



**INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES**  
Autarquia Associada à Universidade de São Paulo

**Produção de esferóides de adenocarcinoma mamário para testes de  
antitumorais**

**MAYELLE MARIA PAZ LIMA**

**Dissertação apresentada como parte dos  
requisitos do programa de Pós-  
Graduação em Tecnologia Nuclear da  
Universidade de São Paulo para  
obtenção do título de Mestre em Ciências  
na Área de Tecnologia  
Nuclear - Aplicações**

**Orientador: Dr. Daniel Perez Vieira**

**São Paulo  
2023**

**INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES**  
**Autarquia Associada à Universidade de São Paulo**

**Produção de esferóides de adenocarcinoma mamário para testes de  
antitumorais**

**MAYELLE MARIA PAZ LIMA**

**Dissertação apresentada como parte dos  
requisitos do programa de Pós-  
Graduação em Tecnologia Nuclear da  
Universidade de São Paulo para  
obtenção do título de Mestre em Ciências  
na Área de Tecnologia  
Nuclear - Aplicações**

**Orientador: Dr. Daniel Perez Vieira**

**São Paulo**  
**2023**

Fonte de Financiamento: Comissão Nacional de Energia Nuclear (CNEN)

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Como citar:

LIMA, M. M. P. ***Produção de esferóides de adenocarcinoma mamário para testes de antitumorais***. 2023. 127 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Nuclear), Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, IPEN-CNEN, São Paulo. Disponível em: <http://repositorio.ipen.br/> (data de consulta no formato: dd/mm/aaaa)

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de geração automática da Biblioteca IPEN, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Lima, Mayelle Maria Paz  
Produção de esferóides de adenocarcinoma mamário para testes de antitumorais / Mayelle Maria Paz Lima; orientador Daniel Perez Vieira. -- São Paulo, 2023.  
127 f.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Nuclear (Aplicações) -- Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo, 2023.

1. Cultura Tridimensional. 2. Tomografia de Coerência Óptica. 3. Nanopartículas de Ferro. 4. Análise de componentes principais (PCA). 5. Câncer de Mama. I. Vieira, Daniel Perez, orient. II. Título.

## FOLHA DE APROVAÇÃO

**Autor:** Mayelle Maria Paz Lima

**Título:** Produção de esferóides de adenocarcinoma mamário para testes de antitumorais

**Dissertação apresentada como parte dos requisitos do programa de Pós-Graduação em Tecnologia Nuclear da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências**

### Banca Examinadora

**Prof. Dr.:** Daniel Perez Vieira

Instituição: IPEN

Julgamento: Aprovado

**Prof. Dr.:** Hugo Pequeno Monteiro

Instituição: Universidade Federal de São Paulo - UNIFESP

Julgamento: Aprovado

**Prof. Dr.(a):** Raphael Caio Tamborelli Garcia

Instituição: Universidade Federal de São Paulo - UNIFESP

Julgamento: Aprovado

**O sentido da vida,  
não tem que saber  
O sentido da vida  
é continuar.**

**Inventar maratonas, mil metros  
obstáculos  
para depois acordar cada dia  
sem meta, sem nada.**

(A axila de Egon Schiele - André Tecedeiro)

## AGRADECIMENTOS

À minha mãe Juvenilda, que abdicou de muitas coisas em sua vida para me ver crescer. Ao meu pai Ednou, que me aconselhou a nunca desistir. Aos meus irmãos Maycon e Priscila, que me deram sempre muito amor e estiveram do meu lado todas as vezes que pensei em desistir, gratidão. À minha tia Maria, que sempre tenta fazer coisas para me ver sorrir, espero retribuir com orgulho. À minha avózinha de criação e coração Eunice, que me ensinou a não fechar os olhos para os problemas e enfrentar tudo com coragem, obrigada por acreditar em mim.

À minha querida amiga Bruna Fontana, que está comigo desde a época da escola. A minha psicóloga, Isabella Lopes por cuidar da minha saúde mental. Agradeço imensamente às minhas amigas Priscila Passos, Leticia Bonfim e Alissandra Gomes, que sempre tem carinho e paciência quase infinitos comigo, sempre me ensinando e me ajudando em momentos de aflição. À Karina Gonçalves, por todo o apoio. Aos meus colegas Leonardo, João, Giovana e Ana Cristina que fizeram parte dos dias que viraram noite no laboratório, que me fizeram companhia em dias difíceis e transformaram em dias felizes. As minhas amigas Stephanie Pomin e Larissa Almeida, por sempre torcerem por mim com amor e companheirismo. À Miriam Suzuki, ao Paolo Bartolini e ao Patrick Spencer pelas conversas reflexivas.

À Eliana Lima, que conheci como uma amiga mas me acolheu como uma irmã, obrigada por sempre ser tão forte. À Emely Rocha, que sempre me escutava e tentava me ajudar com noções estatísticas. À Amanda Baptista, que sempre me escutou tagarelar sobre meu tema, mesmo que não entendesse muito e me animava quando eu pensava em desistir. À Cecília Say, que me ensinou noções básicas de design, acredite mudou minha vida. À Thais Barros, que fez com que as minhas aulas de cálculo fossem mais divertidas. À Paula Maria, que conheci enquanto fazia monitoria e se tornou uma grande amiga. Ao Ricardo Ianelli, por me ensinar a ter paciência mesmo quando não merecem. Às minhas amigas do biotério, que sempre tiveram muito respeito por mim e carinho imenso, Neide Ferreira e Ismária Reis; à Eliana Godoi, que sempre me tratou como uma filha, gratidão. Ao Alex Rodrigues que me deu esperança em meio ao caos da vida acadêmica.

Ao meu orientador, Daniel Perez, que me aceitou no grupo em 2018 no início dessa jornada acadêmica. À Solange Sakata, ao Rene Ramos e ao Anderson Zanatta, pelas colaborações e o carinho que sempre tiveram comigo. E por fim, à Comissão de Energia Nuclear – CNEN pelo apoio financeiro.

## RESUMO

Lima, M.M.P. **Produção de esferóides de adenocarcinoma mamário para testes de antitumorais**. 2023. X f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Nuclear) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN-CNEN/SP. São Paulo

O câncer de mama é considerado uma doença de origem multifatorial, tendo uma maior incidência em pessoas do sexo feminino, e a forma mais letal dessa enfermidade se dá na sua progressão metastática. Dada à sua alta incidência, tem sido objeto de estudo por diversos anos e mesmo assim, alguns mecanismos responsáveis pelas causas e consequências da doença ainda precisam ser esclarecidos. A construção de um modelo *in vitro* que consiga demonstrar de maneira mais fidedigna possível as condições encontradas *in vivo* requer a produção de uma série de complexidades, que, por muitas vezes, transcende várias áreas do conhecimento. Neste contexto, o presente trabalho utilizou a cultura tridimensional por agregação magnética para a construção de um modelo que mostrasse de maneira minimamente satisfatória condições para estudar comportamentos celulares presentes no ambiente tumoral relativos à morte e duplicação celular. Desta maneira, foram utilizadas nanopartículas de óxido de ferro funcionalizadas para utilização na cultura em esferóides tumorais contendo linhagem celular de adenocarcinoma de mama (MCF7) e fibroblasto humano (HF002-J) em sua estrutura. Os esferóides foram divididos em categorias de concentração de cada linhagem e após um processo de triagem as concentrações com maior estabilidade foram irradiadas ou receberam doses de fármaco com atividade antitumoral conhecida para tratamento. Os modelos foram estudados por meio de ensaios de citotoxicidade, tomografia de coerência óptica (OCT) e microscopia de fluorescência. As nanopartículas foram analisadas por DRX e MET. Os resultados obtidos foram processados em simulações de geração de variáveis correlacionadas em componentes principais utilizando distributiva de dados (Análise Paralela, Regra de Kaiser, Análise dos Componentes Principais) e Machine learning para estimar principais funções de controle dentro do modelo escolhido pode ser usado para estudos *in vitro* deste tipo de câncer de mama.

Palavras chave: Cultura Tridimensional, Câncer, Tomografia de Coerência Óptica, Nanopartículas de Ferro, Citotoxicidade, Machine Learning, PCA, DRX, MET.

## ABSTRACT

Lima, M.M.P. **Production of spheroids from breast adenocarcinoma for antitumor testing. 2023. X f.** Dissertação (Mestrado em Tecnologia Nuclear) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN-CNEN/SP. São Paulo

Breast cancer is considered a multifactorial disease, with a higher incidence in females, and its most lethal form occurs during metastatic progression. Due to its high prevalence, it has been the subject of study for many years, yet some mechanisms responsible for the causes and consequences of the disease still need clarification. The construction of an in vitro model that can accurately demonstrate the conditions found in vivo requires the production of a series of complexities that often transcend various areas of knowledge. In this context, the present study employed three-dimensional culture by magnetic aggregation to build a model that minimally satisfactorily represented conditions for studying cellular behaviors present in the tumor environment related to cell death and duplication. Thus, functionalized iron oxide nanoparticles were used for culturing tumor spheroids containing breast adenocarcinoma cell line (MCF7) and human fibroblast (HF002-J) within their structure. The spheroids were divided into concentration categories for each cell line, and after a screening process, the concentrations with greater stability were irradiated or received doses of a drug with known antitumor activity for treatment. The models were studied through cytotoxicity assays, optical coherence tomography (OCT), and fluorescence microscopy. The nanoparticles were analyzed by X-ray diffraction (DRX) and transmission electron microscopy (MET). The obtained results were processed in simulations of generating correlated variables in principal component analysis using data distribution (Parallel Analysis, Kaiser's Rule, Principal Component Analysis) and machine learning to estimate key control functions within the chosen model, which can be used for in vitro studies of this type of breast cancer.

**Keywords:** Three-Dimensional Culture, Cancer, Optical Coherence Tomography, Iron Nanoparticles, Cytotoxicity, Machine Learning, PCA, X-ray Diffraction, TEM.



## LISTA DE TABELAS

|  |    |
|--|----|
| Tabela 1 – Características dos subtipos de câncer de mama.....   | 26 |
| Tabela 2 – Comparação de métodos de cultura celular 2D e 3D.....   | 29 |
| Tabela 3 – Concentrações fracionadas de co-cultura utilizadas.....   | 45 |
| Tabela 4 – Variáveis avaliadas no estudo.....  | 49 |
| Tabela 5 – Variáveis selecionadas a partir das cargas fatoriais e da contribuição para os componentes principais retidos na análise .....  | 81 |
| Tabela 6 – Valores de p das variáveis escolhidas para a RCP das variáveis num modelo múltiplo linear de mínimos quadrados. (*): $p < 0,05$ . (**): $p < 0,001$ . $R^2$ : coeficiente de ajuste linear. MR: coeficiente de correlação múltipla.....               | 83 |
| Tabela 7 – Coeficientes de ajuste da quantidade de núcleos (Hoechst 33342) cada um dos experimentos com diferentes proporções de células MCF7 e HF002-J. $Y_{max}$ : $t_e$ . $T_m:t_m$ . $R^2$ : Coeficiente de ajuste não-linear. P: Diferença estatística..... | 85 |

## LISTA DE FIGURAS

|  |    |
|--|----|
| Figura 1 – Principais cânceres por país, taxas de mortalidade padronizadas para todas as idades estimadas em 2020, para mulheres.....  | 19 |
| Figura 2 – Representação gráfica da mortalidade causada por Doenças e Agravos Não Transmissíveis (DANT) em níveis globais.....   | 24 |
| Figura 3 – Representação da progressão do câncer de mama em mulheres.....  | 25 |
| Figura 4 – Diagrama esquemático da estrutura de um esferóide. Números destacados de 1 a 4 exemplificam as vantagens do modelo.....   | 30 |
| Figura 5 – Esquema ilustrado dos materiais necessários para construção do esferóide por agregação magnética.....   | 32 |
| Figura 6 – Representação estrutural do cristal de magnetita. Onde: Sítio tetraédrico (a.). Sítio octaédrico (b.). Célula unitária (c.). Esquema de $\frac{1}{4}$ da célula unitária da magnetita (d.).....   | 33 |
| Figura 7 – Imagem ilustrativa da nanopartícula de Óxido de Ferro (Magnetita).....  | 36 |
| Figura 8 – Comparação entre diferentes tipos de materiais em análise padrão de DRX onde, (A) representa um material amorfo e (B) um material cristalino.....   | 37 |
| Figura 9 – Espectro de Fluorescência. Diferença entre comprimentos de onda em picos de excitação destacados com linha tracejada e picos de emissão representados por áreas preenchidas. Onde: em azul está representado um fluoróforo (Hoechst 33342) e em verde outro fluoróforo químico (SYTOX Green)..... | 39 |
| Figura 10 – Representação esquemática da aquisição de imagem 3D, onde o plano focal é movido de baixo para cima e as imagens são registradas em níveis de espaçamento controlado pelo eixo Z.....  | 40 |
| Figura 11 – Gráfico de resolução por $\mu\text{m}$ em relação a profundidade de penetração em mm de diferentes modalidades de imagem.....  | 41 |
| Figura 12 – (A) Representação esquemática de uma varredura de OCT. Onde d representa a distância óptica percorrida entre os braços e o divisor de feixes (D.F). (B) Demonstração geométrica da aquisição das imagens 2D para reconstrução 3D.....  | 42 |
| Figura 13 – Difratoograma de raios X da amostra de nanopartículas de óxido de ferro sintetizadas com Glicina (Gly) como surfactante e funcionalizadas com Poli-L-lisina (PLL). Os números acima dos picos referem-se aos planos cristalinos encontrados nas amostras.....                                    | 52 |
| Figura 14 – Imagens de Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) de  |    |

nanopartículas de óxido de ferro sintetizadas com Glicina (Gly) como surfactante e funcionalizadas com Poli-L-lisina (PLL).....53

Figura 15 – Avaliação do crescimento dos esferóides. Fotomicrografias obtidas por microscopia de fluorescência no equipamento INCell Analyzer 2500 HS (Cytiva Lifesciences) por oito dias em placa de 96 poços com SYTOX® Green (verde) indicando núcleos de células mortas e Hoechst 33342 (azul) indicando núcleos viáveis. Barra de 200 µm.....54

Figura 16 – Quantidades de células mortas (A) e volume dos esferóides (B) de MCF7 irradiados a 2Gy. Barras: erro padrão das médias. (\*):  $p < 0,05$ . (\*\*\*):  $p < 0,001$ . (\*\*\*\*):  $p < 0,0001$ . (ns): não significativa em relação ao controle (24h).....55

Figura 17 – Citotoxicidade de concentrações de SDS em esferóides de MCF7. Barras: erro padrão das médias. (\*\*\*\*):  $p < 0,0001$ . Medida de significância estatística relacionada ao grupo controle (CC).....56

Figura 18 – Citotoxicidade de concentrações de MTMC em esferóides de MCF7 (A) Barras: erro padrão das médias. (\*\*\*\*):  $p < 0,0001$ . Citotoxicidade de concentrações de DMSO em esferóides de MCF7 (B) Barras: erro padrão das médias. (\*\*\*\*):  $p < 0,0001$ . (\*):  $p < 0,05$ . C. Medida de significância estatística relacionada ao grupo controle (CC).....57

Figura 19 – (A) Segmentação de esferóides fracionados MCF7/HF002-J, reconstrução OCT. Amostragem observada: células (azul), meio de cultura (amarelo) e Background (roxo). (B) Área dos esferóides ( $\mu\text{m}^2$ , eixo y) em função da porcentagem de MCF7 utilizada (% , eixo x). (C) Volume dos esferóides ( $\mu\text{m}^3$ , eixo y) em função da porcentagem de MCF7 (% , eixo x).....58

Figura 20 – Imagens de OCT reconstrução volumétrica de esferóides fracionados de MCF7/HF002-J. Escala de 10 µm. QR Code: link do YouTube para uma playlist contendo as animações de cada uma das reconstruções.....59

Figura 21 – Comparação entre imagens LIV de esferóides fracionados MCF7/HF002-J. Escala colorimétrica de 5 cores, branco, amarelo, laranja, vermelho e preto, onde o branco representa o maior sinal e preto o menor sinal detectado na imagem. Barra de escala 20 µm.....60

Figura 22 – Avaliação do crescimento dos esferóides. Fotomicrografias obtidas por microscopia de fluorescência no equipamento INCell Analyzer 2500 HS (Cytiva Lifesciences) por oito dias (1, 2, 3, 4,5,6,7 e 8) em placa de 96 poço com SYTOX® Green (verde) indicando núcleos de células mortas e Hoechst 33342 (azul) indicando núcleos viáveis. Barra de 200 µm.....61

Figura 23 – Gráfico de porcentagens de mortalidade (núcleos inviáveis, positivos para SYTOX® Green) em esferóides formados por proporções diferentes de MCF7 e HF002-J ao longo dos dias de experimento. Concentrações referentes a fração MCF7/HF002-J.....62

Figura 24 – Volumes dos esferóides em função dos dias em cultura. Concentrações

|   |    |
|---|----|
| referentes a fração MCF7/HF002-J.....   | 63 |
| Figura 25 – Gráficos de controle de volume dos núcleos totais em função dos dias em cultura. Concentrações referentes a fração MCF7/HF002-J. Barras: erros padrão das médias. (*) $p < 0,05$ . (**) $p < 0,01$ . (***) $p < 0,001$ . (****): $p < 0,0001$ em relação ao controle (Dia 1).....   | 64 |
| Figura 26 – Gráficos de controle de volume dos núcleos de células inviáveis em função dos dias em cultura. Concentrações referentes a fração MCF7/HF002-J. Barras: erros padrão das médias.(*) $p < 0,05$ . (**) $p < 0,01$ . (***) $p < 0,001$ . (****): $p < 0,0001$ em relação ao controle (Dia 1).....  | 65 |
| Figura 27: Gráfico de correlação com coeficientes de Pearson entre os componentes principais (PC) gerados livremente e as cargas fatoriais calculadas das variáveis do trabalho. A linha tracejada delimita o último componente que apresenta um coeficiente de correlação significativamente diferente de 0.....                                 | 68 |
| Figura 28 – Proporções da variância, individuais e cumulativas, de todos os componentes principais obtidos na primeira análise ACP. Linha tracejada: 95% da variância. Valores acima das barras: porcentagens cumulativas. Valores acima dos pontos: porcentagens individuais.....  | 70 |
| Figura 29 – Autovalores de cada um dos componentes principais obtidos. Números acima dos pontos: Valores dos autovalores. Área cinza: delimitação da área do gráfico na qual os auto valores são menores ou iguais a 1 (Kaiser rule).....   | 71 |
| Figura 30 – Autovalores de cada um dos componentes principais obtidos nos grupos experimentais (■) e simulados pela análise paralela (■). Números delimitados acima de cada ponto: Valores dos autovalores.....   | 72 |
| Figura 31 – Valores de PVC e de BS de cada um dos componentes principais obtidos nos grupos experimentais (■) e calculados (■).....   | 73 |
| Figura 32 – Alto: Autovetores (eigenvectors) de cada variável do estudo e os componentes retidos. Estão representadas variações dos valores dos autovetores para os componentes PC1 (A), PC2 (B), PC3 (C) e PC4 (D). Baixo: os mesmos valores dispostos em mapa de calor.....   | 75 |
| Figura 33 – Alto: Cargas fatoriais (loadings) de cada variável do estudo e os componentes retidos. Estão representadas variações dos valores das cargas fatoriais para os componentes PC1 (A), PC2 (B), PC3 (C) e PC4 (D). Baixo: os mesmos valores dispostos em mapa de calor. Posições das variáveis estão alinhadas em todos os gráficos.....  | 76 |
| Figura 34 – Alto: Contribuição de cada variável do estudo para a variância de cada componente retidos. Estão representadas variações dos valores das contribuições para os componentes PC1 (A), PC2 (B), PC3 (C) e PC4 (D). Baixo: os mesmos valores dispostos em mapa de calor. Posições das variáveis estão alinhadas em todos os gráficos..... | 77 |



|  |    |
|--|----|
| Figura 35 – Cargas fatoriais (A), auto vetores (B) e contribuição das variáveis (C) no Componente 1 (PC1). Linhas tracejadas mostram limites estipulados para utilização da variável na análise.....   | 78 |
| Figura 36 – Cargas fatoriais (A), auto vetores (B) e contribuição das variáveis (C) no Componente 2 (PC2). Linhas tracejadas mostram limites estipulados para utilização da variável na análise.....   | 79 |
| Figura 37 – Cargas fatoriais (A), auto vetores (B) e contribuição das variáveis (C) no Componente 3 (PC3). Linhas tracejadas mostram limites estipulados para utilização da variável na análise.....   | 79 |
| Figura 38 – Cargas fatoriais (A), auto vetores (B) e contribuição das variáveis (C) no Componente 4 (PC4). Linhas tracejadas mostram limites estipulados para utilização da variável na análise.....   | 80 |
| Figura 39 – Escores de cada componente (PC Scores) para cada um dos experimentos com diferentes proporções de células MCF7 e HF002-J. Os valores indicam as médias dos escores. Barras: médias dos valores dos escores. Barras de erro: Média dos erros padrão.....  | 84 |
| Figura 40 – Gráfico de processo de crescimento representado pela função de crescimento beta para culturas fracionadas de MCF7/HF002-J.....   | 86 |
| Figura 41 – Matriz de correlação, com os coeficientes -b segundo Kendall calculados entre cada combinação par a par de variáveis. Valores com asteriscos indicam relações significantes, calculados pela metodologia da razão máxima de p de Vovk-Selke. (*): $p < 0,05$ . (**): $p < 0,01$ . (***): $p < 0,001$ .....   | 87 |
| Figura 42 – (Alto): Valores em EZR da progressão diária de células viáveis ( $\Delta$ viáveis). (Centro): Valores em EZR da progressão diária de células inviáveis ( $\Delta$ inviáveis). (Baixo): Número total de núcleos encontrados nos esferoides dos grupos testados, avaliados entre 1 e 4 dias de experimento. Valores transformados em escores z-robustos. (**): $p < 0,01$ . Legenda: barras coloridas refletem os dias de experimento..... | 91 |
| Figura 43 – Valores das áreas (Alto) e dos volumes (Centro) médios dos núcleos marcados com Hoechst 33342 e das áreas médias (Baixo) de núcleos marcados com SYTOX® Green encontrados nos esferoides dos grupos testados, avaliados entre 1 e 4 dias de experimento. (*): $p < 0,05$ . (**): $p < 0,01$ . (****): $p < 0,0001$ em relação ao primeiro dia de cada concentração.....  | 93 |
| Figura 44 – Fotomicrografias obtidas por microscopia de fluorescência de diferentes concentrações de esferoides fracionados MCF7/HF002-J no dia 4 de cultivo. SYTOX® Green (verde) indicando núcleos de células mortas e Hoechst 33342 (azul) indicando núcleos viáveis. Barra de 200 $\mu$ m.....   | 96 |
| Figura 45 – Fotomicrografias obtidas por microscopia de fluorescência de esferoides de MCF7 mantidos com 100 ou 200 $\mu$ L de meio de cultura e irradiados com 0,5 Gy com e sem troca de meio de cultura. SYTOX® Green (verde) indicando núcleos de   |    |

células mortas e Hoechst 33342 (azul) indicando núcleos viáveis. Barra de 200  $\mu\text{m}$ .....97

Figura 46 – Fotomicrografias obtidas por microscopia de fluorescência de esferoides de MCF7 mantidos com 100 ou 200  $\mu\text{L}$  de meio de cultura e irradiados com 4 Gy com e sem troca de meio de cultura. SYTOX® Green (verde) indicando núcleos de células mortas e Hoechst 33342 (azul) indicando núcleos viáveis. Barra de 200  $\mu\text{m}$ .....98

Figura 47 – Processo de deconvolução. Em que: (A) Imagem sem deconvolução. Barra: 200  $\mu\text{m}$ . (B) PSF do comprimento de onda azul, e as visões ortogonais. Barra: 10  $\mu\text{m}$ . (C) PSF do comprimento de onda verde, e as visões ortogonais. Barra 10  $\mu\text{m}$  (D) Imagem trabalhada em deconvolução. Barra: 200  $\mu\text{m}$ . (E) Ampliação da região marcada em A. Todas as Barras: 10  $\mu\text{m}$ . (F) Ampliação da região marcada em D. Todas as Barras: 10  $\mu\text{m}$ .....100

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

**2D** – Bidimensional

**3D** – Tridimensional

**ACP** – Análise de Componentes Principais

**BS** – *Broken Stick*

**CID** – Classificação internacional de doenças

**COD** – *Crystallography Open Database*

**DANT** – Doenças e agravos não transmissíveis

**dB** – Decibel

**DMSO** – Dimetilsulfóxido

**DRX** – Difração de raios X

**EMT** – Esferoide multicelular tumoral

**EZR** – Escore-z Robusto

**GLOBOCAN** – *Global Cancer Observatory*

**Gly** – Glicina

**HCS** – Triagem de alto conteúdo

**HER2** – Fator de crescimento epidérmico humano

**HTS** – Triagem de alto rendimento

**IC** – Intervalo de Confiança

**LIV** – Variação de Intensidade Logarítmica

**MEC** – Matriz extracelular

**MET** – Microscopia eletrônica de transmissão

**MTS**–3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4- sulfofenil)-2H-tetrazolium

**NP** – Nanopartícula

**OCT** – Tomografia de Coerência Óptica

**OMS** – Organização mundial da saúde

**PBS** – *Phosphate Buffer Saline*

**PLL** – Poli-L-lisina

**PMS** – Metilsulfato de Fenazina

**PSF** – *Point Spread Function*

**PVC** – Porcentagem de Variância Cumulativa

**RE** – Receptor de estrogênio

**ROI** – Região de Interesse

**ROUT** – *Robust regression and Outlier removal*

**RCP** – Regressão de Componentes Principais

**RP** – Receptor de progesterona

**SDS** – *Sodium Dodecyl Sulfate*

**TFD** – Taxa de Falsos Descobrimentos

**TNBC** – *Triple-negative breast cancer*



## SUMÁRIO

|       |  |    |
|-------|--|----|
| 1.    | INTRODUÇÃO.....  | 19 |
| 2.    | OBJETIVOS.....   | 22 |
| 2.1.  | Objetivo Geral.....  | 22 |
| 2.2.  | Objetivos Específicos.....   | 22 |
| 3.    | FUNDAMENTOS TEÓRICOS.....  | 23 |
| 3.1.  | Carga global de mortalidade.....                                       | 23 |
| 3.2.  | Câncer de mama.....  | 24 |
| 3.3.  | Tipos moleculares de câncer de mama .....                              | 26 |
| 3.4.  | Processos de seleção e confecção do modelo tridimensional.....         | 27 |
| 3.5.  | Nanopartículas paramagnéticas.....                                     | 32 |
| 3.6.  | Síntese de nanopartículas de óxido de ferro.....                       | 33 |
| 3.7.  | Funcionalização das nanopartículas de óxido de ferro .....             | 34 |
| 3.8.  | Difração de Raios X.....   | 36 |
| 3.9.  | Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET).....                       | 37 |
| 3.10. | Microscopia de Fluorescência.....                                      | 38 |
| 3.11. | Tomografia de Coerência Óptica (OCT).....                              | 40 |
| 4.    | MATERIAL E MÉTODOS.....  | 43 |
| 4.1.  | Cultura Celular.....   | 43 |
| 4.2.  | Síntese de nanopartículas.....   | 43 |
| 4.3.  | Análise por DRX.....   | 44 |
| 4.4.  | Análise por MET.....   | 44 |
| 4.5.  | Adsorção de nanopartículas de magnetita na superfície das células..... | 45 |
| 4.6.  | Formação de esferóides.....  | 45 |
| 4.7.  | Irradiações.....   | 46 |
| 4.8.  | Ensaio de citotoxicidade.....  | 46 |
| 4.9.  | Ensaio de tomografia de coerência óptica.....                          | 46 |
| 4.10. | Imagem de variação de intensidade logarítmica (LIV).....               | 47 |
| 4.11. | Ensaio de microscopia de fluorescência.....                            | 48 |

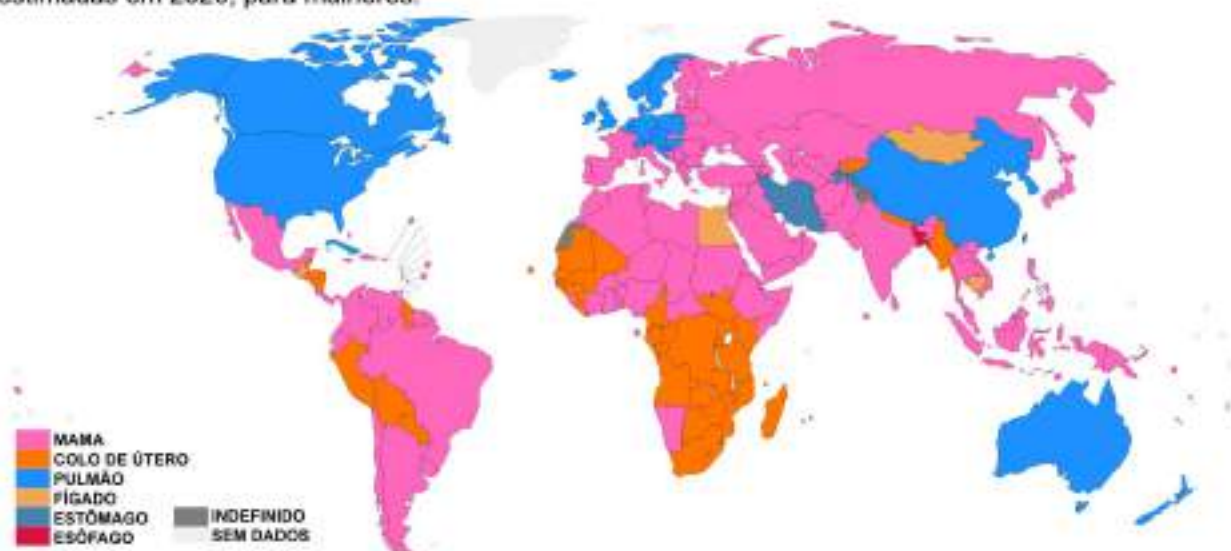
|       |   |     |
|-------|---|-----|
| 4.12. | Tratamento dos dados brutos.....                        | 48  |
| 4.13. | Análise de componentes principais (PCA).....            | 50  |
| 4.14. | Análise de correlação entre variáveis selecionadas..... | 50  |
| 4.15. | Estatística de comparação entre grupos.....             | 50  |
| 5.    | RESULTADOS E DISCUSSÃO.....                             | 52  |
| 6.    | CONCLUSÃO.....  | 101 |
| 7.    | REFERÊNCIAS .....                                       | 103 |

## 1. INTRODUÇÃO

O câncer de mama está em primeiro lugar na taxa de mortalidade entre os cânceres para mulheres em 108 dos 185 países analisados pela base de dados do *Global Cancer Observatory* (GLOBOCAN), fazendo com que este se torne o câncer com maior incidência em mulheres no mundo, representando 11,7% (cerca de 2,3 milhões) dos novos casos estimados ainda em 2020 (SUNG *et al.*, 2021), como visto na Figura 1.

No Brasil o número estimado, a partir de 2023 até 2025, é de 73.610 novos casos, o que corresponde a 66,54 casos para cada 100 mil mulheres (INCA, 2023). Denomina-se câncer as condições nas quais as sinalizações e o metabolismo celular são alterados (UPADHYAY 2021), por ativação de oncogenes intrínseca ou em conjunto com inativação de genes supressores (SARKAR *et al.*, 2013), levando à inibição de cadeias de controle de ciclo e mortalidade celular.

Figura 1 – Principais cânceres por país, taxas de mortalidade padronizadas para todas as idades estimadas em 2020, para mulheres.



Fonte: Adaptado de GLOBOCAN, 2020. Acesso em 03 de maio de 2023

Experimentalmente, as características para este tipo de complexidade foram durante anos estudadas por meio de cultivos celulares bidimensionais (2D). No entanto, estudos indicam que os cultivos 2D não refletem com precisão o ambiente tumoral, acarretando frequentemente em falsos positivos quando realizados para testes de fármacos antitumorais ou doses de tratamento (POZZI *et al.*, 2021;

COSTARD *et al.*, 2021; THANKUR, 2022).

O processo de triagem de alto rendimento (HTS, *High Throughput Screening*) pode ser realizado para o fornecimento de novos fármacos e teve em sua base o cultivo 2D ou cultivo celular em monocamada. Porém esse sistema mantém as células aderidas em uma garrafa plástica estéril de cultura, ocorrendo uma relação lateral célula-célula, e este tipo de condição mantém as células em maior contato com a superfície e o meio de cultura fornecidos, inibindo uma proliferação e morfologia adequada de um microambiente tumoral propício para testes de fármacos antitumorais (LIU & RAJU, 2011; BAKER & CHEN, 2012; LANGHANS, 2018; FONTOURA *et al.*, 2020; REDMOND *et al.*, 2021).

O cultivo tridimensional (3D) surgiu ao longo dos anos como uma alternativa para preencher as lacunas e falhas presentes no modelo de cultivo celular utilizado anteriormente (Pampaloni *et al.*, 2007). O primeiro relato utilizando essa tecnologia foi em 1956, onde observou-se o crescimento de linhagens de fibroblastos de rato alterados (14p-L), linhagens de fibroblastos cardíacos humanos (MaCr) e carcinoma cervical (HeLa) em fibras de colágeno para sustentação da cultura obtendo resultados promissores no crescimento celular (EHRMANN & GEY, 1956).

No decorrer do tempo, estas técnicas de cultivo proporcionaram maior complexidade sistemática uma vez que mantém maior interação célula-célula, preserva a adesão e interação celular em três dimensões, e proporciona condições favoráveis para que ocorram processos químicos e físicos comparáveis aos encontrados em estudo *in vivo*, como a criação de matriz extracelular (MEC) e a concentração de gradientes de gases respiratórios. Essas condições fornecem resultados para o modelo tridimensional semelhantes aos encontrados em estudos *in vivo* podendo num futuro ser uma fonte alternativa a utilização destes modelos para estudo de diagnósticos e tratamentos do câncer de mama (TEVIS *et al.*, 2017; MAZIO *et al.*, 2018; GUPTA *et al.*, 2020; POZZI *et al.*, 2021).

Existem diversas alternativas para o cultivo 3D, estudadas ao longo dos últimos anos (FERREIRA *et al.*, 2018; LEE *et al.*, 2023). A técnica escolhida para este trabalho é a agregação magnética de células em meio de cultura (SOUZA *et al.*, 2010; HAISLER *et al.*, 2013; BONFIM *et al.*, 2019). A nanotecnologia e a engenharia de tecidos tiveram um papel fundamental na construção deste trabalho. As nanopartículas (NP's) paramagnéticas de óxido de ferro são partículas amplamente estudadas por suas particularidades biocompatíveis e suas propriedades de atração

quando expostas a campos magnéticos porém sem reter um quando afastadas dos mesmos (HOLBAN *et al.*, 2015; EPHERRE *et al.*, 2017; YEW *et al.*, 2020).

A técnica de agregação magnética se dá pela adsorção de NP's na superfície externa da membrana citoplasmática (SENSENIG *et al.*, 2012; PASSOS *et al.*, 2019). Quando expostas a ímãs com fluxo magnético moderado, as células revestidas com NP's recebem maiores estímulos em interação célula-célula, e esta recriação do ambiente espacial favorece a produção de matriz extracelular propícia para o posterior desenvolvimento do modelo fora da ação de um campo magnético (JUAREZ-MORENO *et al.*, 2022). Deste modo, o presente trabalho visa a elaboração de um modelo manipulável que não tenha necessidade de utilização *in vivo* para obtenção de resultados futuros.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo Geral**

Produzir modelo de cultivo celular tridimensional de adenocarcinoma de mama utilizando sistema de agregação/levitação magnética.

### **2.2. Objetivos Especificos**

Avaliar a ação da radiação ionizante ( $^{60}\text{Co}$ ) e a ação de fármacos em esferóides de células de adenocarcinoma de mama no que se refere à mortalidade celular, e comparação com os mesmos efeitos em culturas bidimensionais.



