor em ajudar sempre.

Aos meus pais, Ildenê e Valdeci, por apoiar as minhas decisões. Obrigada pelo amor incondicional, pela força durante todo esse período longe e pelo encorajamento nos momentos mais difíceis. Amo vocês.

Ao amor da minha vida por todo amor, companheirismo, paciência nos momentos de medo e também dedicação. Obrigada Fábio por sempre acreditar em mim, e por me impulsionar a ser uma pessoa melhor cada dia. Você é minha fonte de amor, meu melhor amigo e meu porto-seguro nesse plano.

*À minha irmã, meu irmão e minha amada sobrinha Alícia por serem meus tesouros,
por me animarem nos dias difíceis nas nossas conversas diárias por vídeo.
Vocês são essenciais na minha vida.*

*Aos meus tios, Juscelino, Rivanildo, Nego e Maninha, pelas alegrias demonstradas a
cada reencontro nas férias, pela torcida e carinho.*

Aos meus cunhados, Carla e Adriano pelo incentivo, torcida e apoio.

*Aos meus amados sogros, Lúdia e Humberto por todo amor e carinho. Obrigada por
me terem como filha. Sou grata a Deus por juntar as nossas famílias.*

*Aos amigos que fiz em São Carlos em especial a Claudia. Obrigada por me ensinar
tudo no laboratório, pela paciência diante de todas as minhas dificuldades, pelas
discussões ao final de cada experimento e pelo incentivo diário. Obrigada pelos
inúmeros “Thayz você consegue, Mulezinha você é capaz”. Enfim...obrigada por
tudo isso, mais acima de tudo, pela amizade. Essa levarei por toda a vida!!*

*As amigas do BIOMICS, Carol pela amizade que construímos e pelas horas de
tanto aprendizado e paciência nos experimentos e Ma pela amizade e conversas no
momentos difíceis, bem como nos momentos de descontração nos cafezinhos.*

*As minhas brunetes amadas, Jessyca, Raissa, Thamyres e Vivi por tantos
momentos de alegrias e muita descontração e também por me ajudarem nas horas
tristes.*

*As amigas Ana Paula e Luiza pela convivência e risadas diárias. Aos amigos da
RGEM e grupo da comida.*

À todos que contribuíram de forma direta ou indireta, OBRIGADA!

“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis.”

José de Alencar

RESUMO

MORAIS, T. F. L. **Desenvolvimento de modelo de cultura celular tridimensional (3D) e de plataforma microfluídica para avaliação da viabilidade celular após terapia fotodinâmica.** Programa de Pós-Graduação Interunidades em Bioengenharia - Escola de Engenharia de São Carlos / Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto / Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo, 2018.

A Terapia Fotodinâmica (TFD) é uma modalidade de tratamento de câncer que consiste na interação de três componentes: fotossensibilizador (FS), luz para ativar o FS e o oxigênio presente nos tecidos. Os estudos da fototoxicidade e do potencial de agente terapêuticos utilizados no tratamento do câncer, dentre eles os FSs, são realizados utilizando culturas celulares bidimensionais (2D) ou modelos animais. No entanto, os modelos 2D apresentam limitações, como impossibilitar sinais tão importantes que ocorrem *in vivo*, dentre eles o contato célula-célula e célula-matriz. Além disso, busca-se reduzir cada vez mais o número de animais em pesquisas científicas. Diante dessas limitações, nos últimos 30 anos tem sido desenvolvidos métodos alternativos *in vitro* que possam mimetizar melhor as complexas estruturas e funcionalidade dos sistemas *in vivo*. O objetivo desse estudo foi desenvolver um modelo de cultura de células tridimensional (3D) e um modelo de plataforma de cultura microfluídica para avaliar a viabilidade de células de carcinoma humano (HEp-2) após aplicação da terapia fotodinâmica com hipericina. O modelo 3D foi produzido utilizando-se colágeno tipo I aniônico e a plataforma de cultura microfluídica foi produzida utilizando-se lâmina de plástico, que serviu como base para o adesivo biocompatível utilizado para delimitar o canal celular e o poliéster, servindo como uma espécie de tampa para os dois materiais. A caracterização do biomaterial utilizado no modelo 3D foi realizada pela determinação da porosidade e diâmetro dos poros por meio da Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e por ensaios de citotoxicidade pelo método de difusão em ágar e pelo método do MTT (ISO 10993-5). Os ensaios de citotoxicidade comprovaram que o biomaterial utilizado é biocompatível e não causa nenhuma citotoxicidade as células. A viabilidade celular da linhagem HEp-2 foi acompanhada no modelo 2D e 3D durante 168 h (sete dias) utilizando o método do MTT e na plataforma microfluídica por 24 h através de microscopia de fluorescência com perfusão contínua de meio de cultura. Em ambos os modelos as células apresentaram-se capazes de se manter aderidas e em multiplicação. Nos ensaios fototóxicos realizados no modelo 3D por meio do método do MTT, observou-se que a viabilidade celular diminui à medida que se aumenta a concentração da hipericina, mantendo-se a dose de luz e o tempo de incubação constantes, sugerindo que as células HEp-2 em cultura 2D apresentaram-se mais sensíveis à TFD do que as células em cultura 3D. Os ensaios fototóxicos na plataforma microfluídica mostraram através da análise das imagens de microscopia de fluorescência que o tipo de morte celular preponderante foi a apoptose. Portanto, os resultados apresentados sugerem que é possível a realização de estudos de terapia fotodinâmica no modelo de cultura tridimensional bem como na plataforma microfluídica de cultura de células.

Palavras-chave: Cultura Celular 3D, Hipericina, Plataforma Microfluídica, Suporte de Colágeno, Terapia Fotodinâmica.

ABSTRACT

MORAIS, T. F. L. **Development of three-dimensional (3D) cell culture model and of microfluidic platform model for assessing cellular viability after photodynamic therapy.** Programa de Pós-Graduação Interunidades em Bioengenharia - Escola de Engenharia de São Carlos / Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto / Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo, 2018.

Photodynamic Therapy (PDT) is a cancer treatment modality consisting of the interaction of three components: photosensitizer (PS), light to activate the PS and oxygen present in the tissues. The studies about the toxicity and potential of therapeutic agents used for cancer treatment, among them the PS, are performed using 2D cell cultures or animal models. However, the 2D models have several limitations, such as making it impossible that important signals which occur *in vivo*, such as cell-cell and cell-matrix contact occur. In addition, it is important to reduce the number of animals in scientific research. Due to the limitations of the two-dimensional cell culture models and the need to reduce the use of animals in research, in the last 30 years alternative *in vitro* methods have been developed which can better mimic the complex structures and functionality of *in vivo* systems. Therefore, the objective of this study was to develop a three-dimensional (3D) cell culture model and a microfluidic culture platform model to evaluate the viability of human carcinoma cells (HEp-2) after photodynamic therapy with hypericin. The 3D support was produced using type I collagen and the microfluidic culture platform was produced using a plastic blade which served as the basis for the surgical adhesive, used to delimit the cell canal and the polyester, serving as a sort of cap for both materials. The characterization of the biomaterial used in the 3D model was performed by determination of the porosity and pore diameter by Scanning Electron Microscopy (SEM) and by cytotoxic assays using the agar diffusion method and the MTT method (ISO 10993-5). It was observed that the biomaterial used in the 3D model is biocompatible and does not cause any cytotoxicity to the cells. The cell viability of the HEp-2 cells was monitored in the 2D and 3D models for 168 h (seven days) using the MTT method and in the microfluidic platform for 24 h by fluorescence microscopy with continuous perfusion of culture medium. In both models the cells are able to remain adherent and in multiplication. In the phototoxic assays performed on the microfluidic platform, the analysis of fluorescence microscopy images showed that the preponderant cell death type was apoptosis. Results suggest that it is possible to perform photodynamic therapy studies in the three-dimensional culture model as well as in the microfluidic cell culture platform.

Keywords: 3D Culture Cell, Collagen Scaffold, Microfluidic Platform, Photodynamic Therapy, hypericin

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Classificação da citotoxicidade de materiais estabelecida pela ISO 10993-5 de acordo com a viabilidade celular (%) após contato com os extratos das amostras54

Tabela 2 – Viabilidade celular obtida pelo método do MTT para cada diluição dos extratos das amostras utilizando controle positivo – látex, controle negativo - papel de filtro e o suporte de colágeno54

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Diagrama de Jablonski com os principais mecanismos envolvidos nos processos de morte celular por Terapia Fotodinâmica	16
Figura 2 – (a) Espectro de absorção e (b) estrutura química da hipericina	18
Figura 3 – Cultura de célula bidimensional.....	20
Figura 4 – Estatística dos últimos anos com o número de publicações científicas utilizando culturas tridimensionais (3D) de células	25
Figura 5 – Modelos de culturas tridimensional de células in vitro utilizando diferentes plataformas: (A) suportes porosos empregados como matriz para crescimento das células; (B) cultura 3D formada a partir de esferoides, a célula construindo sua própria matriz e (C) o hidrogel é usado para desenvolver cultura 3D misturando o gel com as células	27
Figura 6 – Sistema Microfluídico de Cultura de Células. O microchip é conectado a uma bomba de seringa contendo meio de cultura levado até a câmara ou canal de crescimento celular com auxílio de adaptadores acoplados ao tubos de conexão. O meio é descartado em tubos de 15 mL	29
Figura 7 – Diferentes modelos de microchips recriando órgãos como pulmão, cérebro, coração, sistema vascular, baço, intestino, rim e fígado	30
Figura 8 – Biotable com emissão em 590 ± 10 nm.....	35
Figura 9 – Fluxograma simplificado do processo de produção do suporte de colágeno - (A) processo de congelamento e liofilização, (B) neutralização e (C) lavagem, liofilização e esterilização com o gás óxido de etileno	37
Figura 10 – Modelo de microchip para testes de drogas. Placa de Permanox (a); adesivo dupla face biocompatível (b); filme de poliéster (c); microchip (d) Microchip pronta para ser utilizada.....	45
Figura 11 – Fotomicrografia superficial do suporte de colágeno porcino, aumento de 200x.....	50
Figura 12 – Fotomicrografia transversal do suporte de colágeno porcino, aumento de 200x.....	50
Figura 13 – Determinação da citotoxicidade do biomaterial pelo método de difusão em ágar (a) controle positivo - látex, (b) controle negativo - papel de filtro e (c) suporte de colágeno	52
Figura 14 – Proliferação da linhagem HEP-2 em cultura bidimensional e cultura tridimensional durante 168 h de cultivo com medida da absorbância do formazan em 570 nm a cada 24 h	56

Figura 15– Viabilidade da HEp-2 após TFD, com hipericina ($0,022$ a $0,176 \mu\text{mol L}^{-1}$), irradiação em $590 \pm 10 \text{ nm}$ ($8,4 \text{ mW cm}^{-2}$) por 20 min, dose 10 J cm^2 em cultura bidimensional e cultura tridimensional.....58

Figura 16 – Gráfico de correlação linear entre os percentuais de viabilidade celular dos modelos celulares em cultura 2D e 3D60

Figura 17 – Micrografia das células HEp-2 no interior da plataforma de cultura microfluídica obtidas por microscopia de fluorescência após 24 h com perfusão de nutrientes a uma vazão de $2 \mu\text{L min}^{-1}$. Aumento 4x (a) e 10x (b).61

Figura 18 – Imagens obtidas por microscopia de fluorescência de HEp-2 na plataforma microfluídica de cultura 4 h após TFD com perfusão de HI por 2 h a uma vazão de $2 \mu\text{L min}^{-1}$. a) HEp-2 escuro; b) HEp-2 claro; c) HEp-2 HI $0,088 \mu\text{mol L}^{-1}$ escuro; d) HEp-2 HI $0,022 \mu\text{mol L}^{-1}$ claro; e) HEp-2 HI $0,044 \mu\text{mol L}^{-1}$ claro; f) HEp-2 HI $0,088 \mu\text{mol L}^{-1}$ claro. Irradiação em $590 \pm 10 \text{ nm}$ por 20 min e dose 10 J cm^{-2} ...62

Figura 19 – Porcentagem do número de células HEp-2 vivas, em processos de necrose e apoptose em plataforma microfluídica de cultura 4 h após TFD com com perfusão de HI por 2 h a uma vazão de $2 \mu\text{L min}^{-1}$. a) HEp-2 escuro; b) HEp-2 claro; c) HEp-2 HI $0,088 \mu\text{mol L}^{-1}$ escuro; d) HEp-2 HI $0,022 \mu\text{mol L}^{-1}$ claro; e) HEp-2 HI $0,044 \mu\text{mol L}^{-1}$ claro; f) HEp-2 HI $0,088 \mu\text{mol L}^{-1}$ claro. Irradiação em $590 \pm 10 \text{ nm}$ ($8,4 \text{ mW cm}^{-2}$), por 20 min e dose 10 J cm^{-2}64

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2D - Bidimensional ou Monocamada

3D - Tridimensional

3Rs - *Replacement, Reduction and Refinement* (Substituição, Redução e Refinamento)

ACECIL - Central de Esterilização Comércio e Indústria Ltda

BE - Brometo de Etídio

BIOMICS - Laboratório de Bioanalítica, Microfabricação e Separações

CAQ - Central de Análises Químicas Instrumentais

CEPOF - Centro de Pesquisas em Ótica e Fotônica

DMSO - Dimetilsulfóxido

FS - Fotossensibilizadores

Hep-2 - Linhagem Celular Tumoral de Carcinoma Humano.