### 3. FUNDAMENTOS TEÓRICOS

#### 3.1. Carga global de mortalidade

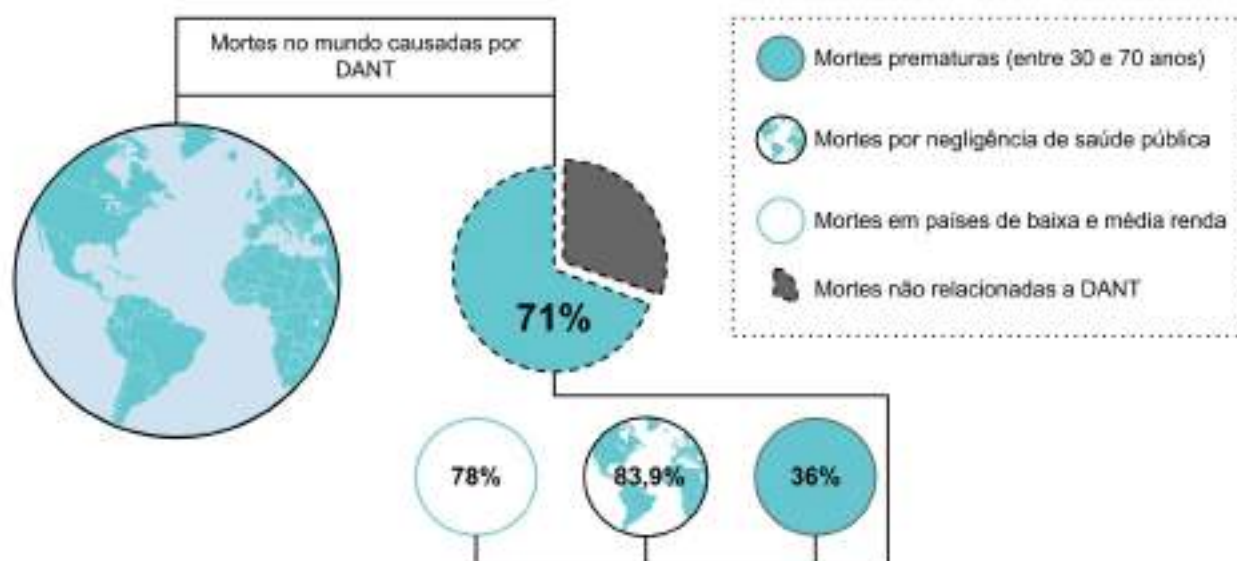
A classificação de doenças e condições de saúde é a base do sistema de dados para monitoramento, prevenção, tratamento e controle de enfermidades em todo o mundo. A classificação internacional de doenças (CID) agrupa informações quantitativas e qualitativas para dados estatísticos de maior escala com o objetivo de permitir a comparação de causas de morte entre nações (JAKOB, 2017; RAGHAVENDRA RAO, 2022).

As doenças e agravos não transmissíveis (DANT), representam cerca de 75% das mortes no Brasil (WHO, 2022). Os principais fatores que culminam nessa categoria de doenças são considerados multifatoriais, ou seja, além dos fatores genéticos pode-se encontrar fatores exógenos derivados do processo de urbanização, comercialização, condições sociais e saúde pública prejudicada (ETHER & SAIF-UR-RAHMAN, 2021; TULCHINSKY *et al.*, 2023a).

O controle de DANT evidencia, de modo significativo, os desafios do sistema de saúde global. A variabilidade e a prevalência de evoluções dessas doenças faz com que exista uma maior demanda na adoção de infraestrutura de fatores de risco compartilhados. É importante ressaltar que, das 57 milhões de mortes no mundo a cada ano, 41 milhões são por DANT e 15 milhões dessas mortes acontecem de maneira prematura; Além disso, 34,5 milhões das mortes por DANT poderiam ser evitadas e ainda assim são consequências de más políticas em ações de saúde pública (MCKEON *et al.*, 2022; KHATIWADA *et al.*, 2022). Esses dados, fornecidos pela organização mundial da saúde (OMS), estão elucidados na Figura 2.

Outro aspecto importante a ser relatado neste trabalho é: a maneira desproporcional que DANT afeta países de baixa e média renda, onde ocorrem 32 milhões das mortes e 12,75 milhões de mortes prematuras ligadas a essa categoria de doenças todos os anos (WHO, 2022). Essa desigualdade acontece também de maneira crescente dentro de cada país, uma vez que os fatores de riscos das DANT acometem com maior taxa de mortalidade pessoas com menor renda, classe social e escolaridade impactando em um problema macroeconômico frente a políticas públicas (GAZIANO *et al.*, 2010; JACKA, 2016; LIBERMAN, 2017; SCHWARTZ *et al.*, 2021).

Figura 2 – Representação gráfica da mortalidade causada por Doenças e Agravos Não Transmissíveis (DANT) em níveis globais.



Fonte: Autora da dissertação.

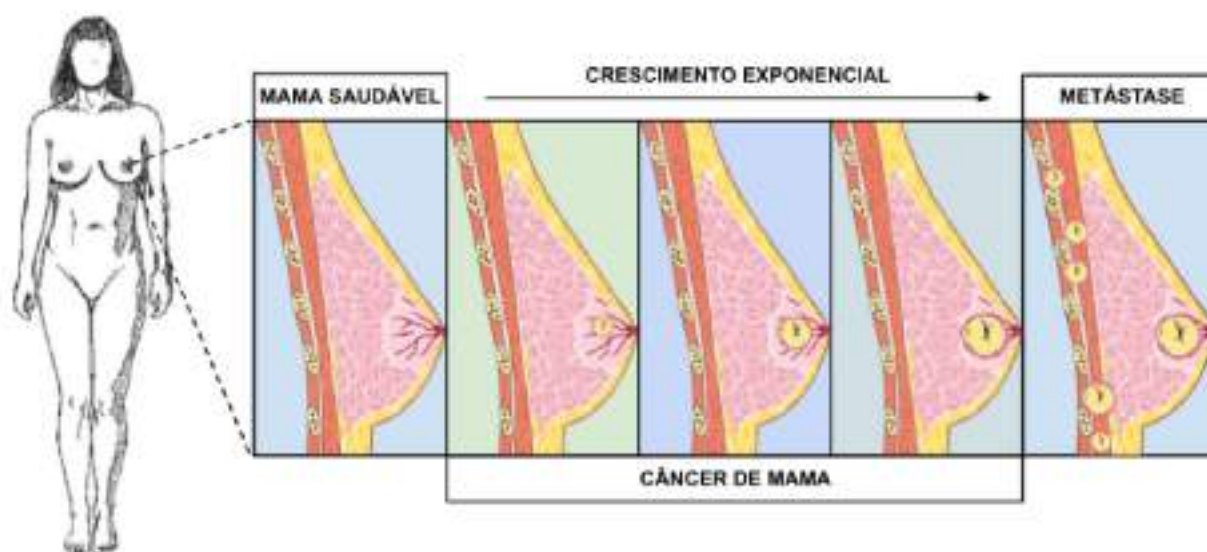
### 3.2. Câncer de mama

O câncer é a segunda doença que mais acomete pacientes em todo o mundo, tendo um percentual de 21% das mortes relacionadas a DANT todos os anos (PAHO, 2023). Dentre todos os tipos de câncer, 1 em cada 8 diagnósticos são qualificados como câncer de mama, tornando esse o tipo de câncer com maior incidência no mundo (ARNOLD *et al.*, 2022). Além disso, o câncer de mama está no topo da lista de causas de mortalidade para mulheres em todo o mundo, tendo relato de sobrevivência de 40% no total de casos em países subdesenvolvidos e 80% em países desenvolvidos (KAUR *et al.*, 2022). Estas altas taxas de mortalidade por câncer de mama estão relacionadas diretamente com dificuldades em acesso a centros públicos de saúde, diferenças socioeconômicas e acessibilidade a tratamentos e diagnósticos especializados (DUGGAN *et al.*, 2021; CARDOSO *et al.*, 2023; TULCHINSKY *et al.*, 2023b).

O câncer de mama tem origem heterogênea em nível molecular, que, quando descoberta em seu estado inicial tem maiores chances de cura, porém conforme a doença evolui, como visto na Figura 3, a chance de cura é reduzida de maneira inversamente proporcional à progressão do câncer (HARBECK *et al.*, 2019).



Figura 3 – Representação da progressão do câncer de mama em mulheres.



Fonte: Adaptado de PARSONS, 2005.

O crescimento anormal das células no revestimento do tecido glandular da mama muitas vezes está associado aos ductos ou lóbulos, onde são vistas as mudanças na fase inicial da doença e as origens de tumores benignos deste órgão. Porém, através do crescimento do tecido cancerígeno e a posterior invasão do tecido mamário, com a migração dessas células modificadas, para outros órgãos acarretam na piora do quadro clínico, causando mortes por metástase (TABÁR *et al.*, 2022; WHITFORD & MCCAFFREY, 2023).

Os lugares com maior potencial metastático decorrentes do câncer de mama são os ossos, pulmão, fígado e cérebro. Porém, as células cancerígenas podem se espalhar de maneira ampla e heterogênea por todo o corpo da paciente. Levando em consideração que 90% dos casos de morte por câncer de mama são decorrentes de metástase, uma das maiores prioridades durante o tratamento é a prevenção de metástases. Portanto, para isto é necessário entender mecanismos moleculares que desencadeiam na resistência a tratamentos convencionais do câncer (ALI MORANDI *et al.*, 2023)

O tratamento personalizado para o câncer de mama é um tópico que, ao longo dos últimos 20 anos, teve um destaque significativo nas publicações. A informação de tumores de maneira complexa e a construção de um histórico de características presentes nos cânceres, contribuem para a identificação de potenciais alvos terapêuticos e biomarcadores para prognósticos do câncer presente (MARCOM, 2017; HERIOT, 2023).

### 3.3. Tipos moleculares de câncer de mama

A classificação dos subtipos moleculares, dos tumores é considerada uma abordagem essencial para um melhor prognóstico e sobrevida do paciente, com base em estudos histopatológicos (AL-THOUBAITY, 2020). Existem marcadores hormonais específicos que auxiliam na classificação dos subtipos moleculares, como o receptor 2 de fator de crescimento epidérmico humano (HER2), receptor de estrogênio (RE) e o receptor de progesterona (RP), estes são utilizados como biomarcadores fundamentais, conforme apresentado na Tabela 1 (ORRANTIA-BORUNDA *et al.*, 2022).

A partir da análise destes marcadores é possível determinar os quatro principais subtipos moleculares utilizados para o diagnóstico clínico, sendo eles: Luminal A, Luminal B, HER2 que leva este nome por ter apenas este marcador hormonal positivo e, por fim, o triplo-negativo (TNBC, *triple-negative breast cancer*) caracterizado pela falta de expressão dos três receptores hormonais (RE-, RP- e HER2-) (LUO *et al.*, 2020; KAVARTHAPU *et al.*, 2021; ROY *et al.*, 2023)

Tabela 1 – Características dos subtipos de câncer de mama.

| Subtipo molecular | Marcador hormonal | Frequência (%) | Prognóstico     | Proliferação celular |
|-------------------|-------------------|----------------|-----------------|----------------------|
| Luminal A         | RE+,RP+, HER2 -   | 55%            | Bom             | Baixa                |
| Luminal B         | RE+, RP+, HER2+/- | 15%            | Intermediário   | Intermediária        |
| HER2              | RE-, RP-, HER2+   | 15 a 20%       | Agressivo       | Alta                 |
| TNBC              | RE-, RP-, HER2-   | 10%            | Muito agressivo | Alta                 |

Fonte: Adaptado de ROY *et al.*, 2023.

Como um regulador de transcrição de genes, o RE está ligado diretamente à divisão celular e tem um papel fundamental no desenvolvimento da glândula mamária, crescimento e proliferação celular (BROWN *et al.*, 2019). A terapia endócrina inibe a produção de RE, sendo precisa na restrição do tamanho do tumor, melhorando as respostas ao tratamento e aumentando a chance de cura da doença ainda em estágios iniciais (BRANDÃO *et al.*, 2020).

Os subtipos moleculares que expressam RE são do tipo Luminal, a resposta ao tratamento endócrino ocorre de maneira diferente decorrente aos níveis de expressão hormonal. Prognósticos positivos geralmente estão ligados a cânceres que expressam altos níveis de RE (Luminal A) enquanto essa resposta tende a ser consideravelmente pior nos tumores que expressam baixos níveis de RE (Luminal B). Por isso, embora a eficiência do sistema de tratamento endócrino alcance uma grande parcela de pacientes, cerca de 20 a 50% das mulheres acometidas com câncer de mama do subtipo Luminal tem recidiva da doença. Desta maneira, é visto em literatura que metástases futuras estão associadas à resistência adquirida graças a respostas do tratamento endócrino em relação aos níveis hormonais (BÉCOURT & ESPIÉ, 2019; RODRIGUES-FERREIRA & NAHMIA, 2022)

O RP é regulado pelos níveis de estrogênio circulantes, por isso necessita da expressão do RE para ser expresso, conseqüentemente mais da metade dos cânceres que expressam RE também expressam RP (AFTIMOS *et al.*, 2018). Responsável por regular os níveis de progesterona no desenvolvimento da glândula mamária, esse receptor é visado também para a análise do desenvolvimento do câncer de mama, contribuindo para previsão de sensibilidade a terapias endócrinas (PU *et al.*, 2023).

Imortalizadas em 1970, na *Michigan Cancer Foundation*, local que deu origem à sigla da linhagem, as células de MCF-7 fazem parte do subtipo molecular Luminal A. Por ser uma linhagem que tem uma alta expressão de RE e RP, a MCF-7 é amplamente utilizada na pesquisa para estudos de resistência à terapia anti-tumoral (COMSA *et al.*, 2015). A utilização da linhagem celular MCF-7 foi documentada ao longo dos anos como uma ferramenta de estudo para resistência do câncer de mama a terapias, por manter características que refletem resultados encontrados em estudos *in vivo* (RAY *et al.*, 2006; CAMARILLO *et al.*, 2014).

#### **3.4. Processos de seleção e confecção do modelo tridimensional**

A utilização de modelos que reproduzem características distintivas de tumores sem a necessidade de experimentos com animais, teve extrema importância para o desenvolvimento deste trabalho. Fundado em 1959, o conceito dos 3R's (*Reduction, Refinement, Replacement*) define a atribuição de melhorias para uso ético de



animais em laboratório, aplicando como princípio os termos de substituição, redução e refinamento para o que posteriormente viria a ser conhecido como “métodos alternativos” para estudos sem a necessidade do uso de modelo animal (RUSSEL & BURCH, 1959; TANNENBAUM & BENNETT, 2015).

Os sistemas de cultura celular são utilizados como uma alternativa para a utilização de animais em estudos, sendo adequados para reduzir e, em alguns casos, substituir métodos *in vivo* (BUSK *et al.*, 2023). A primeira técnica de cultura celular *in vitro* foi realizada, em uma pesquisa sobre o crescimento de fibras nervosas com o objetivo de observar o comportamento do tecido durante o desenvolvimento embrionário, por Ross Granville Harrison (Harrison, 1906). Desde então, a técnica de isolamento de células de tecidos vivos em culturas *in vitro* para avaliação de mecanismos celulares vem sendo aprimorada visando mecanismos de ação de fármacos, terapias oncológicas, produção de proteínas e o desenvolvimento da engenharia de tecidos (KAPALCZYNSKA *et al.*, 2018).

Para utilizar esse tipo de sistema, é necessário que o objeto de pesquisa seja formado por substratos artificiais que supram necessidades específicas das células fora de um corpo vivo. Baseando-se na origem tecidual sólida das células aderentes, classificadas assim pela necessidade de adesão para crescimento e proliferação celular, a cultura de células 2D permite que as células cresçam em direção única, formando uma fina camada na superfície aderente. No entanto, este tipo de cultura é considerado simplificado, falhando quando comparado com a organização do tecido *in vivo* (HUANG *et al.*, 2022; MANFIOLLI *et al.*, 2023).

Os modelos de cultura 3D são conhecidos por manter uma ponte entre culturas 2D *in vitro* e culturas *in vivo*, isso ocorre pelo alto nível de complexidade encontrado neste tipo de sistema quando confrontado com o sistema anterior, como visto na Tabela 2. Alterações na estrutura de cultivo influenciam diretamente na morfologia nuclear, resultando em diferenças consideráveis entre proliferação celular, resposta a estímulos externos, níveis de expressão gênica, etc (JUBELIN *et al.*, 2022; MORADI-MEHR *et al.*, 2023).

Tabela 2 – Comparação de métodos de cultura celular 2D e 3D.

| Recurso                            | Cultura Celular 2D  | Cultura Celular 3D  |
|------------------------------------|---|---|
| <b>Crescimento</b>                 | Monocamada  | Agregação   |
| <b>Características das células</b> | Morfologia e modo de divisão alterados, geometria plana     | Morfologia e modo de divisão preservados, geometria esférica                      |
| <b>Interação célula-célula</b>     | Baixa   | Alta  |
| <b>Distribuição de Nutrientes</b>  | Homogênea, divergência com <i>in vivo</i>                   | Heterogênea, equivalência com <i>in vivo</i>                                      |
| <b>Proliferação celular</b>        | Alta velocidade (fora do normal encontrado <i>in vivo</i> ) | Velocidade realista (pode ser adaptada, resultados coerentes com <i>in vivo</i> ) |
| <b>Diferenciação celular</b>       | Baixa   | Alta  |
| <b>Sensibilidade a fármacos</b>    | Pouca resistência, análise comprometida por falso positivo  | Maior resistência a fármacos, melhor análise de metabolismo e efeitos             |
| <b>Níveis de expressão</b>         | Resultados não compatíveis com modelos <i>in vivo</i>       | Resultados semelhantes aos encontrados em modelos <i>in vivo</i>                  |
| <b>Manuseio</b>                    | Altamente replicável e rápida, fácil cultivo a longo prazo  | Replicação complexa, processo prolongado, interpretação de dados desafiadora      |

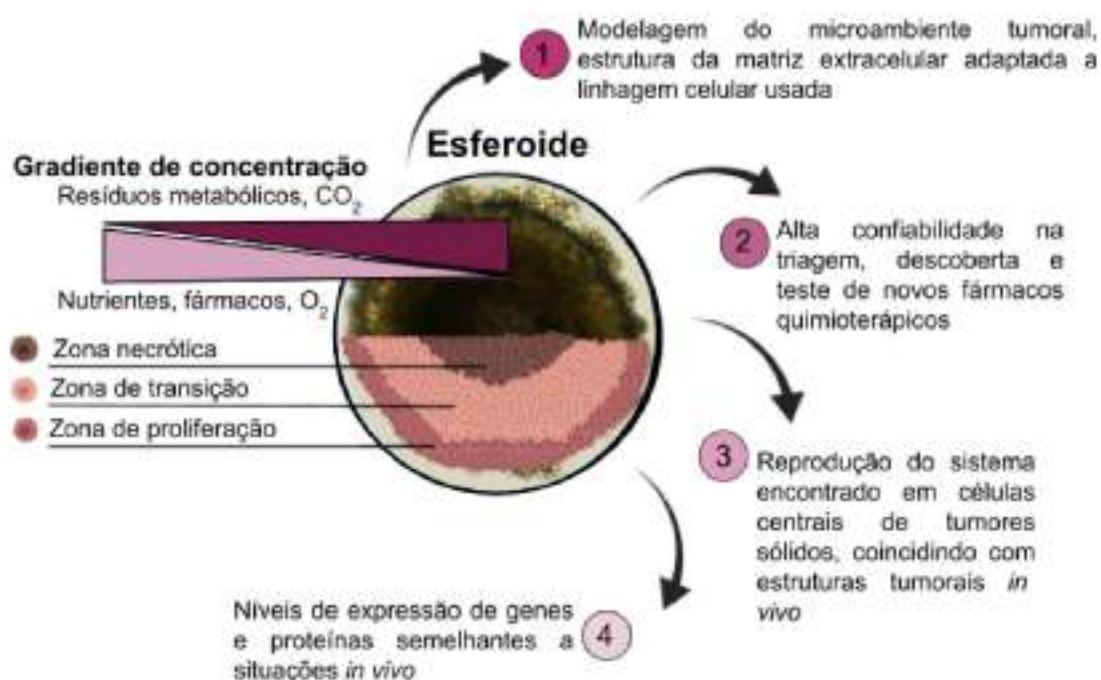
Fonte: Adaptado de Mierke, 2023.

A arquitetura de modelos 3D de cultura celular está relacionada diretamente com o método de produção para simulação do tecido nativo de origem ao qual as células utilizadas foram retiradas. O cultivo 3D pode ser dividido em duas categorias fundamentais, dependente e independente de andaimes. A estrutura 3D dependente de andaimes proporciona uma semelhança da fisiologia *in vivo* de um tecido específico, porém necessita de agentes externos que interagem com as células acarretando mudanças moleculares para obtenção deste resultado. Enquanto técnicas 3D independentes de andaime utilizam a matriz extra celular para obtenção da sustentação do modelo celular estudado (DOCTOR *et al.*, 2020; SHYAM *et al.*, 2023).

Neste trabalho, foi utilizado um modelo 3D independente de andaime denominado como esferoide, ilustrado na Figura 4. O termo esferoide envolve diferentes técnicas para obtenção de agregados celulares, caracterizadas pela

adesão entre células de maneira organizada em formato esférico e compacto (MAITRA *et al.*, 2023). Amplamente utilizado em literatura, o modelo esferóide proporciona um ambiente físico-químico semelhante ao *in vivo*, não necessitando de um meio de cultura específico além do utilizado para linhagem celular escolhida ou reagentes que possam influenciar no comportamento celular (KUNDU *et al.*, 2020).

Figura 4 – Diagrama esquemático da estrutura de um esferóide. Números destacados de 1 a 4 exemplificam as vantagens do modelo.



Fonte: Adaptado de GILAZIEVA *et al.*, 2020.

O desenvolvimento de tumores sólidos ocorre através de interações de diferentes tipos celulares, além de serem cercados por componentes extracelulares. As células no microambiente tumoral são identificadas pelas anormalidades moleculares e vias de sinalização irregulares, que substancialmente influenciam no comportamento celular para respostas a tratamentos do câncer de mama (ZANONI *et al.*, 2020). Modelos de esferóide multicelular tumoral (EMT), mimetizam estas funções por manterem desenvolvimento heterogêneo que permite estudos sobre processos tumorais específicos de maneira eficiente. Além disso, o padrão de crescimento do EMT, quando comparado a tumores sólidos, têm um aumento exponencial de volume em escala microscópica <500 µm de diâmetro, facilitando



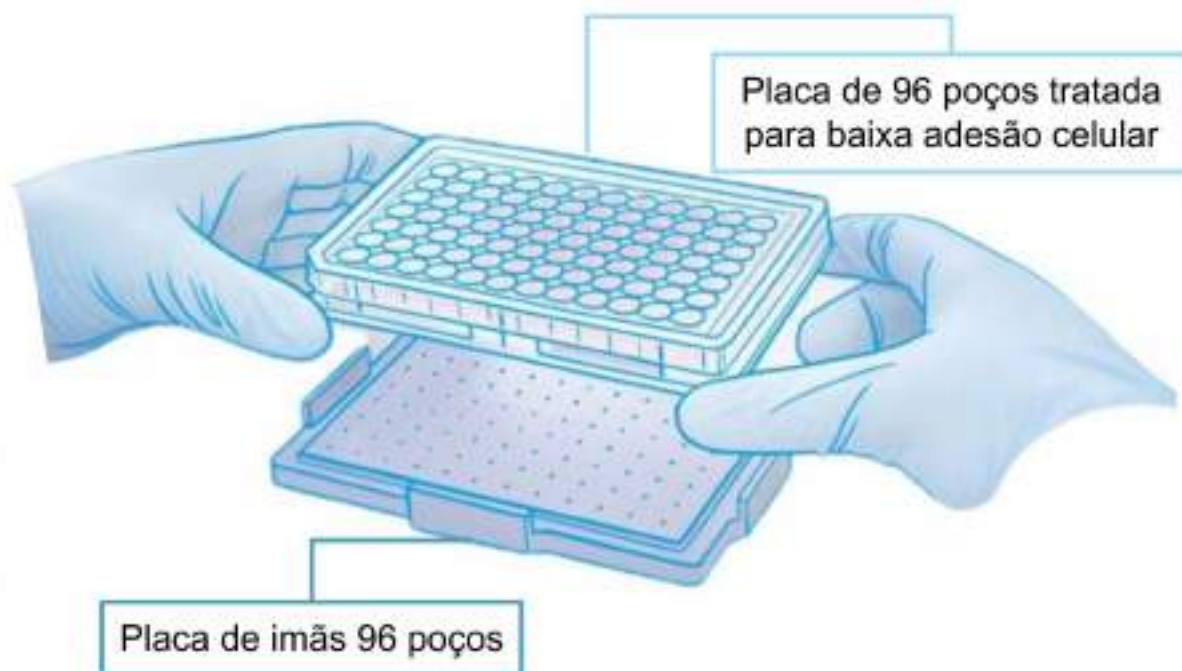
sistemas de triagem de alto rendimento automatizada (KHANNA *et al.*, 2020).

A matriz extracelular (MEC) é uma estrutura essencial para sustentação presente em todos os tecidos e órgãos. Quando observada no processo de interação em nível celular, além de ser um substrato responsável pelo suporte físico, a MEC desempenha papéis importantes no crescimento, sinalização, diferenciação, migração, proliferação celular e estabilidade tecidual (MONTEIRO *et al.*, 2023). A compreensão do microambiente tumoral durante a progressão do tumor é importante para entender os mecanismos que acionam respostas negativas ou positivas referentes a tratamentos. Já é visto em literatura que, mudanças na reorganização e reticulação da MEC resultam em alterações na progressão tumoral aumentando a invasão tecidual e metástase (LI *et al.*, 2020; LIN & WELLSTEIN, 2022).

O sistema de co-cultura de células foi utilizado na padronização do modelo tumoral escolhido ao longo deste trabalho, com ênfase na utilização da linhagem de fibroblastos humanos HF002-J. Os fibroblastos compõem uma parcela fundamental do microambiente tumoral, podendo influenciar no potencial metastático e no desenvolvimento das células cancerígenas por estímulos físicos e bioquímicos durante interações célula-célula e célula-MEC (LAZZARI *et al.*, 2018; AHN *et al.*, 2023).

Por fim, o processo de agrupamento e adesão de células inicialmente separadas descreve a técnica de agregação. A morfologia encontrada neste tipo de técnica permite a manipulação das células mantendo o contato célula-célula estimulando a produção de matriz extracelular, fornecendo um microambiente adequado, compatível em tecidos estudados *in vivo*. Quando utilizado o magnetismo para obtenção da técnica de agregação, obtém-se um método sem contato direto para formação do EMT. Esta técnica consiste na utilização de NP's magnéticas adsorvidas na superfície da membrana celular que, quando expostas a estímulos de um campo magnético em uma superfície de baixa adesão celular proporcionando agregados celulares, como observado na Figura 5 (VAN DE WALLE *et al.*, 2017; Desai *et al.*, 2017; EKE *et al.*, 2022).

Figura 5 – Esquema ilustrado dos materiais necessários para construção do esferoide por agregação magnética.



Fonte: Adaptado de Greiner BIO-ONE, 2023.

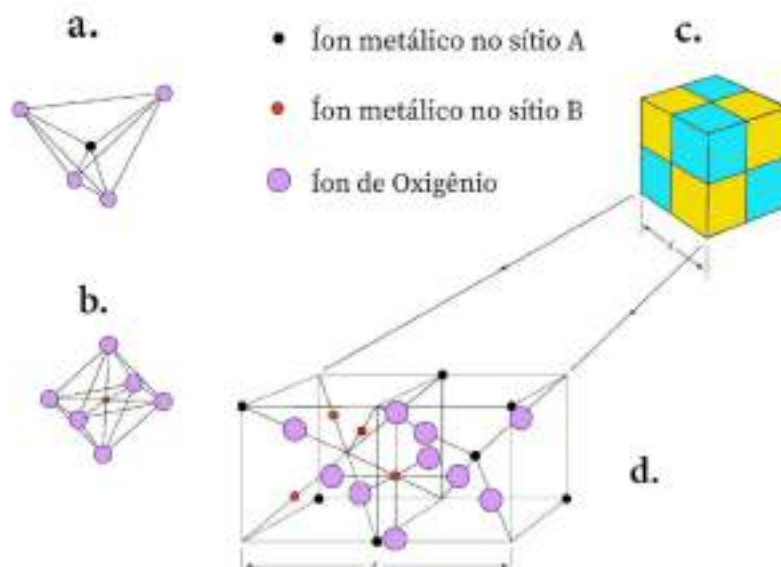
### 3.5. Nanopartículas paramagnéticas

As NP's de óxido de ferro, nos últimos anos, obtiveram um intenso processo investigativo por suas propriedades específicas (MURTHY *et al.*, 2020; NADAR *et al.*, 2022; EZEALIGO *et al.*, 2022; KHAN *et al.*, 2023; VAZHICHAYA *et al.*, 2023). Entretanto, dentro da classe de nanoestruturas, as NP's de óxido de ferro podem apresentar diferentes fases cristalinas, mudando assim as propriedades de cada partícula dependendo de cada síntese. Por esse motivo, a dependência específica de morfologia, estrutura, toxicidade, tamanho e magnetismo foi crucial na escolha da NP utilizada neste trabalho (NKURIKIYIMFURA *et al.*, 2020; LYTVYN *et al.*, 2023).

A Magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) é um óxido de ferro paramagnético, formado por íons ferrosos ( $\text{Fe}^{+2}$ ) íons férricos ( $\text{Fe}^{+3}$ ) divididos em diferentes sítios cristalográficos, como observado na Figura 6. A estrutura cristalina desse material pode ser descrita como um espinélio invertido e as partículas geradas são em sua maioria cúbicas, escuras, de fácil manipulação e alto poder de funcionalização para diferentes aplicações (DUTTA *et al.*, 2022; LAMICHHANE *et al.*, 2022).



Figura 6 – Representação estrutural do cristal de magnetita. Onde: Sítio tetraédrico (a.). Sítio octaédrico (b.). Célula unitária (c.). Esquema de  $\frac{1}{4}$  da célula unitária da magnetita (d.).



Fonte: Adaptado de CULLITY & GRAHAM, 2009

O paramagnetismo das partículas de magnetita contribui para utilização desta NP no presente trabalho, as propriedades magnéticas presentes neste material permitem a atração direcional quando exposto ao campo magnético e o estado de inércia quando se mantém a falta do mesmo, não retendo um magnetismo próprio (TIWARI *et al.*, 2022; BRAIM *et al.*, 2023). Em cristalitos de tamanhos entre 3 a 50 nm, partículas de magnetita podem ser descritas como NP's superparamagnéticas, isto é, quando devido ao tamanho reduzido da partícula pode mudar de direção aleatoriamente sob influência de temperatura, isso permite que as NP's superparamagnéticas sofram um processo de agregação menor que as paramagnéticas, mostrando assim a importância fundamental do tamanho das partículas sintetizadas (ENRIQUEZ-NAVAS & GARCIA-MARTIN, 2012; MARGHUSSIAN 2015; SEABRA *et al.*, 2017; CLEMONS *et al.*, 2019).

### 3.6. Síntese de nanopartículas de óxido de ferro

Existem diversas maneiras de sintetizar NP's de óxido de ferro, e para este trabalho foi escolhido o método de coprecipitação assistida por microondas. Este

método consiste na adição de uma base em uma solução salina aquosa com íons de  $\text{Fe}^{+2}$  e  $\text{Fe}^{+3}$ . Essa reação química faz com que os íons de  $\text{Fe}^{+2}$  oxidem para íons de  $\text{Fe}^{+3}$  (SELVARAJ *et al.*, 2022;). A composição das NP's utilizadas ao longo deste trabalho foi determinada pelo uso do sal de sulfato ferroso heptahidratado ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) como fonte de  $\text{Fe}^{+2}$  e  $\text{Fe}^{+3}$  para esta reação.

Em comparação a outros métodos, a síntese por coprecipitação assistida por microondas tem um maior custo benefício, pois não exige uma produção de alto custo, por ser uma síntese de fácil preparação quando comparada a outros métodos (XIAO *et al.*, 2012, NICULESCU *et al.*, 2022). A energia das microondas auxilia na formação das NP's de maneira mais homogênea, porém é preciso frisar que os produtos químicos gerados pela reação devem ser removidos da suspensão contendo NP's de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ . Esta separação é feita de maneira rápida com um imã utilizando as propriedades paramagnéticas das partículas geradas (KOSTYUKHIN & KUSTOV, 2018).

### 3.7. Funcionalização das nanopartículas de óxido de ferro

A frequente agregação e instabilidade em ambientes biológicos faz com que a aplicação das NPs de óxido de ferro necessite de um processo de modificação da superfície das partículas (ZHU *et al.*, 2018; FAVELA-CAMACHO *et al.*, 2019; MIRKOVIC *et al.*, 2022; VAZHNIHAYA *et al.*, 2023). Esta modificação deve manter características importantes para a utilização das NP's. Uma vez que neste trabalho as NP's seriam usadas para cultura celular, *a priori* havia três grandes características indispensáveis na síntese: a importância de que as partículas fossem pequenas, biocompatíveis e de superfície aderente a membrana celular (MULENS-ARIAS *et al.*, 2020; DOLS-PEREZ *et al.*, 2023).

O revestimento de superfície considera o design da NP para obtenção de uma finalidade específica. É relevante salientar que a superfície das partículas retém uma alta energia livre, e que, para minimizar esse gasto energético as partículas passarão por modificações para tentar manter a estabilidade, podendo mudar parâmetros como tamanho, força de agregação, morfologia e adsorção de superfícies (GONZALEZ-PECH & GRASSIAN, 2018; RODRIGUEZ *et al.*, 2021). Por isso, ao obter o núcleo antes do processo de cristalização, a NP precisa ser encapsulada com algum outro elemento químico, obtendo assim, como descrito em literatura, o revestimento molecular na interação núcleo-casca.

Os aminoácidos são compostos orgânicos de classificação básica, contendo em sua estrutura molecular grupos amina ( $-NH_2$ ) e carboxila ( $-COOH$ ). Graças à preferência de interação dos átomos de nitrogênio (N) e oxigênio (O) com íons metálicos, esses grupos funcionais enquadram aminoácidos como ligantes biológicos com capacidade de quelação considerável além de ser um agente modulador favorecendo no controle do tamanho das partículas (QU *et al.*, 2012; SUBRAMANIYAM *et al.*, 2022; XING *et al.*, 2022).

A glicina (Gly) apresenta fórmula molecular  $C_2H_5NO_2$ , avaliada como uma estrutura pequena, sem cadeia lateral, é considerado o aminoácido mais simples entre esta classe de moléculas. Além destas características, entre todos os aminoácidos, a glicina mantém um alto custo benefício graças à disponibilidade de matéria prima. Em meio aquoso, a Gly se mantém estável e, por sua alta afinidade com metais, essa molécula é amplamente utilizada na indústria e pesquisa (LI *et al.*, 2023; BROEKSMAN & DORFLING, 2023; JOHNSON & CUÉLLAR, 2023).

O revestimento molecular empregado ao longo deste trabalho, utilizou a glicina como quelante para NP's de óxido de ferro por ligação covalente. Além de sua biocompatibilidade, a interação com íons de ferro sem mudar o formato dos cristais, relatado em trabalhos anteriores do grupo (BONFIM *et al.*, 2019), fez com que o envelopamento de glicina na NP se tornasse ainda mais interessante em termos construtivos na síntese. As aminas presentes na molécula de Gly ficam livres para interagir com a membrana das células, esta interação com a NP ocorre por meio do grupamento carboxila presente na superfície celular (VIOTA *et al.*, 2010; CHAKRABORTY *et al.*, 2017).

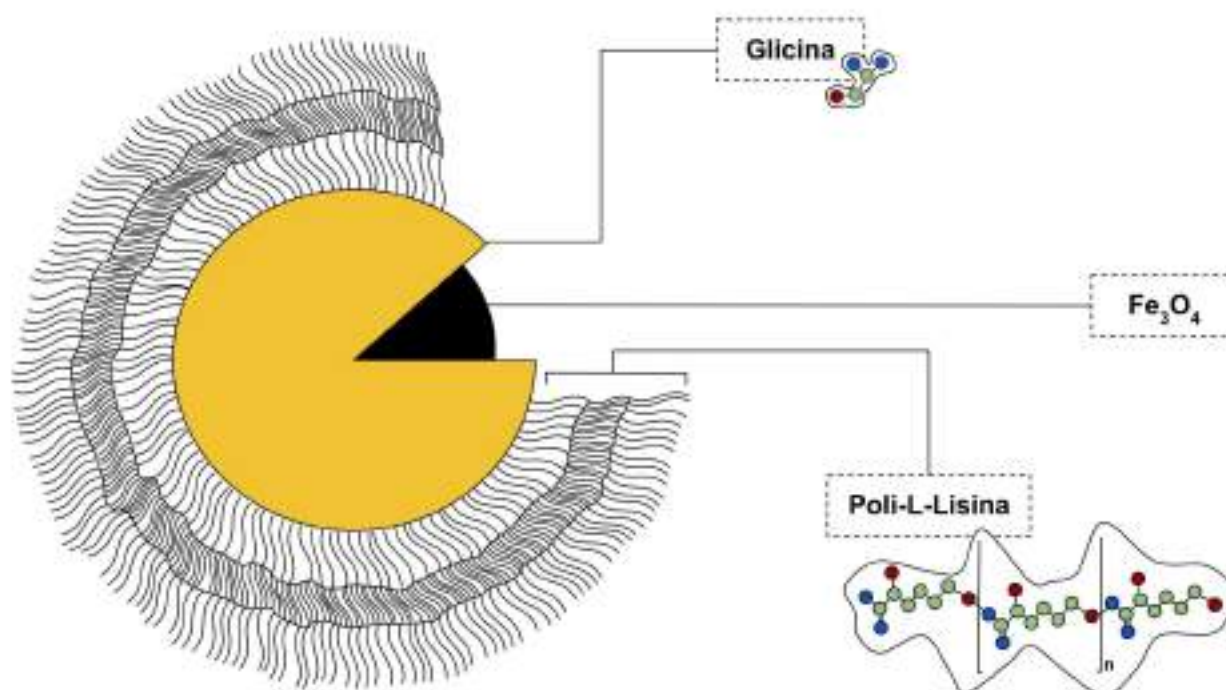
Aliada a este aminoácido na funcionalização da NP de magnetita está a poli-L-lisina (PLL), um polipeptídeo composto por sequências de lisina ( $(C_6H_{14}N_2O_2)_n$ ). Este composto orgânico utiliza o mesmo princípio de ação da Gly na síntese, porém além da interação com os íons metálicos a PLL também interage por meio de ligações peptídicas com a "casca" da NP, revestindo a superfície com uma camada ainda maior de aminas disponíveis. Essa ligação ocorre em pH 7,4 por ser o pH ideal para protonar a PLL (MORGA *et al.*, 2019; Zhang *et al.*, 2021).

Devido a diferença de cargas entre a NP de óxido de ferro funcionalizada e a membrana celular, existe uma forte interação eletrostática devido a carga positiva presente nos grupos amina livres da superfície da NP e a carga negativa presente na superfície das células (FORSMAN *et al.*, 2017). Por ser mantido na parte mais



externa da partícula, como observado na Figura 7, a adesão celular será facilitada por este polipeptídeo (PATEL *et al.*, 2023).

Figura 7 – Imagem ilustrativa da nanopartícula de Óxido de Ferro (Magnetita).



Fonte: Autora da dissertação

### 3.8. Difração de Raios X

As funções e propriedades do nanomaterial estudado ao longo deste trabalho estão ligadas diretamente a sua estrutura cristalina, sendo assim é indispensável a utilização de técnicas adequadas para análise destes parâmetros. A difração de raios X (DRX) é considerada padrão ouro para caracterização de cristais. Sendo uma técnica não destrutiva, baseada na lei de Bragg (Equação 1), utiliza o arranjo ordenado e periódico dos átomos presentes no material para fornecer parâmetros estruturais do material na qualidade de: tamanho médio da partícula (formada por unidades de cristais), fases, orientação cristalina e composição elementar do material estudado (WEIERGRÄBER *et al.*, 2017; SALEH, 2022).

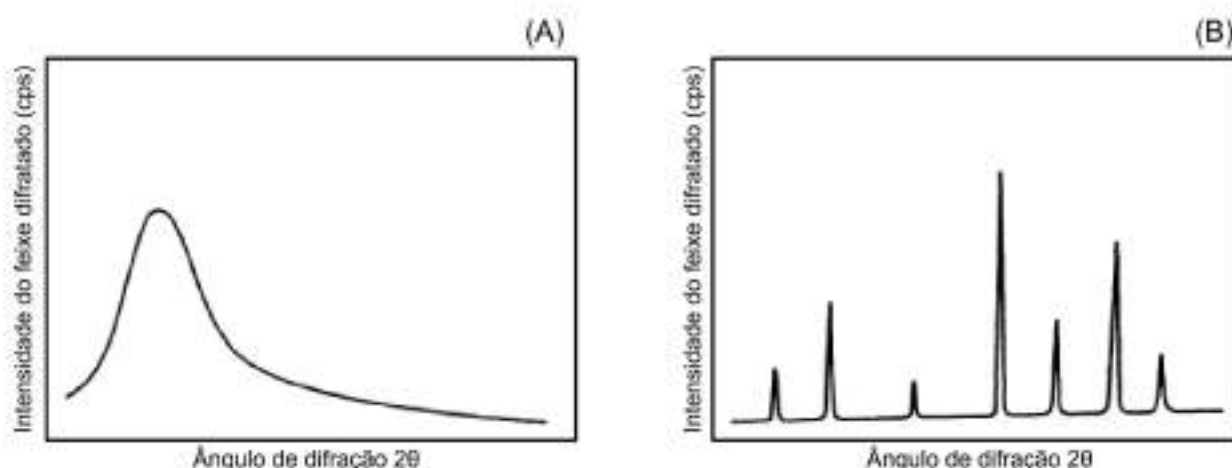
Esta técnica é baseada na interação de fótons de raios X com amostras cristalinas, produzindo interferência construtiva. Este processo ocorre quando a amostra é exposta a um feixe de raios X de comprimento de onda ( $\lambda$ ) em um ângulo ( $\theta$ ) onde a ordem de difração é representada por um número inteiro ( $n$ ), o espaço

entre os planos atômicos ( $d_{hkl}$ ) depende da densidade do material e a energia dos raios incidentes (BISHNOI *et al.*, 2017; FLECK *et al.*, 2021).

$$n\lambda = 2d_{hkl} \text{sen}\theta \quad (1)$$

Portanto, a lei de Bragg relaciona o comprimento de onda da radiação proveniente dos raios X com o ângulo de difração e o espaçamento interplanar de uma rede cristalina. Os picos de interferência construtiva são coletados e comparados a um banco de dados de padrões conhecidos, podendo assim identificar compostos químicos responsáveis pelas formações de cristais na amostra (NASROLLAHZADEH *et al.*, 2019). No DRX a intensidade do feixe é medida em decorrência do ângulo de difração  $2\theta$  para formação dos picos de interferência. Os dados são emitidos de toda a amostra e a mudança do ângulo ocorre de maneira ao qual o feixe consiga varrer a amostra de maneira adequada para obtenção do difratograma (SHITU *et al.*, 2023), exemplificado na Figura 8.

Figura 8 – Comparação entre diferentes tipos de materiais em análise padrão de DRX onde, (A) representa um material amorfo e (B) um material cristalino.



Fonte: Adaptado de Cullity, 1956.

### 3.9. Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

A técnica microscopia eletrônica de transmissão (MET) é uma ferramenta de caracterização de qualidade estrutural e morfológica de nanomateriais em alta

ampliação. As imagens são obtidas por meio de interação entre um feixe de elétrons de alta energia e a amostra, durante esse processo os elétrons podem ser dispersados ou difratados e direcionados por lentes focalizadoras até uma lente objetiva, por fim, as informações detectadas são transmitidas ao computador para posterior reconstrução. As imagens formadas por elétrons dispersos ao longo da amostra são conhecidas como imagens de campo claro, enquanto elétrons difratados dão origem a imagens de alto contraste, conhecidas como imagens de campo escuro (MAYEEN *et al.*, 2018; KOLA-MUSTAPHA, 2019; MERUGU & GOTHALWAL, 2021).

O  $\lambda$  de um elétron é considerado 100.000 vezes menor que um fóton de espectro da luz visível, isso faz com que as imagens geradas no MET tenham uma resolução em escala nanométrica podendo detalhar estruturas de até 0,1 nm em alta qualidade. Além disso, o canhão de elétrons de um MET acelera elétrons de 80 a 300 kV, com isso é possível analisar materiais com profundidade espacial, atingindo diferentes camadas da amostra (INKSON, 2016; MALATESTA, 2021).

### 3.10. Microscopia de Fluorescência

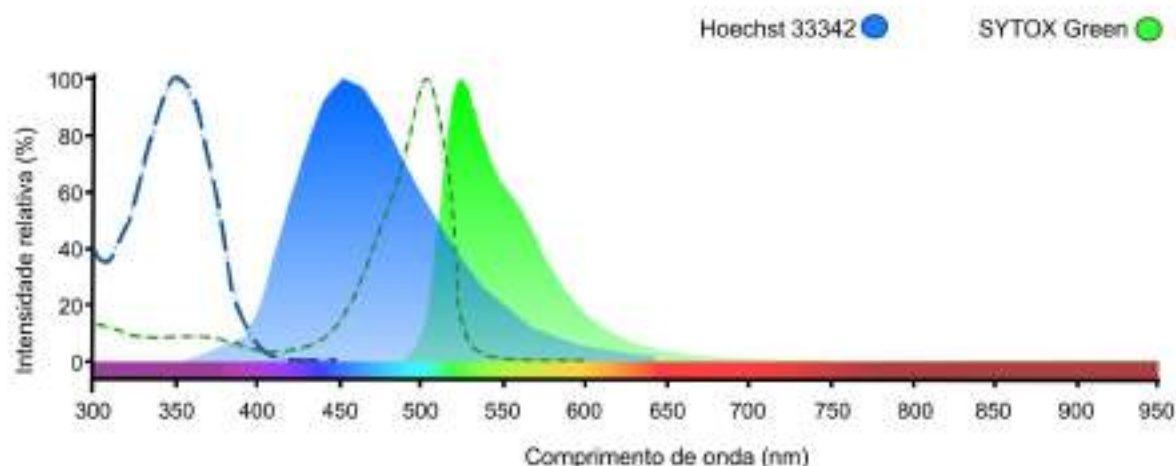
A complexidade encontrada na organização espacial e dinâmica entre os componentes do modelo esferoide, requer a utilização de sistemas de análise celular multiparamétricos. A microscopia de fluorescência é uma ferramenta essencial para o monitoramento de sistemas biológicos (LOVITT & WRIGHT, 2014; CHOLKAR *et al.*, 2017). Esta técnica utiliza fluoróforos, corantes químicos ou proteínas fluorescentes, para visualização de estruturas intracelulares. Quando os elétrons do fluoróforo absorvem energia em um baixo comprimento de onda, eles passam do estado fundamental para o estado excitado e para retornar ao estado fundamental os elétrons devem liberar energia na emissão de luz com um comprimento de onda maior, como visto na Figura 9 (DING & REN, 2023).

Porém a microscopia de fluorescência tem uma resolução espacial limitada, dada pela natureza ondulatória da luz, o limite de difração da luz de excitação impede a visualização de estruturas cujo comprimento de onda está abaixo de 200 nm (MERENICH *et al.*, 2022; SHIN *et al.*, 2022). Além disso, a exposição ao número de fótons necessários para excitação dos fluoróforos é um processo prejudicial para as células, os efeitos tóxicos da luz são originados na geração de espécies químicas



reativas durante a técnica luminescente (MAGIDSON & KHODJAKOV *et al.*, 2013; ENGELBRECHT *et al.*, 2022).

Figura 9 – Espectro de Fluorescência. Diferença entre comprimentos de onda em picos de excitação destacados com linha tracejada e picos de emissão representados por áreas preenchidas. Onde: em azul está representado um fluoróforo (Hoechst 33342) e em verde outro fluoróforo químico (SYTOX Green).



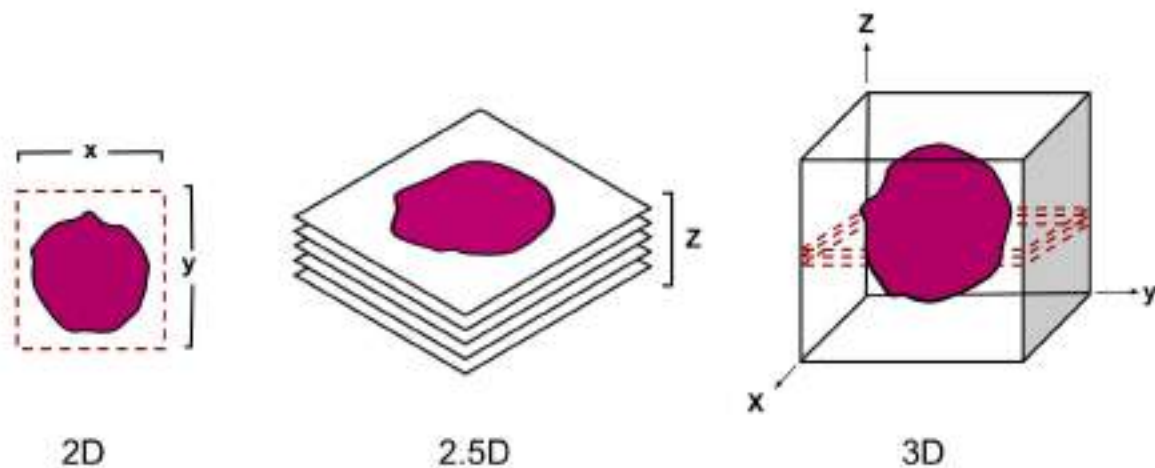
Fonte: Adaptado de ThermoFisher SpectraView, 2023.

Para superar essas limitações foram desenvolvidas técnicas de resolução baseadas em localização e automação visando desempenho em larga escala (MLODZIANOSKI *et al.*, 2023). A triagem de alto conteúdo (HCS, *High Content Screening*) foi criada no início da década de 1990, sendo uma tecnologia elaborada para adquirir grandes quantidades de dados de imagens microscópicas em um processo automatizado. Os equipamentos que utilizam HCS coletam imagens fluorescentes de alta resolução de células cultivadas em múltiplos poços ao mesmo intervalo de tempo, mantendo uma redução da exposição celular. As imagens coletadas são analisadas de maneira quantitativa e convertidas em dados numéricos separados por características mensuráveis, utilizando tratamento por inferência estatística (BLAY *et al.*, 2020; MILLER *et al.*, 2023; KETTELER & KRISTON-VIZI, 2023).

A microscopia de campo amplo, ou como também chamada: microscopia de deconvolução, coleta imagens 3D de uma amostra e um conjunto robusto de seções ópticas 2D, obtidas em diferentes planos focais denominados como fatias (séries z). Nesta modalidade, a amostra é iluminada por inteiro, as fatias são colhidas em intervalos fixos ao longo do eixo z compondo um conjunto de dados volumétrico, que

ao serem reconstruídos formam a imagem 3D, exemplificado pela Figura 10 (MERCHANT & DIASPRO, 2023).

Figura 10 – Representação esquemática da aquisição de imagem 3D, onde o plano focal é movido de baixo para cima e as imagens são registradas em níveis de espaçamento controlado pelo eixo Z.



Fonte: Autora da dissertação

Por conta do poder de penetração da luz ser limitado ao índice de refração, citado anteriormente, a resolução ao longo do eixo de profundidade ( $z$ ) é menor que a resolução da amostra nas dimensões laterais (2D). Isso ocorre perante aberrações como distorção geométrica, sombreamento e dispersão de pontos causados pelo impacto limitante da difração. Com avanços na aquisição de imagens e algoritmos de análise de dados é possível a extração de informações estruturais e funcionais por características fenotípicas das células. A deconvolução é a técnica onde a imagem pode ser modelada matematicamente para correções feitas por algoritmos de restauração de imagem e remoção de artefatos de ruído (SAGE *et al.*, 2017; KÖHN-LUQUE *et al.*, 2023; ZHANG *et al.*, 2023).

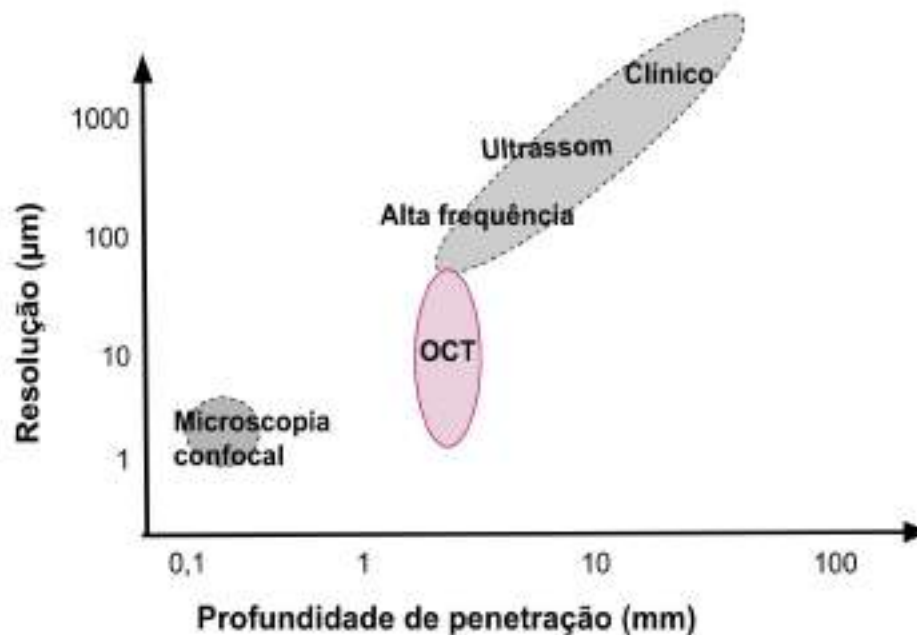
### 3.11. Tomografia de Coerência Óptica (OCT)

A Tomografia de coerência óptica (OCT, *Optical Coherence Tomography*) é uma modalidade de imagem óptica não destrutiva que utiliza uma fonte de luz sintonizável, para reconstrução de imagens tridimensionais em microescala. Como observado na Figura 11, a profundidade de penetração dessa técnica ultrapassa a



da microscopia confocal, que, embora seja uma técnica que oferece uma resolução maior que a encontrada no OCT, é uma técnica destrutiva e com pouca profundidade de penetração. Com a técnica de OCT, o modelo tumoral pode ser estudado com definição de todas as camadas da estrutura, com alta resolução, possibilitando uma maior análise na estrutura volumétrica (KISHI, 2016; HUANG *et al.*, 2017; WANG & LARINA, 2017; MARRESE *et al.*, 2019; YANG *et al.*, 2021).

Figura 11 – Gráfico de resolução por  $\mu\text{m}$  em relação a profundidade de penetração em mm de diferentes modalidades de imagem.

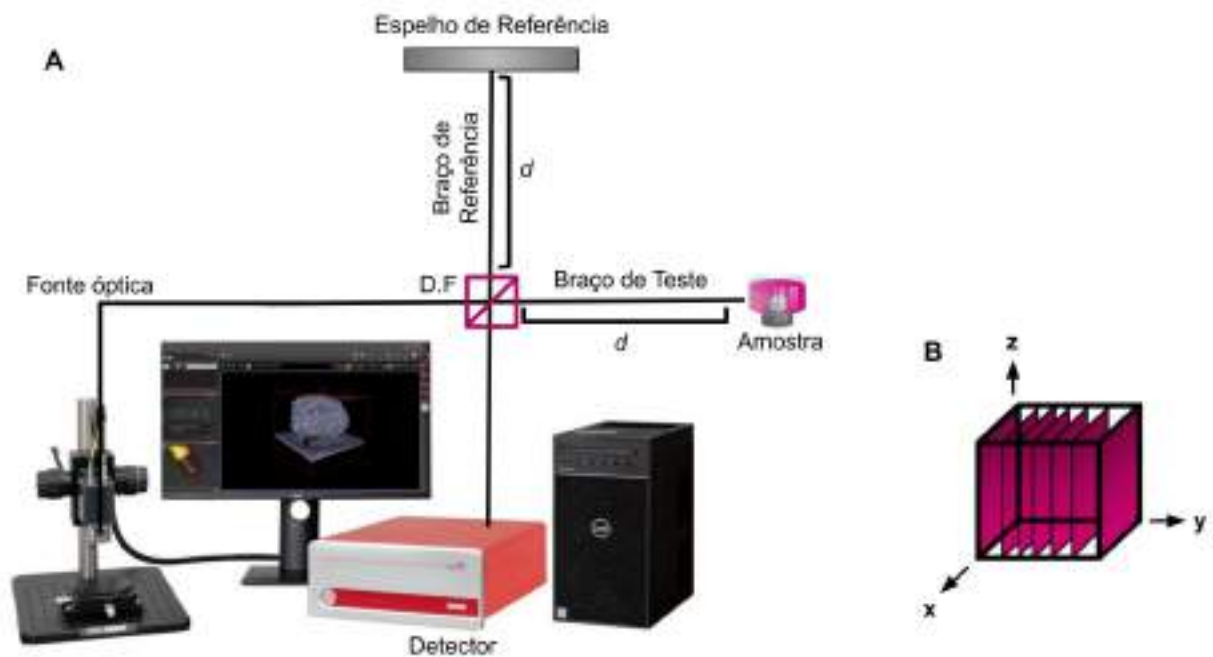


Fonte: Adaptado de ADIE & BOPPART, 2009.

A técnica de OCT foi apresentada pela primeira vez em 1991, baseada na interferometria de baixa coerência. Este sistema consiste na utilização de uma fonte óptica que emite um feixe de luz laser na faixa próxima ao infravermelho, esta luz incide sobre um divisor de feixes, neste momento a energia luminosa é dividida em duas partes iguais em direções diferentes com metade da sua capacidade luminosa inicial. Com isso, 50% da luz é direcionada a um espelho de referência e 50% atinge a amostra de estudo. Os fótons da radiação incidente da amostra sofrem retroespalhamento e retornam ao divisor de feixes onde são recombinados com a radiação refletida do espelho de referência. Quando o caminho óptico da amostra e do espelho de referência são iguais, ocorre o processo de interferência. O detector recebe o sinal de interferência e manda os dados para um software no computador

que irá reconstruir as imagens tomográficas (transversais) geradas, este processo está exemplificado na Figura 12 (HUANG *et al.*, 1991; de AMORIM GARCIA FILHO *et al.*, 2013; KLEIN *et al.*, 2014).

Figura 12 – (A) Representação esquemática de uma varredura de OCT. Onde  $d$  representa a distância óptica percorrida entre os braços e o divisor de feixes (D.F.). (B) Demonstração geométrica da aquisição das imagens 2D para reconstrução 3D.



Fonte: Adaptado de THORLABS, 2023

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. Cultura Celular

A linhagem celular de adenocarcinoma mamário humano, MCF7 (ATCC® HTB-22™) foi mantida em garrafas de cultura de 25 cm<sup>2</sup> contendo meio RPMI-1640 (Gibco) suplementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino e 5% de solução de antibióticos (10.000 UI/mL de penicilina, 10 mg/mL de estreptomicina e 1 mg/mL de anfotericina) em uma atmosfera controlada e umidificada contendo 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C. Após atingir a confluência desejada (60-70%, estimativa visual) as células foram lavadas com solução salina-fosfato tamponada (PBS), pH 7,4 estéril, com 0,05M de EDTA e destacadas por ação da enzima Tripsina em PBS-EDTA (0,05X, Gibco). As suspensões obtidas foram lavadas por centrifugação em meio fresco e ressuspendidas em novas alíquotas de meio de cultura até o momento do uso. Fibroblastos humanos, derivados de culturas primárias (HF002-J) foram isolados de doadores humanos e gentilmente cedidos pela Dra. Monica Beatriz Mathor (Centro de Tecnologia das Radiações, CETER – IPEN) e mantidos em garrafas de cultura de 75 cm<sup>2</sup> sob mesmas condições para posterior uso na cultura.

### 4.2. Síntese de nanopartículas

A síntese de NP's foi realizada por co-precipitação de hidróxidos de ferro, em abordagem de síntese assistida por micro-ondas. Primeiramente, 0,905 g de FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O (Sigma-Aldrich®) e 0,439 g de C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>NO<sub>2</sub> (Sigma-Aldrich®) foram dissolvidos em um béquer contendo 80 mL de água deionizada sob agitação constante para obtenção de uma solução homogênea. Depois disso, lentamente a conta gotas foi adicionada a solução NaOH a 2 molar (8,0 g) sob agitação constante até a mistura atingir pH 6,5. A solução obtida foi corrigida para 100 mL e transferida para um *spinner flask* e irradiada na potência de micro-ondas de 950 W por 2min30s, onde foi obtido um precipitado preto.

O precipitado resultante foi separado da água contendo sais da reação com auxílio de um ímã e lavado quatro vezes aplicando água deionizada em um balão volumétrico de 100 mL. Em seguida, foram adicionados 5 mL de ácido acético (CH<sub>3</sub>COOH) em banho ultrassônico por 5 minutos, o ácido foi descartado e uma solução contendo 200 µL de ((C<sub>6</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)<sub>n</sub>) dissolvidos em 10 mL de água

deionizada em pH 7 foi aplicada a conta gotas no precipitado em banho ultrassônico durante 5 minutos.

Por fim, o balão foi levado ao laboratório de cultura, descartado o líquido com auxílio de um ímã e o produto foi ressuspenso em água ultrapura em 2 mL para armazenamento e posterior refrigeração.

### 4.3. Análise por DRX

Armazenados em um microtubo, foram retirados 500  $\mu$ L da suspensão estéril de NP's. Com auxílio de um ímã, foi retirado o máximo de líquido possível do precipitado magnético e consecutivamente lavado com 1000  $\mu$ L de álcool etílico (Alphatec). Após o descarte do álcool, o microtubo permaneceu aberto dentro de um béquer na estufa de secagem em um período de 24h a 42°C para evaporação total dos líquidos presentes na amostra. Os padrões de difração de raios X da amostra em pó foram caracterizados sob supervisão do Dr. Rene Ramos de Oliveira (Centro de Ciência e Tecnologia de Materiais, CECTM – IPEN) usando o difratômetro Rigaku, modelo DMAX 2100, com radiação  $\text{CuK}\alpha$  ( $\lambda = 1,5416 \text{ \AA}$ ) acelerado por um potencial de 40 kV em uma corrente de 20 mA.

O software QualX2 foi utilizado para analisar os padrões de DRX obtidos, usando a comparação de dados COD (*Crystallography Open Database*) onde as distâncias dos picos mantêm a característica da fase cristalina em que o material está sendo observado. O tamanho médio do cristalito obtido foi calculado de acordo com a equação de Scherrer (1).

### 4.4 Análise por MET

A amostra de NP's em pó foi analisada no Laboratório de Microscopia e Microanálises (LMM) do Centro de Ciência e Tecnologia dos Materiais (CECTM – IPEN) em um equipamento de alta resolução, microscópio JEM-2100 (JEOL), operado a 200 kV. A utilização desse método foi relacionada a observação da morfologia e dispersão das NP's. A amostra foi dispersa em 1 mL de álcool isopropílico, colocada sobre uma grade de cobre coberta com filme de carbono plano e analisada em campo claro.



#### 4.5. Adsorção de nanopartículas de magnetita na superfície das células

As NP's de ferro foram adicionadas em uma proporção de 2  $\mu\text{L}$  (cerca de 3 mM de ferro) para cada  $1,5 \times 10^6$  células em suspensão. A suspensão de células e NP's foi homogeneizada por pipetagem e adicionadas à garrafa de cultura de 25  $\text{cm}^2$  e mantidas em cultura *overnight* a 37°C e 5% de  $\text{CO}_2$ .

#### 4.6. Formação de esferóides

As células contendo NP's de óxido de ferro ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) passaram pelo processo de tripsinização e foram depositadas em placas de 96 poços *Cell-Repellent* (Greiner BIO-ONE) em diferentes concentrações de co-cultura, conforme apresentado na Tabela 3, na proporção de  $5 \times 10^2$  células em 100  $\mu\text{L}$ /poço. As células foram mantidas sob ação do campo magnético por 24 horas até a análise por microscopia de fluorescência.

Alternativamente, foram utilizadas placas de cultura celular de 96 poços pré-tratadas com solução de Pluronic® F-127 (0,5 g/L em 2-propanol, Sigma-Aldrich). Essa solução foi mantida aquecida a 60°C por 10 minutos, ou até a redução total da viscosidade, verificada pela ausência de turbidez da solução. Volumes de 150  $\mu\text{L}$ /poço foram transferidos para as placas. As placas tratadas foram seladas (Parafilm®) permanecendo em temperatura ambiente por 24 horas dentro do fluxo laminar para manutenção da esterilidade. Após este período, o líquido foi retirado dos poços por sucção utilizando uma bomba a vácuo e as placas permaneceram abertas dentro do fluxo laminar estéril para secagem sob radiação UV por 30 minutos.

Tabela 3 – Concentrações fracionadas de co-cultura utilizadas.

|             |     |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
|-------------|-----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|
| MCF7 (%)    | 100 | 95 | 90 | 85 | 80 | 75 | 70 | 65 | 60 | 55 | 50 | 45 | 15 |
| HF002-J (%) | 0   | 5  | 10 | 15 | 20 | 25 | 30 | 35 | 40 | 45 | 50 | 55 | 85 |

Fonte: Autora da dissertação



#### 4.7. Irradiações

Para o preparo das placas para irradiação foi retirado o máximo de meio de cultura possível das placas de cultura de 96 poços e adicionado 10 µL/poço de PBS em temperatura ambiente. Após 10 minutos as placas foram irradiadas com doses de 0,5; 2 e 4 Gy em uma fonte de radiação gama, <sup>60</sup>Co (GammaCell), presente no Centro de Tecnologia das Radiações (CETER – IPEN), em taxa de dose de 130 kGy/h e sob supervisão da Eng. Elizabeth Somessari. Após a irradiação as placas foram lavadas com PBS, adicionados 100 µL/poço de meio RPMI-1640 (Gibco) e foram levadas à incubadora a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> onde permaneceram por 24, 48, 72h até análise no microscópio óptico Nikon Eclipse Ts100 localizado no prédio do CEBIO, IPEN – CNEN.

#### 4.8. Ensaios de citotoxicidade

O estudo da viabilidade celular foi realizado em placas de 96 poços *Cell-Repellent* (Greiner BIO-ONE). Foram semeadas  $5 \times 10^3$  células/poço (60 µL/poço) utilizando a placa de imãs acoplada à placa *Cell-Repellent*. Após 24 horas de incubação a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>, ocorreu a etapa de tratamento com fármaco Mitomicina-C e grupos-controle onde cada poço de placa de 96 poços recebeu 20 µL da solução desejada para análise. Foram utilizados para este ensaio Dimetilsulfóxido (DMSO) e Dodecil Sulfato de Sódio (SDS) como grupos-controle positivo; Cloreto de Sódio (0,045%) como controle negativo e o fármaco Mitomicina-C em diferentes concentrações (1,56; 0,75; 0,375; 0,1875; 0,093 e 0,048 µg/mL). Após 24h da aplicação a placa recebeu a solução de MTS (CellTiter 96® Aqueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay (MTS), Promega®) e PMS (Fenazina metossulfato, Sigma-Aldrich), 40 µL/poço, e foi levada novamente à incubadora onde permaneceu por 2h até a leitura da absorvância (490 nm) no espectrofotômetro de placa Multiskan EX (Thermo) localizado no prédio do CEBIO, IPEN – CNEN.

#### 4.9. Ensaios de tomografia de coerência óptica

Para os ensaios de tomografia de coerência óptica foram utilizadas placas de cultura de 96 poços *µCLEAR® BLACK CELL-REPELLENT* (Greiner BIO-ONE), acopladas com a placa de imãs. Foram semeadas  $5 \times 10^2$  células em 100 µL/poço seguindo concentrações contidas na Tabela 3. As placas permaneceram incubadas

a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> por 48 horas, após isso foi efetuada a troca do meio de cultura e as placas levadas novamente para a incubadora. Após 24 horas, as placas foram levadas para análise no aparelho de VEG220 - OCT Vega Série 200 no Centro de Lasers e Aplicações (CELAP, IPEN – CNEN) sob supervisão do pesquisador Dr. Anderson Zanardi De Freitas. Em um comprimento de onda central de 1300 nm, as imagens adquiridas pelo equipamento têm dimensões de 8 mm por 6 mm, em resolução axial de 16 µm por 12 µm com taxa de 200 kHz de sensibilidade.

As alterações volumétricas encontradas no tecido estudado foram retiradas utilizando *software* para processamento de dados de código aberto baseado no ImageJ (Fiji). A extensão de ferramenta utilizada para reconstrução da imagem segmentada que corresponde às análises volumétricas brutas foi o *Trainable Weka Segmentation* (ARGANDA-CARRERAS *et al.*, 2017), utilizando a região de interesse (ROI) como parâmetro para a área encontrada baseada na intensidade de imagem do tecido e no índice de refração. A extração morfológica do OCT foi obtida com a reconstrução 3D das imagens geradas pelo equipamento em sistema binário utilizando *plugins* correlacionados, sendo estes, o *Skeletonize 3D* (ARGANDA-CARRERAS *et al.*, 2010) e o *3D Viewer* por Java 3D (SCHMID *et al.*, 2010). O volume do esferóide foi calculado a partir da máscara volumétrica criada e binarizada.

#### 4.10. Imagem de variação de intensidade logarítmica (LIV)

A medida da magnitude de flutuação do sinal durante a aquisição da imagem OCT, é calculada com a variância do sinal de intensidade OCT em escala logarítmica de sequência de tempo (dB) de cada pixel. A imagem de variação de intensidade logarítmica (LIV, do inglês *Logarithmic intensity variance*), é expressa na separação da imagem dinâmica da estática presente no volume de aquisição (EI-SADEK *et al.*, 2020; MUKHERJEE *et al.*, 2021). A representação matemática desta medida está expressa na Equação 2.

Para ajudar na compreensão, detalhamento e identificação de alvos na imagem, foi utilizado uma máscara de pseudo-cores para transformar a imagem cinza obtida como resultado da LIV em uma imagem colorida. A máscara escolhida no Fiji foi a *smart* que utiliza 5 cores, branco, amarelo, laranja, vermelho e preto; Onde de forma gradativa o branco representa o maior índice de intensidade

encontrado na imagem e o preto o menor índice de intensidade encontrado.

$$LIV(x, z) = \frac{1}{N} \sum_{t=0}^{N-1} \left[ 10 \log I_D(x, z, t_i) - \langle 10 \log I_D(x, z) \rangle_{t_i} \right]^2 \quad (2)$$

Onde:

$N$  = Número de imagens por volume de aquisição, neste caso foram 512 imagens por esferoide estudado;

$10 \log I_D(x, z, t_i)$  = componente dinâmico;

$\langle 10 \log I_D(x, z) \rangle_{t_i}$  = componente estático, média temporal entre as imagens.

#### 4.10. Ensaios de microscopia de fluorescência

As placas foram coradas com SYTOX<sup>®</sup> Green (10 µL/poço, Thermo Scientific) e Hoechst 33342 (10 µg/mL, Sigma-Aldrich) em meio de cultura e mantidas na incubadora por 60 minutos para análise. O corante SYTOX<sup>®</sup> Green cora os núcleos de todas as células inviáveis presentes na amostra, enquanto o corante Hoechst 33342 cora todos os núcleos. Os experimentos foram acompanhados durante intervalos de quatro dias, para amostras irradiadas, e oito dias, para triagem de amostras não irradiadas. Os experimentos foram realizados no equipamento INCell Analyzer 2500 HS (Cytiva Lifesciences), utilizando objetiva com aumento de 4X (Nikon 4X/o.20, Plan Apo, CFI/60) e aquisição nos canais *brightfield* (campo claro), *blue* (fluorescência do Hoechst 33342) e *green* (fluorescência do SYTOX<sup>®</sup> Green). Cada esferoide foi capturado em *stacks* com 30 a 100 planos (*slices*) espaçados por 3 a 15 µm (z). As análises foram realizadas no software INCarta 1.12 (Cytiva Lifesciences).

#### 4.11. Tratamento dos dados brutos

As medidas obtidas pela microscopia de fluorescência em alta demanda (INCell Analyzer 2500HS) foram codificadas em dados brutos e organizadas em tabelas. Para preservar todas as informações contidas nas imagens coletadas ao longo do trabalho, foi necessário um armazenamento de 1 TB para realização da

triagem, dada a resolução do equipamento utilizado o trabalho gerou uma quantidade de 600 GB de imagens finais, para posterior análise. A Tabela 4 mostra todas as variáveis que compuseram o estudo. Foram adquiridas 32 variáveis.

Tabela 4 – Variáveis avaliadas no estudo.

| Variável                      | Descrição   |
|-------------------------------|---|
| Concentração MCF7             | 0,5; 0,7; 0,85; 1 (50, 70, 85 e 100% de MCF7)   |
| Dias em cultivo               | 1 a 8   |
| Total de Núcleos              | Número total de núcleos   |
| $\Delta$ Total/Dia            | (Número total de núcleos <sub>t<sub>n</sub></sub> ) - (Número total de núcleos <sub>t<sub>n-1</sub></sub> )                     |
| SYTOX®Green-                  | Número de núcleos células viáveis (sem marcação por SYTOX® Green)   |
| SYTOX®Green+                  | Número de núcleos células inviáveis (com marcação por SYTOX® Green)   |
| $\Delta$ Viáveis/Dia          | (Número total de núcleos viáveis <sub>t<sub>n</sub></sub> ) - (Número total de núcleos viáveis <sub>t<sub>n-1</sub></sub> )     |
| EsfericidadeMin - Hoechst     | Esfericidade mínima do número total de núcleos  |
| EsfericidadeMédia - Hoechst   | Esfericidade média do número total de núcleos   |
| EsfericidadeMáx - Hoechst     | Esfericidade máxima do número total de núcleos  |
| EsfericidadeMediana - Hoechst | Mediana da esfericidade do número total de núcleos  |
| ÁreaMin - Hoechst             | Área mínima do número total de núcleos  |
| ÁreaMédia - Hoechst           | Área média do número total de núcleos   |
| ÁreaMáx - Hoechst             | Área máxima do número total de núcleos  |
| ÁreaMediana - Hoechst         | Mediana da área do número total de núcleos  |
| VolumeMin - Hoechst           | Volume (Área x Z) mínimo do número total de núcleos   |
| VolumeMédia - Hoechst         | Volume (Área x Z) médio do número total de núcleos  |
| VolumeMáx - Hoechst           | Volume (Área x Z) máximo do número total de núcleos   |
| VolumeMediana - Hoechst       | Mediana do volume (Área x Z) do número total de núcleos   |
| $\Delta$ Inviáveis/Dia        | (Número total de núcleos inviáveis <sub>t<sub>n</sub></sub> ) - (Número total de núcleos inviáveis <sub>t<sub>n-1</sub></sub> ) |
| EsfericidadeMin - SYTOX®      | Esfericidade mínima do número de núcleos inviáveis  |
| EsfericidadeMédia - SYTOX®    | Esfericidade média do número de núcleos inviáveis   |
| EsfericidadeMáx - SYTOX®      | Esfericidade máxima do número de núcleos inviáveis  |
| EsfericidadeMediana - SYTOX®  | Mediana da esfericidade do número de núcleos inviáveis  |
| ÁreaMin - SYTOX®              | Área mínima do número de núcleos inviáveis  |
| ÁreaMédia - SYTOX®            | Área média do número de núcleos inviáveis   |
| ÁreaMáx - SYTOX®              | Área máxima do número de núcleos inviáveis  |
| ÁreaMediana - SYTOX®          | Mediana da área do número de núcleos inviáveis  |
| VolumeMin - SYTOX®            | Volume (Área x Z) mínimo do número de núcleos inviáveis   |
| VolumeMédia - SYTOX®          | Volume (Área x Z) médio do número de núcleos inviáveis  |
| VolumeMáx - SYTOX®            | Volume (Área x Z) máximo do número de núcleos inviáveis   |
| VolumeMediana - SYTOX®        | Mediana do volume (Área x Z) do número de núcleos inviáveis   |

Fonte: Autora da dissertação



Os valores brutos de cada variável foram transformados em valores de escores-z robustos (*robust z-scores*) usando o aplicativo *Microsoft Excel 2010*, seguindo a fórmula (3), para a estandardização dos dados e consequente redução dos efeitos de *outliers* sobre as medianas.

$$RZS \text{ ou } EZR = \frac{(X_i - \eta_{X\eta})}{\eta(|X_i - \eta_{X\eta}|)} \quad (3)$$

Onde:

RZS ou EZR = *Robust z-score* – escore-z robusto;

$X_i$  = Valor da variável;

$\eta_{X\eta}$  = Mediana dos valores da variável no grupo estudado;

$\eta(|X_i - \eta_{X\eta}|)$  = Mediana da distância absoluta (módulo da diferença) entre o valor da variável e sua mediana no grupo estudado.