HI - Hipericina

INCA - Instituto Nacional do Câncer

ISO - *International Organization for Standardization* (Organização Internacional para Padronização)

LA - Laranja de Acridina

LED *Light Emitting Diode* (Diodos Emissores de Luz)

LDL - Lipoproteína de Baixa Densidade

MEC - Matriz Extracelular

MEV - Microscopia Eletrônica de Varredura

MTT 3 - (4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenilbrometo de tetrazolina

OMS - Organização Mundial da Saúde

PBS - *Phosphate Buffered Saline* (Tamão Fosfato-Salino)

PEG - Poli(Etilenoglicol)

PEO - Poli(Óxido de Etileno)

PDMS - Poli(metil metacrilato)

PMCC - Plataforma Microfluídica de Cultura de Células

PMMA - Policarbonato-PC

RENAMA - Rede Nacional de Métodos Alternativos

TFD - Terapia Fotodinâmica

VERO - Linhagem Celular Epitelial não Tumoral de Rim de Macaco Verde Africano

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
1.1	TERAPIA FOTODINÂMICA.....	15
1.2	FOTOSENSIBILIZADORES.....	16
1.3	HIPERICINA.....	17
1.4	SISTEMA DE IRRADIAÇÃO.....	Erro! Indicador não definido.
1.5	CÂNCER	18
1.6	CULTURA BIDIMENSIONAL E MODELOS ANIMAIS PARA ESTUDOS DE AGENTES TERAPÊUTICOS	20
1.7	MÉTODOS ALTERNATIVOS	23
1.7.1	MODELO DE CULTURA TRIDIMENSIONAL DE CÉLULAS	24
1.7.2	PLATAFORMAS MICROFLUÍDICAS DE CULTURA CELULAR OU MICROCHIPS.....	28
2	OBJETIVOS	32
2.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	32
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	34
3.1	HIPERICINA E SISTEMA ÓTICO DE IRRADIAÇÃO	34
3.2	ESCOLHA DO BIOMATERIAL PARA PRODUÇÃO DOS SUPORTES	35
3.3	PRODUÇÃO DOS SUPORTES DE COLÁGENO.....	35
3.4	ESTERILIZAÇÃO DO SUPORTE DE COLÁGENO COM ÓXIDO DE ETILENO	37
3.5	ANÁLISE MORFOLÓGICA DO SUPORTE DE COLÁGENO POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA.....	38
3.6	CULTURA CELULAR.....	39
3.6.1	CÉLULAS TESTADAS	39
3.7	MEIO DE CULTURA	39
3.7.1	SUBCULTURA CELULAR.....	39
3.8	AVALIAÇÃO QUALITATIVA DA CITOTOXICIDADE DO SUPORTE DE COLÁGENO PELO MÉTODO DE DIFUSÃO EM ÁGAR.....	41
3.9	AVALIAÇÃO QUANTITATIVA DA CITOTOXICIDADE DO SUPORTE DE COLÁGENO PELO MÉTODO DO MTT	41
3.10	PROLIFERAÇÃO DAS CÉLULAS HEp-2 NO SUPORTE DE COLÁGENO	42
3.11	VIABILIDADE CELULAR NO MODELO 2D E 3D APÓS TFD	43
3.12	DESENVOLVIMENTO DA PLATAFORMA MICROFLUÍDICA DE CULTURA CELULAR	44

3.13	CRESCIMENTO DE CÉLULAS NA PLATAFORMA MICROFLUÍDICA DE CULTURA CELULAR	46
3.14	TERAPIA FOTODINÂMICA NA PLATAFORMA MICROFLUÍDICA DE CULTURA CELULAR	46
3.15	TIPO DE MORTE CELULAR NA PLATAFORMA MICROFLUÍDICA DE CULTURA CELULAR APÓS TFD.....	47
4	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	49
4.1	ANÁLISE DA MORFOLOGIA DO SUPORTE DE COLÁGENO POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA.....	49
4.2	AVALIAÇÃO QUALITATIVA DA CITOTOXICIDADE DO SUPORTE DE COLÁGENO PELO MÉTODO DE DIFUSÃO EM ÁGAR.....	51
4.3	AVALIAÇÃO QUANTITATIVA DA CITOTOXICIDADE DO SUPORTE DE COLÁGENO PELO MÉTODO DO MTT DE ACORDO COM A ISO 10993-5	53
4.4	PROLIFERAÇÃO CELULAR NO MODELO TRIDIMENSIONAL (3D) PELO MÉTODO DO MTT	55
4.5	VIABILIDADE CELULAR DA CULTURA 2D E 3D APÓS TFD	57
4.6	CRESCIMENTO CELULAR NA PLATAFORMA MICROFLUÍDICA DE CULTURA.....	60
4.7	TIPO DE MORTE CELULAR NA PLATAFORMA APÓS TFD	61
5	CONCLUSÕES	67
6	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	69
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	70

1 INTRODUÇÃO

1.1 TERAPIA FOTODINÂMICA

A Terapia Fotodinâmica (TFD) é uma promissora modalidade terapêutica para o tratamento de câncer que é minimamente invasiva quando comparada aos tratamentos convencionais e pode ser realizada quantas vezes forem necessárias, sendo essas algumas de suas principais vantagens. Essa terapia pode ser administrada de forma tópica ou sistêmica (AGOSTINIS et al., 2011; WANG; CHENG; LIU, 2013) e consiste na interação de três componentes: fotossensibilizador (FS), luz com comprimento de onda específico para ativar o FS e o oxigênio presente nos tecidos (DOUGHERTY et al., 1998; MORITZ et al., 2017).

O mecanismo de fotossensibilização ocorre da seguinte maneira: o fotossensibilizador quando irradiado com luz, absorve energia e passa para o estado energético excitado. Dessa forma, pode reagir com moléculas próximas por transferência de elétrons ou hidrogênio, gerando radicais livres (reação do tipo I) ou por transferência de energia ao oxigênio (reação do tipo II), levando à produção de oxigênio singlete (Figura 1). Ambos os caminhos podem levar as células à morte por processos de necrose ou apoptose (BANERJEE et al., 2017; CASTANO; DEMIDOVA; HAMBLIN, 2014).

Vale ressaltar que além de utilizada no tratamento do câncer, a TFD é também aplicada no tratamento de outras disfunções, tais como: degeneração macular da retina, psoríase, micoses, infecções bacterianas, etc (ONISZCZUK et al., 2016).

Figura 1 – Diagrama de Jablonski com os principais mecanismos envolvidos nos processos de morte celular por Terapia Fotodinâmica

Fonte: Adaptado de DAI et al., 2012

1.2 FOTOSSENSIBILIZADORES

Os fotossensibilizadores (FSs) são compostos que, quando expostos a luz em comprimento de onda específico, absorvem energia e dessa forma reagem com o oxigênio presente nos tecidos e geram espécies reativas de oxigênio.

Para ser empregado na TFD, um fotossensibilizador precisa apresentar propriedades desejáveis, tais como: alto rendimento de geração de oxigênio singlete e espécies reativas de oxigênio, direcionamento seletivo e eficiente para o tecido tumoral, eliminação rápida do organismo, ausência de efeitos adversos, mínima toxicidade no escuro e citotoxicidade apenas na presença de luz além de possuir elevado grau de pureza química, baixo custo e acumular preferencialmente em células tumorais (ABRAHAMSE; HAMBLIN, 2016). Isso é possível uma vez que as células tumorais apresentam mais receptores de lipoproteína de baixa densidade (LDL) e pH diferente das células não tumorais, podendo assim, reter o FS por um período mais prolongado (JONIOVA et al., 2014).

Um fotossensibilizador muito utilizado e que vem apresentando bastante destaque na TFD é a hipericina, no qual muitos trabalhos descrevem o grande potencial desse agente fotossensibilizante na TFD (KLEEMANN et al., 2014; MIRMALEK et al., 2016; XU et al., 2015).

1.3 HIPERICINA

A hipericina (HI) é um fotossensibilizador natural presente na planta do gênero *Hypericum perforatum*, popularmente conhecida como Erva de São João, muito utilizada em casos de depressão leve (ZHANG et al., 2015). Esse composto pode ser obtido por meio de síntese utilizando como precursor um derivado de 1,3,8-trihidroxi-6-metil-10H-antraceno-9-ona (LIN-FANG; ZENG-HUI; SHI-LIN, 2014) e apresenta diversas aplicações médicas como antiviral, anti-retroviral, antitumoral, antipsoriático, entre outras (AGOSTINIS et al., 2002; GUEDES; ERIKSSON, 2005).

Algumas características da HI como fotossensibilizador fazem com que essa molécula apresente-se de forma promissora para ser utilizada na TFD, dentre elas: apresentar toxicidade insignificante no escuro, alto rendimento quântico do estado triplete e formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) quando exposta a luz, (AGOSTINIS et al., 2002; BERNAL et al., 2015; LIMA et al., 2013; ZHANG et al., 2015). A HI é considerada o fotossensibilizador mais potente encontrado na natureza (PERUSSI, 2007). Muito disso se deve ao fato desse composto produzir grandes quantidades de ROS após fotoativação (SCHMITT et al., 2006).

Essa molécula que apresenta solubilidade em diversos solventes e possui o pico máximo de absorção em 590 nm em dimetilsulfóxido (DMSO), como apresentado Figura 2a. A Figura 2b também ilustra a estrutura química da hipericina.

Figura 2 – (a) Espectro de absorção no UV e (b) estrutura química da hipericina

1.4 CÂNCER

Câncer é o nome dado ao conjunto de mais de 100 doenças que apresentam em comum o crescimento e a proliferação celular descontrolados, com perda da diferenciação e consequentemente da função do tecido (INCA, 2016; OMS, 2016).

As células cancerosas são definidas por duas propriedades: (1) reproduzem-se desobedecendo aos limites normais da divisão celular e (2) invadem e colonizam regiões normalmente destinadas a outras células. A invasividade é uma característica das células cancerosas que apresentam a capacidade de se desprender do tecido, penetrar na corrente sanguínea ou nos vasos linfáticos e formar tumores secundários em outras partes do corpo, sendo estes eventos denominados metástases (ALBERTS et al., 2014).

O câncer é um dos maiores problemas de saúde pública mundial, estima-se que, 20 milhões de novos casos sejam registrados no mundo até 2025. Somente no Brasil, espera-se a ocorrência de cerca de 600 mil casos novos (INCA, 2016). Em

vista disso, essa doença causa muito temor à sociedade, sendo sinônimo de dor e mortalidade.

O tratamento para essa disfunção celular geralmente é realizado através de quimioterapia, radioterapia e/ou intervenções cirúrgicas, podendo, em alguns casos, ser necessária a utilização de mais de uma dessas modalidades. Porém, diante dos inúmeros efeitos colaterais que causam, novas alternativas são continuamente estudadas e propostas para minimizar os efeitos dos tratamentos convencionais (WANG; CHENG; LIU, 2013; ZHANG et al., 2015), dentre elas, encontra-se a Terapia Fotodinâmica (SHARMA et al., 2013).

Dessa forma, os estudos *in vitro* com o propósito de se obter a compreensão molecular da progressão ou a identificação de terapias eficazes contra o câncer são realizados utilizando-se culturas celulares ou animais. Tais culturas são derivadas de explantes primários ou de suspensão de células e permitem o acesso a informações importantes no que diz respeito ao crescimento, diferenciação e morte celular, além de possibilitarem efetuar manipulações genéticas, possibilitando grandes avanços (EAGLE, 1955; XU; FARACH-CARSON; JIA, 2014).

Os ensaios para verificar a toxicidade e o potencial de agentes terapêuticos utilizados no tratamento do câncer, dentre eles os FSs utilizados na terapia fotodinâmica são realizados em culturas celulares bidimensionais (2D) ou em monocamadas, bem como, em modelos animais (BRESLIN; DRISCOLL, 2013; HO et al., 2010; NYGA; CHEEMA; LOIZIDOU, 2011; ZHANG et al., 2005).

1.5 CULTURA BIDIMENSIONAL E MODELOS ANIMAIS PARA ESTUDOS DE AGENTES TERAPÊUTICOS

Os ensaios baseados em culturas celulares são uma importante ferramenta na busca de potenciais agentes terapêuticos por fornecerem soluções simples, rápidas e econômicas (EDMONDSON et al., 2014). Para isso, são utilizadas inicialmente as culturas de células bidimensionais.

Os modelos de culturas de células 2D são muito aplicados para avaliar a toxicidade de novos compostos. Isso é possível por que esses modelos apresentam uma maior facilidade para serem formados e permitem uma boa viabilidade celular, já que as células são cultivadas aderidas a uma superfície de plástico ou vidro, multiplicando-se em uma única camada, sem a presença de matriz extracelular (ou de suporte celular), como apresentado na Figura 3 (LEE et al., 2009).

Figura 3 – Cultura de célula bidimensional

Fonte: Adaptado de FITZPATRICK; MCDEVITT, 2015

As culturas bidimensionais fornecem muitas informações importantes, no entanto, não apresentam condições ideais para expressar as funções e respostas observadas *in vivo*, uma vez que impossibilitam sinais tão importantes que ocorrem *in vivo*, como o contato célula-célula e célula-matriz, os quais são essenciais para a diferenciação celular, proliferação e uma variedade de funções celulares (EDMONDSON et al., 2014; KIM, 2005; LEE et al., 2009). Desse modo, a simplicidade dos modelos 2D podem limitar a sua capacidade preditiva em testes biológicos (TUNG et al., 2011)

Em vista dessas limitações, têm-se a necessidade de utilizar modelos animais. O uso de animais para experimentação científica produziu muitos avanços no conhecimento científico, especialmente na área da saúde, como exemplo: a prevenção e tratamento de doenças em humanos e animais, o desenvolvimento e/ou aprimoramento de técnicas cirúrgicas, estudos relevantes nas áreas da fisiologia, bioquímica e comportamento animal entre outros. Desse modo, o emprego de animais em laboratórios, propicia o entendimento de vários processos fisiológicos e patológicos (PACHECO; SAAD; TREVISAN, 2015; RIVERA et al., 2002).

Porém, muitas vezes modelos animais apresentam custos elevados, uma vez que são necessários locais adequados para manutenção e manipulação, além disso, muitos ensaios requerem um número grande de animais, sendo que muitas vezes esse modelo de estudo não produz respostas fidedignas e nem segurança para a fase de experimentação clínica (CHAGAS; D'AGOSTINI, 2012). Além disso, verifica-se cada vez mais o aumento no apelo das sociedades protetoras dos animais e da sociedade como um todo, em diminuir o uso de animais em pesquisas científicas e em variados testes (medicamentos, vacinas, cosméticos, entre outros) (GUIMARÃES et al., 2016).

Foram criadas em todo o mundo diversas leis em defesa de animais utilizados em laboratórios. A primeira tentativa foi proposta na Inglaterra por Marshall Hall, no século XIX, na qual Marshall sugeriu a substituição dos grandes animais por espécies inferiores na escala zoológica, além de mencionar a necessidade de se evitar repetições desnecessárias para a obtenção de resultados (ANDRADE; PINTO, SC.; OLIVEIRA, 2002). Ainda no século XIX foi fundada a primeira sociedade protetora dos animais, a Sociedade Britânica para a Prevenção da Crueldade aos Animais, seguida da publicação de Russel e Burch, na qual estabeleceram o princípio dos 3Rs – *Replacement, Reduction and Refinement* (Substituição, Redução e Refinamento), descritos em seu livro *The Principles of Humane Experimental Techique*. A substituição sugere que outras técnicas sejam utilizadas no lugar dos animais; a redução é caracterizada pela diminuição do número de animais nos experimentos e no refinamento procura-se minimizar a dor, sofrimento e estresse causado durante a experimentação (CERQUEIRA, 2011; RIVERA et al., 2002).