#### 4.12. Análise de componentes principais (PCA)

A análise de componentes principais (ACP, ou PCA em inglês) foi realizada para a redução da dimensionalidade do conjunto de 32 variáveis. Os EZR calculados foram tabulados no pacote estatístico GraphPad Prism 9.4.0 e submetidos à APC com nova estandardização dos dados, escalando as médias para 1 e o desvio padrão para 0. Embora reduza a variância total dos dados, esta metodologia ajuda a comparar dados de naturezas e desvios padrão diferentes.

#### 4.13. Análise de correlação entre variáveis selecionadas

Foi utilizado o pacote estatístico JASP (JASP Team, 2023), e aplicado o método de Kendall, que calcula os coeficientes  $\tau$ -b (tau-b) de correlação entre as variáveis selecionadas.

#### 4.14. Estatística de comparação entre grupos

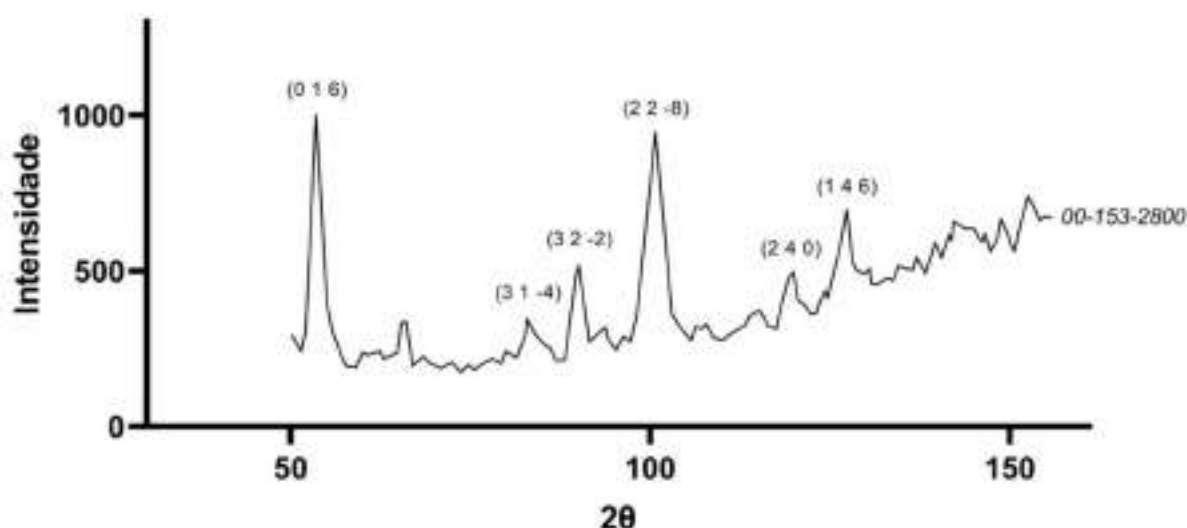
As variáveis selecionadas pela RCP foram consideradas. O experimento avaliou as variáveis já estudadas em grupos experimentais formados por cultivos celulares compostos por proporções diferentes de células de adenocarcinoma

mamário humano (MCF7) e de fibroblastos saudáveis humanos (HF002-J). As proporções estudadas foram (MCF7/HF002-J): 50/50, 70/30, 85/15, 100/0. Além disso, foram também avaliados os grupos irradiados com 0,5 ou 4Gy de radiação gama ( $^{60}\text{Co}$ ) e mantidos com 100 ou 200  $\mu\text{L}$  de meio de cultura.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As análises das NP's utilizadas para construção do modelo 3D de cultura de células foram feitas priorizando a morfologia e o tamanho das partículas sintetizadas. A Figura 13, ilustra o padrão de raios X obtido com a amostra analisada por DRX. O difratograma indica picos de difração atribuídos a estrutura de espinélio invertido correspondente a organização cristalina da magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , COD: 00-153-2800). Foram calculados tamanhos médios de 57,574 nm dos cristalitos obtidos a partir da equação de Scherrer.

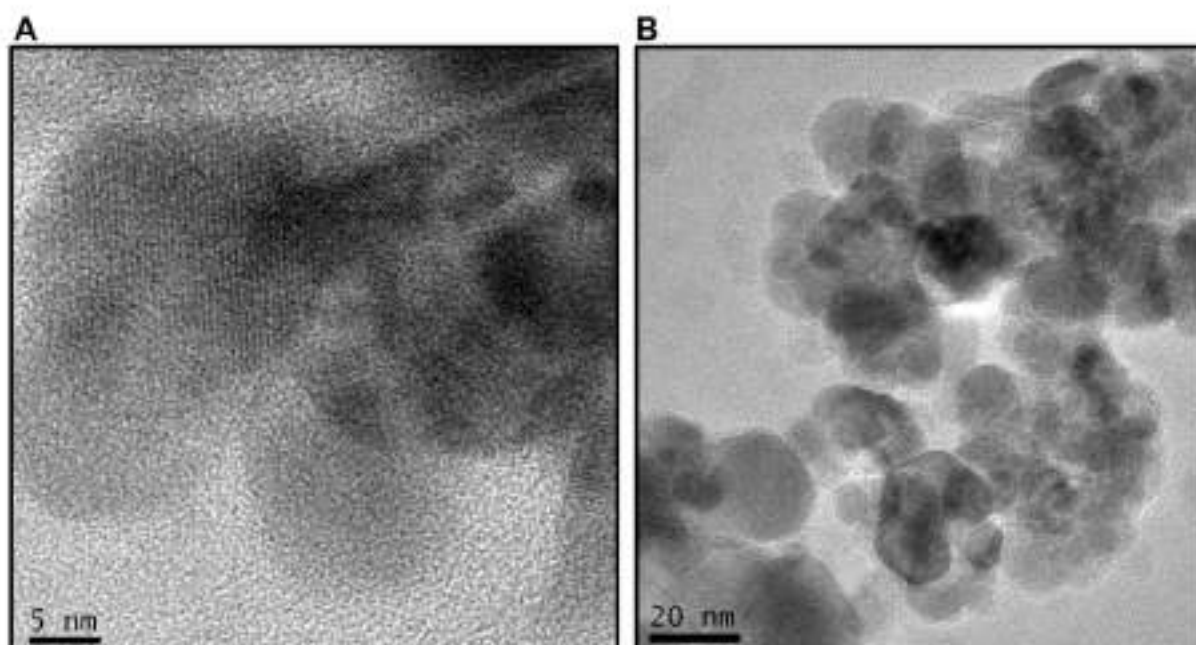
Figura 13 – Difratograma de raios X da amostra de nanopartículas de óxido de ferro sintetizadas com Glicina (Gly) como surfactante e funcionalizadas com Poli-L-lisina (PLL). Os números acima dos picos referem-se aos planos cristalinos encontrados nas amostras.



Fonte: Autora da dissertação

As imagens de MET ilustram de forma eficaz a distribuição e formato das NP's de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , expondo partículas quasi-cúbicas. Foi verificada uma considerável distribuição de tamanho na amostra estudada, Figura 14. É possível observar planos atômicos em algumas nanopartículas, ressaltando características monocristalina presente na amostra. A interação do feixe de elétrons de alta energia com a amostra revela NP's com baixo artefato de agregação, observadas em resoluções espaciais de de 5 nm e 20 nm.

Figura 14 – Imagens de Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) de nanopartículas de óxido de ferro sintetizadas com Glicina (Gly) como surfactante e funcionalizadas com Poli-L-lisina (PLL).



Fonte: Autora da dissertação

A magnetita, como visto anteriormente, é evidenciada como uma partícula amplamente utilizada em diversos estudos na área da biologia e medicina (INOZEMTSEVA *et al.*, 2018; MUKHORTOVA *et al.*, 2022). A estabilidade das NP's de  $Fe_3O_4$  e a biocompatibilidade com a funcionalização feita por PLL já foi um tópico anteriormente estudado pelo grupo (BONFIM, 2019). Por isso, no presente trabalho as NP's foram sintetizadas para servir como base da construção do modelo 3D de cultura de células. A utilização das NP's nas células em cultura tiveram resultados compatíveis com o esperado, mantendo alta adesão na membrana celular e resistência à tripsinização/manipulação em ensaios posteriores.

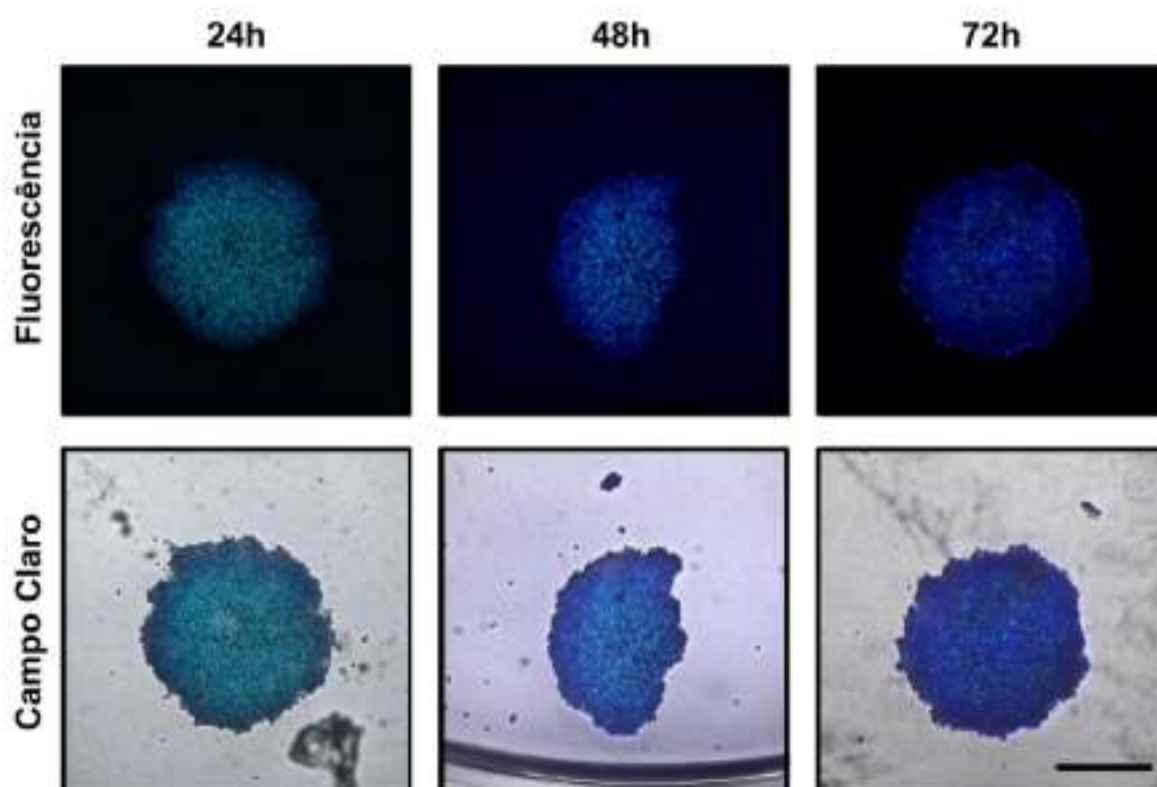
Para construção do modelo 3D foram estudados polímeros biomédicos e biocompatíveis como os da classe de Pluronic® F-127, usados como carreadores de fármacos na medicina (OTTENBRITE & JAVAN, 2005), por sua capacidade de formar micelas, estruturas anfifílicas, que separam o meio interno ao meio externo ao qual a estrutura estará agregada. Neste trabalho utiliza-se o Pluronic® F-127 em 2-propanol anidro, o que permite que a porção hidrofóbica presente na micela seja direcionado para o centro do poço, impedindo a adesão celular.

A Figura 15 mostra o aspecto típico dos esferóides de MCF7 após 24, 48 ou 72 horas de incubação. Neste experimento foi realizada a estabilidade dos



esferóides após horas de incubação referente à quantidade de células SYTOX® Green positivas, portanto inviáveis. Nas aquisições é visível uma redução do número de células mortas após 72 horas de incubação, indicando que o número total de células aumenta e a concentração relativa de células inviáveis declina ao longo do período de incubação. O experimento mostrou que esferóides com 72 horas de incubação são íntegros, pouco friáveis (baixa quantidade de fragmentos) e com poucos eventos de morte celular, mostrando-se adequados aos experimentos.

Figura 15 – Avaliação do crescimento dos esferóides. Fotomicrografias obtidas por microscopia de fluorescência no equipamento INCell Analyzer 2500 HS (Cytiva Lifesciences) por oito dias em placa de 96 poços com SYTOX® Green (verde) indicando núcleos de células mortas e Hoechst 33342 (azul) indicando núcleos viáveis. Barra de 200 µm.

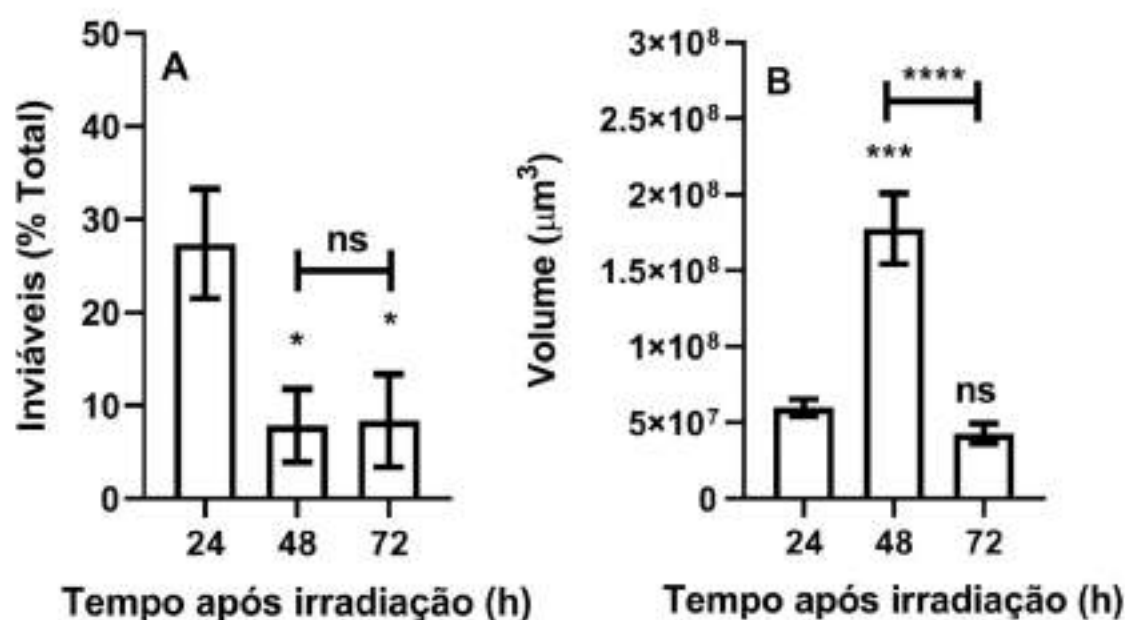


Fonte: Autora da dissertação

O modelo de tratamento para placas de 96 poços, como explicado ao longo deste trabalho, mantém uma boa alternativa para cultivo e análise de esferóides de MCF7 no equipamento de microscopia de fluorescência INCell Analyzer 2500 HS (Cytiva Lifesciences). A Figura 16 mostra a quantificação de núcleos de células mortas (A) e volume dos esferóides (B) irradiados a 2 Gy em placas tratadas com

Pluronic® F-127. As placas tratadas desta forma apresentaram boa compatibilidade com os estudos de microscopia de fluorescência. Porém, quando utilizado para ensaios de citotoxicidade, a técnica não proveu reprodutibilidade em relação aos valores de absorbância. Portanto o presente estudo manteve o uso de placas de 96 poços *Cell-Repellent* (Greiner BIO-ONE) para aprimoramento da técnica utilizada em ensaios posteriores.

Figura 16 – Quantidades de células mortas (A) e volume dos esferóides (B) de MCF7 irradiados a 2Gy. Barras: erro padrão das médias. (\*):  $p < 0,05$ . (\*\*\*):  $p < 0,001$ . (\*\*\*\*):  $p < 0,0001$ . (ns): não significativo em relação ao controle (24h).



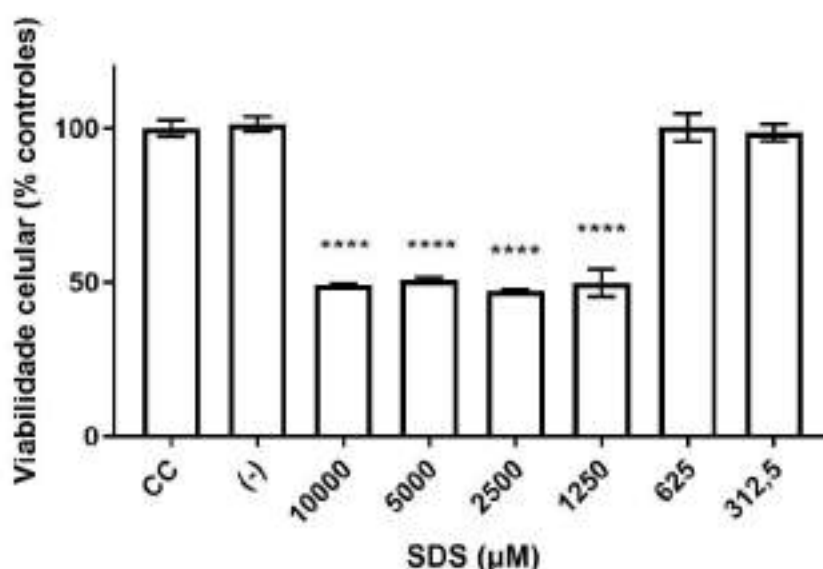
Fonte: Autora da dissertação

O controle de viabilidade celular apresentado na Figura 17, utiliza o princípio do ensaio colorimétrico quantitativo para medir a atividade metabólica das células, a redução do componente tetrazólico (MTS) utiliza o agente redutor Metilsulfato de Fenazina (PMS) em meio de cultura para reação de redutase mitocondrial (MALICH *et al.*, 1997; KUETE *et al.*, 2017).

Como observado, o grupo controle positivo composto pelo Dimetilsulfóxido (DMSO), um solvente universal para compostos polares e apolares, apresentou citotoxicidade de forma gradual em relação a quantidade percentual adicionada em cultura. Este resultado corrobora com os achados na literatura (DLUDLA *et al.*,

2021). O grupo controle positivo utilizando Dodecil Sulfato de Sódio (SDS) induziu resposta diferente. Aparentemente o desnaturante agiu sobre as células induzindo citotoxicidade em maiores quantidades em diferentes concentrações, induzindo toxicidade relevante em concentrações a partir de 625  $\mu\text{M}$ , conforme Figura 17.

Figura 17 – Citotoxicidade de concentrações de SDS em esferóides de MCF7. Barras: erro padrão das médias. (\*\*\*\*):  $p < 0,0001$ . Medida de significância estatística relacionada ao grupo controle (CC).



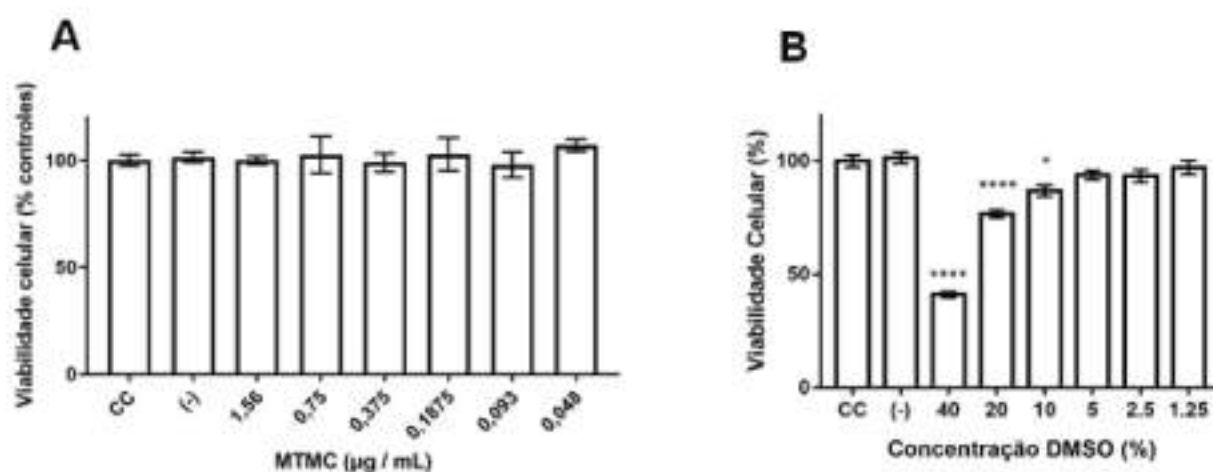
Fonte: Autora da dissertação

A Mitomicina-C tem ação antitumoral discreta em cultivos de MCF7 em 2 dimensões (ZHOU *et al.*, 2017; AL-OTAIBI *et al.*, 2018; PIRNIA *et al.*, 2002). No entanto, há relatos de dificuldade de difusão em tumores sólidos, requerendo perfusão artificial, ou ainda, vascularização no caso de situação *in vivo* (FISCHER *et al.*, 2013), sugerindo sua dificuldade de penetração em várias camadas de células. A estrutura tridimensional possibilita o aparecimento de gradientes de nutrientes, excretas, gases e de pH nas diversas camadas celulares. O valor de pH é reduzido conforme se penetra nas camadas (BOEDTKJER & PEDERSEN, 2020). A Mitomicina-C é degradável em pH baixo (FANG *et al.*, 2018) e é possível além de relacionar à sua relativa baixa capacidade de difusão, sua sensibilidade ao pH à sua relativa baixa eficácia relatada pelo presente trabalho, conforme visualizado na Figura 18 (A).

A literatura relaciona o DMSO a um efeito aparentemente bimodal; em doses

baixas o DMSO pode ser considerado até mesmo benéfico para as células mas em grandes quantidades este agente tende a ser considerado extremamente tóxico por sua facilidade em mediar morte celular por apoptose e necrose (DLUDLA *et al.*, 2018). A Figura 18 (B) demonstra que porcentagens de 20% e 40% de DMSO podem ser utilizados como controle positivo para teste de citotoxicidade em células de MCF7 mantidas em cultura tridimensional.

Figura 18 – Citotoxicidade de concentrações de MTMC em esferóides de MCF7 (A) Barras: erro padrão das médias. (\*\*\*\*);  $p < 0,0001$ . Citotoxicidade de concentrações de DMSO em esferóides de MCF7 (B) Barras: erro padrão das médias. (\*\*\*\*);  $p < 0,0001$ . (\*);  $p < 0,05$ . C. Medida de significância estatística relacionada ao grupo controle (CC).



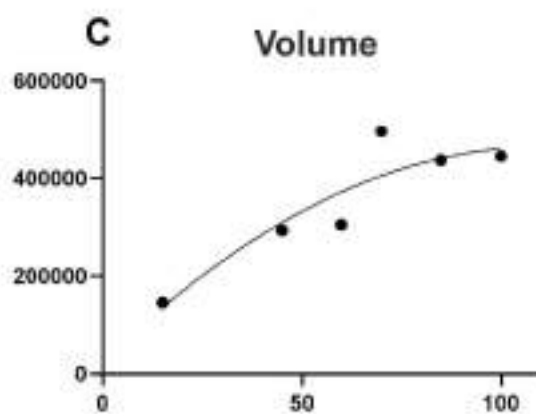
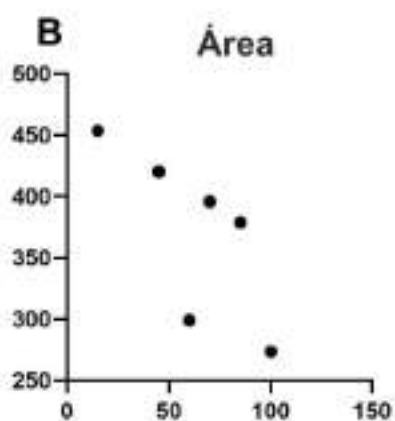
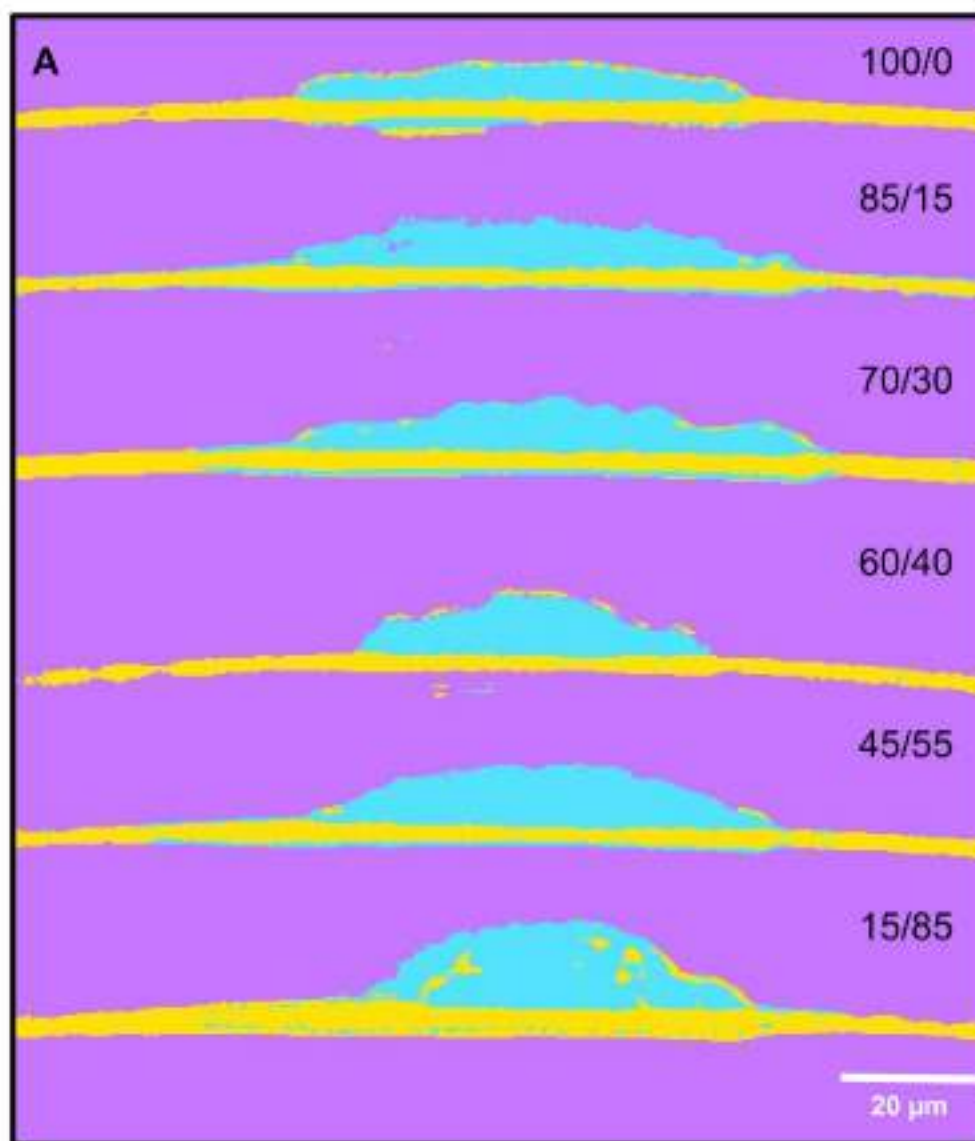
Fonte: Autora da dissertação

A análise por OCT foi realizada com o intuito de visualizar de maneira representativa o esferóide como um todo, tendo como foco o volume total do modelo construído. A Figura 19 resume a imagem segmentada dos esferóides fracionados, levando em consideração o meio de cultura presente no sistema, os esferóides apresentam um ponto central de medição diferente pela característica flutuante da cultura 3D e do giro natural dos esferóides fora de um campo magnético.

É possível perceber, na Figura 19, a tendência de agregação celular conforme a quantidade percentual de fibroblasto é adicionada ao sistema, quanto mais células HF002-J no modelo 3D menor e mais compacto é o esferoide formado. Por ter uma profundidade de penetração maior que o microscópio de fluorescência, foi possível observar uma diferença considerável entre a morfologia dos esferóides de MCF7 e os esferóides produzidos por co-cultura.

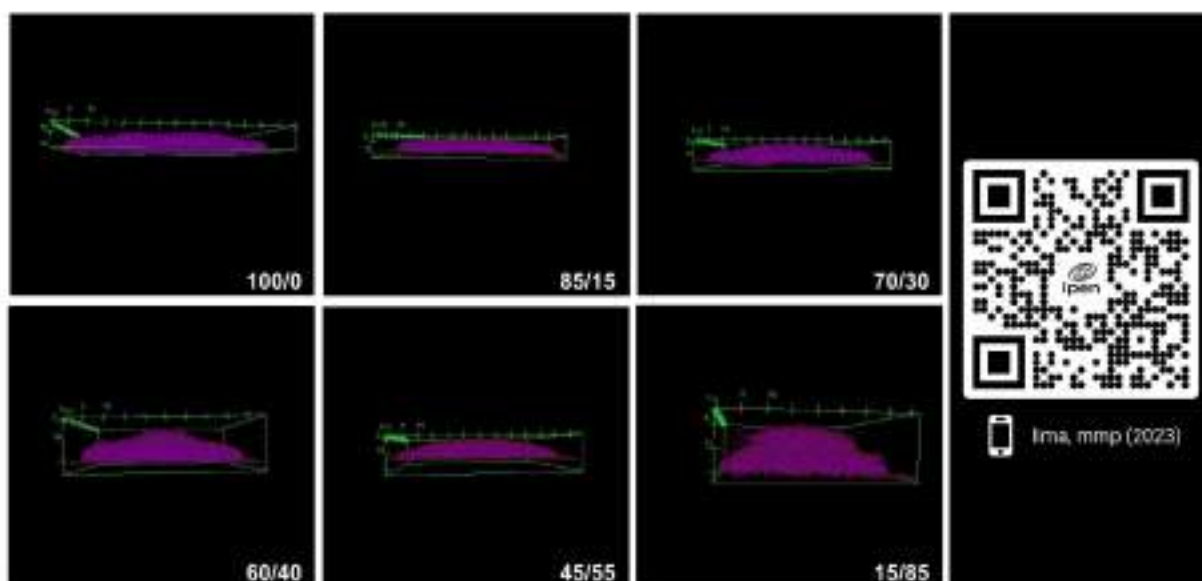


Figura 19 – (A) Segmentação de esferoides fracionados MCF7/HF002-J, reconstrução OCT. Amostragem observada: células (azul), meio de cultura (amarelo) e *Background* (roxo). (B) Área dos esferoides ( $\mu\text{m}^2$ , eixo y) em função da porcentagem de MCF7 utilizada (% , eixo x). (C) Volume dos esferoides ( $\mu\text{m}^3$ , eixo y) em função da porcentagem de MCF7 (% , eixo x).



O OCT permite imagens não invasivas para controle da morfologia do esferoide estudado. Como visto na Figura 20, região impermeável pela luz visível na estrutura do modelo 3D pode ser investigada pelo OCT, evidenciando aspectos como a distribuição das células no poço. Dentre as frações utilizadas, os esferóides de 60% MCF7 e 40% HFO02-J; 15% MCF7 e 85% HF002-J se destacaram, por manter um formato mais próximo do que se espera de uma esfera. Já é visto em literatura que os fibroblastos são mantidos em um estado inativo, em tecidos saudáveis, agindo no controle de mecanismos para regulação da arquitetura do tecido como a MEC (SALMENPERÄ *et al.*, 2016; DOMINGUES *et al.*, 2023), no resultado apresentado quanto mais fibroblastos no esferoide maior será a altura e o volume encontrado.

Figura 20 – Imagens de OCT reconstrução volumétrica de esferóides fracionados de MCF7/HF002-J. Escala de 10  $\mu\text{m}$ . QR Code: link do YouTube para uma playlist contendo as animações de cada uma das reconstruções

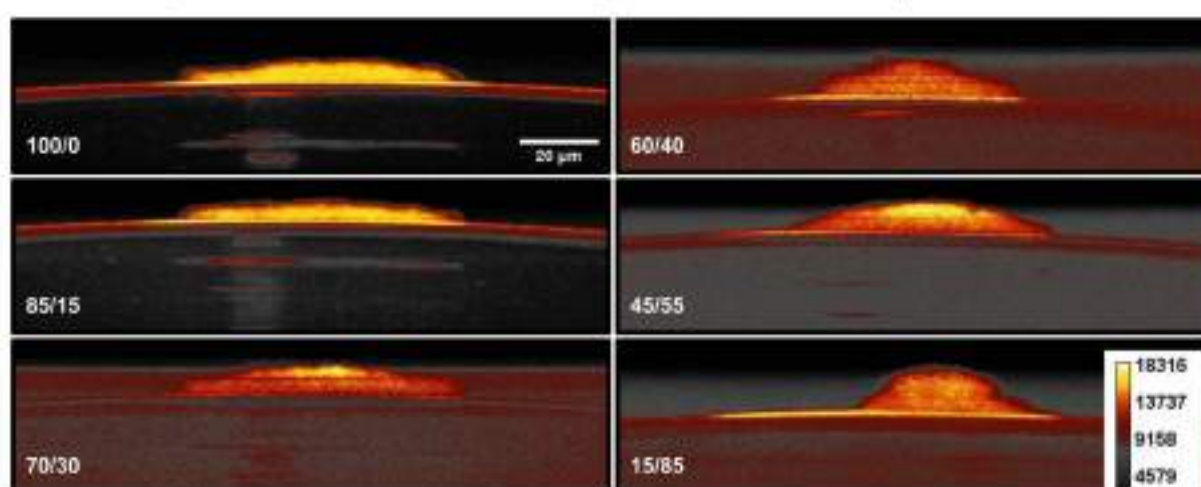


Fonte: Autora da dissertação

A permeabilidade do esferoide, em decorrência da densidade do mesmo, foi analisada ainda com o OCT, com base no coeficiente de atenuação óptica da imagem LIV, representativa no aspecto morfológico dos esferóides (EI-SADEK *et al.*, 2021). A Figura 21 demonstra a diferença entre os esferóides fracionados, resumindo a intensidade do laser de OCT presente na amostra. Os esferóides com menores concentrações de fibroblastos tendem a ter um sinal mais intenso

(branco/amarelo) demonstrando alta movimentação tecidual, mantendo um modelo disperso parecido com um "prato" por falta de sustentação. Com adição de fibroblastos no modelo, o sinal tende a se manter o mais próximo possível da água (preto), demonstrando uma maior densidade do tecido e isto fica ainda mais ostensivo quando verificamos a diferença morfológica do esferóide com maiores concentrações de HF002-J, onde o modelo 3D adquire um formato compacto e arredondado.

Figura 21 – Comparação entre imagens LIV de esferóides fracionados MCF7/HF002-J. Escala colorimétrica de 5 cores, branco, amarelo, laranja, vermelho e preto, onde o branco representa o maior sinal e preto o menor sinal detectado na imagem. Barra de escala 20  $\mu\text{m}$ .

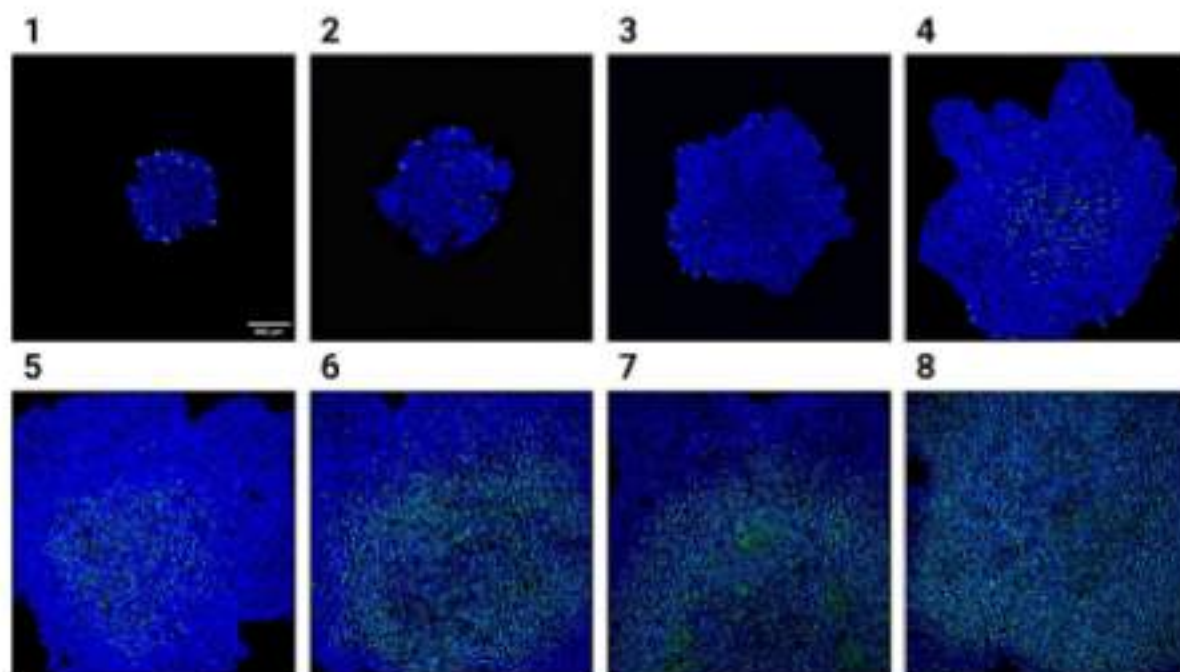


Fonte: Autora da dissertação.

A Figura 22 mostra o aspecto típico dos esferóides de concentração de 60% MCF7 e 40% HF002-J após 24h de incubação, analisados por oito dias após a semeadura. Foi possível observar o aumento do diâmetro do esferóide ao longo dos dias em cultura. Verificou-se diferenças entre os números de células mortas, coradas em verde por SYTOX<sup>®</sup> Green e o número de núcleos íntegros corados em azul por Hoechst 33342. No primeiro dia, apenas alguns pontos no esferóide apresentaram morte celular, enquanto no oitavo dia considerável área no interior marcou positivamente para morte celular.



Figura 22 – Avaliação do crescimento dos esferóides. Fotomicrografias obtidas por microscopia de fluorescência no equipamento INCell Analyzer 2500 HS (Cytiva Lifesciences) por oito dias (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8) em placa de 96 poço com SYTOX® Green (verde) indicando núcleos de células mortas e Hoechst 33342 (azul) indicando núcleos viáveis. Barra de 200 µm.

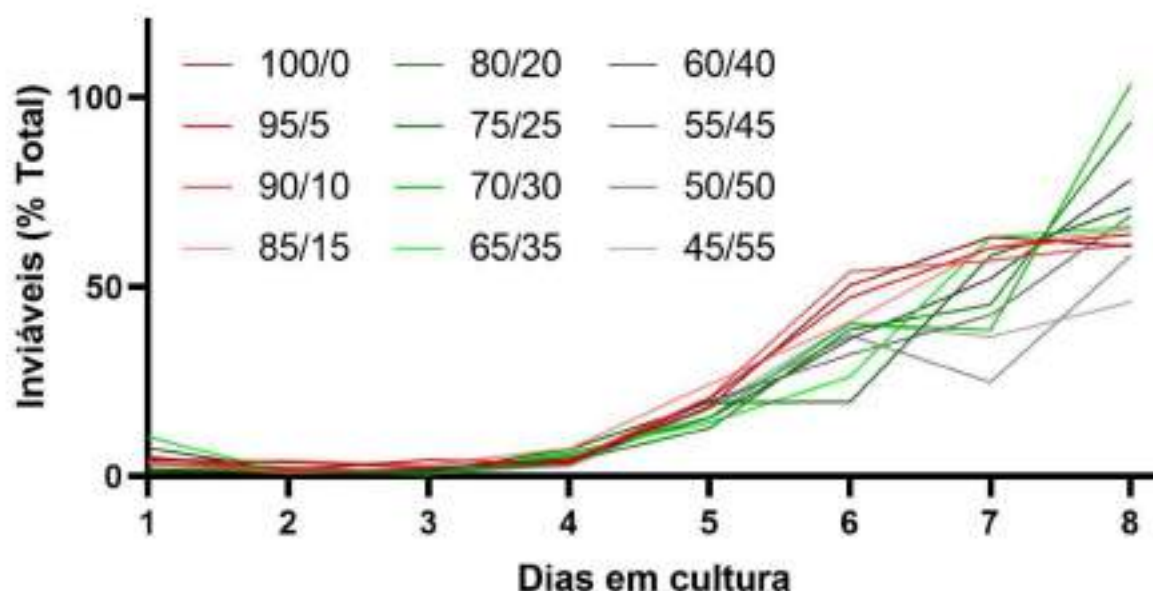


Fonte: Autora da dissertação

A partir das imagens obtidas, foi analisado um padrão de aumento da mortalidade entre as diversas combinações de concentrações de linhagens estudadas ao longo dos dias em cultura, como observado na Figura 23. É possível inferir que a partir do quarto dia a quantidade de morte celular aumenta de maneira considerável, os esferóides foram mantidos por oito dias sem troca de meio de cultura. Na periferia do esferoide são encontradas, em sua maioria, células viáveis enquanto no centro da estrutura tridimensional são encontradas células inviáveis, possivelmente pela dificuldade de difusão de nutrientes e oxigênio para o centro e de excretas e  $\text{CO}_2$  para o meio exterior pela interação célula-célula mais acentuada por este tipo de cultivo (ZHANG *et al.*, 2016). Devido a falta de nutrientes no meio as células presentes nos esferóides, na maioria das concentrações utilizadas, ultrapassou 50% de mortalidade no total de células estudadas.



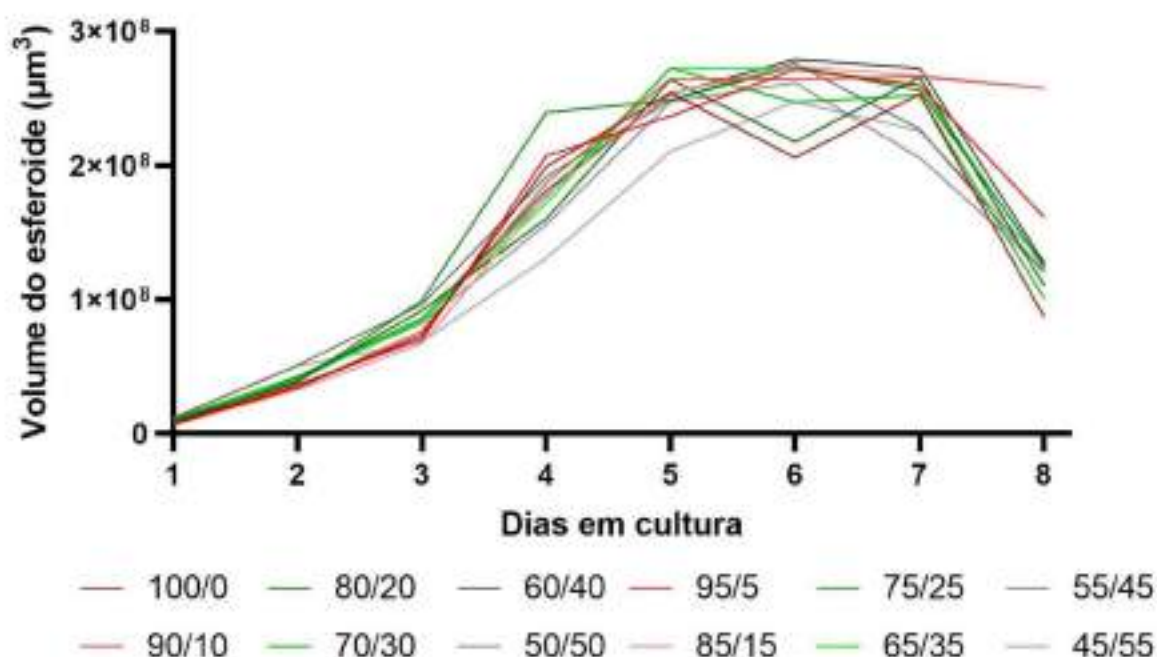
Figura 23 – Gráfico de porcentagens de mortalidade (núcleos inviáveis, positivos para SYTOX® Green) em esferoides formados por proporções diferentes de MCF7 e HF002-J ao longo dos dias de experimento. Concentrações referentes a fração MCF7/HF002-J.



Fonte: Autora da dissertação

Ao longo do experimento, o campo de visão capturado pela objetiva 4X aparentou ser insuficiente para as dimensões da amostra devido ao aumento do volume do esferoide. Até o quinto dia, a amostra pôde ser analisada de maneira íntegra no campo de visão do equipamento, porém a partir do sexto dia apenas cerca de metade da extensão de cada amostra puderam ser analisadas e no oitavo dia cerca de um terço correspondia ao campo de visão analisado. Tal variação pode ser observada na Figura 24. Os volumes dos esferóides da placa tiveram um crescimento gradativo até o quinto dia, este fenômeno já estava previsto em literatura relacionado ao crescimento normalizado das células semeadas (JAYME *et al.*, 2022). Com a restrição do campo de visão, as análises passaram a ter um desvio na contagem levando à redução considerável entre os volumes computados.

Figura 24 – Volumes dos esferóides em função dos dias em cultura. Concentrações referentes a fração MCF7/HF002-J.

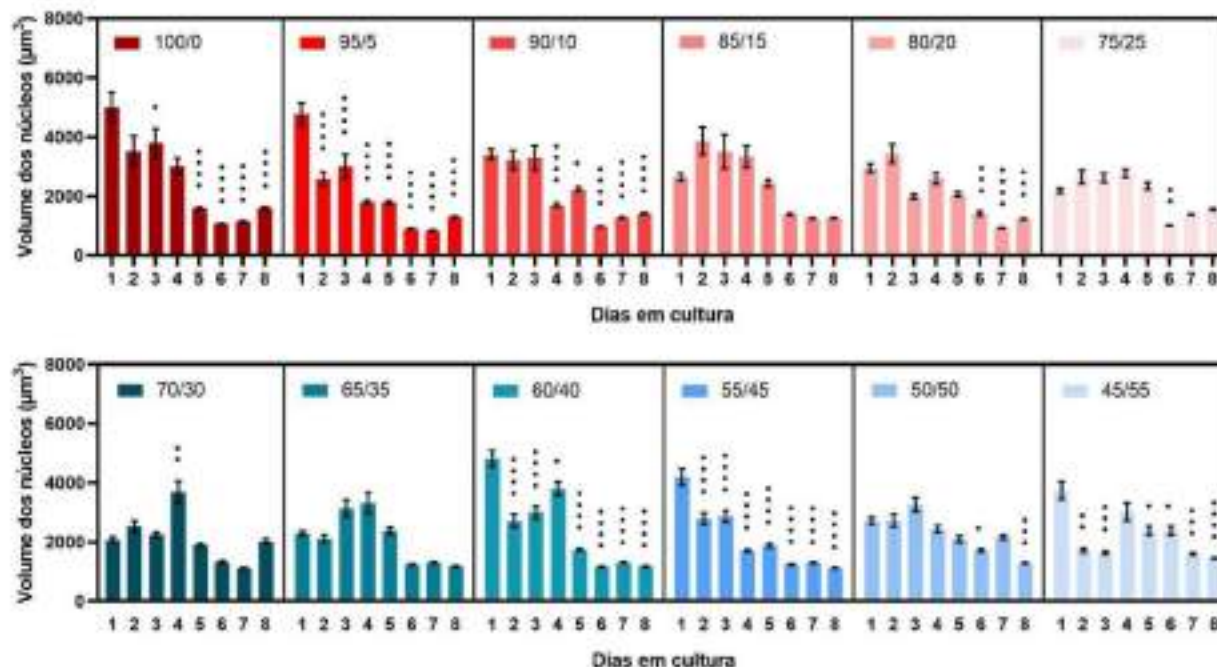


Fonte: Autora da dissertação

Quando analisa-se um esferóide de co-cultura, deve-se levar em consideração que além das diferenças entre as linhagens celulares estudadas o tamanho e a geometria do esferóide corroboram com as características presentes no microambiente estudado. É comum que as células centrais tendam a ser menores pela compressão realizada pela interação célula-célula enquanto as células da periferia mantêm tamanho acentuado pela alta taxa de proliferação celular proveniente neste local (ROJAS-CALDERÓN *et al.*, 2018; BIALKOWSKA *et al.*, 2020).

O controle do volume total de células, observado na Figura 25, demonstra que nos primeiros dias de cultura as células estão se adaptando ao local em que foram semeadas. Ao longo dos dias o esferóide passa a ter uma variação do volume nuclear mais acentuada e este fenômeno acontece de maneiras heterogêneas entre as concentrações estudadas.

Figura 25 – Gráficos de controle de volume dos núcleos totais em função dos dias em cultura. Concentrações referentes a fração MCF7/HF002-J. Barras: erros padrão das médias. (\*)  $p < 0,05$ . (\*\*)  $p < 0,01$ . (\*\*\*)  $p < 0,001$ . (\*\*\*\*):  $p < 0,0001$  em relação ao controle (Dia 1).



Fonte: Autora da dissertação

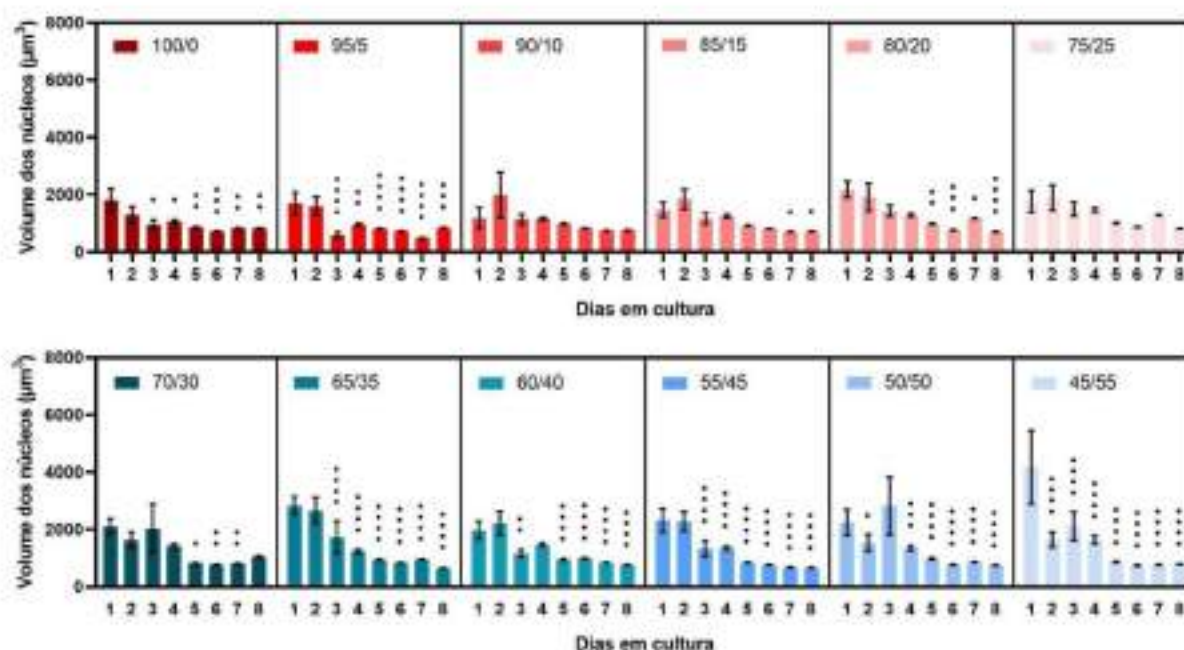
Quando observamos a diferença volumétrica entre os núcleos de células inviáveis, demonstrado na Figura 26, tem como esperado tamanhos reduzidos e que ao longo do tempo sofrem alterações significativas quando comparados com as mesmas populações de amostragem. O que pode também ser percebido com este resultado é que a partir do terceiro dia os núcleos começam a apresentar diferenças estatísticas, isso pode envolver a quantidade crescente da mortalidade neste mesmo período estudado.

A variação do volume dos núcleos ocorre por fatores que se relacionam e podem estar ligados em diferentes categorias como tipo celular, ciclo celular, temperatura, pH presente dentro das organelas nucleares e entre outros aspectos que ainda estão sendo estudados para uma melhor definição desta característica morfológica (CHAN *et al.*, 2017; CANTWELL & NURSE, 2019; Efremov *et al.*, 2022). Pode ser influenciado pela atividade de proteínas do envelope nuclear, especialmente lamininas formadoras dos andaimes proteicos da carioteca (JEVTIC *et al.*, 2015) e por outras proteínas como as nesprinas, que interligam a carioteca ao citoesqueleto e tem relações com processos de ciclo celular (LU *et al.*, 2012).



A mecânica nuclear, descrita ao longo dos anos, tem como fundamento a dispersão da cromatina, responsável pela organização das macromoléculas presentes no núcleo e a rigidez superficial, impactando diretamente no tamanho e formato do núcleo (LEBEAUPIN *et al.*, 2018; BAIRAMUKOV *et al.*, 2022).

Figura 26 – Gráficos de controle de volume dos núcleos de células inviáveis em função dos dias em cultura. Concentrações referentes a fração MCF7/HF002-J. Barras: erros padrão das médias. (\*):  $p < 0,05$ . (\*\*):  $p < 0,01$ . (\*\*\*):  $p < 0,001$ . (\*\*\*\*):  $p < 0,0001$  em relação ao controle (Dia 1).



Fonte: Autora da dissertação

Ao trabalhar com conjuntos de dados derivados de experimentos de análise celular por imagens de microscopia, diversos fatores podem desviar a distribuição de dados pela inserção de valores discrepantes. Além disso, para eliminar artefatos sistemáticos na correção de dados, pontos fora da curva podem ser deliberadamente excluídos das análises microscópicas manuais, ou em baixa demanda. Porém, quando gerados em alta demanda, a frequência destes valores pode aumentar em decorrência da existência de erros aleatórios ou sistemáticos (DRAGIEV *et al.*, 2011).

Também deve-se contar com erros de sistema causados por múltiplos fatores, como exemplo, a variabilidade célula-célula pode ser alta (SNIJDER & PELKMANS, 2011), às variações entre a qualidade dos reagentes, variabilidade da transparência das placas de ensaio, potência dos lasers de excitação de



fluorescência, entre outros (MALO *et al.*, 2006). No presente trabalho, a padronização de um modelo de análise de dados compatível com o modelo 3D desenvolvido foi indispensável. Para isto, foram traçados dois critérios fundamentais: o modelo deve manter uma quantificação padronizada que consiga detectar a variabilidade de compostos presentes entre as placas e deve delimitar efeitos de ruído de fundo, para que a separação dos dados analisados ocorram sem falsos positivos.

Entre as metodologias de standardização das medições, estão as denominadas "dependentes de controles", como por exemplo a padronização por porcentagem de controles não-tratados e a porcentagem normalizada de inibição (MPINDI *et al.*, 2015). A métrica de porcentagem de controles não-tratados utiliza a comparação do percentual do controle positivo (onde a substância utilizada no experimento tem um alto nível de atividade) e o controle negativo (onde a substância utilizada no experimento não exerce efeito na amostra em níveis moleculares) para detectar a variabilidade entre os elementos da placa. A porcentagem normalizada de inibição utiliza a diferença da média do sinal do controle positivo e o sinal da amostra dividida pela diferença entre a média do controle negativo e o sinal da amostra (GUPTA *et al.*, 2020) como pode-se observar na Equação 4.

$$X_i' = \left[ \frac{H - X_i}{L - X_i} \right] \times 100\% \quad (4)$$

Onde:

$X_i'$  = Porcentagem normalizada de inibição;

$X_i$  = Sinal da amostra;

$H$  = Média do sinal do controle positivo;

$L$  = Média do sinal do controle negativo.

Ensaio de perfil, são conhecidos por manter abordagens que requerem grande número de replicatas e sofrem com efeitos da localização dos controles ou da integridade dos mesmos (BRAY *et al.*, 2017). Portanto, são preferíveis estratégias que não dependam de dados extrínsecos ao grupo experimental, como o score-Z

(Z-score). O método escore-Z utiliza todas as medidas de variação dentro da placa como um composto de controle, sendo assim o cálculo feito a partir deste princípio é formado pela diferença entre o sinal da amostra e a média dos sinais do grupo da amostra, dividida pelo desvio padrão dos sinais do grupo da amostra, Equação 5.

$$Z = \frac{X_i - \bar{X}}{SD} \quad (5)$$

Onde:

$Z$  = escore-Z;

$X_i$  = Sinal da amostra;

$\bar{X}$  = Média dos sinais do grupo da amostra;

$SD$  = Desvio padrão dos sinais do grupo da amostra.

O cálculo centraliza a população para que tenha média = 0 e desvio padrão = 1. Embora não necessite do valor de controles para ser calculado, o valor de escore-Z é dependente da média e do desvio padrão do grupo, estando sujeito a distorções na presença de valores discrepantes de módulo superior à média, ou em grande quantidade. Ainda assume que a maioria das situações experimentais (tratamentos, por exemplo) é ineficaz, portanto, o desvio padrão é o mesmo do encontrado em controles negativos, o que nem sempre pode ser confirmado (MALO *et al.*, 2006), além de ter pouca capacidade de discriminar mais de uma população entre o grupo avaliado (PEARSON *et al.*, 2022).

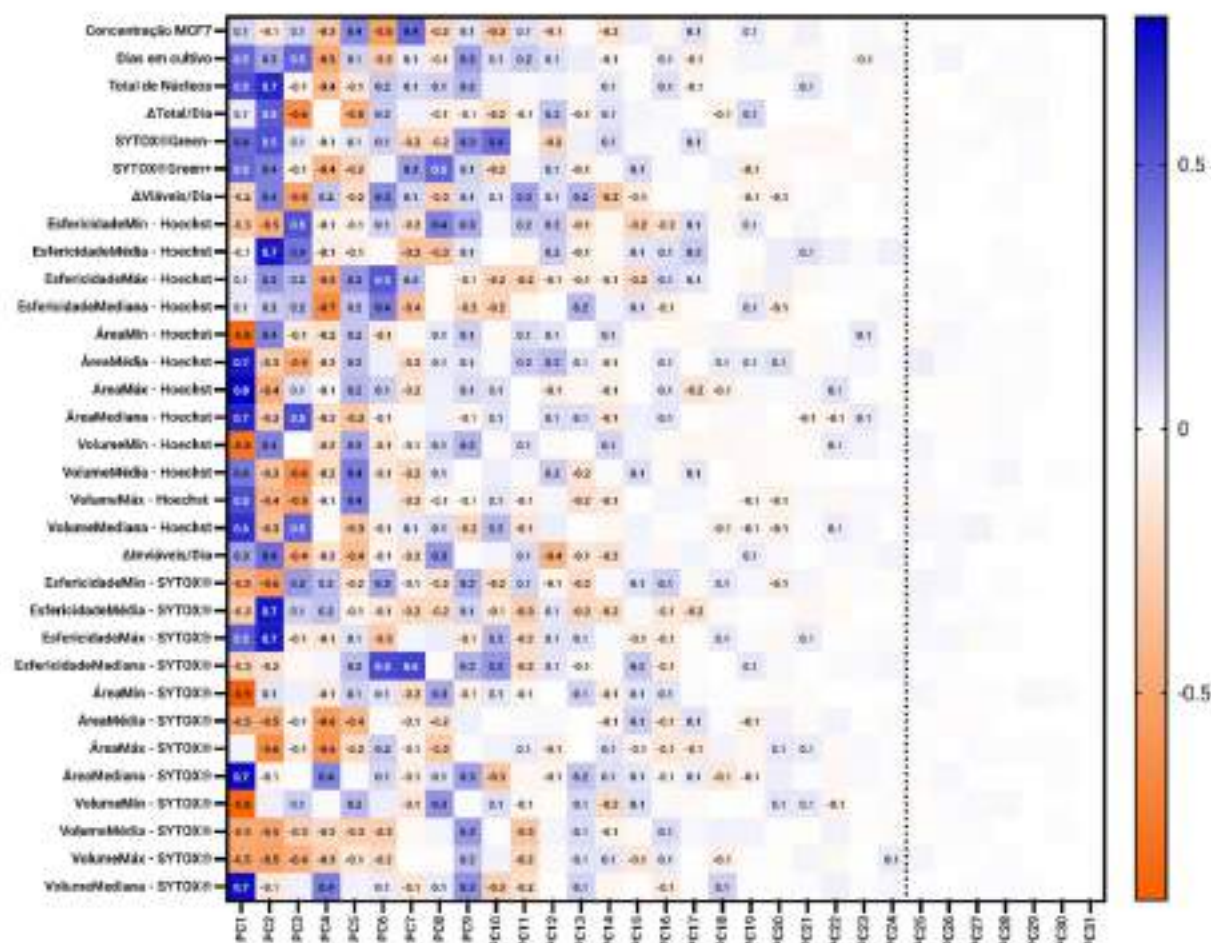
O presente trabalho escolheu a standardização pela metodologia do escore-z robusto (EZR), variação do escore-Z (IGLEWICZ & HOAGLIN, 1993) que habilita a eliminação de valores maiores que 3,5 ou menores que -3,5 como discrepantes em potencial. Há modificações que forçam a distribuição normal (IGLEWICZ & HOAGLIN, 2010), mas o trabalho optou por não retirar valores nesta etapa, utilizando posteriormente uma metodologia específica para isto.

A intenção da standardização pelo cálculo do EZR de cada amostra é reduzir a variância, uma vez que a mediana do grupo é subtraída do valor da amostra e depois dividida pela distância absoluta (módulo da diferença) entre o valor da variável e sua mediana no grupo, além de não requerer distribuição normal dos

dados (BRAY *et al.*, 2004). Sua aplicação em análise celular por imagem em alta demanda é abrangente e costumeira (NAZLAMOVA *et al.*, 2021; VINCENT *et al.*, 2020); embora haja discussões sobre sua precisão (GUYON *et al.*, 2015).

O número máximo de componentes gerados na ACP é menor ou igual ao número de variáveis relacionadas. No entanto, utilizar todos os componentes vai em direção oposta ao próprio intuito da análise, que é reduzir a dimensionalidade diminuindo o número de variáveis relevantes. O trabalho encontrou, numa primeira instância, 31 componentes principais, como mostra a Figura 27.

Figura 27 – Gráfico de correlação com coeficientes de Pearson entre os componentes principais (PC) gerados livremente e as cargas fatoriais calculadas das variáveis do trabalho. A linha tracejada delimita o último componente que apresenta um coeficiente de correlação significativamente diferente de 0.



Fonte: Autora da dissertação

Embora pela figura seja possível observar que, nem todos os componentes têm cargas fatoriais diferentes de 0 (faixa delimitada pela linha pontilhada que compreende os componentes 1 a 24), também é possível entender que a simples

observação da correlação das cargas fatoriais de cada variável em relação aos componentes não tem capacidade de reduzir o número dos mesmos, não tendo sido adequada no estudo para reter apenas variáveis com relevância.

Ainda que o cálculo de correlações por Pearson não seja adequado a dados que, conforme dados apresentados em seção posterior do texto, não possuem distribuição normal, (DEWINTER *et al.*, 2016; ROVETTA, 2020), a ACP acaba por ajustar de certa forma os dados a relações lineares entre si (ALKARKHI & ALGARAGHULI, 2019; XIA, 2020). Além disso, a estandardização pelo EZR reduz a relevância de valores discrepantes da mediana, ajudando a linearizar os dados e colocando-os em situação mais adequada à ACP.

É possível avaliar diversos parâmetros calculados para determinar quais componentes serão retidos para análises posteriores. Foram utilizados os seguintes critérios:

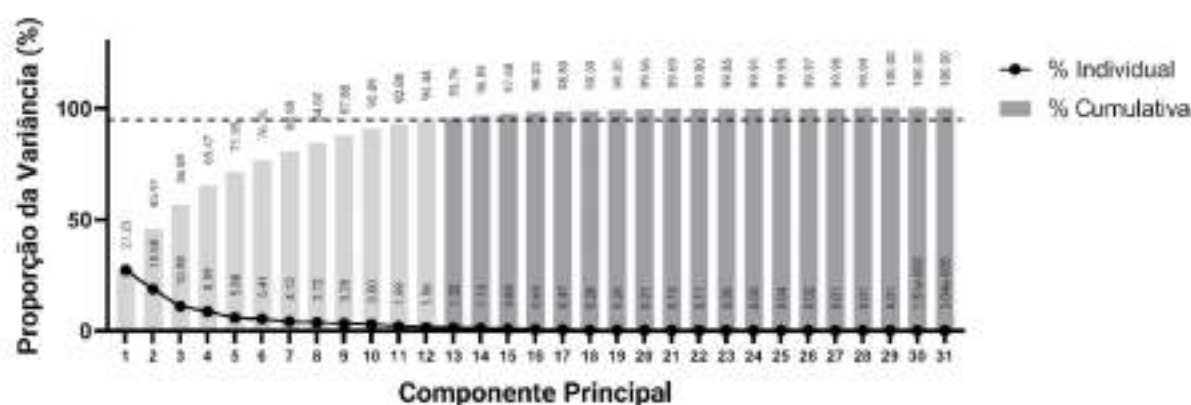
- A escolha de componentes cuja proporção de variância cumulativa atinja uma maioria vasta (90 a 95%);
- O uso da "regra de Kaiser-Guttman" (KAISER, 1960), escolhendo componentes cujo autovalor seja maior ou igual a 1;
- Utilizando análise paralela, que simula dados com algoritmo de Monte Carlo cujas dimensionalidades sejam as mesmas dos dados experimentais, computa percentis relevantes (usualmente o percentil 95%) e os aplica aos dados experimentais (HORN, 1965; DINNO, 2009);
- Usando o modelo broken-stick, que calcula uma curva de proporções esperadas de variância dos auto valores e compara com a experimental, e considera-se elegíveis para retenção os componentes cujo valor esperado seja menor do que o experimental (FRONTIER, 1976);
- Escolhendo componentes cujos autovalores sejam objetivamente maiores do que os demais;
- Comparação e estimativas entre outros métodos, discutidos em outros trabalhos, (GORETZKO & BÜHNER, 2022; AUERSUALD & MOSHAGEN, 2019; JACKSON, 1993; SILVA *et al.*, 2020; CANGELOSI & GORIELY, 2007), para obtenção de uma variedade de campo, mesmo que estes não necessariamente construíssem o escopo dos dados do presente trabalho.

Dessa forma, foi realizada inicialmente uma análise exploratória com o



mínimo de restrições possível, a qual gerou um número livre de componentes principais. A ACP encontrou inicialmente 31 componentes principais. A Figura 28 mostra as proporções de variância, individual e cumulativa, de cada um dos componentes iniciais. É importante ressaltar que, os componentes 1 a 12 juntos contém 95% de toda a variância presente na placa e por isso estão destacados em um tom de cinza mais claro.

Figura 28 – Proporções da variância, individuais e cumulativas, de todos os componentes principais obtidos na primeira análise ACP. Linha tracejada: 95% da variância. Valores acima das barras: porcentagens cumulativas. Valores acima dos pontos: porcentagens individuais.



Fonte: Autora da dissertação

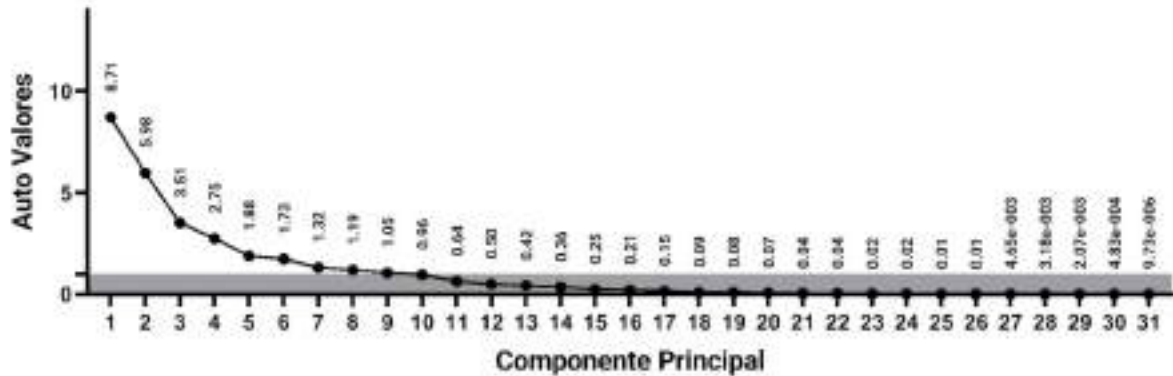
Os autovalores obtidos estão ilustrados na Figura 29. Os autovetores são encontrados durante o cálculo da PCA e são usados para transformar as variáveis originais em componentes principais. Cada autovetor corresponde a um componente principal e indica a direção na qual os dados têm a maior variabilidade. A magnitude do autovalor, medida pelo seu valor próprio (*eigenvalue*), indica a quantidade de variabilidade dos dados que é explicada por esse componente principal. Autovalores com valores próprios maiores indicam que a correspondente direção de variação possui uma contribuição mais significativa para a estrutura dos dados.

A área cinza do gráfico representa a zona na qual os autovalores são iguais ou menores que 1, representando a "Regra de Kaiser" (*Kaiser rule*) (KAISER, 1960), nome reduzido da "regra de Kaiser-Guttman", que assume que, se o autovetor de um componente tem valor maior que 1, sua variância deve obrigatoriamente ser maior do que a de uma única variável, portanto, convém ser considerada relevante na análise (GORETZKO & BÜHNER, 2022). Na Figura 29, os componentes 1 a 9



cumprem esta premissa, sendo representados acima da área cinza.

Figura 29 – Autovalores de cada um dos componentes principais obtidos. Números acima dos pontos: Valores dos autovalores. Área cinza: delimitação da área do gráfico na qual os auto valores são menores ou iguais a 1 (Kaiser rule).

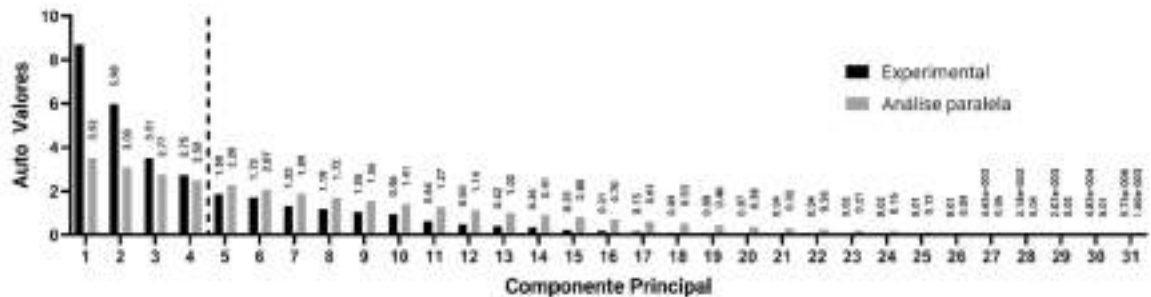


Fonte: Autora da dissertação

Tanto pela metodologia de retenção de componentes pela proporção majoritária da variância quanto pelo critério de Kaiser-Guttman, são utilizados parâmetros *ad hoc*, ou seja, formulados unicamente para ajustar-se à situação corrente, o que é ainda mais impactante no caso da retenção pela proporção majoritária. Em princípio, escolher visualmente um parâmetro não seria muito mais preciso do que escolhê-lo aleatoriamente sem supervisão, expondo a análise à dependência de certas condições de distribuição de dados (VIEIRA, 2012; CAMARGO, 2022), o que geralmente não se confirma em dados de microscopia de alta demanda / muitos conteúdos (HTS/HCS – High Throughput Screening / High Content Screening) (HANEY, 2014; BURCHFIELD *et al.*, 2013; SISAN *et al.*, 2012; LAPAN *et al.*, 2008).

Utilizando o pacote estatístico GraphPad Prism 9.4.0, foi gerado um conjunto artificial e randômico de dados, com a mesma dimensionalidade e tamanho do conjunto experimental. Para tanto, foram utilizadas 1000 simulações Monte-Carlo, usando como semente o valor 1694707560. Os autovalores do conjunto simulado foram comparados com os autovalores dos grupos experimentais e estão apresentados na Figura 30. Nesta, é possível observar uma linha tracejada que delimita o último componente do grupo experimental cujo valor é maior do que o simulado. Além disso, os valores experimentais e da análise paralela para o componente 31 foram idênticos, e por isso apenas um rótulo é mostrado.