No Brasil, foi aprovada em março de 2017 o projeto de lei (nº 70, de 2014) que proíbe a utilização de animais em testes para produção de cosméticos, perfumes e produtos de higiene pessoal, além de vetar o comércio de produtos que tenham sido testados em animais. Porém, mesmo com as orientações para a redução da utilização de animais em laboratórios, não é possível a substituição definitiva destes, visto a necessidade de estudos de respostas imunológicas em ensaios de toxicidade (CAMI; PONS, 2014).

Diante das limitações dos modelos de culturas de células bidimensionais e da necessidade da redução de animais em pesquisas científicas, nos últimos 30 anos tem-se buscado desenvolver métodos alternativos *in vitro* que possam mimetizar

melhor as complexas estruturas e funcionalidade dos sistemas *in vivo* (CHEN et al., 2015; FOLCH, 2000; SIMÃO et al., 2013).

1.6 MÉTODOS ALTERNATIVOS

Segundo a RENAMA (Rede Nacional de Métodos Alternativos), um método alternativo pode ser definido como qualquer método que possa ser usado para substituir, reduzir ou refinar o uso de experimentos com animais na pesquisa biomédica, ensaios ou educação. O uso de métodos alternativos apresenta diversas vantagens, como diminuição do número de animais utilizados, eficiência na obtenção de resultados com maior rapidez, redução dos custos, além da flexibilidade para controlar as variáveis do experimento (ARORA et al., 2011; PIERSMA, 2006).

Somando-se estratégias das mais diversas áreas do conhecimento tais como ciência de engenharia e materiais, biologia celular e molecular, bem como bioquímica e ciências médicas (RAMIER et al., 2014), tem-se buscado o desenvolvimento de substitutos biológicos que mantenham ou melhorem a função do tecido, minimizando a utilização de animais na experimentação científica (LANGER; VACANTI, 1993).

Diferentes metodologias são empregadas objetivando desenvolver abordagens alternativas à utilização de animais para fins científicos, dentre elas destacam-se as técnicas físico-químicas, análises computacionais ou matemáticas que são conhecidas como testes *in silico* e os testes *in vitro*, dentre estes estão os modelos de cultura tridimensional (3D) de células e as plataformas microfluídicas de cultura de células (DOKE; DHAWALE, 2013; PIERSMA, 2006; ECVAM, 2016).

1.6.1 MODELO DE CULTURA TRIDIMENSIONAL DE CÉLULAS

Os modelos de cultura tridimensional (3D) de células surgem como um dos métodos alternativos *in vitro* mais estudados e têm obtido destaque em estudos pré-clínicos de agentes terapêuticos para o câncer. Isso ocorre, devido à possibilidade de se mimetizar as interações célula-célula e célula matriz extracelular, recriando a organização e função do tecido (ADISSU; ASEM; LELIÈVRE, 2007; FITZGERALD et al., 2015). Segundo dados disponibilizados pelo PubMed, os números de publicações empregando cultura tridimensional de células cresceram significativamente nos últimos anos, como apresentado na Figura 4.

Esses modelos tridimensionais são formados cultivando-se células em ambientes que reproduzam a matriz-extracelular encontradas no tecido nativo, buscando-se reproduzir o ambiente *in vivo* encontrado pelas células, tanto em situações normais, como patológicas, sendo possível obter respostas bioquímicas e fisiológicas mais confiáveis. Além disso, quando cultivadas em modelos tridimensionais, as células respondem a estímulos internos e externos, como mudanças na temperatura, absorção de nutrientes, pH e temperatura, de forma parecida àquelas encontradas *in vivo* (WANG et al., 2014).

Figura 4 – Estatística dos últimos anos sobre o número de publicações científicas utilizando culturas tridimensionais de células

Fonte: www.thewellbio.com/3d-cell-culture

Nesse sentido, a engenharia de tecidos tem buscado desenvolver diferentes abordagens *in vitro*, que possibilitam mimetizar o ambiente 3D encontrado *in vivo*. Dentre elas, as mais estudadas são (AMELIAN et al., 2017; DIEKJÜRGEN; GRAINGER, 2017; FITZGERALD et al., 2015; MOHAMMAD-HADI et al., 2018; PARAMESH et al., 2015; ZHU; MARCHANT, 2012):

- **Esferoides:** são agregados celulares que não possuem um substrato artificial que auxilie nas interações das células, ou seja, eles produzem e organizam sua própria matriz. Esse modelo de cultura 3D é formado em cultura de sobreposição e geralmente mantido em cultura suspensa, estática ou agitada. Os esferoides são muito utilizados para estudos relacionados ao crescimento tumoral, tendo em vista que algumas células tumorais derivadas de tumores apresentam a capacidade de formar esferoides.

- **Suportes de Hidrogéis:** caracterizam-se por apresentar arquitetura em forma de gel, formando uma espécie de rede polimérica hidrofílica embebida por água. Os hidrogéis são produzidos à base de polímeros naturais e sintéticos. Esses géis são aplicados no desenvolvimento de modelos tridimensionais de culturas de células por apresentarem diversas vantagens, como boa biocompatibilidade e permitirem a permeação do oxigênio, nutrientes e metabolitos solúveis em água. Apesar disso, apresentam limitações como propriedades mecânicas fracas e potenciais reações imunogênicas.
- **Suportes porosos (*scaffolds*):** Os modelos de cultura 3D utilizando suportes ou *scaffolds* são desenvolvidos com arquitetura 3D e mimetizam a matriz nativa a partir da presença de poros por toda sua extensão, por permitirem a permeabilidade de células e nutrientes e apresentarem estabilidade mecânica. Os suportes porosos servem como uma espécie de matriz “de suporte” no qual as células, seja apenas uma linhagem ou co-culturas mais complexas, poderão proliferar, diferenciar e depositar matriz-extracelular (MEC). Tais suportes são produzidos a partir de uma variedade de diferentes materiais, envolvendo polímeros naturais, incluindo a agarose, fibronectina, gelatina, colágeno (o mais utilizado), entre outros. Alguns polímeros sintéticos também são utilizados para o desenvolvimento desses suportes, como poli-etilenoglicol (PEG) e poli-óxido de etileno (PEO) que possibilitam mimetizar as propriedades da matriz extracelular do tecido *in vivo*. O material utilizado para formação desse suporte não deve apresentar toxicidade, deve permitir a difusão de nutrientes e promoção do

crescimento celular normal, além de viabilizar a realização de ensaios de viabilidade celular, citotoxicidade e fenotipagem.

Diante das diversas vantagens apresentadas pelos suportes porosos para o desenvolvimento de modelos de cultura 3D, essa técnica foi escolhida para ser utilizada nesse estudo.

A Figura 5 ilustra os diferentes métodos descritos anteriormente, utilizados para o cultivo de células em plataformas tridimensionais.

Figura 5 – Modelos de culturas tridimensional de células *in vitro* utilizando diferentes plataformas: (A) suportes porosos empregados como matriz para crescimento das células; (B) cultura 3D formada a partir de esferóides, a célula construindo sua própria matriz e (C) o hidrogel é usado para desenvolver cultura 3D misturando o gel com as células

Adaptado de FITZGERALD et al., 2015 e www.thewellbio.com

São descritas na literatura diversas vantagens dos modelos tridimensionais de cultura de células quando comparadas aos modelos 2D, dentre eles o formato

tridimensional, que pode levar a melhores interações célula-célula e célula-matriz, proporcionando interações biofísicas e bioquímicas de forma mais expressiva entre as células (DUVAL et al., 2017; EKERT et al., 2014).

1.6.2 PLATAFORMAS MICROFLUÍDICAS DE CULTURA CELULAR OU MICROCHIPS

Os sistemas microfluídicos de cultura celular ou microchips, também denominados de órgãos em chip (do inglês *organs on chip*), começaram a ser desenvolvidos nos últimos 20 anos devido à necessidade de novas alternativas biologicamente relevantes para mimetizar tecidos e órgãos humanos (PAVESI et al., 2016; TORISAWA et al., 2007; WU et al., 2017).

As plataformas microfluídicas de cultura de células (PMCC) são dispositivos construídos baseados na microfabricação para o cultivo de células em câmaras ou canais de tamanho micrométrico que permitem a difusão de substratos e nutrientes para as células, fornecidos por sistemas de perfusão contínua e possibilitam a observação e análise em tempo real das respostas celulares a agentes terapêuticos (TEHRANIROKH et al., 2013; YOUNG; BEEBE, 2010). Muitos autores descrevem os microchips como plataformas ideais para ensaios bioquímicos, tais como, para detecção biomolecular e também triagem de agentes terapêuticos (WU et al., 2016). Todo o sistema microfluídico de cultura de células utilizado nesse estudo é apresentado na Figura 6.

Figura 6 – Sistema Microfluídico de Cultura de Células. O microchip é conectado a uma bomba de seringa contendo meio de cultura levado até a câmara ou canal de crescimento celular com auxílio de adaptadores acoplados aos tubos de conexão. O meio é descartado em tubos de 15 mL.

Adptado de URBACZEK et al., 2017

Esses dispositivos têm ganhado grande destaque por possibilitarem o fácil manuseio das células, além de permitirem o controle com exatidão do ambiente celular, tornando-os uma importante ferramenta para o estudo e compreensão de sistemas biológicos (JASTRZEBSKA et al., 2015). Além disso, apresentam um baixo custo, tanto em termos de fabricação como em consumo de reagentes e amostras que são empregadas, visto que são necessárias pequenas quantidades desses reagentes para realização dos ensaios (KARIMI et al., 2016).

Os órgãos em chip possibilitam interfaces célula-célula como acontece nos tecidos *in vivo* através de influências químicas, transporte de nutrientes, sinais físicos e forças fluídicas fisiológicas que são essenciais para a funcionalidade do tecido nativo (ESCH; BAHINSKI; HUH, 2015; URBACZEK et al., 2017).

Essa tecnologia possibilita avaliar o comportamento das células quando expostas a agentes terapêuticos, em diferentes geometrias e diferentes

configurações em estudos pré-clínicos (YOUNG; BEEBE, 2010). Com isso, diversos modelos de órgãos em chips foram desenvolvidos tais como, rim, fígado, pulmão, intestino, e para diversas patologias, dentre elas, o câncer (GHAEMMAGHAMI et al., 2011), como apresentado na Figura 7.

Figura 7 – Diferentes modelos de microchips recriando órgãos como pulmão, cérebro, coração, sistema vascular, baço, intestino, rim e fígado

Os microchips utilizados para o cultivo de células devem possuir condições fundamentais, dentre estas, não serem tóxicos para as células. Para isso, devem ser utilizados materiais biocompatíveis e quimicamente inertes. Dessa maneira, como citado anteriormente, os materiais mais utilizados para a fabricação dos microsistemas são: polímeros poli-dimetilsiloxano (PDMS), poli-metil metacrilato

(PMMA), policarbonato (PC), vidro, plástico e silicone. Outro fator que deve ser levado em conta na fabricação de microchips é que os materiais devem apresentar transparência, haja vista que materiais transparentes permitem um acompanhamento em tempo real da proliferação celular e o seu crescimento.

O uso de plataformas 3D *in vitro* e de sistemas microfluídicos para cultura de células na pesquisa e desenvolvimento de novas moléculas utilizadas para o tratamento do câncer tem sido sugerido como um caminho com grande potencial para preencher as lacunas existentes entre as culturas bidimensionais e minimizar estudos em modelo animal (RIMANN; GRAF-HAUSNER, 2012).

2 OBJETIVOS

O objetivo desse estudo foi o desenvolvimento de um modelo de cultura tridimensional de células, utilizando um suporte (*scaffold*) poroso de colágeno tipo I aniônico para servir como matriz de crescimento celular e de uma plataforma microfluídica para cultura de células. Ambos os modelos foram construídos para realizar ensaios de terapia fotodinâmica com hipericina em células de carcinoma humano (HEp-2) e avaliar a viabilidade celular após o tratamento.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

I. Suporte de colágeno:

- Produzir uma matriz polimérica de suporte celular à base de colágeno tipo I aniônico
- Avaliar a arquitetura do suporte por microscopia eletrônica de varredura (MEV)
- Determinar a existência ou não de citotoxicidade do suporte para as células Vero pelo método de difusão em ágar e pelo método do MTT
- Avaliar a proliferação das células HEp-2 no suporte pelo método do MTT
- Determinar o índice de sobrevivência celular após terapia fotodinâmica utilizando o IC_{50} da hipericina previamente obtido na linhagem de carcinoma humano células HEp-2

II. Plataforma microfluídica de cultura celular (PMCC)

- Preparar o desenho para fabricação da PMCC
- Fabricar a plataforma microfluídica
- Avaliar a proliferação das células HEp-2 na PMCC
- Determinar o tipo de morte celular na PMCC por microscopia de fluorescência após Terapia fotodinâmica nas células HEp-2

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 HIPERICINA E SISTEMA ÓTICO DE IRRADIAÇÃO

A hipericina testada nesse estudo foi obtida através de síntese realizada pelo Prof. Dr. Anderson O. Ribeiro da UFABC.

A irradiação foi realizada utilizando-se LEDs, que são diodos emissores de luz (do inglês, “*light emitting diodes*”). Esses dispositivos possibilitam a iluminação de uma superfície ampla e homogênea, o que é muito importante, pois uma distribuição irregular da luz pode deixar de tratar regiões de um tumor superficial mais extenso (ENK; LEVI, 2012; WIEGELL et al., 2011). Os LEDs apresentam vantagens em sua aplicabilidade na TFD, como: emitir luz dentro de uma faixa de espectro eletromagnético mais ampla, não ocasionar o aquecimento da superfície irradiada, facilidade no manuseio e apresentar um custo menor quando comparado aos lasers (GUIMARÃES et al., 2014).

Para irradiação utilizou-se uma *biotable*, que consiste em um conjunto de lâmpadas de LED com emissão em 590 ± 10 nm (amarelo) como apresentado na Figura 8. Esse sistema foi desenvolvido para irradiação de culturas celulares em superfícies planas pelo Laboratório de Apoio Técnico do Centro de Pesquisas em Ótica e Fotônica (CEPOF) do IFSC-USP.

Figura 8 – *Biotable* com emissão em 590 ± 10 nm

Fonte: Autoria própria

3.2 ESCOLHA DO BIOMATERIAL PARA PRODUÇÃO DOS SUPORTES

O colágeno tipo I aniônico de origem porcina foi o biomaterial escolhido para formação do suporte utilizado como modelo de estudo. Essa proteína é usada com grande frequência na construção de sistemas de cultura 3D, dentre eles, os suportes porosos. Isso ocorre em razão de que as matrizes de colágeno tipo I aniônico exibem grande facilidade no processamento, baixo custo, fácil adaptação para manipulação de células vivas, além de possibilitar a variação do tamanho dos poros variando a concentração de colágeno ou adicionando compostos reticulantes, auxiliando nas mudanças das propriedades estruturais do gel (PARAMESH et al., 2015).

3.3 PRODUÇÃO DOS SUPORTES DE COLÁGENO

Para a produção do modelo de cultura 3D empregou-se suportes de colágeno para o crescimento de células. Foi utilizado colágeno do tipo I aniônico de origem porcina, hidrolisado por 96 h. O processo de hidrólise alcalina propicia o aumento de até 130 cargas negativas na molécula de tropocolágeno, superpostas na molécula

nativa, de acordo com o tempo de tratamento empregado (LACERDA; PLEPIS; GOISSIS, 1998). Com isso, são geradas pequenas alterações na estrutura da matriz de colágeno com o aumento das cargas negativas, como maior possibilidade de variação de tamanho dos poros por causa da repulsão eletrostática causada por estas cargas (BET, 2000).

Para a produção dos suportes foi utilizada uma placa de teflon de 68 poços, adicionando-se 0,8 g de gel de colágeno aniônico em cada poço de 15 mm de diâmetro e 5 mm de altura. Os géis foram congelados em nitrogênio líquido e subsequente, as amostras foram liofilizadas por três dias. Uma vez obtidos os suportes, estes foram tratados com bicarbonato de sódio $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ por 24 h visando neutralizar os grupos de carboxílicos no colágeno aniônico. Subsequente, as amostras foram lavadas com água desionizada três vezes ao dia por um período de 15 dias para retirar o sal formado após a neutralização. A seguir repete-se o processo de congelamento e de liofilização para obtenção dos suportes esponjosos neutros. O processo de produção dos suportes de colágeno é apresentado na Figura 9.

Figura 9 – Fluxograma simplificado do processo de produção do suporte de colágeno - (A) processo de congelamento e liofilização, (B) neutralização e (C) lavagem, liofilização e esterilização com o gás óxido de etileno

Fonte: Autoria própria

3.4 ESTERILIZAÇÃO DO SUPORTE DE COLÁGENO COM ÓXIDO DE ETILENO

Subsequente à liofilização as amostras foram embaladas em triplicatas em embalagens com papel de grau cirúrgico e enviadas para esterilização por óxido de etileno na Central de Esterilização Comércio e Indústria Ltda – ACECIL, Campinas – São Paulo. Esse procedimento de esterilização é adequado já que este gás apresenta a capacidade de penetrar em materiais porosos e por seu mecanismo de ação ocorrer por alquilação de proteínas microbianas, ou seja, desnaturando organismos vivos (FRANCA et al., 2013; MORIYA et al., 2011).

Após esterilização, as amostras foram aeradas por 15 dias para que o ar circulasse nos materiais esterilizados, a fim de que fosse possível a eliminação total

dos resíduos do gás na amostra, já que este é citotóxico para as células (GONÇALVES; CRUZ, 2013; STEELMAN, 1992)

3.5 ANÁLISE MORFOLÓGICA DO SUPORTE DE COLÁGENO ANIÔNICO POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

Para avaliar a arquitetura do suporte, bem como a existência de poros e a conexão entre eles foram realizadas análises dos suportes por microscopia eletrônica de varredura (MEV). Para esse tipo de análise, o suporte foi intumescido por 24 h em água desionizada e congelado em nitrogênio líquido. O suporte congelado foi fraturado em uma secção transversal com o auxílio de uma lâmina de bisturi estéril, nº 10, de aço carbono. A amostra fraturada foi novamente submetida ao congelamento em nitrogênio líquido. Posteriormente, o suporte foi liofilizado por 10 h. A amostra liofilizada foi preparada para MEV de secção superficial e transversal. As imagens por MEV foram obtidas na Central de Análises Químicas Instrumentais do Instituto de Química de São Carlos (CAQI/IQSC/USP), no equipamento ZEISS LEO 440 (Cambridge, Inglaterra) com detector OXFORD (modelo 7060), operando com feixe de elétrons de 15 kV. As amostras foram recobertas com 30 nm de ouro em um metalizador Coating System BAL-TEC MED 020 (BAL-TEC, Liechtenstein) e mantidas em dessecador até o momento de análise. Condições de metalização: pressão na câmara = 2×10^{-2} mbar; corrente = 60 mA; taxa de deposição $0,60 \text{ nm s}^{-1}$). As amostras foram colocadas na porta-amostra de alumínio (*stubs*), para a observação. Como as amostras analisadas não apresentam condutividade elétrica, para esta fixação foi empregado um adesivo condutor, necessário para garantir um caminho condutivo. A obtenção da distância entre as paredes dos canais presentes na estrutura da esponja foi realizada pelo

processamento das imagens no *software UTHSCSA Image Tool 3.0* através da medida de 30 determinações em cada imagem.

3.6 CULTURA CELULAR

3.6.1 CÉLULAS UTILIZADAS NESTE ESTUDO

Neste estudo foram utilizadas duas linhagens: Vero (ATCC CCL-81) células epiteliais de rim de macaco verde africano (*Cercopithecus aethiops*) e HEp-2 (ATCC CCL-23) células de carcinoma de laringe humana. A linhagem Vero é padrão em estudos com biomateriais e a HEp-2 bastante descrita na literatura para testes de terapias relacionadas ao câncer. Neste estudo, as células Vero foram empregadas para determinar a existência ou não de citotoxicidade do suporte de colágeno e as células HEp-2 para ensaios de proliferação e Terapia Fotodinâmica.

3.7 MEIO DE CULTURA

Para o crescimento celular foi utilizado o meio Iscove's (do inglês Iscove's Modified Dulbecco's Medium, Sigma). Para manutenção do pH entre 7,2 e 7,4 foi adicionado 2,15 g L⁻¹ de bicarbonato de sódio (Synth). A suplementação foi feita com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB, Cultilab), 1% de penicilina 10.000 UI mL⁻¹ e estreptomicina 10 mg mL⁻¹.

3.7.1 SUBCULTURA CELULAR

A subcultura das células foi realizada a cada três dias removendo-se o meio de cultura e adicionando-se a solução salina tamponada com fosfato (PBS), para retirar o excesso de meio de cultura. As células foram desagregadas das garrafas de

cultura com tripsina, enzima que hidrolisa as cadeias polipeptídicas nos radicais lisil-arginil formando terminações de clivagem, éster e amida. Essa reação desestrutura a matriz, impossibilitando a ligação dos receptores da superfície celular, ligados ao citoesqueleto e à matriz, obrigando as células a rearranjarem seu citoesqueleto. As células foram contadas em câmara de Neubauer para a determinação da viabilidade celular utilizando-se o corante azul de Trypan blue que é incorporado seletivamente pelas células não viáveis (OLIVEIRA et al., 2010) nas quais a integridade da membrana celular é danificada. Para isso, foi colocada em um recipiente criogênico uma alíquota de 100 µL de suspensão celular, 400 µL de PBS e 500 µL de trypan blue e então calculou-se separadamente o número de células mortas e vivas, tendo em vista que as células vivas são evidenciadas incolores ao microscópio e as mortas em violeta em consequência do corante nelas incorporado (FRESHNEY, 2015). A viabilidade celular foi calculada em porcentagem (%) a partir da equação abaixo:

$$\% \text{ viabilidade} = \frac{\text{número de células não coradas} \times 100}{\text{número total de células}}$$

Vale ressaltar que todos os procedimentos envolvendo o manuseio de células foram realizados utilizando-se materiais estéreis com manipulação em câmara de fluxo laminar para manutenção da esterilidade. Para manutenção de um estoque foi realizado o congelamento de um estoque de células utilizando um crioprotetor, substância que faz com que a membrana celular seja protegida dos cristais. O crioprotetor utilizado nesse estudo foi o dimetilsulfóxido (DMSO) a 10%(v/v) (FRESHNEY, 2015).

3.8 AVALIAÇÃO QUALITATIVA DA CITOTOXICIDADE DO SUPORTE DE COLÁGENO PELO MÉTODO DE DIFUSÃO EM ÁGAR

Para a avaliação da citotoxicidade do suporte de colágeno foram realizados testes de contato direto *in vitro* adaptado de Rogero et al. (ROGERO et al., 2003). Para isso, 5,0 mL de uma suspensão da linhagem Vero contendo 3×10^5 células mL^{-1} , foram depositados em placa de Petri (15x60 mm) contendo 5,0 ml de meio de cultura e incubadas por um período de 48 h a 37°C em atmosfera úmida com 5%(v/v) de CO₂. Posteriormente, com a monocamada de células já formada, o meio de cultura foi retirado e adicionou-se 5,0 ml de um novo meio de cultura e ágar contendo 0,01%(m/v) de vermelho neutro em cada placa de Petri a uma temperatura de aproximadamente 44 °C.

Além dos suportes de colágeno, as amostras utilizadas nesse ensaio foram papel de filtro atóxico (controle negativo) e látex (controle positivo). Todas as amostras utilizadas foram recortadas em círculos com fragmentos medindo aproximadamente 0,25 cm de diâmetro e dispostas em placa de Petri contendo ágar e novamente incubadas em estufa a 37 °C e 5% CO₂ por 24 h. A seguir avaliou-se o grau de citotoxicidade pela formação de halo. O experimento foi realizado em triplicata.

3.9 AVALIAÇÃO QUANTITATIVA DA CITOTOXICIDADE DO SUPORTE DE COLÁGENO PELO MÉTODO DO MTT

A avaliação quantitativa da citotoxicidade foi realizada seguindo as normas estabelecidas pela ISO 10993-5, utilizando-se o corante MTT. Foram utilizados extratos das amostras, diluídos em série (100%, 50%, 25%, 12,5%, v/v) com meio Iscove's, usado para o crescimento das células utilizadas no ensaio. Além dos suportes de colágeno e dos poços contendo somente células Vero, as amostras

utilizadas nesse ensaio foram papel de filtro atóxico utilizado como controle negativo e o látex utilizado como controle positivo.

De uma suspensão de 1×10^5 células mL^{-1} , 200 μL de células Vero foram distribuídas em placa de 96 poços e incubadas em estufa de células por 48 h a 37°C e 5% CO_2 . Após 24 h, o meio de cultura foi substituído pelas diluições seriadas dos extratos do suporte de colágeno e dos respectivos controles, látex e papel de filtro e as placas foram novamente armazenadas em estufa de células por 24 h a 37°C e 5% CO_2 . A seguir os extratos foram retirados com auxílio de uma bomba de sucção e a viabilidade celular foi mensurada utilizando-se o método colorimétrico de MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenilbrometo de tetrazolina). O MTT quando incubado com células vivas é reduzido a um composto denominado formazan, de coloração roxa que absorve em 570 nm. Essa redução é realizada pelas desidrogenases mitocondriais presentes somente nas células vivas (MOSMANN, 1983; RISS et al., 2016; STOCKERT et al., 2012; ZHANG et al., 2016). Preparou-se uma solução estoque de 5 mg mL^{-1} de MTT em PBS e foram adicionados 50 μL de MTT 1 mg mL^{-1} em meio em cada poço da placa de 96 poços contendo as amostras. As placas foram armazenadas em estufa de células por 3 h. O MTT foi retirado e adicionou-se álcool etílico e uma solução contendo álcool isopropílico para solubilização dos cristais de formazan. Subsequente, foram obtidas as absorbâncias em 570 nm no leitor de microplacas (BIO-RAD). O ensaio foi realizado em triplicata e a viabilidade celular foi determinada pela média das triplicatas.

3.10 VIABILIDADE DAS CÉLULAS HEP-2 NO SUPORTE DE COLÁGENO

Para avaliação da viabilidade celular foram adicionados 200 μL de uma suspensão de células de 1×10^6 células mL^{-1} no suporte com meio de cultura

específico. As placas de 24 poços contendo as amostras foram armazenadas na estufa por 30 min para adesão celular no suporte. Posteriormente, adicionou-se mais 100 μL de meio para manter as células úmidas. Após 30 min de incubação adicionou-se mais 2,0 mL de meio nos poços e as placas foram colocadas na estufa e mantidas até o momento da análise (Hofmann et al. 2014).

A proliferação celular foi determinada utilizando-se o método colorimétrico MTT. Preparou-se uma solução estoque de 5,0 mg mL^{-1} de MTT em PBS e foram adicionados 2,0 mL de MTT 1 mg mL^{-1} em meio em cada poço da placa de 24 poços contendo as amostras. As placas foram armazenadas em estufa de células por 3 h. O MTT foi retirado com auxílio de uma bomba de sucção e adicionou-se 2,0 mL de dimetilsulfóxido (DMSO). Subsequentemente, as placas foram mantidas em estufa incubadora com agitação orbital por 30 min para dissociação das células da esponja. Após a solubilização dos cristais de formazan, foram obtidas as absorbâncias em 570 nm no leitor de microplacas (BIO-RAD). Foram realizados três experimentos independentes, cada um em triplicata sendo que a viabilidade celular foi determinada pela média das triplicatas dos três experimentos.

3.11 VIABILIDADE CELULAR NO MODELO 2D E 3D APÓS TFD

Para avaliação da viabilidade na monocamada e nos suportes de colágeno (previamente umedecidos por 2 h), 200 μL de células HEp-2, 1×10^6 células mL^{-1} mais 2,0 mL de meio de cultura foram adicionados em placas de 24 poços e mantidas em estufa a 37°C e 5% de CO_2 por 5 dias com troca de meio a cada 3 dias.