Figura 30 – Autovalores de cada um dos componentes principais obtidos nos grupos experimentais (■) e simulados pela análise paralela (▨). Números delimitados acima de cada ponto: Valores dos autovalores.



Fonte: Autora da dissertação

A análise paralela calcula os autovalores e os compara com os autovalores experimentais. Utilizando o percentil de 95% (contenção de 95% da variabilidade), foram retidos os 4 primeiros componentes, conforme mostra a linha tracejada da Figura 30.

A metodologia de retenção pelo “*broken-stick*” implica na variância encontrada em cada componente, de maneira simplificada, a variação de cada componente ao ser dividida aleatoriamente em “n” valores é maior do que o esperado, quanto maior o valor encontrado mais forte é a relação daquele componente na análise estatística. O cálculo para encontrar essa relação foi dividido em duas colunas: a primeira é a da porcentagem da variância cumulativa (PVC). O PVC implica na probabilidade de um componente principal manter uma relação de variáveis considerada forte para reter aquele componente. Podendo ser calculada na Equação 6.

$$PVC = \frac{A_j}{\sum A_1, A_n} \quad (6)$$

Sendo:

$A_j$  = Auto valor do componente analisado;

$\sum A_1, A_n$  = Somatória dos autovalores do grupo, variando de 1 a n valores.

A segunda coluna é propriamente a dos valores “*broken-stick*”. É importante ressaltar que, ao ser encontrado, Equação 7, o autovetor de BS deve ser maior do que o encontrado no componente para manter proporções esperadas para manter aquele componente principal.

$$BS = \frac{\left(1 + \frac{X}{2} + \frac{X}{3} + \frac{X}{4} + \dots + \frac{X}{n}\right)}{n} \quad (7)$$

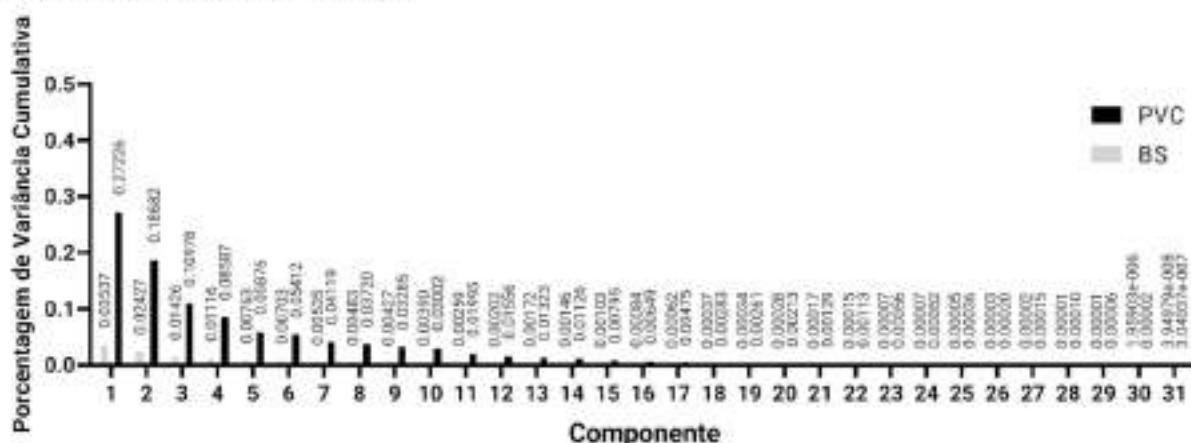
Onde:

$X$  = Valor de PVC calculado para uma amostra, Equação 6;

$n$  = Número de componentes criados.

A comparação dos PVC com os valores BS encontrados está na Figura 31. Nas condições experimentais avaliadas, o modelo “*broken-stick*” não foi capaz de reter nenhum componente. Sua natureza é de fato, restritiva, e sua capacidade de reter componentes depende de variância constante e apreciável entre os componentes (CARON, 2016), mesmo tendo sido relatado com baixo potencial de cometer erro estatístico do tipo-I (rejeição errônea de uma hipótese correta) (CARMIZ & PILLAR, 2018). Além disso, não se relaciona com o tamanho da amostra (FRANKLIN *et al.*, 1995), levando possivelmente à subestimação de componentes importantes (PATERSON *et al.*, 2006).

Figura 31 – Valores de PVC e de BS de cada um dos componentes principais obtidos nos grupos experimentais (■) e calculados (□).



Fonte: Autora da dissertação

Contrapõe-se então à retenção de componentes pela variância majoritária cumulativa, a qual tende a reter substancial proporção de componentes, provavelmente sendo útil em análises com fatores muito diversos, e sendo a abordagem “*broken-stick*” a com a menor retenção, aplicável mais adequadamente em grupos cujas cargas fatoriais se agrupam muito fortemente em apenas um

componente. No presente trabalho, a metodologia geração de conjunto de dados sintéticos e randômicos por algoritmo de Monte-Carlo, denominada análise paralela encontrou-se num meio-termo entre os extremos encontrados, não parecendo, ao menos inicialmente, sub ou superestimar componentes.

Após a retenção dos componentes principais. Realiza-se análises para avaliar quais variáveis contribuem mais na formação de cada componente, e assim reter também apenas as mais relevantes, continuando os esforços para redução da dimensionalidade da análise. Foram analisados 3 fatores em cada variável, em cada um dos componentes retidos:

- 1) Autovetores (*Eigenvectors*);
- 2) Cargas fatoriais (*Loadings*);
- 3) Contribuição das variáveis.

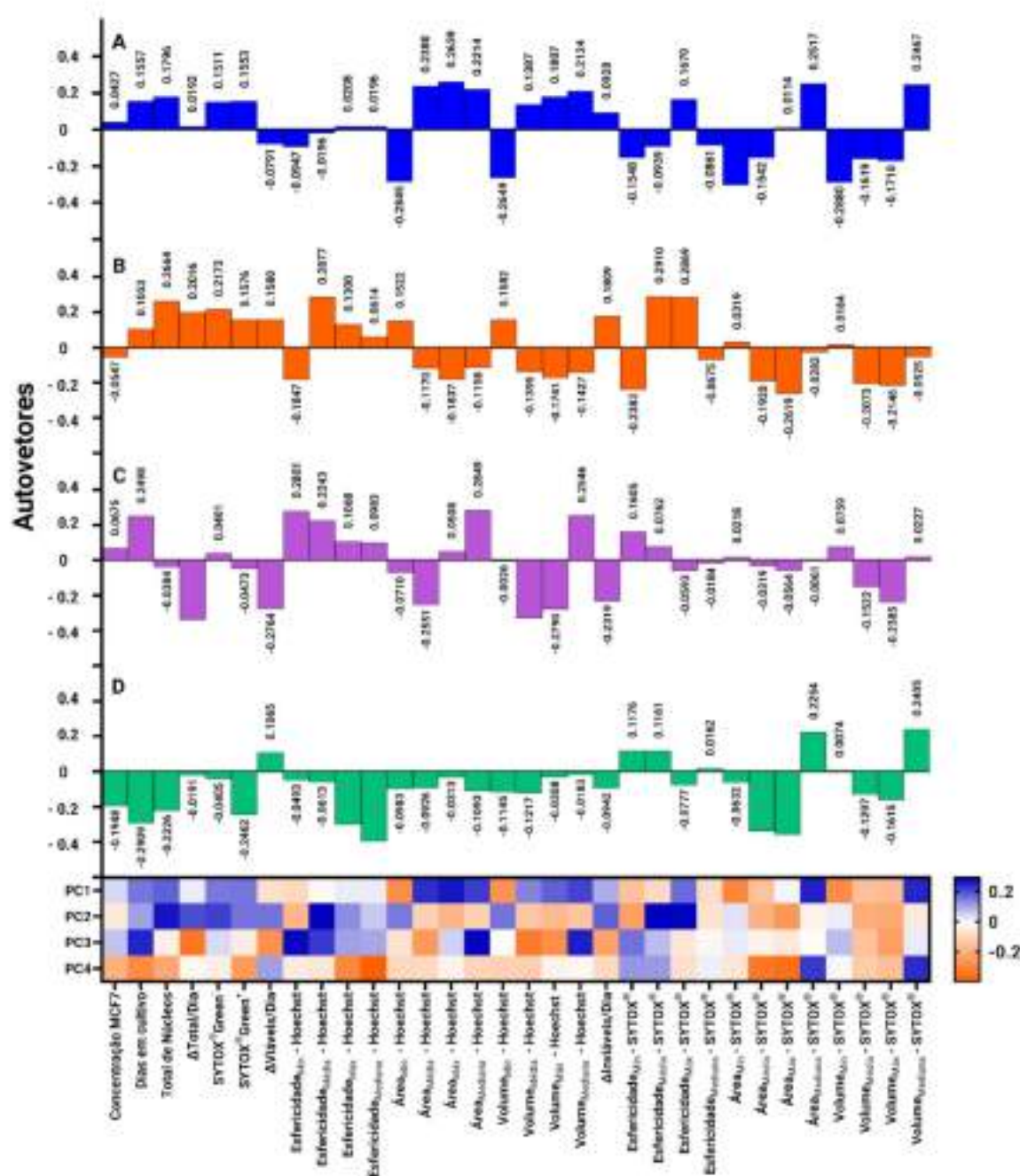
Autovetores (*Eigenvectors*) são vetores que descrevem a direção de um componente principal retido na ACP, que quando aplicada, a matriz de covariância é calculada e, em seguida, os autovetores da matriz são determinados. Cada autovetor é associado a um autovalor (*Eigenvalue*), que indica a importância desse autovetor na explicação da variância dos dados. Seus valores fornecem informações sobre a relação entre as variáveis originais e os componentes principais, permitindo identificar quais variáveis têm um peso maior em cada componente. Os autovalores das variáveis em relação aos componentes retidos na presente análise estão em posições alinhadas em todos os gráficos representados na Figura 32.

Cargas fatoriais (*loadings*) são os coeficientes que medem a correlação entre as variáveis originais e os componentes principais. Os componentes principais são combinações lineares das variáveis originais e são usados para representar as informações contidas nas variáveis de maneira mais compacta. As cargas fatoriais indicam quanto cada variável contribui para a formação de cada componente principal. Uma carga fatorial positiva indica uma correlação positiva entre a variável e o componente principal, enquanto uma carga fatorial negativa indica uma correlação negativa. Quanto maior o valor absoluto da carga fatorial, mais forte é a associação entre a variável e o componente principal. As cargas fatoriais são comumente utilizadas na ACP para interpretar os componentes principais e identificar quais



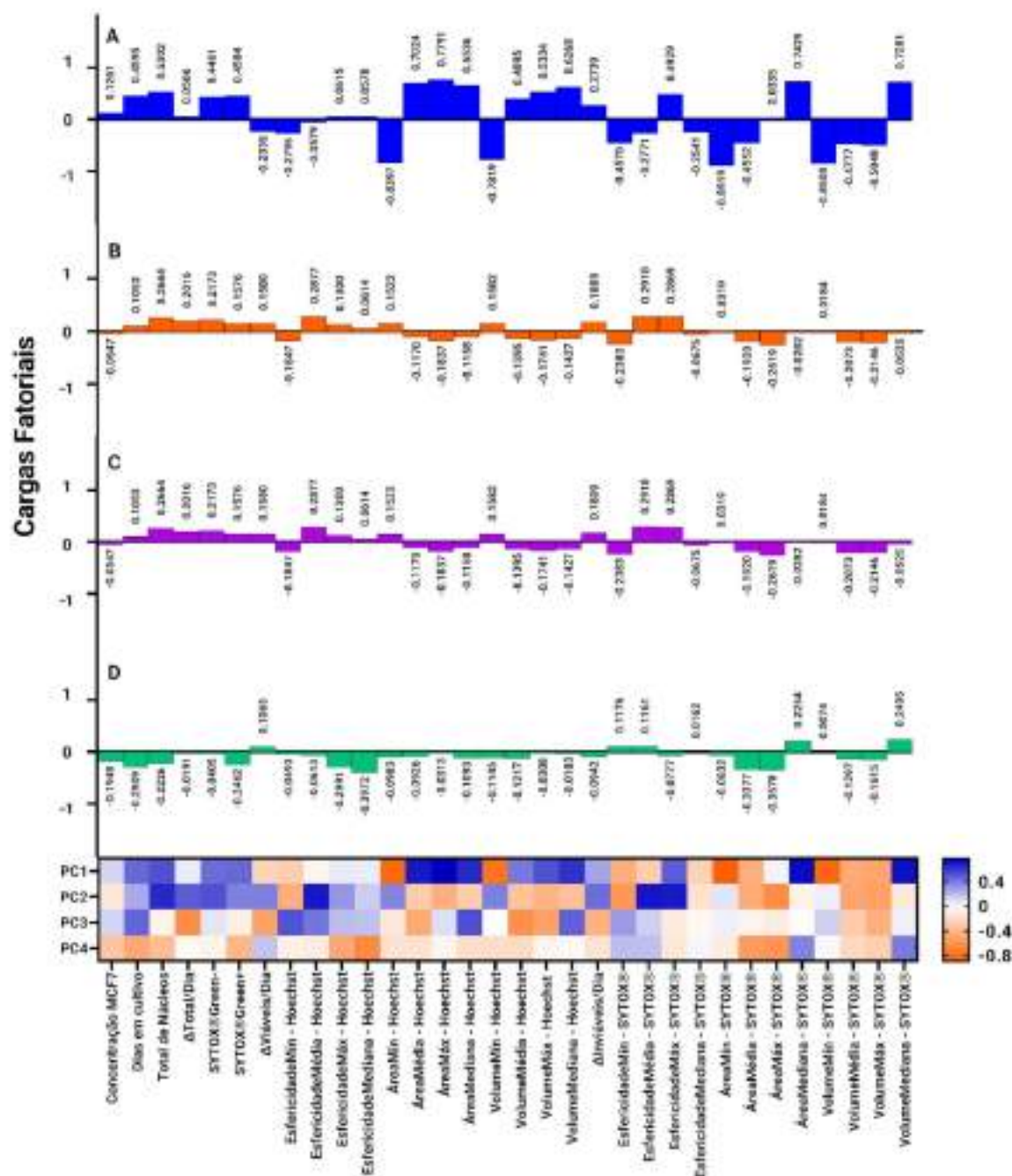
variáveis têm uma relação mais relevante com cada componente. As cargas fatoriais encontradas neste experimento estão na Figura 33.

Figura 32 – Alto: Autovetores (*eigenvektors*) de cada variável do estudo e os componentes retidos. Estão representadas variações dos valores dos autovetores para os componentes PC1 (A), PC2 (B), PC3 (C) e PC4 (D). Baixo: os mesmos valores dispostos em mapa de calor.



Fonte: Autora da dissertação

Figura 33 – Alto: Cargas fatoriais (*loadings*) de cada variável do estudo e os componentes retidos. Estão representadas variações dos valores das cargas fatoriais para os componentes PC1 (A), PC2 (B), PC3 (C) e PC4 (D). Baixo: os mesmos valores dispostos em mapa de calor. Posições das variáveis estão alinhadas em todos os gráficos

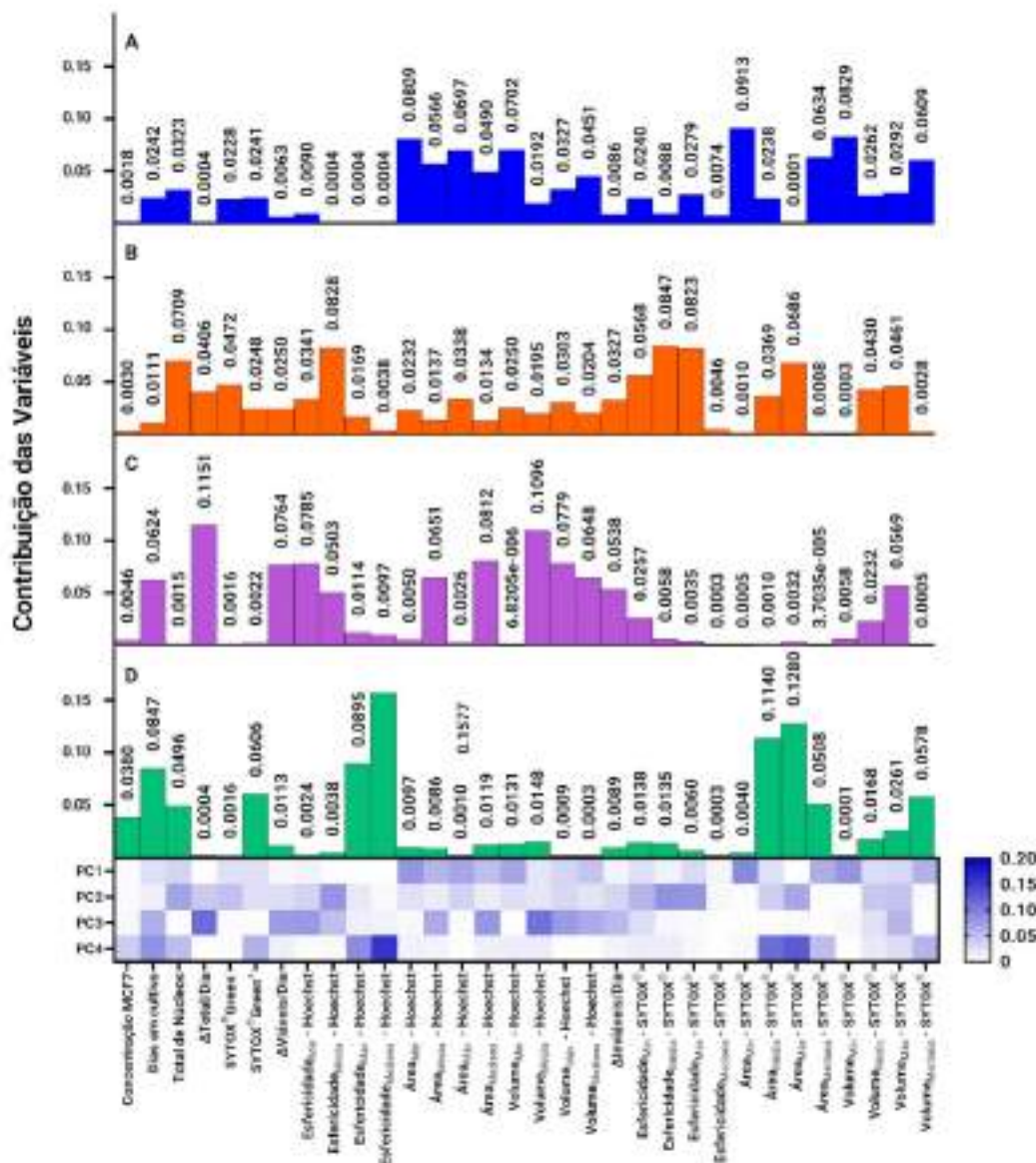


Fonte: Autora da dissertação

A contribuição das variáveis representa a proporção da variância total dos dados. Cada componente principal é uma combinação linear das variáveis originais, e a contribuição das variáveis em um determinado componente é calculada pelo quadrado dos valores dos coeficientes de cada variável nesse componente. A contribuição das variáveis pode ser interpretada como uma medida de importância

ou influência de cada variável para a formação do componente principal. Quanto maior a contribuição de uma variável, mais ela influencia a formação desse componente e explica a variabilidade dos dados. Deve-se notar que a soma das contribuições das variáveis em um componente principal é igual a 1, pois representa toda a variância explicada por esse componente. Portanto, as contribuições das variáveis podem ser usadas para identificar as variáveis mais relevantes em cada componente e auxiliar na interpretação dos resultados da ACP. Figura 34.

Figura 34 – Alto: Contribuição de cada variável do estudo para a variância de cada componente retidos. Estão representadas variações dos valores das contribuições para os componentes PC1 (A), PC2 (B), PC3 (C) e PC4 (D). Baixo: os mesmos valores dispostos em mapa de calor. Posições das variáveis estão alinhadas em todos os gráficos.



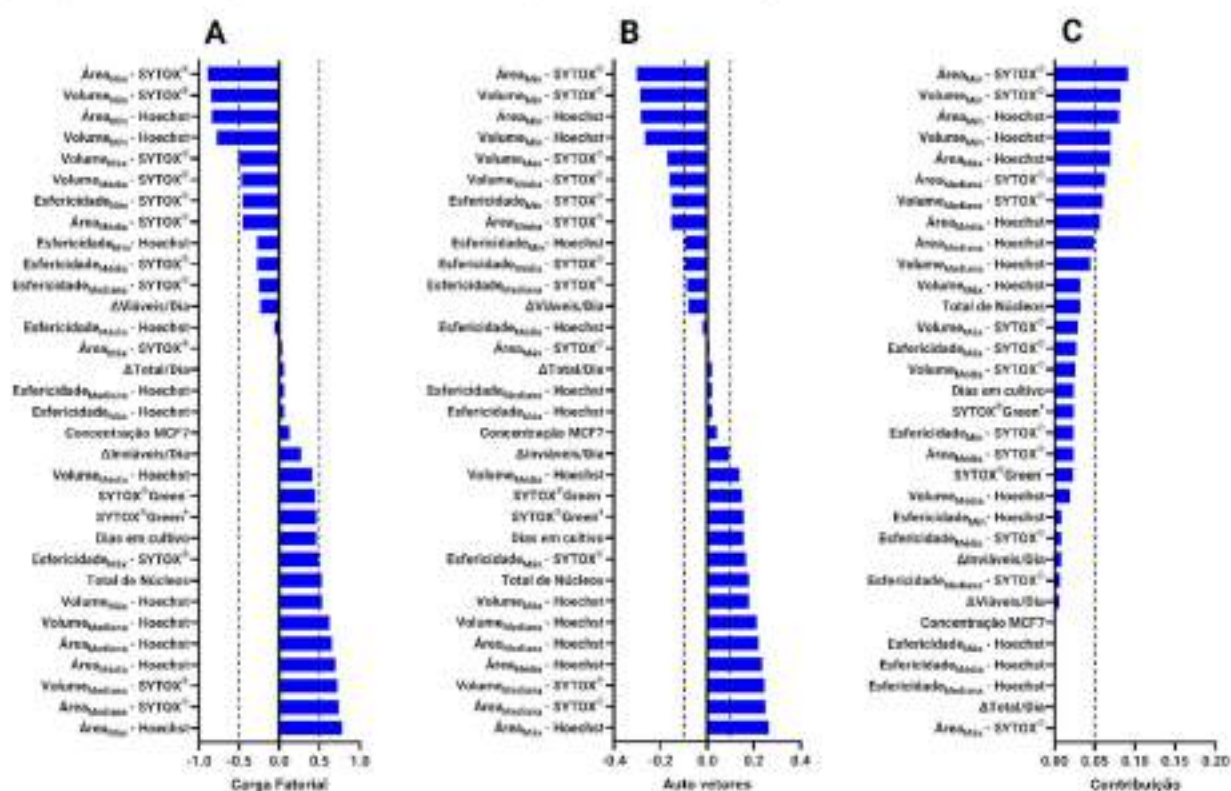


Embora a visualização gráfica dos autovalores, cargas fatoriais e contribuição das variáveis auxilia no processo de escolha de variáveis relevantes, o presente trabalho exigiu outros tipos de organização e visualização dos dados avaliados pela ACP. As Figuras 35, 36, 37 e 38 mostram comparativos lado-a-lado dos três valores das variáveis para os quatro componentes retidos.

Foram aplicados critérios *ad hoc* nesta avaliação para a seleção das variáveis mais relevantes:

- Para a análise das cargas fatoriais, cargas com valor absoluto mínimo de 0,5 (0,5 ou -0,5) foram buscadas. O parâmetro representa correlação mínima da variável com o componente, positiva ou negativa, de 0,5;
- Autovetores menores que -0,1 e maiores 0,1 foram preferencialmente avaliados. No entanto, esse critério não foi eliminatório, apenas fortalecendo ou enfraquecendo a análise das cargas fatoriais;
- Variáveis com contribuições de ao menos 0,05 (pelo menos 5% de participação no componente) foram buscadas.

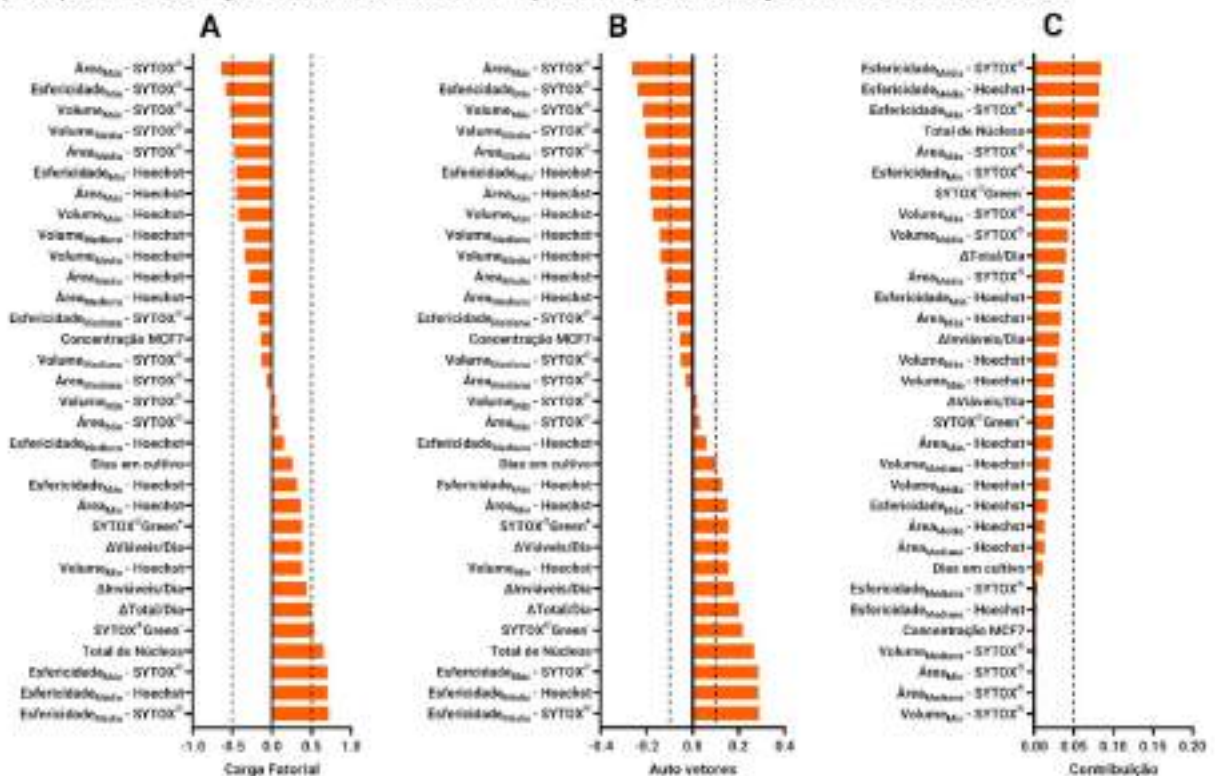
Figura 35 – Cargas fatoriais (A), auto vetores (B) e contribuição das variáveis (C) no Componente 1 (PC1). Linhas tracejadas mostram limites estipulados para utilização da variável na análise.



Fonte: Autora da dissertação

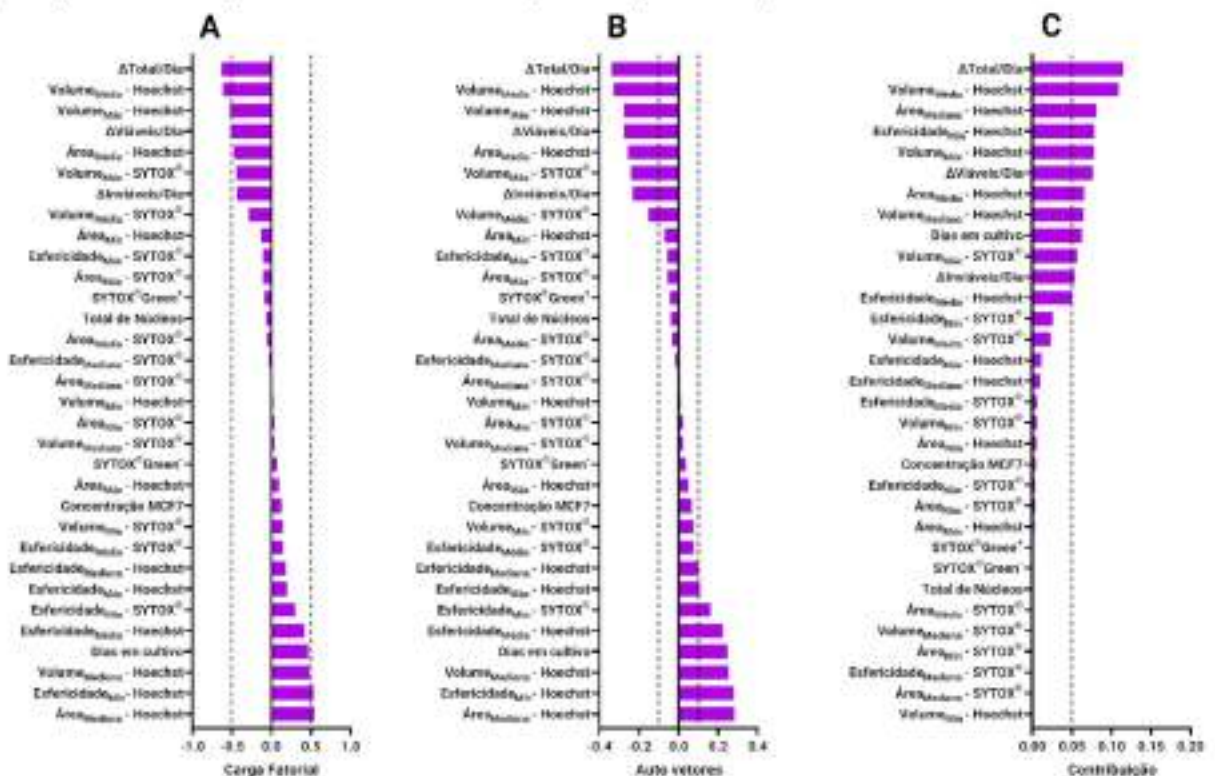


Figura 36 – Cargas fatoriais (A), auto vetores (B) e contribuição das variáveis (C) no Componente 2 (PC2). Linhas tracejadas mostram limites estipulados para utilização da variável na análise.



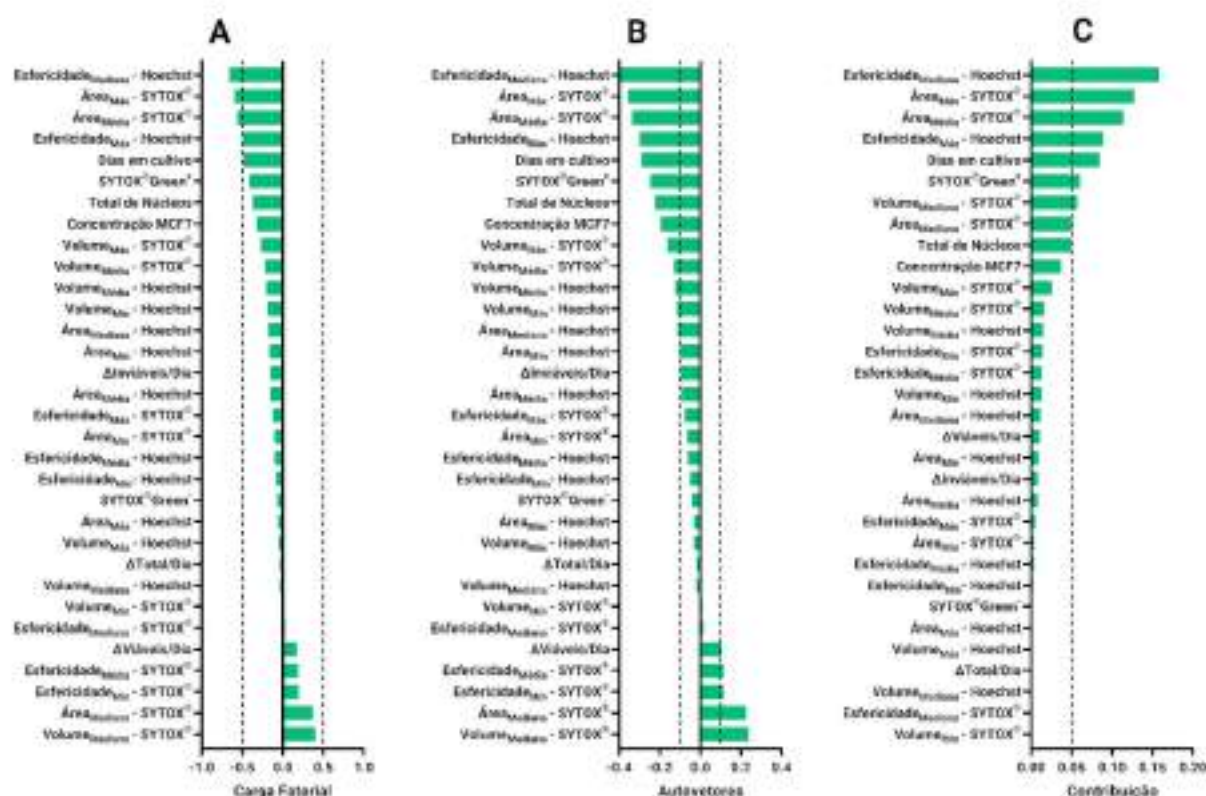
Fonte: Autora da dissertação

Figura 37 – Cargas fatoriais (A), auto vetores (B) e contribuição das variáveis (C) no Componente 3 (PC3). Linhas tracejadas mostram limites estipulados para utilização da variável na análise.



Fonte: Autora da dissertação

Figura 38 – Cargas fatoriais (A), auto vetores (B) e contribuição das variáveis (C) no Componente 4 (PC4). Linhas tracejadas mostram limites estipulados para utilização da variável na análise.



Fonte: Autora da dissertação

Desta forma, foram selecionadas 23 variáveis. A Tabela 5 contém todas as variáveis obtidas, seus respectivos componentes principais, cargas fatoriais e contribuições. Embora a APC não seja uma técnica que se destine propriamente a selecionar variáveis de peso, mas sim reduzir a dimensionalidade dos dados, é possível remover variáveis que pouco ou nada contribuem, ou ainda, que se integram aos dados como fonte de ruído.

Adicionalmente, as variáveis selecionadas foram agrupadas para uma análise de regressão de componentes principais (RCP), que (HARTNETT *et al.*, 1998) pode detectar relações entre as variáveis, mostradas por valores de  $p$  que representam os coeficientes de regressão parciais entre cada componente principal e a variável dependente, indicando a relação entre essa componente principal específica e o resultado da regressão. Valores de  $p$  positivos indicam uma relação positiva, enquanto valores negativos indicam uma relação negativa. Esses valores de  $p$  podem ser interpretados em termos de força e direção do relacionamento entre a

componente principal correspondente e a variável dependente. Valores de  $p$  com magnitudes maiores indicam um impacto mais forte da componente principal na variável dependente.

Tabela 5 – Variáveis selecionadas a partir das cargas fatoriais e da contribuição para os componentes principais retidos na análise.

| <b>Componente Principal</b> | <b>Variável</b>                           | <b>Carga Fatorial</b> | <b>Contribuição</b> |
|-----------------------------|---|-----------------------|---------------------|
| <b>PC1</b>                  | Área <sub>Mín</sub> - SYTOX®              | -0,892                | 0,091               |
|                             | Volume <sub>Mín</sub> - SYTOX®            | -0,850                | 0,083               |
|                             | Área <sub>Mín</sub> - Hoechst             | -0,840                | 0,081               |
|                             | Volume <sub>Mín</sub> - Hoechst           | -0,782                | 0,070               |
|                             | Área <sub>Máx</sub> - Hoechst             | 0,779                 | 0,070               |
|                             | Área <sub>Mediana</sub> - SYTOX®          | 0,743                 | 0,063               |
|                             | Volume <sub>Mediana</sub> - SYTOX®        | 0,728                 | 0,061               |
|                             | Área <sub>Média</sub> - Hoechst           | 0,702                 | 0,057               |
| <b>PC2</b>                  | Esfericidade <sub>Média</sub> - SYTOX®    | 0,711                 | 0,085               |
|                             | Esfericidade <sub>Média</sub> - Hoechst   | 0,703                 | 0,083               |
|                             | Esfericidade <sub>Máx</sub> - SYTOX®      | 0,702                 | 0,082               |
|                             | Total de Núcleos                          | 0,651                 | 0,071               |
|                             | Área <sub>Máx</sub> - SYTOX®              | -0,640                | 0,069               |
|                             | Esfericidade <sub>Mín</sub> - SYTOX®      | -0,583                | 0,057               |
| <b>PC3</b>                  | $\Delta$ Total/Dia                        | -0,636                | 0,115               |
|                             | Volume <sub>Média</sub> - Hoechst         | -0,620                | 0,110               |
|                             | Área <sub>Mediana</sub> - Hoechst         | 0,534                 | 0,081               |
|                             | Esfericidade <sub>Mín</sub> - Hoechst     | 0,525                 | 0,078               |
|                             | Volume <sub>Máx</sub> - Hoechst           | -0,523                | 0,078               |
|                             | $\Delta$ Viáveis/Dia                      | -0,518                | 0,076               |
| <b>PC4</b>                  | Esfericidade <sub>Mediana</sub> - Hoechst | -0,658                | 0,158               |
|                             | Área <sub>Máx</sub> - SYTOX®              | -0,593                | 0,128               |
|                             | Área <sub>Média</sub> - SYTOX®            | -0,560                | 0,114               |

Fonte: Autora da dissertação

Para a análise de RCP, é necessário escolher uma variável dependente, a partir da qual as outras variáveis podem ter ou não relação. A partir de significados biológicos estabelecidos, foram escolhidas duas variáveis que representam uma ou outra das seguintes situações:



- A resistência da população celular, dada pela progressão da quantidade de células viáveis do esferoide dia a dia, ao longo do tempo do experimento -  $\Delta Viáveis / Dia$  – definida pela Equação (8).

$$\Delta Viáveis / Dia = (NCV_t) - (NCV_{t-1}) \quad (8)$$

Sendo:

$NCV$  = Número de núcleos de células viáveis;

$t$  = Tempo.