Posteriormente, as placas foram retiradas da estufa, o meio foi removido e concentrações de hipericina em meio de cultura entre 0,022 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e 0,176 $\mu\text{mol L}^{-1}$

¹ foram adicionadas aos poços da cultura bidimensional e da tridimensional e foram incubadas por 2 h. Em seguida, as soluções foram retiradas e cada poço foi lavado com PBS para eliminar os possíveis resíduos de fotossensibilizador. Por fim, os poços foram preenchidos com um novo meio de cultura e as placas foram submetidas à irradiação com LED 590 ± 10 nm ($8,4 \text{ mW cm}^{-2}$) por 20 min e dose 10 J cm^{-2} . Ao término da irradiação, as placas foram incubadas por 48 h em estufa e após esse período foi realizada a determinação da viabilidade celular pelo método colorimétrico do MTT. Foram realizados três experimentos independentes, cada um em triplicata e a viabilidade celular foi obtida pela média das triplicatas dos três experimentos.

3.12 DESENVOLVIMENTO DA PLATAFORMA MICROFLUÍDICA DE CULTURA CELULAR

A plataforma foi montada utilizando-se Permanox™ para adesão e crescimento celular. O Permanox™ consiste em uma lâmina de plástico e apresenta características adequadas para a microfabricação como: excelente resistência química, transparência adequada para microscopia óptica e baixa autofluorescência, permitindo o preparo da amostra e a visualização adequada das células. Inicialmente, foi criado o esboço da câmara de crescimento celular, de acordo com URBACEK et al., 2017, utilizando o *software* gráfico Corel DRAW, por método adaptado de KIM et al., 2011. Em seguida, com auxílio de uma cortadora a laser 600 Kawaj, a câmara interna foi recortada em um adesivo dupla face biocompatível que delimita a área e a altura da câmara e liga a lâmina ao filme de poliéster. Foram construídos tubos de conexão utilizando-se as bases de ponteiros plásticas de 200 μL , que foram fixadas ao redor dos orifícios do filme de poliéster para facilitar a

adaptação de tubos de silicone tipo escalpe que levam as células com meio de cultura e posteriormente o fotossensibilizador até a câmara de crescimento. Todo o material utilizado para montagem da PMCC foi esterilizado com luz ultravioleta por 30 min antes da montagem e todo o procedimento foi realizado em capela de fluxo laminar. A Figura 10 apresenta o esquema de montagem do microchip com o molde contendo a placa de Permanox (Figura 10a), o adesivo biocompatível (Figura 10b), o filme de poliéster (Figura 10c). Todos os materiais utilizados no desenvolvimento da plataforma foram esterilizados com álcool 70%. A plataforma microfluídica pronta para ser utilizada na Figura 10d.

Figura 10 – Modelo de microchip para testes de drogas. Lâmina de Permanox (a); adesivo dupla face biocompatível (b); filme de poliéster (c) e Microchip pronto para ser utilizado (d)

Fonte: a, b c: Adaptado de URBACZEK et al., 2017; d: Autoria Própria

O desenvolvimento da Plataforma microfluídica de cultura celular foi realizado no laboratório de Bioanalítica, Microfabricação e Separações (BioMicS) do IQSC, com auxílio da Dr. Ana Carolina Urbaczek, sob coordenação do professor Dr. Emanuel Carrilho. Vale ressaltar que o BioMics faz parte da Rede Nacional de Métodos Alternativos (RENAMA).

3.13 CRESCIMENTO DE CÉLULAS NA PLATAFORMA MICROFLUÍDICA DE CULTURA CELULAR

A adesão e a proliferação das células na PMCC foram avaliadas de forma qualitativa através de microscopia de fluorescência. Para isso, 5×10^6 células mL^{-1} da linhagem HEp-2 em meio Iscove's com suplementação específica foram injetadas na plataforma e armazenadas em estufa a 37°C e 5% de CO_2 por 4 h para adesão celular. Utilizou-se escalpes e seringas de 5,0 mL estéreis que foram acoplados ao microchip para que a solução contendo meio com nutrientes fosse perfundida com auxílio de uma bomba de seringa a uma vazão de $2,0 \mu\text{L min}^{-1}$ por 24 h. A vazão foi determinada de acordo com KIM; LIN; HAYNES, 2011; URBACZEK et al., 2017. Todo o sistema de perfusão juntamente com a plataforma microfluídica foi mantido em estufa. Posteriormente, o sistema de perfusão foi desligado e o meio presente no canal foi retirado para adição de $30,0 \mu\text{L}$ da solução do corante laranja de acridina $100,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ (SIGMA ALDRICH). As imagens foram obtidas no microscópio de fluorescência (Olympus BX41) no aumento de 4x e 10x, filtro de excitação de 460/90 nm, espelho dicromático de 500 nm e filtro de barreira de 520 nm.

3.14 TERAPIA FOTODINÂMICA NA PLATAFORMA MICROFLUÍDICA DE CULTURA CELULAR

Foram realizados ensaios de TFD na plataforma microfluídica a fim de que se pudesse verificar posteriormente os danos causados às células HEp-2 pelo tratamento nesse modelo de cultura. Para isso, 5×10^6 células mL^{-1} em meio Iscove's com suplementação específica foram injetadas na plataforma e armazenadas em estufa a 37°C e 5% de CO_2 por 4 h para adesão celular. Após a confluência das células, os microchips foram conectados aos sistemas de perfusão (seringas de 5 mL, escalpes e bombas de injeção) e mantidos em estufa por 15 h. Posteriormente,

o meio de cultura presente no canal de crescimento das células foi retirado e diferentes concentrações de hipericina em meio de cultura, no intervalo de 0,022 $\mu\text{mol L}^{-1}$ a 0,088 $\mu\text{mol L}^{-1}$ foram perfundidas na plataforma por 2 h a uma vazão de 2 $\mu\text{L min}^{-1}$ para promover acúmulo intracelular da hipericina nas células. Em seguida, as soluções foram retiradas da plataforma, os canais foram preenchidos com um novo meio de cultura e os microchips foram submetidos à irradiação com LED $590 \pm 10 \text{ nm}$ ($8,4 \text{ mW cm}^{-2}$), por 20 min, dose 10 J cm^{-2} e perfusão contínua a uma vazão de 2 $\mu\text{L min}^{-1}$. Após a irradiação, os microchips foram armazenados em estufa por 5 h.

3.15 TIPO DE MORTE CELULAR NA PLATAFORMA MICROFLUÍDICA DE CULTURA CELULAR APÓS TFD

O tipo de morte celular após TFD no microchip foi avaliado por microscopia de fluorescência. Para isso as células foram marcadas utilizando os corantes fluorescentes brometo de etídio (BE) e laranja de acridina (LA). Quando marcadas com o LA, as células vivas vão apresentar coloração verde. Isso ocorre por que este corante consegue atravessar a membrana das células vivas ou em processo de morte e permear o DNA. Já as células que sofrem necrose aparecem com coloração vermelha, pois o BE só penetra nas células que perderam a integridade da membrana. As células em processo de apoptose aparecem com corpos alaranjados marcados pelos dois fluorocromos (RIBBLE et al., 2005).

Cinco horas após a realização da terapia fotodinâmica os microchips foram retirados da estufa de cultura celular e o meio de cultura presente nos canais foi aspirado. Para análise do tipo de morte celular, 30,0 μL da solução corante (1:1) de LA ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$) / BE ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$) foram adicionados aos canais. Após 1 minuto à

temperatura ambiente e ao abrigo da luz, o corante foi retirado e os microchips foram lavados três vezes com PBS a cada 1 min. As câmaras foram desmontadas e levadas imediatamente ao microscópio de fluorescência (Olympus BX41) no aumento de 10x, filtro de excitação de 460/90 nm, espelho dicromático de 500 nm e filtro de barreira de 520 nm. Obtiveram-se as imagens de oito campos de cada lâmina com a câmara Olympus DP72. Foram realizados dois ensaios independentes e para quantificar o tipo de morte após TFD, utilizou-se o software *ImageJ* utilizando as seguintes identificações:

- Células viáveis apresentam coloração verde;
- Células em apoptose apresentam coloração alaranjada;
- Células necróticas apresentam coloração vermelha.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 ANÁLISE DA MORFOLOGIA DO SUPORTE DE COLÁGENO ANIÔNICO POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

A caracterização da morfologia do suporte de colágeno foi realizada por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV). Essa técnica possibilita a obtenção de observações diretas da estrutura polimérica sobre a morfologia, topografia e identificação de elementos químicos de uma amostra sólida, utilizando para isso um feixe de elétrons (OLIVEIRA et al., 2010).

A MEV possui inúmeras aplicações. Em seus estudos, Bernardi *et al* (2017) utilizou o microscópio eletrônico de varredura para avaliar o comportamento de microrganismos salivares em superfícies de titânio. Yu *et al* (2009) observou por meio da MEV a proliferação de células endoteliais em membranas de hidroxiapatita. Zhang et al. (2014) avaliou a importância do tamanho dos poros de quatro tipos de suportes porosos de colágeno utilizados para a regeneração do tecido.

Neste estudo, a partir da análise das imagens da MEV do suporte de colágeno evidenciou-se uma morfologia organizada nos canais, formando poros por toda a extensão do suporte. Foram obtidas imagens da seção superficial e transversal, como apresentado nas Figuras 11 e 12.

Figura 11 – Fotomicrografia superficial do suporte de colágeno porcino, aumento de 200x

Figura 12 – Fotomicrografia transversal do suporte de colágeno porcino, aumento de 200x

Observa-se na Figura 11 um elevado grau de porosidade no suporte de colágeno e com uma distribuição heterogênea dos poros. No entanto, para permeação das células, os poros precisam apresentar tamanho adequado.

Utilizando o programa *image tool* foi possível estabelecer que a distância média entre a parede dos canais do suporte de colágeno é de $68\pm 13\text{ }\mu\text{m}$, sendo portanto adequada para a permeação de células de mamíferos, visto que essas apresentam tamanho em torno de 10 a 20 μm . Além disso, foram obtidas imagens transversais do suporte de colágeno porcino (Figura 12) evidenciando mais uma vez a interconexão dos poros, agora entre as seções adjacentes e subjacentes. Portanto, o suporte de colágeno apresenta condição adequada para ser utilizado como matriz de suporte para crescimento das células e consequente formação de um modelo de cultura 3D, visto que apresenta elevado grau de porosidade com interconexão entre os canais.

Os suportes porosos (*scaffolds*) são muito utilizados para cultivo de células. O tamanho e a interconexão entre os poros são determinações importantes para permitir a invasão celular (TANG; HUNT, 2006). Esses compósitos podem ser utilizados para mimetizar a matriz extracelular nativa por apresentarem permeabilidade e estabilidade mecânica. A micro-arquitetura melhora a interação bioquímica das células aderidas para serem melhor expressas *in vitro* (FITZGERALD et al., 2015). Dessa forma, foi possível a validação do modelo para concluir os objetivos desse estudo.

4.2 AVALIAÇÃO QUALITATIVA DA CITOTOXICIDADE DO SUPORTE DE COLÁGENO PELO MÉTODO DE DIFUSÃO EM ÁGAR

Os ensaios para verificar a citotoxicidade *in vitro* de biomateriais devem seguir as normas estabelecidas pela Organização Internacional de Padronização (International Standard Organization), ISO 10993, devendo-se avaliar a

biocompatibilidade para todo e qualquer material utilizado para fins biomédicos, bem como para aqueles que entrem em contato direto ou indireto com o corpo humano.

Segundo Schmalz (1998) os ensaios de biocompatibilidade permitem avaliar se existe ou não reação biológica de tecidos, no momento em que entram contato com determinados materiais. Esses ensaios são de grande importância, uma vez que reduzem os riscos de problemas nos testes clínicos, além de ocasionarem uma redução de custos e tempo, quando comparados à utilização de animais para esse fim. Desse modo, a biocompatibilidade da matriz para formação do modelo 3D foi avaliada utilizando a técnica qualitativa do método de difusão em ágar, utilizando células Vero. A Figura 13 apresenta as placas contendo as amostras após 24 h de incubação com ágar e vermelho neutro para avaliação macroscópica quanto à presença ou não de halo.

Figura 13 – Determinação da citotoxicidade do biomaterial em células Vero pelo método de difusão em ágar (a) controle positivo - látex, (b) controle negativo - papel de filtro e (c) suporte de colágeno

A citotoxicidade foi verificada pela presença ou não de halo ao redor das amostras. Tal fato ocorre quando há lise e morte das células, havendo liberação do corante vermelho neutro incorporado, formando um halo ao redor da amostra (ROGERO et al., 2003), como observado na Figura 13a. Não foi observada formação de halo de toxicidade ao redor do suporte de colágeno, como também não foi observado no controle negativo (papel de filtro). Houve formação de halo somente na placa contendo o látex (controle positivo). Portanto, com base nas imagens é possível afirmar que o colágeno de serosa porcina não causa nenhuma toxicidade às células de acordo com o método de difusão de em agar.

4.3 AVALIAÇÃO QUANTITATIVA DA CITOTOXICIDADE DO SUPORTE DE COLÁGENO PELO MÉTODO DO MTT DE ACORDO COM A ISO 10993-5

A norma ISO 10933-5 estabelece regras para determinação da citotoxicidade dos dispositivos com potencial uso em saúde, dentre estes: dispositivos médicos e/ou materiais que entrem em contato direto ou indireto com o corpo humano e dispositivos desenvolvidos para fins biomédicos à base de polímeros.

Essa norma estabelece a classificação de citotoxicidade (Tabela 1) de acordo com a viabilidade celular após o contato das células com as diluições dos extratos das amostras testadas. Dessa maneira, a avaliação quantitativa da citotoxicidade do suporte de colágeno foi determinada empregando-se o método colorimétrico do MTT, seguindo as normas estabelecidas pela norma ISO 10993-5.

Tabela 1- Classificação da citotoxicidade de materiais estabelecida pela ISO 10993-5 de acordo com a viabilidade celular (%) após contato com os extratos das amostras

Citotoxicidade	Viabilidade celular (%)
Não-citotóxico	> 90
Levemente citotóxico	80 a 89
Moderadamente	50 a 79
Severamente citotóxico	< 50

De acordo com Schmalz (1998) os ensaios de citotoxicidade apresentam grande relevância, uma vez que possibilitam o entendimento do comportamento biológico dos materiais testados.

Assim, na Tabela 2 estão apresentados os resultados da viabilidade das células Vero em diferentes diluições dos extratos das amostras utilizadas no experimento.