- O decaimento do esferoide como agregado celular, dado pela progressão da quantidade de células inviáveis, também diariamente e durante todo o experimento -  $\Delta Inviáveis / Dia$  – definida pela Equação (9).

$$\Delta Inviáveis / Dia = (NCI_t) - (NCI_{t-1}) \quad (9)$$

Sendo:

$NCI$  = Número de núcleos de células inviáveis;

$t$  = Tempo.

O modelo escolhido para o ajuste foi o de múltiplo linear de mínimos quadrados (*least-squares*), e os resultados estão na Tabela 6. Além dos valores de  $p$ , foram avaliados os valores do coeficiente de ajuste linear ( $R^2$ ), como medida de adequação dos dados ao modelo, e o coeficiente de correlação múltipla ( $M_R$ ). Enquanto  $R^2$  é a proporção da variabilidade na variável dependente explicada pelas variáveis independentes no modelo,  $M_R$  representa a correlação linear entre as variáveis independentes e a variável dependente, sendo calculado pela raiz quadrada de  $R^2$ . Seu valor varia de 0 a 1, e quanto mais próximo de 1, mais forte é a relação linear entre as variáveis independentes e a variável dependente. Desta forma, foi considerado uma medida mais adequada de ajuste do que a observância tradicionalista dos valores de  $R^2$ .



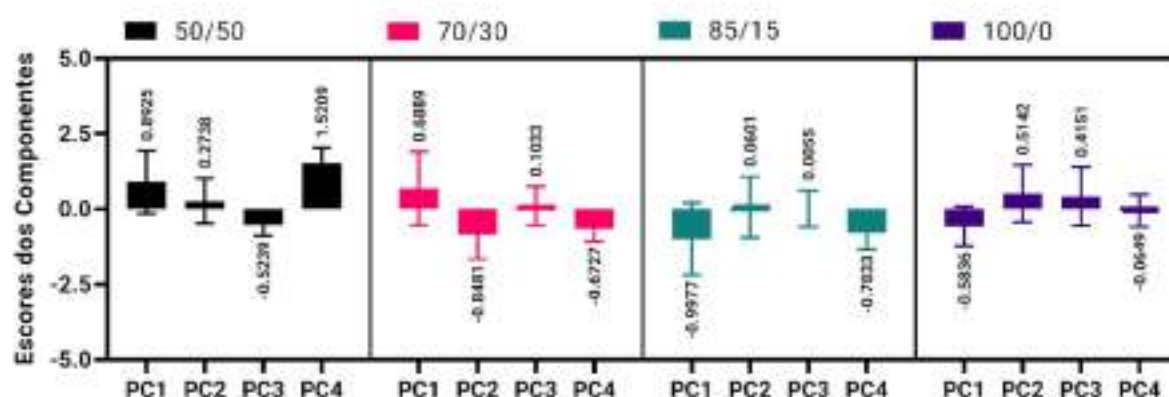
Tabela 6 – Valores de  $p$  das variáveis escolhidas para a RCP das variáveis num modelo múltiplo linear de mínimos quadrados. (\*):  $p < 0,05$ . (\*\*):  $p < 0,001$ .  $R^2$ : coeficiente de ajuste linear.  $M_R$ : coeficiente de correlação múltipla.

| Variável                      | $\Delta$ viáveis / Dia |          | $\Delta$ inviáveis / Dia |          |
|-------------------------------|------------------------|----------|--------------------------|----------|
|                               |                        |          |                          |          |
| Concentração MCF7             | 0,7355                 | ns       | 0,3509                   | ns       |
| Total de Núcleos              | 0,6621                 | ns       | 0,0219                   | *        |
| $\Delta$ Total/Dia            | 0,5316                 | ns       | 0,8102                   | ns       |
| EsfericidadeMín - Hoechst     | 0,8846                 | ns       | 0,6961                   | ns       |
| EsfericidadeMédia - Hoechst   | 0,8162                 | ns       | 0,2041                   | ns       |
| EsfericidadeMediana - Hoechst | 0,9304                 | ns       | 0,7844                   | ns       |
| ÁreaMédia - Hoechst           | 0,003                  | **       | 0,6851                   | ns       |
| ÁreaMáx - Hoechst             | 0,2588                 | ns       | 0,3077                   | ns       |
| ÁreaMediana - Hoechst         | 0,0336                 | *        | 0,113                    | ns       |
| VolumeMédia - Hoechst         | 0,0015                 | **       | 0,2405                   | ns       |
| VolumeMáx - Hoechst           | 0,0252                 | *        | 0,298                    | ns       |
| EsfericidadeMín - SYTOX®      | 0,4978                 | ns       | 0,4185                   | ns       |
| EsfericidadeMédia - SYTOX®    | 0,5369                 | ns       | 0,6525                   | ns       |
| EsfericidadeMediana - SYTOX®  | 0,4604                 | ns       | 0,0048                   | **       |
| ÁreaMín - SYTOX®              | 0,9165                 | ns       | 0,24                     | ns       |
| ÁreaMédia - SYTOX®            | 0,1556                 | ns       | 0,0457                   | *        |
| ÁreaMáx - SYTOX®              | 0,3367                 | ns       | 0,1146                   | ns       |
| ÁreaMediana - SYTOX®          | 0,5448                 | ns       | 0,4445                   | ns       |
| VolumeMín - SYTOX®            | 0,714                  | ns       | 0,32                     | ns       |
| VolumeMediana - SYTOX®        | 0,2582                 | ns       | 0,8641                   | ns       |
|                               |                        | = 0,8497 |                          | = 0,804  |
|                               |                        | =0,8967  |                          | = 0,9218 |

Fonte: Autora da dissertação

Os valores de  $p$  encontrados na RCP foram a última etapa de seleção de variáveis neste experimento, que serviu posteriormente de modelo de análise a outros experimentos deste trabalho. Uma opção feita neste trabalho foi a de não apresentar os valores dos escores dos componentes principais (*PC Scores*) nas formas mais usuais, com vetores dispostos em eixos cartesianos representando os componentes da análise; esta organização foi gerada inicialmente, mas foi considerada de visual poluído demais para boa interpretação. A Figura 39 mostra os escores em gráficos de barras mostrando o valor dos vetores e suas orientações em cada componente.

Figura 39 – Escores de cada componente (PC Scores) para cada um dos experimentos com diferentes proporções de células MCF7 e HF002-J. Os valores indicam as médias dos escores. Barras: médias dos valores dos escores. Barras de erro: Média dos erros padrão.



Fonte: Autora da dissertação.

Nos experimentos com 50% de cada uma das linhagens utilizadas, a predominância dos escores foi em favor dos componentes 4, 1 e 2, nessa ordem (1,5209; 0,8925; 0,2738), e opostos ao componente 3 (-0,5239). Os experimentos com essa combinação de linhagens renderam os escores com maior valor, conforme mostrado na Figura 39. Na combinação de 70% de MCF7 e 30% de HF002-J, os componentes apoiados foram 1 e 3 (0,6889; 0,1033), e os opostos, 2 e 4 (-0,8481; -0,6727). Para a combinação 85/15 (MCF7/HF002-J), os componentes 2 e 3 foram fracamente apoiados (0,0601; 0,0055), e 1 e 4 foram opostos de maneira significativa (-0,9977; -0,7833). Nos experimentos com esferoides compostos apenas por células MCF7, os componentes 2 e 3 tiveram apoio (0,5142, 0,4151) e oposição em 1 e 4 (-0,5836; -0,0649).

Os algoritmos de previsão para análise de estruturas complexas, como as de um esferoide, são baseados no controle de crescimento populacional (DROUTSAS *et al.*, 2022). Dentro de um sistema biológico é importante capturar informações como o crescimento e proliferação celular, para entender o comportamento daquela cultura, isto é, quando modelo está no auge e quando está em declínio, para fins de controle do crescimento tumoral e padronização de protocolos (PAPA *et al.*, 2023). Para isto foi utilizado a taxa de crescimento beta (YIN *et al.*, 2003), essa função descreve a dinâmica do acúmulo de biomassa presente em organismos vegetais ou animais, descrita pela Equação 13.

$$Y = Y_{max} \left( 1 + \frac{t_e - t}{t_e - t_m} \right) \left( \frac{t}{t_m} \right)^{\frac{t_e}{t_e - t_m}} \quad (13)$$

Onde:

$$0 \leq t_m < t_e$$

$Y$  = Biomassa

$Y_{max}$  = Biomassa em seu tempo máximo. Pico populacional; maior quantidade de núcleos atingida no experimento.

$t_e$  = Tempo no qual  $Y_{max}$  foi atingido, em dias.

$t_m$  = Tempo em que a taxa máxima de crescimento é atingida, em dias.

$t$  = Tempo total do experimento, em dias.

As concentrações de esferóides fracionados, 50% MCF7/HF002-J 50%, 70% MCF7/HF002-J 30%, 85% MCF7/HF002-J 15%, e o mono cultivo de MCF7, foram utilizados para computar os dados morfológicos dos experimentos tendo um intervalo de confiança (IC) de 95% nos valores calculados com a função de taxa de crescimento beta, Tabela 7.

Tabela 7 – Coeficientes de ajuste da quantidade de núcleos (Hoechst 33342) cada um dos experimentos com diferentes proporções de células MCF7 e HF002-J.  $Y_m$ :  $Y_{max}$ .  $T_e$ :  $t_e$ .  $T_m$ :  $t_m$ .  $R^2$ : Coeficiente de ajuste não-linear. P: Diferença estatística.

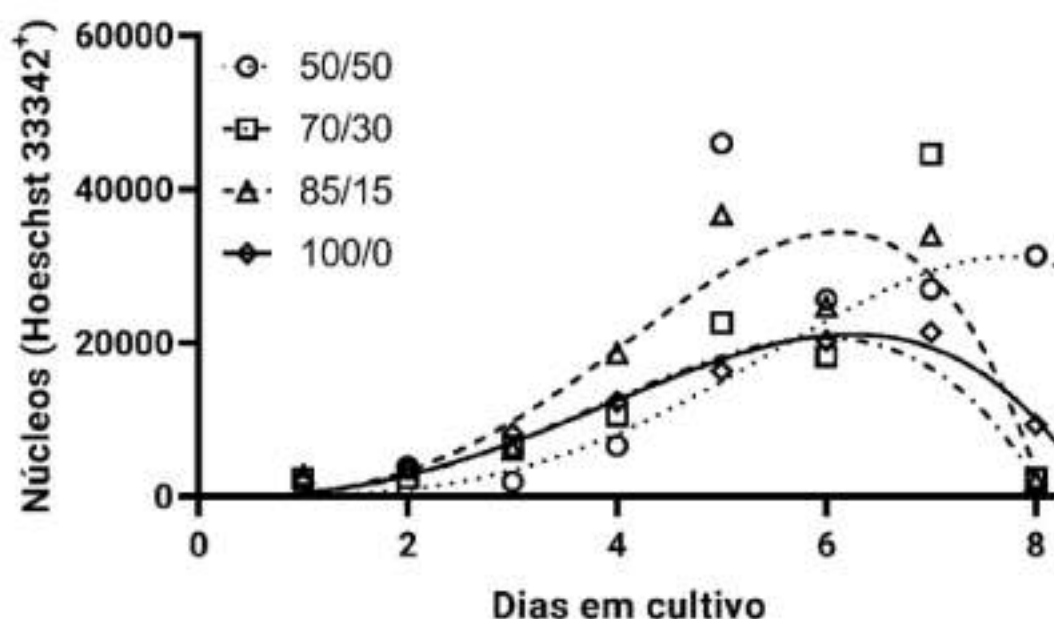
|          | 50/50          | P             | 70/30          | P      | 85/15          | P             | 100/0          |
|----------|----------------|---------------|----------------|--------|----------------|---------------|----------------|
| $Y_m$    | 31192±2013     | <b>0,0013</b> | 20541±2483     | 0,8187 | 34624±4264     | <b>0,0148</b> | 21131±1051     |
| $T_e$    | 7,716±0,2285   | 0,8671        | 5,967±0,1295   | 0,5315 | 6,129±0,1213   | 0,8943        | 6,248±0,5531   |
| $T_m$    | 5,546±0,5661   | <b>0,0018</b> | 3,832±0,2806   | 0,8671 | 4,1852±0,2783  | 0,7597        | 3,926±0,1760   |
| IC (95%) |                |               |                |        |                |               |                |
| $Y_m$    | 25603 to 36781 |               | 13648 to 27435 |        | 23663 to 45584 |               | 18428 to 23833 |
| $T_e$    | 7,081 to 8,350 |               | 5,607 to 6,326 |        | 5,818 to 6,441 |               | 6,106 to 6,390 |
| $T_m$    | 3,974 to 7,118 |               | 3,053 to 4,611 |        | 3,469 to 4,900 |               | 3,474 to 4,379 |
| $R^2$    | 0,9729         |               | 0,9154         |        | 0,8618         |               | 0,9679         |

Fonte: Autora da dissertação.

Também foi possível analisar o comprimento final da função sigmóide entre os dias de experimento, análoga a Equação 13, na Figura 40. Com o número de crescimento da taxa populacional do experimento sendo medida pelos núcleos

marcados por Hoechst 33342, em função dos dias de cultivo. É possível dizer que a concentração de 50% MCF7 e 50% HF002-J se sobressai em relação às outras, mantendo um pico de populacional desenvolvido ao longo dos dias mesmo que não seja o com maior concentração de núcleos, destacado pelo 85% MCF7 e 15% HF002-J que sofre decaimento após o sexto dia.

Figura 40 – Gráfico de processo de crescimento representado pela função de crescimento beta para culturas fracionadas de MCF7/HF002-J.



Fonte: Autora da dissertação

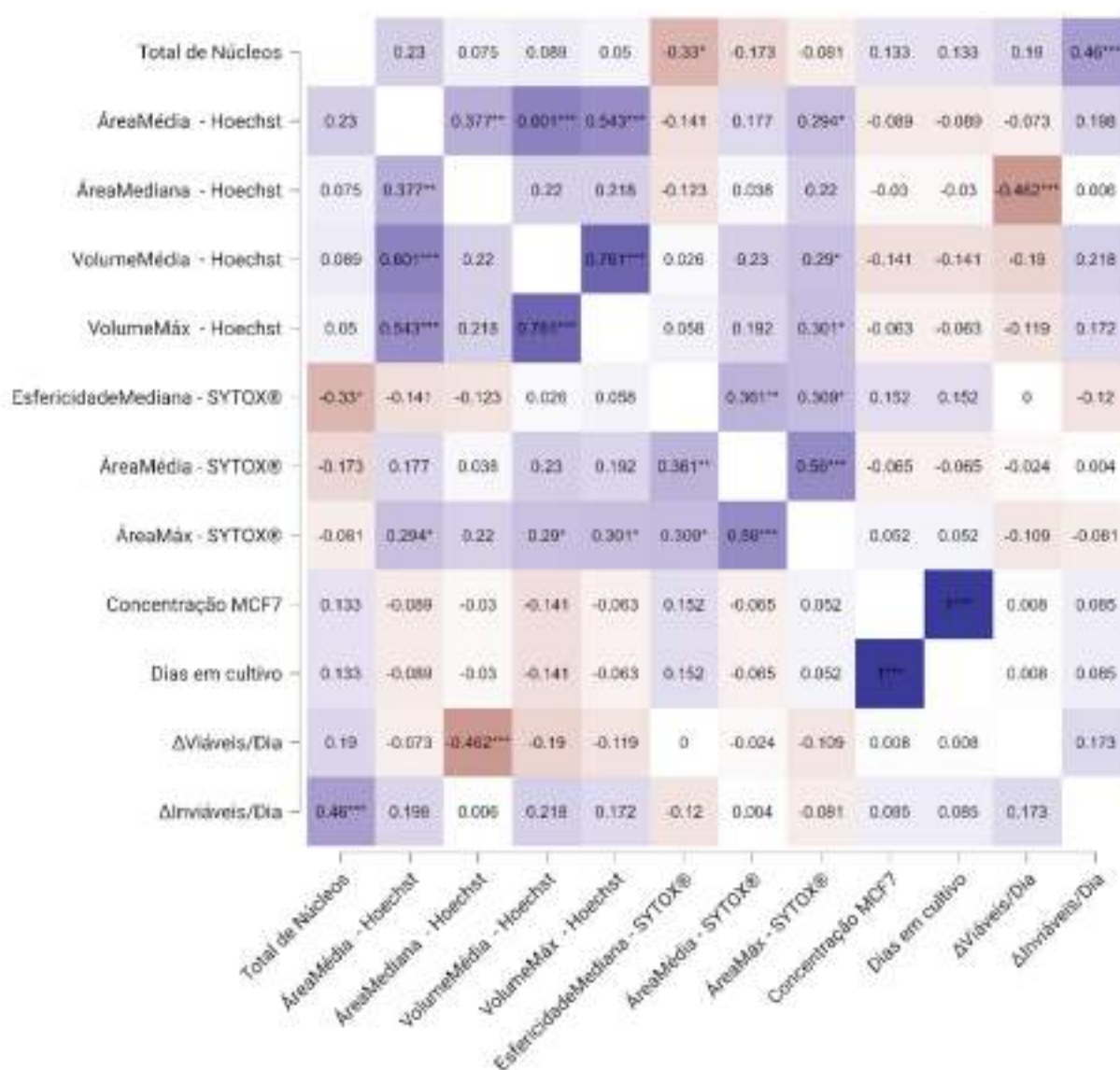
Os coeficientes de correlação de Pearson, Spearman e Kendall são medidas de correlação que avaliam a relação entre duas variáveis. Os três coeficientes variam de -1 a 1, sendo os valores próximo a -1 indicativos de correlação negativa, próximos a 1 indicam correlação positiva e valores próximos a 0 indicam falta de correlação. A principal diferença entre eles é o tipo de dados que podem ser usados e a forma como são calculados. O coeficiente de correlação de Pearson é usado para avaliar a correlação linear entre duas variáveis contínuas que seguem uma distribuição normal, medindo a força e a direção da relação linear entre as variáveis. O coeficiente de correlação de Spearman é uma medida não paramétrica que avalia a relação monotônica entre duas variáveis, sendo usado quando as variáveis não seguem uma distribuição normal ou quando a relação entre elas não é linear.



Finalmente, o coeficiente de correlação de Kendall é outra medida não paramétrica que avalia a relação entre duas variáveis que não seguem uma distribuição normal ou quando a relação entre elas não é linear.

As variáveis seleccionadas pela RCP foram compiladas numa matriz de correlação ilustrada na Figura 41. Nesta matriz, os tons azulados exibem relações positivas de correlação, e avermelhados expressam relações negativas. Quadros sem nenhuma predominância, tendendo ao branco, indicam falta de correlação

Figura 41 – Matriz de correlação, com os coeficientes  $\tau$ -b segundo Kendall calculados entre cada combinação par a par de variáveis. Valores com asteriscos indicam relações significantes, calculados pela metodologia da razão máxima de  $p$  de Vovk-Selke. (\*):  $p < 0,05$ . (\*\*):  $p < 0,01$ . (\*\*\*) :  $p < 0,001$ .



Fonte: Autora da dissertação.

A principal diferença entre o coeficiente de Spearman e o coeficiente de

Kendall é a forma como lidam com os empates (ou laços, *ties*) nos dados. O coeficiente de Spearman atribui uma média de classificação para os empates, enquanto o coeficiente de Kendall trata os empates como concordâncias perfeitas. Uma vantagem do método de Kendall é que é menos sensível a valores extremos do que o coeficiente de Pearson. Além disso, ele pode ser usado com dados que não seguem uma distribuição normal e é robusto a valores discrepantes. No entanto, o método de Kendall pode ser menos eficiente do que o coeficiente de Pearson quando a relação entre as variáveis é linear e os dados seguem uma distribuição normal. Além disso, o método de Kendall não requer uma distribuição específica dos dados.

Na análise da Figura 40, há correlações diretas que existem naturalmente dada a natureza das variáveis envolvidas. Por exemplo, as correlações positivas entre as médias dos volumes e os volumes máximos dos núcleos marcados com Hoechst em relação às áreas dos núcleos são diretas, dada a proporcionalidade entre as medidas de área (10) e volume (11), portanto, não serão consideradas para avaliação.

$$A = \pi r^2 \quad (10)$$

$$V = \frac{4\pi r^3}{3} \quad (11)$$

Adiante, há relações que podem ter relevância biológica. Foi encontrada correlação negativa (-0,33,  $p < 0,05$ ) entre o número total de núcleos encontrados e a mediana da esfericidade total (Hoechst). A esfericidade de uma partícula é expressa pela Equação 12.

$$\Psi = \frac{\pi^{\frac{1}{3}} (6V_p)^{\frac{2}{3}}}{A_p} \quad (12)$$

Onde:

$V_p$  = Volume da partícula;

$A_p$  = Área da superfície da partícula.

Foi observado em outra linhagem de células de tumor mamário humano (GROSSER *et al.*, 2021), que a perda de esfericidade derivou do aumento do número de células no esferoide, que por sua vez estimula a fluidez das células por entre o tecido, aumentando seu potencial migratório e metastático. A fluidez das células é característica de carcinomas (que é o caso da linhagem utilizada), num panorama em que a escassez de espaços intracelulares, ao contrário dos agregados celulares típicos de ambientes embrionários (MONGERA *et al.*, 2018), estimula o aparecimento de diversidade de formatos e tamanhos de citoplasma e núcleos. Em carcinomas, a congestão (*jamming*) de células no espaço tridimensional aumenta a pressão e reduz a quantidade de espaços livres para expansão, o que leva à queda na expressão de caderinas (ILINA *et al.*, 2020), induzindo o fenômeno denominado fluidização (SARASWATHIBHATLA & NOTBOHM, 2020), que permite a migração celular e que tem como características o pleomorfismo nuclear.

Esferoides de células tumorais são relatados tendo baixa adesão intercelular (GROSSER *et al.*, 2021; PAWLIZAK *et al.*, 2015), o que também facilitaria o trânsito de células entre o tecido e, conforme as células migram, a variedade de formatos nucleares. A experiência deste grupo de pesquisa é a mesma: esferoides compostos apenas pela linhagem MCF7 tem baixa esfericidade, sendo frequentemente observados com um formato de duas elipses concêntricas achatadas, com um centro mais denso e periferias com rarefação celular. Além disso, são bastante frágeis e friáveis, desfazendo-se com relativamente pouca ação mecânica.

O conceito de rigidez (*stiffness*) da matriz extracelular também deve ser levado em consideração. À medida em que o agregado celular aumenta de tamanho, é esperado que haja, além do aumento do número de células, a resistência ao crescimento do esferoide pela ação das proteínas da matriz extracelular. A presença de lamina não aumenta a rigidez, mas possibilita a formação de componentes basilares da membrana; sua ausência já foi discutida neste trabalho.

O aumento na quantidade de colágeno (CHHETRI *et al.*, 2019), ou o aumento das ligações entre suas cadeias (LEVENTAL *et al.*, 2009), ou ainda a expressão de proteínas acessórias, porém importantes, como a fibronectina (PASZEK *et al.*, 2019) podem ser responsáveis pelo aumento da rigidez (medida em módulo de Young) (CHHETRI *et al.*, 2021), o que aumentaria ainda mais o congestionamento de células, reduzindo espaços intracelulares e levando também ao pleomorfismo nuclear. Por último, toda a pressão gerada pela proliferação celular e pela rigidez da

matriz extracelular ainda é amplificada pelas ligações célula-célula mantidas pela caderina, o que leva à interpretação de que não só a pressão, mas o estresse por tração também influi na fluidização e por conseguinte, nos formatos nucleares (CAI *et al.*, 2022).

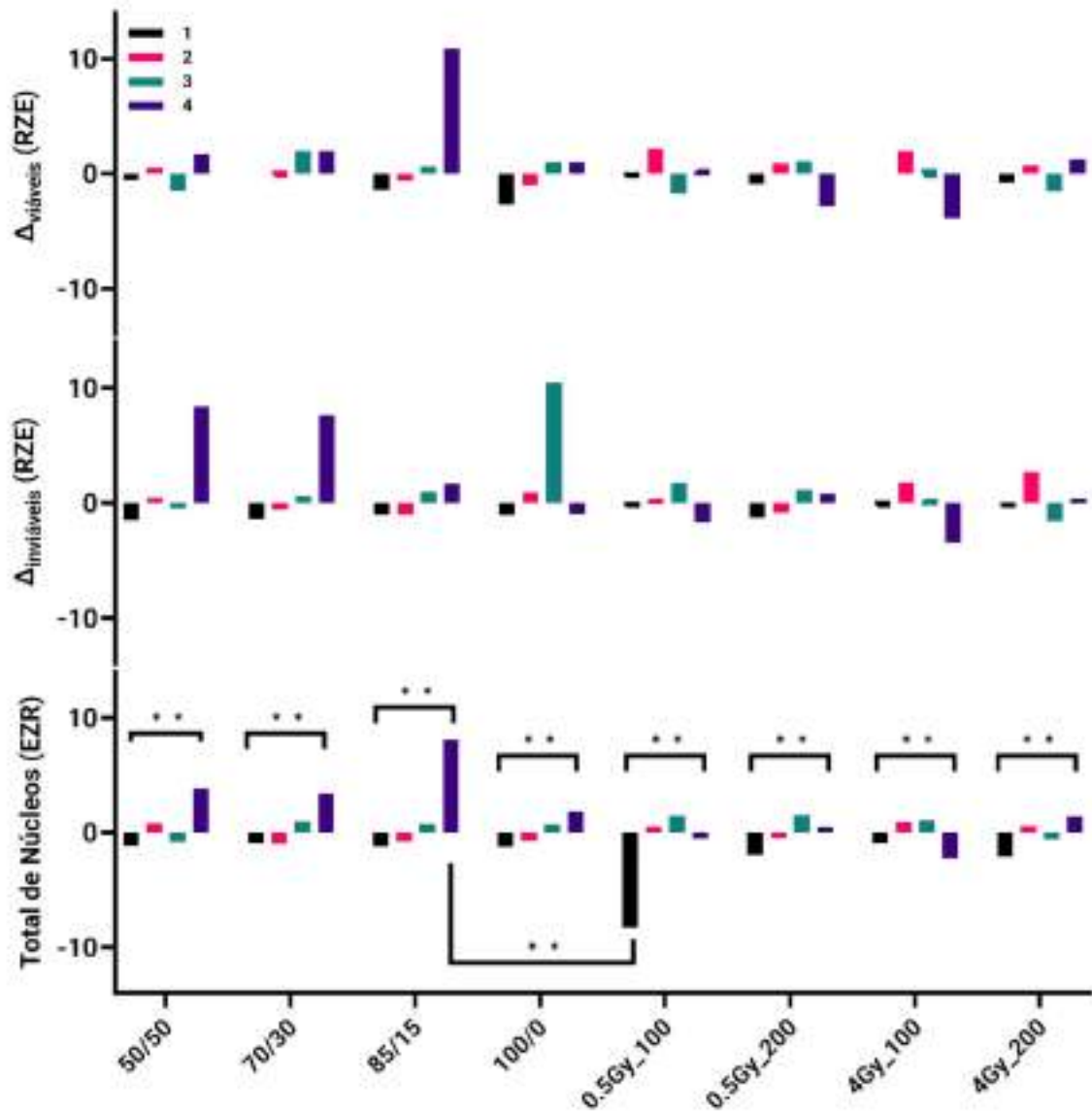
As correlações entre o número total de núcleos e a variação de inviáveis por dia (0,46,  $p < 0,001$ ) e a mediana das áreas dos núcleos com a variação de viáveis por dia (-0,462,  $p < 0,001$ ) foram interpretadas como consequências com vetores opostos mas reflexos dos mesmos fenômenos. Núcleos de células de adenocarcinomas colônicos *in vivo* já foram relatados com áreas aproximadamente duas vezes maior do que o encontrado em células saudáveis, também em pacientes (LIM *et al.*, 2015). Em experimentos *in vitro*, é reconhecido o aumento da área nuclear em resposta à toxicidade de fármacos, de maneira proporcional à sua concentração (CHIARAVALLI *et al.*, 2017; KWON *et al.*, 2015). O aumento da área nuclear é classicamente relacionado à necrose (ZIEGLER & GROSCURTH, 2004), presente em modelos tumorais tridimensionais *in vitro* (DÄSTER *et al.*, 2017; BARISAM *et al.*, 2018; YAN *et al.*, 2021; NILES *et al.*, 2019).

As correlações fortemente positivas entre "Concentração MCF7" e "Dias em cultivo" são relacionadas à variância idêntica entre as duas colunas de variáveis, impedindo assim avaliações detalhadas sobre suas relações. Portanto, para ser feita a estatística de comparação entre grupos, apenas as variáveis selecionadas pela RCP foram consideradas. O experimento avaliou as variáveis já estudadas em grupos experimentais formados por cultivos celulares compostos por proporções diferentes de células de adenocarcinoma mamário humano (MCF7) e de fibroblastos saudáveis humanos (HF002-J). As proporções estudadas foram (MCF7/HF002-J): 50/50, 70/30, 85/15, 100/0. Além disso, foram também avaliados os grupos irradiados com 0,5 ou 4Gy de radiação gama ( $^{60}\text{Co}$ ) e mantidos com 100 ou 200  $\mu\text{L}$  de meio de cultura.

Na Figura 42 está a análise de variância do número total de núcleos encontrados nos esferoides dos grupos avaliados durante quatro dias de experimento. A passagem do tempo gerou 38,16% da variância total calculada ( $p = 0,0059$ ). Foram encontradas diferenças significativas apenas entre os dias 1 e 4, em todos os grupos. Há uma tendência negativa nos dias 1 dos experimentos, que se contrapõe a tendências positivas nos grupos não irradiados, ou também negativa, mas de magnitude muito menor, como a encontrada nos grupos irradiados.



Figura 42—(Alto): Valores em EZR da progressão diária de células viáveis ( $\Delta_{\text{viáveis}}$ ). (Centro): Valores em EZR da progressão diária de células inviáveis ( $\Delta_{\text{inviáveis}}$ ). (Baixo): Número total de núcleos encontrados nos esferoides dos grupos testados, avaliados entre 1 e 4 dias de experimento. Valores transformados em escores z-robustos. (\*\*):  $p < 0,01$ . Legenda: barras coloridas refletem os dias de experimento.



Fonte: Autora da dissertação.

Essa contraposição de tendências também levou ao aparecimento de diferenças estatisticamente significantes entre os valores do quarto dia do grupo 85/15 e o primeiro dia do grupo 0,5Gy\_100 (irradiados a 0,5Gy e mantidos com 100 $\mu$ L de meio de cultura). Uma vez que as taxas de dose foram constantes, seria razoável esperar que grupos irradiados a 4Gy apresentassem menores valores de

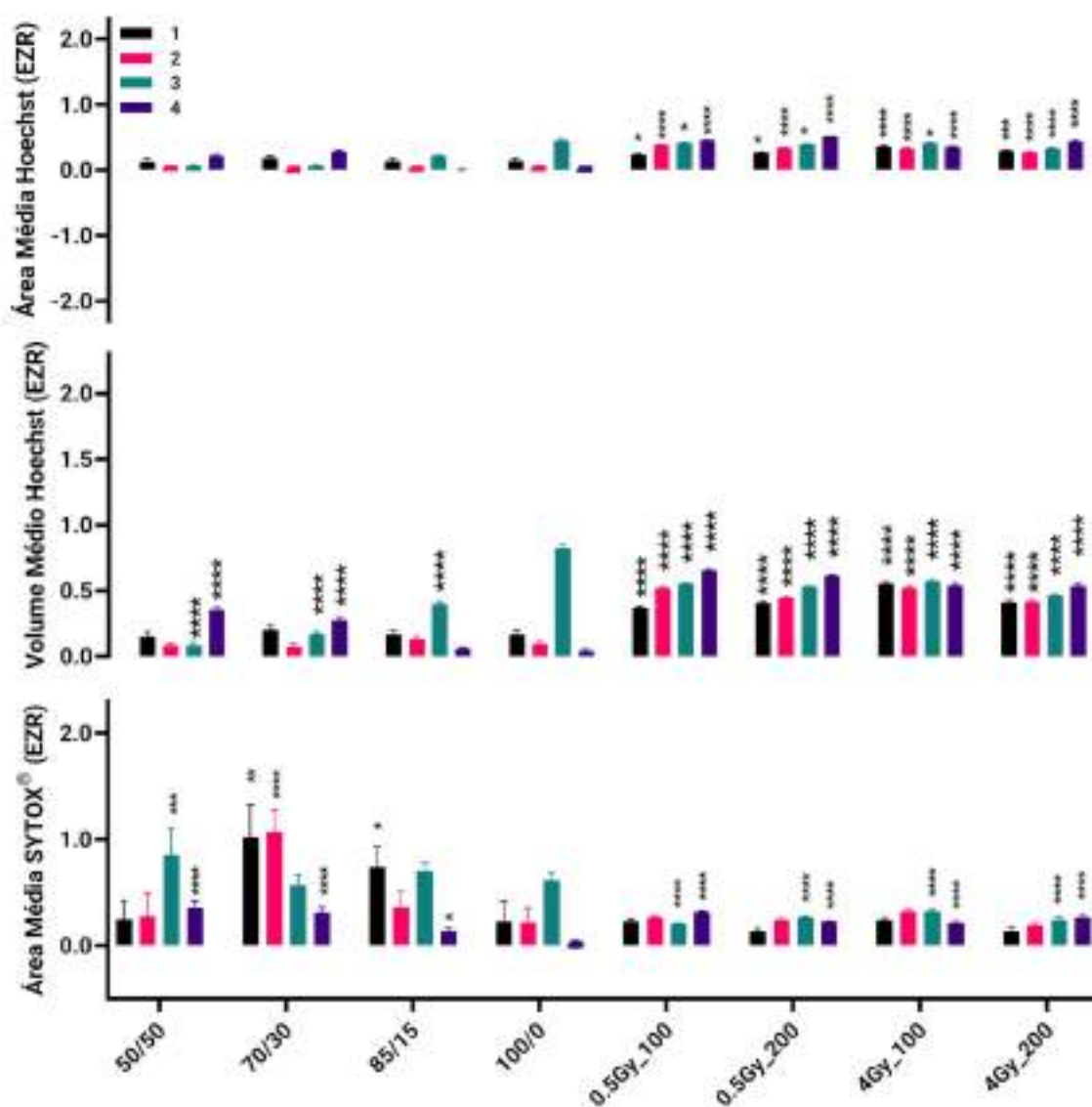
EZR, pois doses maiores de radiação ionizante podem reduzir a proliferação celular (paralisação de ciclo em G2) e acelerar os processos de morte apoptótica (MORTENSEN *et al.*, 2020; AL-RAMADAN *et al.*, 2018; HACKER *et al.*, 2023; BRÜNINGK *et al.*, 2020; STORME *et al.*, 1983).

No entanto, os grupos de 4Gy não apresentaram a tendência de redução. Embora a ACP realizada não tenha sido capaz de destacar algum efeito da quantidade de meio de cultura na proliferação celular, a amostra de 0,5Gy mantida com 100 $\mu$ L mostra evidente redução dos valores de EZR no primeiro dia do experimento, ou seja, 24 horas após a irradiação. Não há evidência consistente de alterações danos às células causadas pelas ações das radiações no próprio meio de cultura (ZHOU *et al.*, 2002). Mesmo com tendências de aumento nos valores de  $\Delta_{\text{plâveis}}$  (85/15, dia 4) e em  $\Delta_{\text{implâveis}}$  (50/50 e 70/30, dia 3 e 100/0, dia 4), a análise de variância aliada ao FDR não encontrou nem variância geral, nem diferenças entre os grupos.

A Figura 43 mostra a variação dos EZR das áreas médias dos núcleos marcados com Hoechst 33342 e SYTOX® Green. Estes valores, junto com os valores de volume médio de núcleos marcados por Hoechst foram transformados em escores z-robustos. (\*):  $p < 0,05$ . (\*\*):  $p < 0,01$ . (\*\*\*\*):  $p < 0,0001$  em relação ao primeiro dia de cada concentração. Onde os índices de significância estão relacionados ao grupo controle (100/0, 100% de MCF7 nos esferoides, sem irradiação, com troca de meio e mantidos com 200 $\mu$ L de meio de cultura) no mesmo dia de avaliação.