Tabela 2 – Viabilidade celular obtida pelo método do MTT para cada diluição dos extratos das amostras utilizando controle positivo – látex, controle negativo - papel de filtro e o suporte de colágeno

Concentrações dos extratos (%)	Viabilidade Celular (%)		
	Látex (controle +)	Papel de filtro (controle -)	Suporte de colágeno
12,5	4,9 ± 0,2	96 ± 8	98 ± 5
25	5,5 ± 0,5	97 ± 7	97 ± 9
50	6,6 ± 0,7	95 ± 7	96 ± 10
100	9,7 ± 0,9	86 ± 4	94 ± 9

O ensaio quantitativo da citotoxicidade pelo método do MTT permitiu avaliar a viabilidade celular para cada amostra nas diferentes diluições dos extratos. Dessa maneira, como observado na Tabela 2, nos poços contendo papel de filtro (controle-) o índice de sobrevivência foi acima de 86% e nos poços contendo o suporte de colágeno foi acima de 94%. Diferentemente ao observado nos poços contendo as diluições dos extratos do látex (controle +), os quais evidenciaram a diminuição da viabilidade celular. Esse resultado corrobora com os obtidos anteriormente no ensaio qualitativo, evidenciando mais uma vez que o suporte de colágeno não apresenta toxicidade às células, podendo, portanto, ser empregado como matriz para crescimento celular.

4.4 PROLIFERAÇÃO CELULAR NO MODELO TRIDIMENSIONAL (3D) PELO MÉTODO DO MTT

A observação da proliferação celular foi de grande importância, uma vez que as células foram cultivadas no suporte tridimensional de colágeno a fim de mimetizar um ambiente 3D encontrado *in vivo*. Segundo Boyan e colaboradores (1996), as propriedades físico-químicas, químicas ou morfológicas dos biomateriais, podem provocar efeitos na adesão, na proliferação, na diferenciação e na função celular.

No presente trabalho, a proliferação das células HEp-2 foi avaliada no suporte de colágeno por sete dias pelo método colorimétrico do MTT. A observação da proliferação celular no suporte de colágeno possibilita avaliar o crescimento das células, determinar o tempo de cultivo ideal para a utilização das células como modelo de estudo, nesse caso, para aplicação da TFD. A Figura 14 apresenta o gráfico da proliferação celular em cultura 3D das células HEp-2, bem como da cultura bidimensional para comparação do comportamento.

Figura 14 – Proliferação da linhagem HEP-2 em cultura bidimensional e cultura tridimensional durante 168 h de cultivo com medida da absorbância do formazan em 570 nm a cada 24 h

Durante o período de sete dias (168 h) as células permaneceram viáveis no suporte de colágeno, aumentando continuamente o número de células, diferente do observado em 2D, onde a partir do sexto dia (144 h) houve diminuição na viabilidade causada pela senescência das células. Apesar disso, a absorbância foi maior na cultura bidimensional. Tal fato pode ser explicado devido à complexidade do modelo tridimensional, o que poderia impedir que todas as regiões fossem expostas a condições idênticas de recebimento de nutrientes e oxigênio, diferente do que foi verificado em culturas 2D, onde a difusão desses nutrientes ocorreu de forma homogênea (HARRIS, 2002; HIRSCHHAEUSER et al., 2010; MEHTA et al., 2012).

O mesmo comportamento foi observado por Zuppinger (2016) que no seu trabalho propôs um modelo 3D utilizando Cardiomiócitos humanos (células do tecido muscular cardíaco) e observou que essas células no modelo de estudo são capazes de sobreviver por um período prolongado e mostrar taxas de proliferação mais

lentas. Szot et al. (2011) desenvolveu suportes a base de dois biomateriais nanofibrosos, a celulose bacteriana e o colágeno tipo I aniônico para estudos de câncer *in vitro* e observaram uma proliferação mais lenta das células. Segundo os autores, isso pode ter ocorrido devido ao recebimento limitado de nutrientes pelas células. Assim, a plataforma desenvolvida nesse estudo é bastante promissora quando comparada a outros modelos já descritos na literatura.

4.5 VIABILIDADE CELULAR DA CULTURA 2D E 3D APÓS TFD

Baseando-se em estudos realizados anteriormente pelo Grupo de Fotossensibilizadores (LING, 2016), nos quais foi obtido o valor de IC_{50} para HEP-2 de $0,04 \pm 0,01 \mu\text{mol L}^{-1}$ após irradiação com LED 590 nm por 20 min e dose de 10 J cm^{-2} , utilizou-se esse valor como parâmetro de comparação para que diferentes concentrações de hipericina fossem avaliadas na cultura bidimensional e no modelo 3D. Com base nos resultados apresentados na Figura 15, observa-se que a viabilidade celular diminui de acordo com o aumento da concentração da hipericina mantendo-se a dose de luz e o tempo de incubação constantes. Além disso, as células HEP-2 em cultura 2D apresentaram-se mais sensíveis ao tratamento com terapia fotodinâmica do que as células em cultura 3D, uma vez que a viabilidade no modelo 3D foi maior.

Além disso, as células HEP-2 em cultura 2D apresentaram-se mais sensíveis ao tratamento com terapia fotodinâmica do que as células em cultura 3D, uma vez que a viabilidade no modelo 3D foi maior em todas as concentrações de hipericina. Tais resultados podem ser explicados devido ao fato de que as células em cultura bidimensional foram expostas de maneira uniforme à hipericina, à luz, bem como ao nível de oxigênio, diferentemente do que ocorreu no modelo tridimensional de

culturas de células, no qual o fotossensibilizador e os nutrientes essenciais não foram distribuídos de maneira tão homogênea a todas as células. Essa limitação de difusão devido à geometria do suporte pode influenciar no comportamento celular e ajudar o entendimento de repostas fisiológicas (DUVAL et al., 2017).

Figura 15– Viabilidade da HEp-2 após TFD, com hipericina (0,022 a 0,176 $\mu\text{mol L}^{-1}$), irradiação em $590 \pm 10 \text{ nm}$ ($8,4 \text{ mW cm}^{-2}$) por 20 min, dose 10 J cm^{-2} em cultura bidimensional e cultura tridimensional

Dhiman et al (2005) produziu um modelo tridimensional de cultura de células a base de quitosana para avaliar os efeitos do tamoxifeno (droga utilizada no tratamento do câncer de mama) em células humanas de adenocarcinoma de mama, MCF-7. Segundo Dhiman, após a aplicação do fármaco, a redução no número de células no modelo tridimensional foi de 25% em comparação com as células cultivadas em monocamada no qual a redução foi de 50%, sugerindo que células cultivadas no suporte 3D apresentaram-se mais resistentes ao tamoxifeno que as células cultivadas em 2D. Alemany-Ribes et al (2013) propôs um modelo

tridimensional de células à base de RAD16-I (precursor de hidrogel) para avaliação dos efeitos fotodinâmicos em fibroblastos dérmicos humanos (hNDF). Os resultados apresentados nesse trabalho demonstraram que as células responderam de forma diferente à terapia fotodinâmica nos modelos 3D quando comparados ao 2D, uma vez que os efeitos fotodinâmicos no modelo 3D foram menores devido à redução de nutrientes, oxigênio e difusão limitada do FS para as células localizadas mais internamente no suporte.

Para compreender e analisar a relação entre os dois modelos de culturas propostos nesse estudo, foi calculado o coeficiente de correlação linear (R). Esta medida, cujo valor pode variar de $-1 < R < 1$, destaca o grau de associação da relação linear entre duas variáveis. Assim, se o coeficiente positivo é próximo à 1, então elas apresentam comportamento semelhantes. Caso contrário, cada variável apresenta comportamento oposto (FEIJOO, 2010). Nesse sentido, os dois modelos foram avaliados de acordo com o cálculo do coeficiente de correlação entre o conjunto dos valores dos percentuais de viabilidade do modelo bidimensional (variável 1) e os percentuais de viabilidade do modelo tridimensional (variável 2), como ilustrado na Figura 16.

Observou-se na Figura 16 o ajuste linear entre os percentuais de viabilidade e o coeficiente de correlação $R = 0,9560$, o qual foi muito próximo a 1. Portanto os dois modelos possuíam grau de proporcionalidade entre si, ou seja, os menores/menores percentuais obtidos no modelo bidimensional corresponderam aos menores/menores percentuais obtidos no modelo tridimensional.

Figura 16 – Gráfico de correlação linear entre os percentuais de viabilidade celular dos modelos celulares em cultura 2D e 3D

4.6 CRESCIMENTO CELULAR NA PLATAFORMA MICROFLUÍDICA DE CULTURA

Com o propósito de avaliar a adesão e proliferação da linhagem HEp-2 após 24 h com perfusão de nutrientes na plataforma de cultura celular microfluídica, o corante fluorescente laranja de acridina (LA) foi adicionado aos canais de crescimento celular para determinação da viabilidade de forma qualitativa por microscopia de fluorescência. Quando marcadas com LA, as células vivas apresentaram fluorescência com coloração verde. Isso ocorreu em virtude de que o corante laranja de acridina consegue atravessar a membrana das células vivas e permear o DNA. A Figura 17 apresenta as imagens obtidas após 24 h com perfusão de nutrientes essenciais para a sobrevivência das células.

A partir da Figura 17 foi possível afirmar que após 24 h de perfusão de meio de cultura na plataforma com auxílio de uma bomba de injeção, e mesmo sofrendo tensão de cisalhamento (forças geradas pelo fluxo de meio de cultura) as células apresentaram-se capazes de se manterem aderidas, em multiplicação e com uma

boa morfologia, confirmando que foi possível a sobrevivência das células no microchip.

Figura 17 – Micrografia das células HEp-2 no interior da plataforma de cultura microfluídica obtidas por microscopia de fluorescência após 24 h com perfusão de nutrientes a uma vazão de $2 \mu\text{L min}^{-1}$. Aumento 4x (a) e 10x (b).

Além disso, verificou-se que os materiais utilizados no desenvolvimento da plataforma microfluídica (lâmina de permanox, adesivo cirúrgico atóxico e filme de poliéster) não são citotóxicos às células. Todavia, vale ressaltar que de acordo com Didar e Tabrizian (2010) a adesão celular é dependente do tipo de célula, uma vez que as linhagens celulares podem apresentar comportamentos diferentes.

4.7 TIPO DE MORTE CELULAR NA PLATAFORMA APÓS TFD

Para avaliação do tipo de morte celular após terapia fotodinâmica, as células em diferentes plataformas foram coradas, utilizando os marcadores fluorescentes laranja de acridina e brometo de etídio. Foram realizados ensaios em plataforma contendo células aderidas submetidas ou não à irradiação, na presença de hipericina, $0,022$, $0,044$ e $0,088 \mu\text{mol L}^{-1}$. Esses valores de concentração de HI foram utilizados partindo-se do valor de IC_{50} igual a $0,044 \pm 0,01 \mu\text{mol L}^{-1}$ para HEp-2 na

monocamada. A dose utilizada foi de 10 J cm^{-2} , com LED 590 nm. Vale ressaltar, que a vazão utilizada para perfusão de nutrientes (meio de cultura celular) e de hipericina no canal de crescimento celular foi de $2 \mu\text{L min}^{-1}$.

A Figura 18 apresenta as imagens obtidas por microscopia de fluorescência 4 h após tratamento com terapia fotodinâmica das células HEp-2.

Figura 18 – Imagens obtidas por microscopia de fluorescência de HEp-2 na plataforma microfluídica de cultura 4 h após TFD com perfusão de HI por 2 h a uma vazão de $2 \mu\text{L min}^{-1}$. a) HEp-2 escuro; b) HEp-2 claro; c) HEp-2 HI $0,088 \mu\text{mol L}^{-1}$ escuro; d) HEp-2 HI $0,022 \mu\text{mol L}^{-1}$ claro; e) HEp-2 HI $0,044 \mu\text{mol L}^{-1}$ claro; f) HEp-2 HI $0,088 \mu\text{mol L}^{-1}$ claro. Irradiação em $590 \pm 10 \text{ nm}$ ($8,4 \text{ mW cm}^{-2}$), por 20 min e dose 10 J cm^{-2}

Para quantificação, as células foram contadas com auxílio do software *imageJ*, utilizado para processamento e extração de informações em imagens biológicas (HELMY; AZIM, 2012). O *imageJ* consegue destacar por meio do contraste das cores, as células presentes em cada imagem. Assim, ele evidenciou e delimitou a partir de uma coloração especificada, neste caso as células vivas em coloração verde, as necróticas em vermelho e as apoptóticas em tom alaranjado, o contorno de cada célula e, conseqüentemente, quantificou, aproximadamente, o número de células vivas e mortas presentes em cada análise, como apresentado nas Figura 19.

Pelas imagens obtidas, pode-se observar que a medida que se aumentou a concentração de hipericina e as células foram irradiadas, houve uma diminuição significativa do número de células, quando comparadas ao controle no escuro. Na concentração de hipericina $0,022 \mu\text{mol L}^{-1}$ e luz a viabilidade celular diminuiu 12%. Para a concentração $0,044 \mu\text{mol L}^{-1}$ a viabilidade foi de 40% e na maior concentração utilizada $0,088 \mu\text{mol L}^{-1}$ a morte celular atingiu 94%. Tais respostas sugerem que o tratamento com TFD-HI nas células HEp-2 no modelo de cultura microfluídica foi eficiente nas condições já citadas, uma vez que foram observadas aumento da morte celular com o aumento da concentração do fotossensibilizador.

Figura 19 – Porcentagem do número de células HEp-2 vivas, em processos de necrose e apoptose em plataforma microfluídica de cultura 4 h após TFD com perfusão de HI por 2 h a uma vazão de $2 \mu\text{L min}^{-1}$. a) HEp-2 escuro; b) HEp-2 claro; c) HEp-2 HI $0,088 \mu\text{mol L}^{-1}$ escuro; d) HEp-2 HI $0,022 \mu\text{mol L}^{-1}$ claro; e) HEp-2 HI $0,044 \mu\text{mol L}^{-1}$ claro; f) HEp-2 HI $0,088 \mu\text{mol L}^{-1}$ claro. Irradiação em $590 \pm 10 \text{ nm}$ e dose 10 J cm^{-2}

Fazendo uma análise das imagens microscópicas, bem como dos gráficos obtidos com auxílio do *imageJ* foi possível inferir que não houve detecção de morte celular por necrose. Por outro lado, houve maior predominância de células em processo de apoptose após TFD, o que era esperado.

Para a terapia fotodinâmica, os dois tipos principais de morte celular são necrose e apoptose (CASTANO; DEMIDOVA; HAMBLIN, 2005). A necrose é caracterizada por um processo patológico que ocorre quando há dano às membranas, no qual as enzimas lisossômicas entram no citoplasma, destroem as organelas e levam a uma inflamação celular (BARATHAN et al., 2013; ELMORE, 2007). Os processos de apoptose podem começar de duas formas: via extrínseca (citoplasmática) ou via intrínseca (mitocondrial). Como descrito na literatura após a terapia fotodinâmica observa-se que os fotossensibilizadores acumulam preferencialmente nas mitocôndrias e após a irradiação, levam as células cancerígenas à apoptose (OLEINICK; MORRIS; BELICHENKO, 2002). A apoptose ocasiona a eliminação das células indesejáveis e impede o crescimento celular descontrolado. Os resultados obtidos mostraram uma predominância de morte por apoptose o que é favorável ao uso em TFD, além de mostrarem que é possível a realização da TDF no modelo proposto. Entretanto, outros estudos com outras linhagens celulares devem ser realizados, uma vez que a eficiência dessa terapia depende do tipo de célula estudada (JASTRZEBSKA et al., 2015).

Muitos estudos apresentam a utilização de sistemas microfluídicos de cultura de células para estudos com terapia fotodinâmica. Em 2015, Lou et al. propôs um microchip que consistia em vidro dimetilsiloxano (PDMS) para estudos de TFD de alto rendimento em células de glioma (C6). O modelo de alto rendimento foi construído para gerar nove gradientes de níveis de oxigênio, criando nove

concentrações de FS (azul de metileno) simultaneamente e permitiu que 1000 condições diferentes fossem testadas em paralelo. Em 2015, em trabalho publicado por JASTRZEBSKA et al. (2015) foi proposta uma plataforma microfluídica de PDMS para estudo de TFD utilizando três tipos de culturas celulares: monocultura, co-cultura e cultura mista. Os resultados obtidos pelos autores comprovaram que a plataforma microfluídica desenvolvida foi uma eficiente alternativa para estudos de TFD.

Em outro trabalho publicado por Jastrzebska et al. (2016), os autores pesquisaram a entrega de FSs hidrofóbicos nanoencapsulados (IR-780) para linhagem não tumoral de fibroblasto humano (MRC-5) e células de adenocarcinoma de pulmão (A549) cultivadas em um dispositivo microfluídico de PDMS e vidro. Jedrych et al. (2011) descreveu um sistema microfluídico desenvolvido a base de vidro e PDMS para avaliar a eficiência da TFD em células de adenocarcinoma de pulmão (A549). A geometria da plataforma apresentada no trabalho permitia realizar ensaios com diferentes concentrações de um precursor de FS (o ALA) em um único ensaio. A viabilidade celular da linhagem A549 foi determinada 24 h após o procedimento de TFD com LED 625 nm. As células cultivadas em placa de petri apresentaram-se mais sensíveis a TFD do que aquelas cultivadas no microchip.

Desse modo, é possível afirmar que as plataformas microfluídicas surgem como uma tecnologia que possibilita a realização de cultura de células nesses sistemas de microescalas, bem como a realização de estudos de FSs com terapia fotodinâmica e permitem a variação dos diferentes parâmetros aplicados na mesma, como dose de luz, tempo de incubação e concentração dos fotossensibilizadores.

5 CONCLUSÕES

Nesse estudo foi realizado o desenvolvimento de duas tecnologias para o cultivo de células: modelo de cultura tridimensional de células e plataforma de cultura celular microfluídica. O suporte de colágeno utilizado para construção do modelo de cultura tridimensional de células exibiu alta porosidade com poros interconectados e distância média adequada para permeação das células entre os canais. Os ensaios de citotoxicidade realizados utilizando o método de difusão em ágar e o método do MTT comprovaram que o biomaterial utilizado é biocompatível podendo ser empregado para o desenvolvimento de um modelo de cultura tridimensional (3D). Durante sete dias foi possível verificar a viabilidade da HEp-2 no modelo tridimensional bem como na cultura bidimensional (2D), indicando que no modelo 3D as células cresceram continuamente. As condições de exposição aos nutrientes e oxigênio são menos favoráveis no modelo 3D devido à arquitetura do suporte de colágeno. Nos ensaios de TFD nos dois modelos (2D e 3D), mantendo-se a dose de luz e o tempo de incubação com hipericina constantes, a viabilidade celular diminuiu de acordo com o aumento da concentração da hipericina. Além disso, as células HEp-2 em cultura 2D apresentaram-se mais sensíveis ao tratamento com terapia fotodinâmica do que as células em cultura 3D, o que pode ser explicado devido ao fato de que as células em cultura bidimensional são expostas de maneira uniforme ao fotossensibilizador, à luz, bem como ao mesmo nível de oxigênio, diferentemente do que ocorre no modelo tridimensional.

Após montagem da plataforma microfluídica de cultura celular, pôde-se confirmar que é possível a adesão e proliferação celular da HEp-2 na plataforma. Mesmo após 24 h com perfusão de meio de cultura as células apresentaram-se capazes de permanecer aderidas e em multiplicação. A plataforma microfluídica

possibilitou a realização de cultura celular nesse sistema de microescala e permitiu o estudo do tipo de morte celular após terapia fotodinâmica com hipericina e células HEp-2.

O processo de fabricação do suporte de colágeno utilizado como matriz para cultura tridimensional de células e microfabricação da plataforma microfluídica de cultura de células requer o uso de materiais distintos, o custo de ambos os modelos, quando comparados a modelos comerciais disponíveis pode ser considerado baixo, pois o colágeno utilizado no modelo 3D foi obtido de restos de animais de abate e o material utilizado na plataforma microfluídica é em sua maioria adaptado. O tempo dispendido para obtenção das duas tecnologias propostas foram diferentes. Enquanto o modelo 3D necessitou de três meses de preparação, a plataforma microfluídica pode ser preparada em cerca de duas semanas.

Nos dois métodos foi possível a proliferação celular, porém a análise quantitativa no modelo 3D é simples, pois pode ser utilizado o método MTT. Já na plataforma microfluídica, a análise quantitativa é mais complexa e menos precisa.

Portanto, pode-se concluir que é possível a realização de estudos de terapia fotodinâmica no modelo de cultura tridimensional bem como na plataforma microfluídica de cultura de células, podendo ser esses modelos uma interessante ferramenta para estudos de agente terapêuticos utilizados no tratamento de diversas doenças como o câncer.

6 Sugestões para trabalhos futuros

Como visto anteriormente, foi possível a realização de estudos de TFD no modelo de cultura tridimensional (3D) bem como na plataforma microfluídica de cultura de células. Entretanto, outros ensaios podem ser realizados sugerindo-se para a continuidade desse estudo:

- Realizar ensaios de TFD no *scaffold* e na plataforma microfluídica variando as condições, como: dose de luz, concentração do fotossensibilizador e tempo de incubação.
- Realizar ensaios de TFD no *scaffold* e na plataforma microfluídica utilizando outros fotossensibilizadores e outras linhagens tumorais, tais como: MCF-7 (células de adenocarcinoma de mama humano)
- Realizar análises histológicas no modelo tridimensional após tratamento com TFD
- Determinar o tipo de morte celular nos dois modelos de cultura por microscopia confocal de fluorescência após aplicação da HI-TFD
- Determinar a produção de ROS na plataforma microfluídica por microscopia de fluorescência.
- Desenvolver um modelo de co-cultura microfluídica e avaliar os efeitos da TFD nas células

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- A.ADISSU, H.; K.ASEM, E.; LELIÈVRE, S. A. Three-Dimensional Cell Culture to Model Epithelia in the Female Reproductive System. **The Society for gynecologic Investigation**, v. 14, p. 11–19, 2007.
- ABRAHAMSE, H.; HAMBLIN, M. R. New photosensitizers for photodynamic therapy. **The Biochemical journal**, v. 473, n. 4, p. 347–364, fev. 2016.
- AGOSTINIS, P. et al. Hypericin in cancer treatment: more light on the way. **The International of biochemistry & Cell Biology**, v. 34, p. 221–241, 2002.
- AGOSTINIS, P. et al. PHOTODYNAMIC THERAPY OF CANCER: AN UPDATE. **Photodynamic Therapy of Cancer**, v. 61, n. 4, p. 250–281, 2011.
- ALBERTS, B. et al. **Molecular Biology of the Cell**. 4. ed. New York: Garland Science, 2002.
- ALBERTS, B. et al. **Molecular Biology of the Cell**. [s.l.] Taylor & Francis Group, 2014.
- ALEMANY-RIBES, M.; BUSOM, M. Toward a 3D Cellular Model for Studying In Vitro the Outcome of Photodynamic Treatments: Accounting for the Effects of Tissue Complexity. **Tissue engineering. Part A**, v. 19, p. 1665–1674, 2013.
- AMELIAN, A. et al. Application of standard cell cultures and 3D in vitro tissue models as an effective tool in drug design and development. **Pharmacological Reports**, v. 69, n. 5, p. 861–870, 2017.
- ANDRADE, A.; PINTO, SC., A.; OLIVEIRA, R. Etica na Experimentação Animal. **Scielo Books**, p. 388, 2002.
- ARORA, T. et al. Substitute of Animals in Drug Research: An Approach Towards Fulfillment of 4R's. **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 73, n. 1, p. 1–6, 2011.
- BANERJEE, S. M. et al. Photodynamic therapy: Inception to application in breast cancer. **The Breast**, v. 31, p. 105–113, 2017.
- BARATHAN, M. et al. Hypericin-photodynamic therapy leads to interleukin-6 secretion by HepG2 cells and their apoptosis via recruitment of BH3 interacting-domain death agonist and caspases. **Cell Death and Disease**, v. 4, n. 6, p. e697–10, 2013.
- BERNAL, C. **Hipericina, photodithazine e photogemum estudo comparativo da atividade fotodinâmica**. [s.l.] Universidade de São Paulo, 2011.
- BERNAL, C. et al. **Photodynamic efficiency of hypericin compared with chlorin and hematoporphyrin derivatives in HEp-2 and Vero epithelial cell lines**, 2015.
- BOYAN, B. D. et al. Role of material surfaces in regulating bone and cartilage cell

response. **Biomaterials**, v. 17, n. 2, p. 137–146, 1996.

BRESLIN, S.; DRISCOLL, L. O. Three-dimensional cell culture : the missing link in drug discovery. **Drug Discovery Today**, v. 18, n. 5-6, p. 240–249, 2013.

CAMI, J.; PONS, J. M. V. Animal experimentation and progress in medicine. **Sciencedirect**, v. 143, n. 10, p. 448–454, 2014.

CASTANO, A. P.; DEMIDOVA, T. N.; HAMBLIN, M. R. Mechanisms in photodynamic therapy: Part three — Photosensitizer pharmacokinetics , biodistribution , tumor localization and modes of tumor destruction. **Photodiagnosis and photodynamic therapy**, v. 1000, p. 91–106, 2005.

CASTANO, A. P.; DEMIDOVA, T. N.; HAMBLIN, M. R. Mechanisms in photodynamic therapy: part one— photosensitizers, photochemistry and cellular localization. **NIH Public Access**, v. 1, n. 4, p. 279–293, 2014.

CERQUEIRA, N. Indústria adere a métodos alternativos Métodos alternativos ainda são poucos e não substituem totalmente o uso de animais. **Ciência e Cultura**, v. 60, n. 2, 2011.

CHAGAS, F. B.; D'AGOSTINI, F. M. Considerações sobre a experimentação animal: Conhecendo as implicações éticas do uso de animais em pesquisas / Considerations for animal experimentation: **Revista Redbioética/UNESCO Red**, v. 2, n. 6, 2012.

CHEN, Y.-C. et al. High-Throughput Cancer Cell Sphere Formation for Characterizing the Efficacy of Photodynamic Therapy in 3D Cell Cultures. **Scientific reports**, v. 5, p. 12175, 2015.

DAI, T. et al. Concepts and Principles of Photodynamic Therapy as an Alternative Antifungal Discovery Platform. **Frontiers in Microbiology**, v. 3, p. 120, 10 abr. 2012.

DHIMAN, H. K.; RAY, A. R.; PANDA, A. K. Three-dimensional chitosan scaffold-based MCF-7 cell culture for the determination of the cytotoxicity of tamoxifen. **Biomaterials**, v. 26, p. 979–986, 2005.

DIDAR, T. F.; TABRIZIAN, M. Adhesion based detection , sorting and enrichment of cells in microfluidic Lab-on-Chip devices. **Lab Chip**, v. 10, p. 3043–3053, 2010.

DIEKJÜRGEN, D.; GRAINGER, D. W. Polysaccharide matrices used in 3D in vitro cell culture systems. **Biomaterials**, v. 141, p. 96–115, 2017.

DOKE, S. K.; DHAWALE, S. C. Alternatives to animal testing : A review. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 23, n. 3, p. 223–229, 2013.

DOUGHERTY, T. J. et al. Photodynamic Therapy. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 90, n. 12, p. 889–905, 1998.

DUVAL, K. et al. Modeling Physiological Events in 2D vs . 3D Cell Culture. **Physiology**, v. 32, p. 266–277, 2017.

EAGLE, H. Amino Acid Metabolism Cell Cultures in Mammalian. **Science**, v. 130, n.

10, 1955.

EDMONDSON, R. et al. Three-Dimensional Cell Culture Systems and Their Applications in Drug Discovery and Cell-Based Biosensors. **ASSAY and Drug Delivery Technologies**, v. 12, n. 4, p. 207–218, 2014.

EKERT, J. E. et al. Three-Dimensional Lung Tumor Microenvironment Modulates Therapeutic Compound Responsiveness In Vitro – Implication for Drug Development. **Plos One**, v. 9, n. 3, p. 1–14, 2014.

ELMORE, S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death Susan. **Toxicology Patology**, v. 35, n. 4, p. 495–516, 2007.

ENK, C. D.; LEVI, A. Low-irradiance red LED traffic lamps as light source in PDT for actinic keratoses. **Photodermatology, Photoimmunology e Photomedicine**, v. 28, p. 332–334, 2012.

ESCH, E. W.; BAHINSKI, A.; HUH, D. Organs-on-chips at the frontiers of drug discovery. **Nature Publishing Group**, v. 14, n. 4, p. 248–260, 2015.

FITZGERALD, K. A. et al. Life in 3D is never flat: 3D models to optimise drug delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 215, p. 39–54, 2015.

FITZPATRICK, L. E.; MCDEVITT, T. C. Cell-derived matrices for tissue engineering and regenerative medicine applications. **Biomaterials Science**, v. 3, n. 1, p. 12–24, 2015.

FOLCH, A. Microengineering of Cellular Interactions. **Revista Biomédica**, v. 2, p. 227–256, 2000.

FRANCA, R. et al. The effect of ethylene oxide sterilization on the surface chemistry and in vitro cytotoxicity of several kinds of chitosan. **Journal of biomedical materials research. Part B, Applied biomaterials**, jun. 2013.

FRESHNEY, R. I. **Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications**. [s.l.] John Wiley & Sons, Inc., 2015.

GHAEMMAGHAMI, A. M. et al. Biomimetic tissues on a chip for drug discovery. **Drug Discovery Today**, v. 17, n. 3-4, p. 173–181, 2011.

GONÇALVES, C. R.; CRUZ, Á. S. Citotoxicidade de tubos de PVC esterilizados em óxido de etileno após exposição à radiação gama. **Revista Esc Enfermagem**, v. 47, p. 494–499, 2013.

GUEDES, R. C.; ERIKSSON, L. A. Theoretical study of hypericin. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, v. 172, n. 3, p. 293–299, 2005.

GUIMARÃES, L. et al. Comparative evaluation of photodynamic therapy using LASER or light emitting diode on cariogenic bacteria: An in vitro study. **European Journal of Dentistry**, v. 8, n. 4, p. 509–514, 2014.

GUIMARÃES, M. V. et al. Utilização de animais em pesquisas: breve revisão da

legislação no Brasil. **Revista Biomédica**, v. 24, p. 217–224, 2016.

HARRIS, A. L. Hypoxia--a key regulatory factor in tumour growth. **Nature reviews. Cancer**, v. 2, n. 1, p. 38–47, jan. 2002.

HELMY, I. M.; AZIM, A. M. A. Efficacy of ImageJ in the assessment of apoptosis. **Diagnostic Pathology**, v. 7, n. 1, p. 15, 2012.

HIRSCHHAEUSER, F. et al. Multicellular tumor spheroids: an underestimated tool is catching up again. **Journal of biotechnology**, v. 148, n. 1, p. 3–15, jul. 2010.

HO, W. J. et al. Incorporation of multicellular spheroids into 3-D polymeric scaffolds provides an improved tumor model for screening anticancer drugs. **Cancer Science**, v. 101, n. 12, p. 2637–2643, 2010.

INCA, I. N. DE C.-. **O que é câncer**. Disponível em: <<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/cancer/site/oquee>>. Acesso em 22 jan 2017.

ISO document 10993-5:1999, **Biological evaluation of medical devices**, Part 5, Tests for cytotoxicity: in vitro methods.

JASTRZEBSKA, E. et al. Analysis of the efficiency of photodynamic therapy using a microsystem for mono-, co- and mixed cultures. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 221, p. 1356–1365, 31 dez. 2015.

JASTRZEBSKA, E. et al. Microfluidic platform for photodynamic therapy cytotoxicity analysis of nanoencapsulated indocyanine-type photosensitizers. **biomicrofluidics**, v. 014116, p. 1–15, 2016.

JEDRYCH, E. et al. Evaluation of photodynamic therapy (PDT) procedures using microfluidic system. **Analytica Chimica Acta**, v. 683, n. 2, p. 149–155, 2011.

JONIOVA, J. et al. Kinetics of incorporation/redistribution of photosensitizer hypericin to/from high-density lipoproteins. **International journal of pharmaceutics**, v. 475, n. 1-2, p. 578–584, nov. 2014.

KARIMI, M. et al. Microfluidic systems for stem cell-based neural tissue engineering. **Lab on a chip**, v. 16, n. 14, p. 2551–2571, jul. 2016.

KIM, J. BIN. Three-dimensional tissue culture models in cancer biology. **Elsevier Seminars in Cancer Biology**, v. 15, p. 365–377, 2005.

KIM, D.; LIN, Y.-S.; HAYNES, C. L. On-Chip Evaluation of Shear Stress Effect on Cytotoxicity of Mesoporous Silica Nanoparticles. **Analytical Chemistry**, v. 83, n. 22, p. 8377–8382, 15 nov. 2011.

KLEEMANN, B. et al. St John ' s Wort (Hypericum perforatum L .) Photomedicine : Hypericin-Photodynamic Therapy Induces Metastatic Melanoma Cell Death. **Plos One**, v. 9, n. 7, 2014.

LACERDA, C.; PLEPIS, A. M. DE G.; GOISSIS, G. Hidrólise seletiva de

carboxiamidas de resíduos de asparagina e glutamina em colágeno: preparação e caracterização de matrizes aniônicas para uso como biomateriais. **QUÍMICA NOVA**, v. 2, n. 3, p. 267–271, 1998.

LANGER, R.; VACANTI, J. P. Tissue Engineering. **Science**, v. 260, n. 5110, p. 920–926, 1993.

LEE, W. et al. Biomaterials Multi-layered culture of human skin fibroblasts and keratinocytes through three-dimensional freeform fabrication. **Biomaterials**, v. 30, n. 8, p. 1587–1595, 2009.

LIMA, A. M. et al. Hypericin encapsulated in solid lipid nanoparticles: phototoxicity and photodynamic efficiency. **Journal of photochemistry and photobiology. B, Biology**, v. 125, p. 146–154, ago. 2013.

LIN-FANG, H.; ZENG-HUI, W.; SHI-LIN, C. Hypericin: chemical synthesis and biosynthesis. **Chinese Journal of Natural Medicines**, v. 12, n. 2, p. 81–88, 2014.

LING, M. HUI. **Estudo Comparativo da Eficiência fotodinamica da hipericina e da curcumina em células tumorais**. [s.l.] Universidade de São Paulo, 2016.

LOUA, X. et al. A High-Throughput Photodynamic Therapy Screening Platform with On-Chip Control of Multiple Microenvironmental Factors. **Lab chip**, v. 14, n. 5, p. 892–901, 2015.

MEHTA, G. et al. Opportunities and challenges for use of tumor spheroids as models to test drug delivery and efficacy. **Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society**, v. 164, n. 2, p. 192–204, dez. 2012.

MIRMALEK, S. A. et al. Cytotoxic and apoptogenic effect of hypericin , the bioactive component of *Hypericum perforatum* on the MCF-7 human breast cancer cell line. **Cancer Cell International**, v. 16, p. 1–9, 2016.

MOHAMMAD-HADI, L. et al. Photodynamic therapy in 3D cancer models and the utilisation of nanodelivery systems. **Nanoscale**, v. 10, p. 1570–1581, 2018.

MORITZ, M. N. O. et al. Semi-synthesis and PDT activities of a new amphiphilic chlorin derivative. **Photodiagnosis and photodynamic therapy**, v. 17, p. 39–47, 2017.

MORIYA, G. A. D. A. et al. Métodos de esterilização a baixa temperatura. **Enfermagem CME**, p. 1–16, 2011.

MOSMANN, T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, p. 55–63, 1983.

NYGA, A.; CHEEMA, U.; LOIZIDOU, M. 3D tumour models: novel in vitro approaches to cancer studies. **Springer**, v. 5, p. 239–248, 2011.

OLEINICK, N. L.; MORRIS, R. L.; BELICHENKO, I. The role of apoptosis in response to photodynamic therapy: what , where , why , and how. **Photochemical and**

photobiological Sciences, n. 1, p. 1–21, 2002.

OLIVEIRA, L. S. DE A. F. et al. Biomateriais com aplicação na regeneração óssea—método de análise e perspectivas futuras. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v. 9, p. 37–44, 2010.

ONISZCZUK, A. et al. The potential of photodynamic therapy (PDT) — Experimental investigations and clinical use. **Biomedicine et Pharmacotherapy**, v. 83, p. 912–929, 2016.

PACHECO, G. F. E.; SAAD, F. M. O. B.; TREVISAN, L. ASPECTOS ÉTICOS NO USO DE ANIMAIS DE PRODUÇÃO EM EXPERIMENTAÇÃO CIENTÍFICA. **Acta Veterinaria**, v. 6, n. 2012, p. 2012, 2015.

PARAMESH, V. et al. 3D Cell Culture Systems: Advantages and Applications. **Journal of Journal of Cellular PhysiologyPhysiology**, n. May 2014, p. 16–26, 2015.

PAVESI, A. et al. Engineering a 3D microfluidic culture platform for tumor-treating field application. **Scientific reports**, v. 6, p. 26584, maio 2016.

PERUSSI, J. R. INATIVAÇÃO FOTODINÂMICA DE MICRORGANISMOS. **Quimica Nova**, v. 30, n. 4, p. 988–994, 2007.

PIERSMA, A. H. Alternative Methods for Developmental Toxicity Testing. **Pharmacology & Toxicology**, v. 98, p. 427–431, 2006.

RAMIER, J. et al. Biocomposite scaffolds based on electrospun poly (3-hydroxybutyrate) nano fi bers and electrosprayed hydroxyapatite nanoparticles for bone tissue engineering applications. **Materials Science & Engineering C**, v. 38, p. 161–169, 2014.

RIBBLE, D. et al. A simple technique for quantifying apoptosis in 96-well plates. **BMC Biotechnology**, v. 7, p. 1–7, 2005.

RIMANN, M.; GRAF-HAUSNER, U. Synthetic 3D multicellular systems for drug development. **Current opinion in biotechnology**, v. 23, n. 5, p. 803–809, out. 2012.

RISS, T. L. et al. Cell Viability Assays. **Assay Guiance Manual**, p. 1–31, 2016.

RIVERA, E. A. B. et al. Etica na Experimentação Animal. 2002.

ROGERO, S. O. et al. Teste in vitro de citotoxicidade: estudo comparativo entre duas metodologias. **Materials Research**, v. 6, p. 317–320, 2003.

SCHMALZ, G.; LANGER, H.; SCHWEIKL, H. Cytotoxicity of Dental Alloy Extracts and Corresponding Metal Salt Solutions. **Journal of Dental Research**, v. 77, n. 10, p. 1772–1778, 1998.

SCHMITT, L. A. et al. Reduction in hypericin-induced phototoxicity by Hypericum perforatum extracts and pure compounds. **Journal of photochemistry and photobiology. B, Biology**, v. 85, n. 2, p. 118–130, nov. 2006.

SHARMA, S. K. et al. Photodynamic Therapy for Cancer and for Infections : What Is. **Isr J Chem Journal**, v. 52, p. 691–705, 2013.

SIMÃO, D. et al. Sistemas de cultura 3D para diferenciação neural de células estaminais humanas. **Boletim de Biotecnologia**, 2013.

STEELMAN, V. M. Ethylene Oxide. **Aorn Journal**, v. 55, n. 3, p. 773–787, 1992.

STOCKERT, J. C. et al. MTT assay for cell viability: Intracellular localization of the formazan product is in lipid droplets. **Acta histochemica**, v. 114, n. 8, p. 785–796, dez. 2012.

SZOT, C. S. et al. 3D in vitro bioengineered tumors based on collagen I hydrogels. **Biomaterials**, v. 32, n. 31, p. 7905–7912, 2011.

TANG, Z. G.; HUNT, J. A. The effect of PLGA doping of polycaprolactone films on the control of osteoblast adhesion and proliferation in vitro. **Biomaterials**, v. 27, p. 4409–4418, 2006.

TEHRANIROKH, M. et al. Microfluidic devices for cell cultivation and proliferation. **Biomicrofluidics**, v. 7, n. 5, p. 51502, 29 set. 2013.

TORISAWA, Y. et al. A multicellular spheroid array to realize spheroid formation , culture , and viability assay on a chip. **Biomaterials**, v. 28, p. 559–566, 2007.

TUNG, Y.-C. et al. High-throughput 3D spheroid culture and drug testing using a 384 hanging drop array. **Analyst**, v. 136, n. 3, 2011.

URBACZEK, A. C. et al. Endothelial Cell Culture Under Perfusion On A Polyester-Toner Microfluidic Device. **Scientific reports**, n. 2016, p. 1–12, 2017.

WANG, C. et al. Three-dimensional in vitro cancer models: a short review. **Biofabrication**, v. 6, p. 1–9, 2014.

WANG, C.; CHENG, L.; LIU, Z. Upconversion nanoparticles for photodynamic therapy and other cancer therapeutics. **Theranostics**, v. 3, n. 5, p. 317–330, 2013.

WIEGELL, S. R. et al. Continuous ultra-low-intensity artificial daylight is not as effective as red LED light in photodynamic therapy of multiple actinic keratoses. **Photodermatology, Photoimmunology e Photomedicine**, n. May 2009, p. 280–285, 2011.

WU, J. et al. Biochemical analysis on microfluidic chips. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 80, p. 213–231, 2016.

WU, J. et al. Recent advances in microfluidic 3D cellular scaffolds for drug assays. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 87, p. 19–31, fev. 2017.

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.

XU, Y. et al. Hypericin-mediated photodynamic therapy induces apoptosis in K562 human leukemia cells through JNK pathway modulation. **Molecular Medicine Reports**, p. 6475–6482, 2015.

YOUNG, E. W. K.; BEEBE, D. J. Fundamentals of microfluidic cell culture in controlled microenvironments. **Chemical Society Reviews**, v. 39, n. 3, 2010.

YU, H. et al. Improved tissue-engineered bone regeneration by endothelial cell mediated vascularization. **Biomaterials**, v. 30, n. 4, p. 508–517, 2009.

ZHANG, Q. et al. Pore size effect of collagen scaffolds on cartilage regeneration. **Acta Biomaterialia**, v. 10, n. 5, p. 2005–2013, 2014.

ZHANG, Q. et al. Hypericin-photodynamic therapy induces human umbilical vein endothelial cell apoptosis. **Scientific reports**, v. 5, p. 18398, dez. 2015.

ZHANG, X. et al. Development of an in Vitro Multicellular Tumor Spheroid Model Using Microencapsulation and Its Application in Anticancer Drug Screening and Testing. **Biotechnol. Prog**, v. 21, p. 1289–1296, 2005.

ZHANG, Y. et al. Switchable PDT for reducing skin photosensitization by a NIR dye inducing self-assembled and photo-disassembled nanoparticles. **Biomaterials**, v. 107, p. 23–32, 2016.

ZHU, J.; MARCHANT, R. E. Design properties of hydrogel tissue-engineering scaffolds. **Expert Review of Medical Devices**, v. 8, n. 5, p. 607–626, 2012.

ZUPPINGER, C. 3D culture for cardiac cells. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1863, n. 7, p. 1873–1881, 2016.