A área dos núcleos, e possivelmente o seu volume (dada a proporcionalidade entre estas medidas) aumenta significativamente em células irradiadas, em situações em que ocorre a expressão de p21 e conseqüente arresto das células na fase G2 em detrimento das fases G1 e S (HECKENBACH *et al.*, 2022). A fase G2 é posterior à fase S (síntese de DNA), na qual a quantidade de DNA nuclear dobra em preparação ao desfecho de divisão celular. O DNA acumulado desta forma pode, em tese, levar ao aumento das dimensões do núcleo. Outros agentes genotóxicos diferentes das radiações ionizantes também induzem estes efeitos de paralisia do ciclo celular (BAUS, 2003).

Figura 43 – Valores das áreas (Alto) e dos volumes (Centro) médios dos núcleos marcados com Hoechst 33342 e das áreas médias (Baixo) de núcleos marcados com SYTOX® Green encontrados nos esferoides dos grupos testados, avaliados entre 1 e 4 dias de experimento. (\*):  $p < 0,05$ . (\*\*):  $p < 0,01$ . (\*\*\*\*):  $p < 0,0001$  em relação ao primeiro dia de cada concentração.



Fonte: Autora da dissertação.

Mesmo com variações óbvias entre alguns dias (dias 1 e 4 dos grupos 50/50 e 70/30; dias 1 e 3 dos grupos 85/15 e 100/0, por exemplo), as variações estatisticamente significantes de áreas médias foram encontradas entre o grupo 100/0 e os grupos irradiados nas duas doses. Para os volumes de núcleos marcados com Hoechst, há tendência de alta exatamente nestes grupos.

A área média dos núcleos de células mortas foi significativamente menor nos

grupos irradiados. A apoptose disseminada numa população celular teria este efeito (NÚÑEZ et al, 2010), e as radiações ionizantes são indutoras de apoptose em células (SIA et al., 2020; ZHAO et al., 2019; ADJEMIAN et al., 2020; JIAO et al., 2022), podendo explicar a redução observada.

A distinção rápida entre células vivas e mortas, desempenhada com as imagens coletadas durante as análises de microscopia de fluorescência, teve um papel importante no estudo da morfologia e homeostase regular do tecido desenvolvido. As imagens que foram utilizadas para a quantificação dos dados brutos, descrita anteriormente durante este trabalho, foram divididas entre placas irradiadas e placas não irradiadas. Portanto, levando em consideração os resultados anteriores, as imagens escolhidas para demonstrar as diferenças morfológicas estão presentes no quarto dia de experimento.



Como visto ao longo deste trabalho, com as análises de OCT, é possível associar a quantidade de células mortas presentes nos sistemas com maior porcentagem de MCF7, uma vez que as células da linhagem de adenocarcinoma mamário tendem a formar um esferoide mais "solto", com menores compressões e consequentemente menores interações célula-célula, célula-matriz acarretando em respostas no crescimento e proliferação celular.

Em vista disso, a Figura 44 ilustra uma diferença gradativa entre o aparecimento de células mortas, coradas em verde por SYTOX® Green, em relação aos núcleos íntegros, corados em azul por Hoechst 33342 em diferentes concentrações de esferoides fracionados MCF7/HF002-J. Nesta figura é possível observar que esferoides compostos por 100% MCF7 quando comparados com esferoides fracionados em 50% MCF7 e 50% HF002-J demonstram que quanto mais células de fibroblasto no esferoide maiores serão as regiões de proliferação celular e menores serão as regiões que apresentam morte celular.

Por manter a mesma concentração de esferoides homogêneos de MCF7, as Figuras 45 e 46 demonstram imagens de esferoides irradiados com 0,5 Gy e 4 Gy



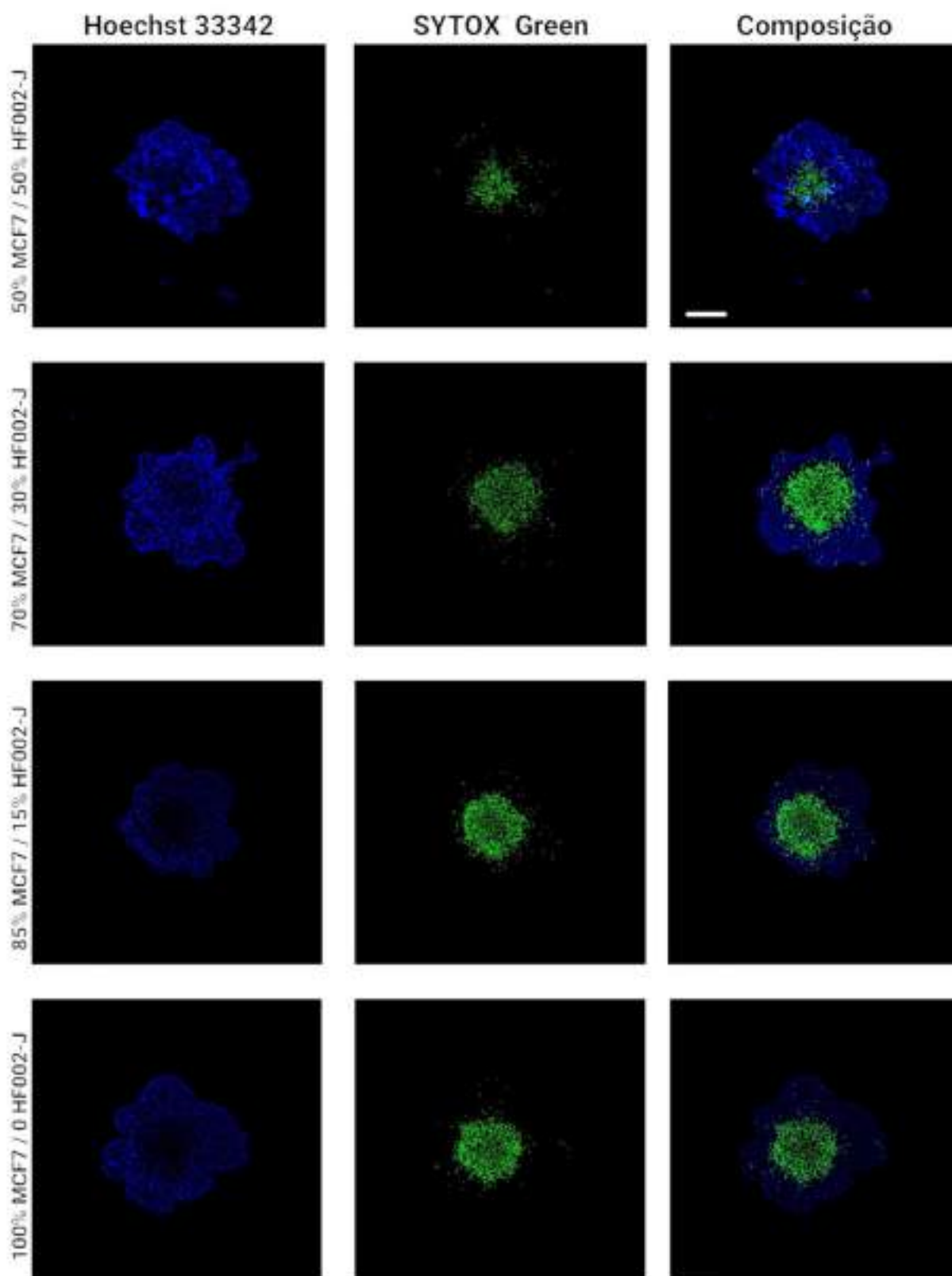
respectivamente. Já é visto em literatura que, o tipo de morte celular mais encontrado em células de MCF7 ocorre por necrose (FAZEL, 2016). O que fica evidenciado ao observar as imagens, porém além disso a distribuição das células no esferoide, como citado em outros tópicos deste trabalho, também contribui para o desenvolvimento do esferoide. Por isso, também foi feita uma análise de diferença na troca de meio de cultura antes da irradiação e depois da irradiação dos sistemas 3D analisados, para um maior rendimento de triagem levando em consideração a obtenção de nutrientes presentes no sistema.

É possível observar na Figura 45 a diferença considerável da área dos esferoides quando comparadas a concentração de 100% MCF7 e 0% HF002-J na Figura 44 para o mesmo dia de análise. Na Figura 45 observa-se esferoides com regiões periféricas com maiores índices de mortalidade, que poderia ser levado em consideração a quantidade de meio de cultura presente no poço com ou sem troca, porém quando comparado com a Figura 46, que representa a placa irradiada à 4 Gy, fica evidente que a diferença entre as amostras está relacionada diretamente com a dose de radiação utilizada.

Ainda na Figura 45, os esferoides analisados obtêm uma morfologia diferenciada pelo alto índice populacional das células coradas em azul, porém com isso também é visto uma região consideravelmente maior de células mortas quando comparadas à imagem anterior. Levando em consideração os esferoides encontrados na Figura 46, congruentes em tamanho relacionado ao grupo homogêneo de MCF7 da placa da Figura 44, a divergência proporcional encontrada nos esferoides da Figura 45 mostra-se consequência da dose de radiação utilizada no dia anterior a análise.

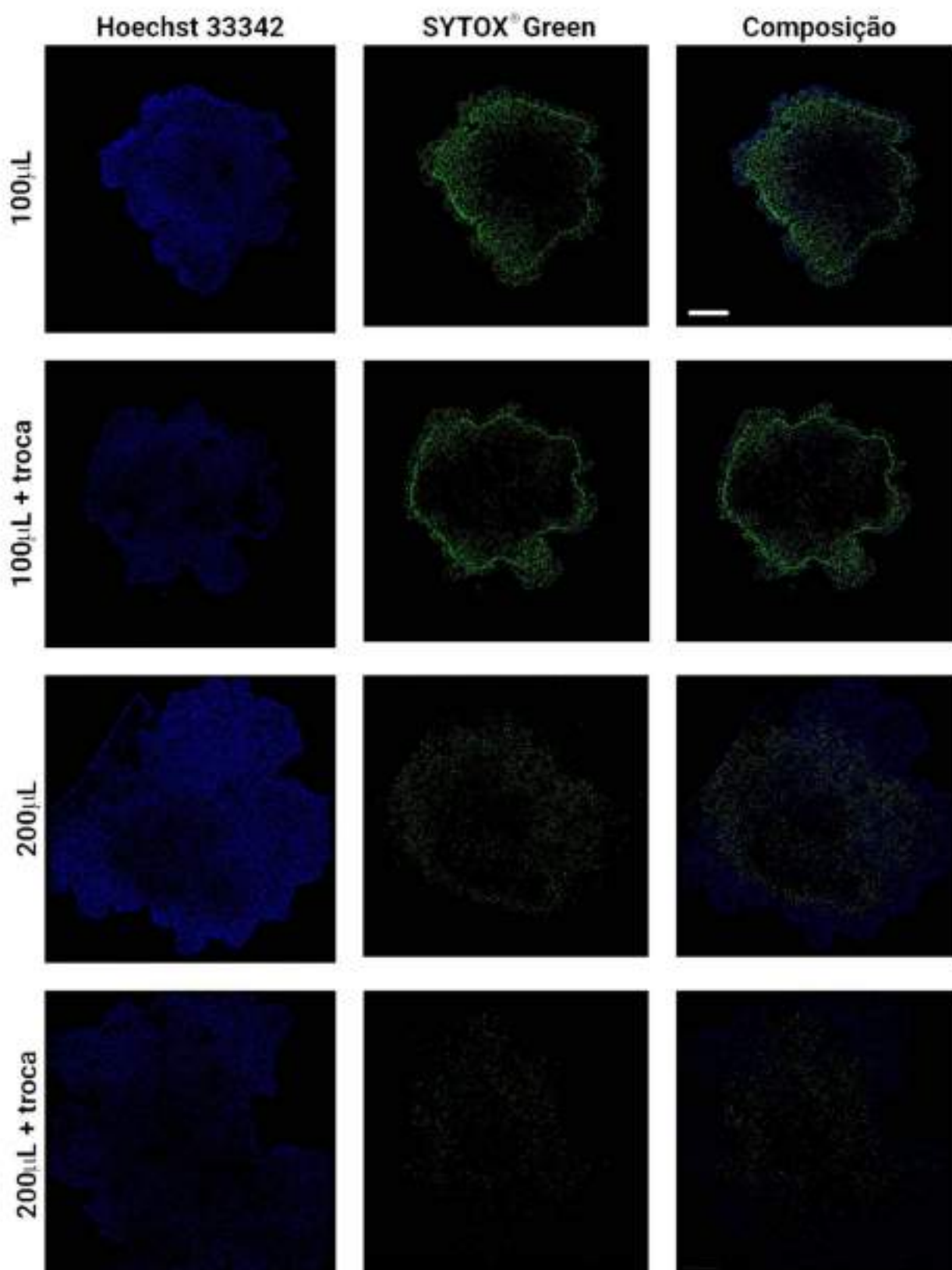
Na Figura 46, os esferoides apresentados tem um tamanho coerente com os achados na Figura 44, porém o centro necrótico característico nos esferoides não irradiados manteve-se consideravelmente maior entre todas as amostras irradiadas com 4 Gy. A morfologia analisada na Figura 46 quando comparada com as duas figuras antecedentes demonstra estruturas 3D compactadas, com núcleos íntegros ultrapassando a quantidade de núcleos de células mortas, o que é esperado nos primeiros dias de cultivo. Porém o diferencial está na quantidade de células mortas que compõem essa figura, onde todas as amostras têm uma zona periférica viva pouco delimitada, com células mortas invadindo o espaço que é caracterizado por manter uma quantidade constante de células viáveis.

Figura 44 – Fotomicrografias obtidas por microscopia de fluorescência de diferentes concentrações de esferoides fracionados MCF7/HF002-J no dia 4 de cultivo. SYTOX® Green (verde) indicando núcleos de células mortas e Hoechst 33342 (azul) indicando núcleos viáveis. Barra de 200 µm.



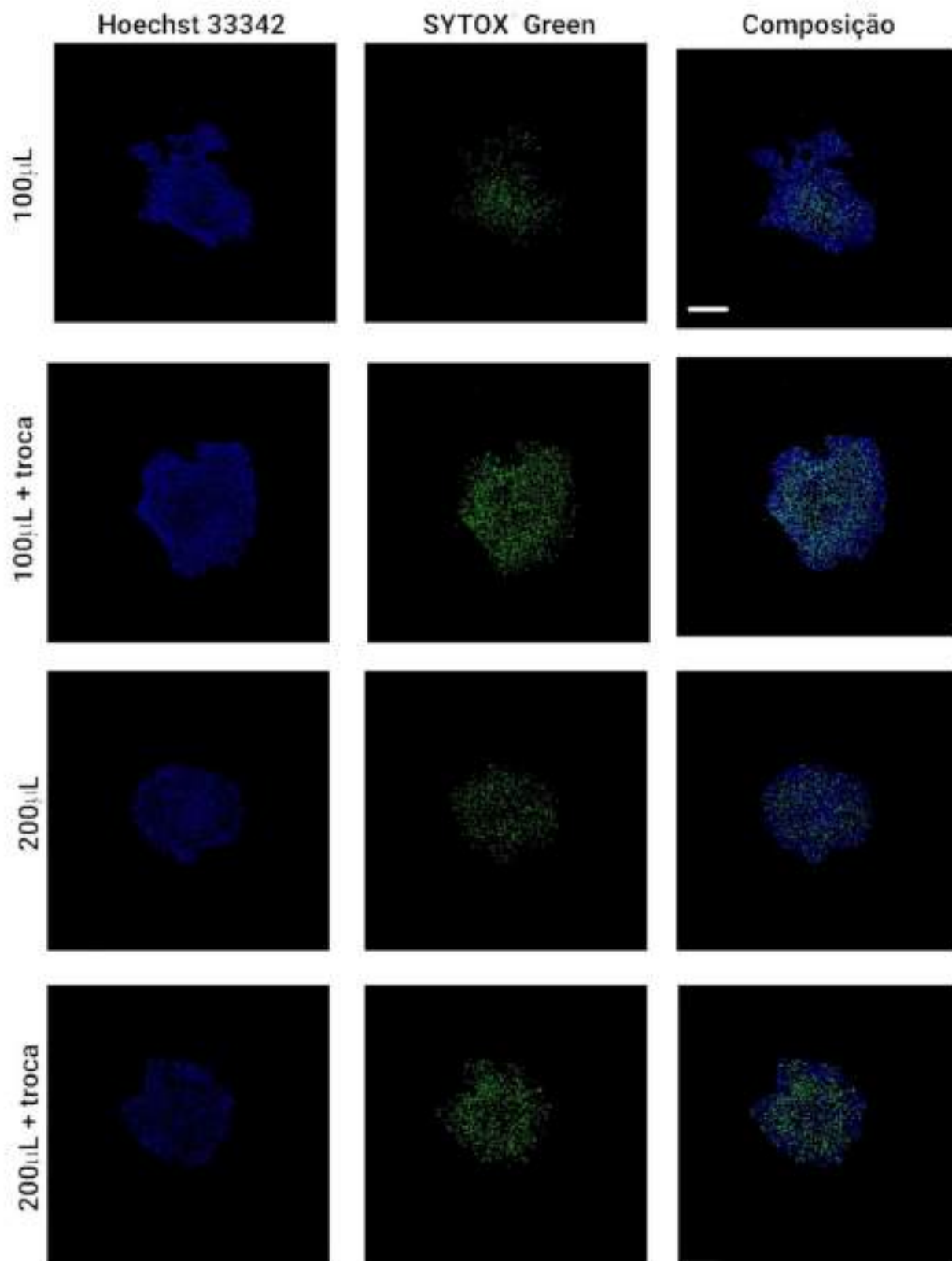
Fonte: Autora da dissertação.

Figura 45 – Fotomicrografias obtidas por microscopia de fluorescência de esferoides de MCF7 mantidos com 100 ou 200  $\mu\text{L}$  de meio de cultura e irradiados com 0,5 Gy com e sem troca de meio de cultura. SYTOX® Green (verde) indicando núcleos de células mortas e Hoechst 33342 (azul) indicando núcleos viáveis. Barra de 200  $\mu\text{m}$ .



Fonte: Autora da dissertação.

Figura 46 – Fotomicrografias obtidas por microscopia de fluorescência de esferoides de MCF7 mantidos com 100 ou 200  $\mu\text{L}$  de meio de cultura e irradiados com 4 Gy com e sem troca de meio de cultura. SYTOX® Green (verde) indicando núcleos de células mortas e Hoechst 33342 (azul) indicando núcleos viáveis. Barra de 200  $\mu\text{m}$ .



Fonte: Autora da dissertação.



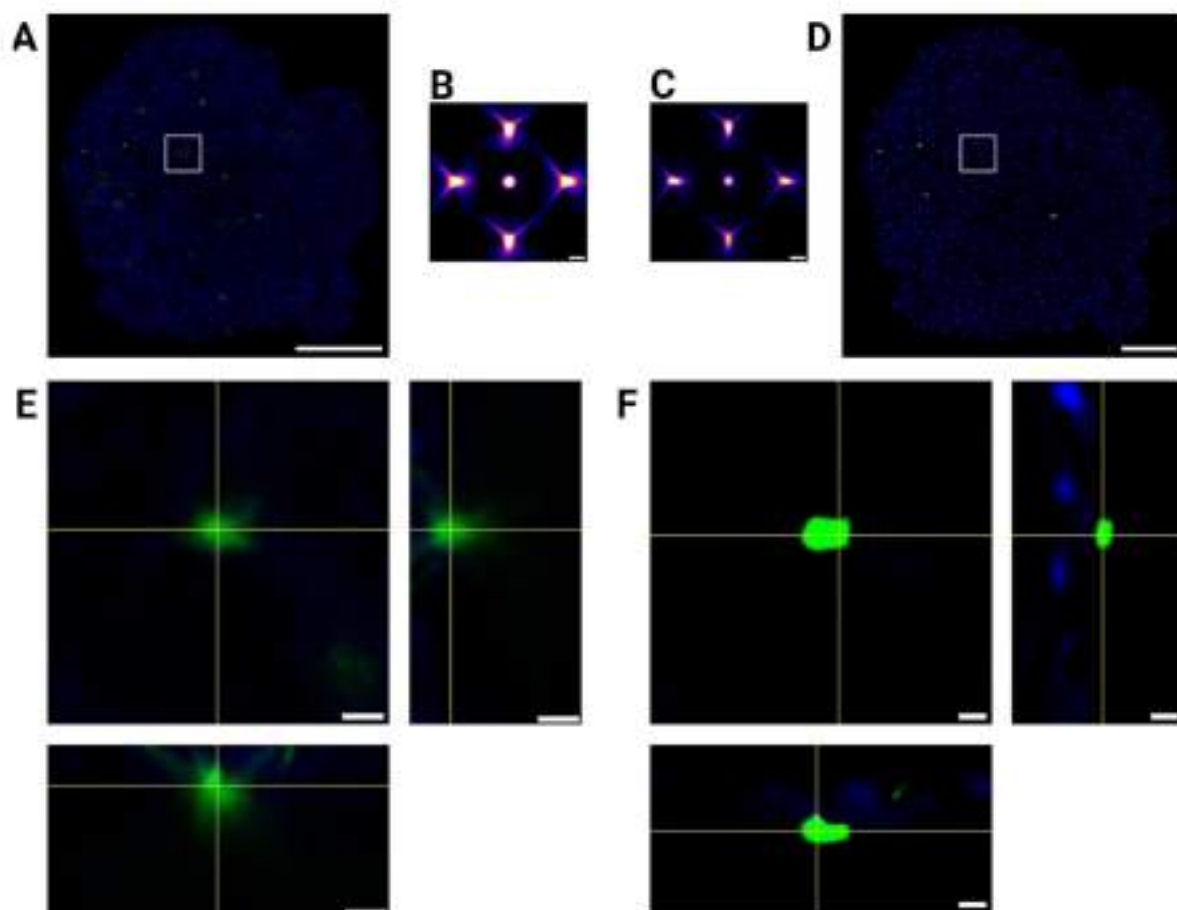
O princípio geracional da imagem de microscopia de fluorescência, como visto anteriormente, tem uma barreira física dada pela baixa profundidade de penetração da luz na amostra estudada. Deve-se ter em mente que a quantidade de informações adquiridas por uma imagem de microscopia de fluorescência sempre sofrerá com essa barreira, além da distorção de pontos, falta de nitidez geométrica e redução da resolução espacial do sistema estudado por conta da natureza ondulatória da luz utilizada e suas limitações (KASHYAP *et al*, 2023; MERCHANT & DIASPRO, 2023).

O método de reconstrução da imagem baseado nas leis da ondulatória presente neste trabalho foi o processamento de deconvolução pelo algoritmo de Richardson-Lucy (RL) que consiste na deconvolução da imagem inicial utilizando a função de dispersão de pontos (PSF, *Point Spread Function*). Na microscopia de fluorescência é preciso levar em consideração que os objetos analisados na imagem são muitas vezes descritas como a imagem de um ponto, caracterizado pela intensidade da onda óptica de energia específica. Ao sofrer difração o ponto se deforma e causa imagens aberrantes e distorcidas. O modelo de PSF deve manter o parâmetro de índice de refração da imagem com precisão de volume em uma variação transversal de amplitude de imagem recebida para o que é conhecido como uma fonte de ponto perfeito (RICHARDSON, 1972; LUCY, 1974; HOU & WEI, 2023).

A imagem gerada inicialmente, quando confrontada com o algoritmo de RL e a PSF correspondente ao menor ponto de luz estudado, passa por uma reconstrução onde a imagem anteriormente distorcida e de baixa resolução por interferência de artefatos, passa a ser uma imagem com resolução relativamente maior e conseqüentemente retém maiores detalhes morfológicos.

A Figura 47 ilustra o processo de deconvolução no presente trabalho que foi mantido para a reconstrução das imagens geradas para fins de visualização do esferoide. Na Figura 47, a imagem do esferoide adquirido inicialmente (A) se mantém desfocado e com pontos distorcidos, a amostra é reconstruída então em diferentes profundidades com a PSF referente a coloração de fluorescência desejada, azul (B) ou verde (C), com a PSF escolhida e a utilização do algoritmo de RL uma nova imagem é gerada (D) com a reconstrução dos pontos, mantendo uma dispersão de luz controlada, uma maior delimitação dos pontos gerados e conseqüentemente uma maior resolução de imagem.

Figura 47 – Processo de deconvolução. Em que: (A) Imagem sem deconvolução. Barra: 200  $\mu\text{m}$ . (B) PSF do comprimento de onda azul, e as visões ortogonais. Barra: 10  $\mu\text{m}$ . (C) PSF do comprimento de onda verde, e as visões ortogonais. Barra 10  $\mu\text{m}$  (D) Imagem trabalhada em deconvolução. Barra: 200  $\mu\text{m}$ . (E) Ampliação da região marcada em A. Todas as Barras: 10  $\mu\text{m}$ . (F) Ampliação da região marcada em D. Todas as Barras: 10  $\mu\text{m}$ .



Fonte: Autora da dissertação.

## 6. CONCLUSÃO

O modelo biocompatível de cultura tridimensional, construído por levitação magnética apresentado no trabalho, mostrou ser uma alternativa viável para análises de viabilidade celular, citotoxicidade e morfologia de um esferoide tumoral. A morfologia do esferoide pôde ser estudada em equipamentos com diferentes finalidades, visando o volume em detrimento da resolução e vice-versa, o que pode ser considerado como uma análise avançada do conteúdo construído.

As imagens obtidas concluíram que existem diferentes áreas de movimentação celular nos esferóides e a movimentação das células muda com a quantidade de fibroblasto adicionado ao sistema. Essa condição fisiológica foi mais uma vez ressaltada quando analisados por microscopia de fluorescência, esferóides construídos apenas com MCF7 tendem a ser mais frágeis e delicados, o que deve ser mantido em consideração ao se pensar em uma cultura voltada para HTS. A utilização das PSF para reconstrução da imagem se mostrou importante para caracterizar regiões do esferoide de maneira complexa, mostrando com uma resolução satisfatória as estruturas marcadas com corantes químicos.

É importante dizer que as NP's utilizadas não causaram artefatos nas imagens obtidas, mostrando assim o potencial elevado como uma base satisfatória para construção do sistema 3D. A utilização do ímã na troca de meio é algo de extrema importância, auxiliando o usuário do sistema na manipulação dos esferóides sem perda de amostras. Além disso com os resultados obtidos foi possível concluir que a Mitomicina-C não é um fármaco favorável para o tratamento de tumores de mama, por ser um fármaco que precisa de altas doses para que ocorra um efeito no tecido, podendo trazer assim efeitos colaterais acentuados com a utilização desta terapia.

A utilização de co-cultura com fibroblastos humanos mostrou-se viável e pertinente quando a morfologia dos esferóides foi avaliada, por formar esferóides mais compactos e menos frágeis. Além disso, foi possível relacionar tamanho e formato de núcleos de células em esferóides com a sobrevivência ou decaimento geral da população utilizando ACP. A análise de correlação entre as variáveis encontradas deve ser interpretada com cautela, pois algumas correlações são puramente matemáticas, tais como as entre volumes e áreas dos núcleos.

Foi possível encontrar diferenças estatísticas entre diferentes concentrações

do modelo criado, e graças a quantidade de dados obtidos o modelo pôde ser submetido a diferentes análises. A complexidade encontrada no modelo tumoral estudado se mostrou adequada para estudos aprofundados sobre linhagem de adenocarcinoma mamário para testes antitumorais.



## 7. REFERÊNCIAS

ADIE, S. G.; BOPPART, S. A. Optical Coherence Tomography for Cancer Detection. *Optical Imaging of Cancer*, p. 209-250, 2009.

ADJEMIAN, S.; OLTEAN, T.; MARTENS, S.; WIERNICKI, B.; GOOSSENS, V.; BERGHE, T. V.; CAPPE, B.; LADIK, M.; RIQUET, B. F.; HEYNDRICKX, L.; BRIDELANCE, J.; VUYLSTEKE, M.; VANDECASTEELE, K.; VANDENABEELE, P. Ionizing radiation results in a mixture of cellular outcomes including mitotic catastrophe, senescence, methuosis, and iron-dependent cell death. *Cell Death & Disease* volume, v. 11, n. 1003, 2020.

AFTIMOS, P.; AZIM, H. A.; SOTIRIOU, C. Chapter 26 - Molecular Biology of Breast Cancer. *Molecular Pathology (Second Edition)*, p. 569-588, 2018.

AHN, J.; KIM, D-H.; KOO, D-J.; LIM, J.; PARK, T-E.; LEE, J.; KO, J.; KIM, S.; KIM, M.; KANG, K-S.; MIN, D-H.; KIM, S-Y.; KIM, Y.; JEON, N. L. 3D microengineered vascularized tumor spheroids for drug delivery and efficacy testing☆. *Acta Biomaterialia*, v. 165, p. 153-167, 2023.

AL-OTAIBI, W. A.; ALKHATIB, M. H.; WALI, A. N. Wall, A. N. Cytotoxicity and apoptosis enhancement in breast and cervical cancer cells upon coadministration of mitomycin C and essential oils in nanoemulsion formulations. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, v. 106, p. 946-955, 2018.

AL-RAMADAN, A.; MORTENSEN, A. C.; CARLSSON, J.; NESTOR, M. V. Analysis of radiation effects in two irradiated tumor spheroid models. *Oncology Letters*, v. 15, n. 3, 2018.

AL-THOUBAITY, F. K. Molecular classification of breast cancer: A retrospective cohort study. *Annals of Medicine and Surgery*, v. 49, p. 44-48, 2020.

ALI MORADI, A.; MORADI, M.; HOSSEINI, S.; GARMSIRI, A.; BAHARI, E.; BAHRAMI, F.; SHEIKHESMAELLI, F.; GHADERI, B.; YOUSEFINEJAD, V.; BAHRAMI, T. Organotropism of breast cancer metastasis: A comprehensive approach to the shared gene network. *Gene Reports*, v. 30, 2023.

ALKARKHI, A. F. M.; ALGARAGHULI, W. A. A. Chapter 8 - Principal Components Analysis. *Easy Statistics for Food Science with R*, p. 125-141, 2019.

ARGANDA-CARRERAS, I.; FERNÁNDEZ-GONZÁLEZ, R.; MUÑOZ-BARRUTIA, A., ORTIZ-DE-SOLORZANO, C. 3D reconstruction of histological sections: Application to mammary gland tissue. *Microscopy Research and Technique*, v. 73, n. 11, p. 1019-1029, 2010.

ARGANDA-CARRERAS, I.; KAYNIG, V.; RUEDEN, C.; ELICEIRI, K. W.; SHINDELIN, J.; CARDONA, A.; SEUNG, H. S. Trainable Weka Segmentation: a machine learning tool for microscopy pixel classification. *Bioinformatics*, v. 33, n. 15, p. 2424-2426, 2017.

ARNOLD, M.; MORGAN, E.; RUMGAY, H.; MAFRA, A.; SINGH, D.; LAVERSANNE, M.; VIGNAT, J.; GRALOW, J. R.; CARDOSO, F.; SIESLING, S.; SOERJOMATARAM, I. Current and future burden of breast cancer: Global statistics for 2020 and 2040. *The Breast*, v. 66, p. 15-23, 2022.

AUERSWALD, M. MORTEN, M. How to determine the number of factors to retain in exploratory factor analysis: A comparison of extraction methods under realistic conditions. *Psychological Methods*, v. 24, n. 4, p. 468-491, 2019.

BAIRAMUKOV, V. Y.; FILATOV, M. V.; KOVALEV, R. A.; FEDOROVA, N. D.; PANTINA, R. A.; ANKUDINOV, A. V.; IASHINA, E. G.; GRIGORIEV, S. V.; VANFOLOMEEVA, E. Y. AFM imaging of the transcriptionally active chromatin in mammalian cells' nuclei. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, v. 1866, n. 12, 2022.

BAKER, B. M.; CHEN, C. S. Deconstructing the third dimension – how 3D culture microenvironments alter cellular cues. *Journal of Cell Science*, v.125, n. 13, p. 3015-3024, 2012.

BARISAM, M.; SAIDI, M. S.; KASHANINEJAD, N.; NGUYEN, N-T. Prediction of Necrotic Core and Hypoxic Zone of Multicellular Spheroids in a Microbioreactor with a U-Shaped Barrier. *Micromachines*, v. 9, n. 3, 2018.

BAUS, F.; GIRE, V.; FISHER, D.; PIETTE, J.; DULIC, V. Permanent cell cycle exit in G2 phase after DNA damage in normal human fibroblasts. *THE EMBO Journal*, v. 22, n. 15, 2003.

BÉCOURT, S.; ESPIÉ, M. Hormonal Treatment of Breast Cancer. *Encyclopedia of Endocrine Diseases (Second Edition)*, v. 2, p. 646-665, 2019.

BIALKOWSKA, K.; KOMOROWSKI, P.; BRYZIEWSKA, M.; MILOWSKA, K. Spheroids as a type of three-dimensional cell cultures—examples of methods of preparation and the most important application. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 21, n. 17, p. 1-17, 2020.

BISHNOI, A.; KUMAR, S.; JOSHI, N. Chapter 9 - Wide-Angle X-ray Diffraction (WXR): Technique for Characterization of Nanomaterials and Polymer Nanocomposites. *Microscopy Methods in Nanomaterials Characterization*, p. 313-337, 2017.

BLAY, V.; TONALI B.; HO, S. P.; ARKIN, M. R. High-Throughput Screening: today's biochemical and cell-based approaches. *Drug Discovery Today*, v. 25, n. 10, p. 1807-1821, 2020.

BONFIM, L.; PASSOS, P. Q. S.; GONÇALVES, K. O.; COURROL, L. C.; SILVA, F. R. O.; VIEIRA, D. P. Microwave-mediated synthesis of iron-oxide nanoparticles for use in magnetic levitation cell cultures. *Appl Nanosci*, p. 1707–1717, 2019.

BOEDTKJER, E.; PEDERSEN, S. F. The Acidic Tumor Microenvironment as a Driver of Cancer. *Annual Review of Physiology*, v. 82, p. 103–126, 2020.

BRAIM, F. S.; RAZAK, N. N. A. N. A; AZIZ, A. A.; DHEYAB, M. A.; ISMAEL, L. Q. Rapid green-assisted synthesis and functionalization of superparamagnetic magnetite nanoparticles using Sumac extract and assessment of their cellular toxicity, uptake, and anti-metastasis property. *Ceramics International*. v. 49, n. 5, p. 7359-7369, 2023.

BRANDÃO, M.; AFTIMOS, P.; AZIM, H. A.; SOTIRIOU, C. Chapter 26 - Molecular biology of breast cancer. *Essential Concepts in Molecular Pathology (Second Edition)*, p. 449-461, 2020.

BRAY, M-A.; CARPENTER, A.; Imaging Platform, Broad Institute of MIT and Harvard. Advanced Assay Development Guidelines for Image-Based High Content Screening and Analysis. *Assay Guidance Manual*, 2017.

BROEKSMAN, C. P.; DORFLING, C. Evaluating glycine as an alternative lixiviant for copper recovery from waste printed circuit boards. *Waste Management*, v. 163, p. 96-107, 2023

BROWN, M.; CATO, L.; JESELSON, R. Chapter 29 - Hormone-Responsive Cancers. *Yen and Jaffe's Reproductive Endocrinology (Eighth Edition)*, p. 717-741, 2019.

BRÜNINGK, S. C.; RIVENS, I.; BOX, C.; OELFKE, U.; HAAR, G. 3D tumour spheroids for the prediction of the effects of radiation and hyperthermia treatments. *Scientific Reports volume*, v. 10, n. 1653, 2020.

BURCHFIELD, J. G.; LU, J.; FAZAKERLEY, D. J.; TAN, S-X.; NG, Y.; MELE, K.; BUCKLEY, M. J.; HAN, W.; HUGHES, W. E.; JAMES, D. E. Novel systems for dynamically assessing insulin action in live cells reveals heterogeneity in the insulin response. *TRAFFIC*, v. 14, n. 3, p. 259-273, 2013.

BUSK, M.; SINNING, S.; ALSTRUP, A. K. O.; MUNK, O. L.; VENDELBO, M. H. Nuclear Medicine Preclinical Research: The Role of Cell Cultures. *Seminars in Nuclear Medicine*, 2023.

CAI, G.; NGUYEN, A.; BASHIRZADEH, Y.; LIN, S-S.; BI, D.; LIU, A. P. Compressive stress drives adhesion-dependent unjamming transitions in breast cancer cell migration. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, v. 10, 2022.

CAMARGO, A. PCAtest: testing the statistical significance of Principal Component Analysis in R. *PeerJ*, 2022.

CAMARILLO, I. G.; XIAO, F.; MADHIVANAN, S.; SALAMEH, T.; NICHOLS, M.;

REECE, L. M.; LEARY, J. F.; OTTO, K.; NATARAJAN, A.; RAMESH, A.; SUNDARARAJAN, R. 4 - Low and high voltage electrochemotherapy for breast cancer: an in vitro model study. *Electroporation-Based Therapies for Cancer*, p. 55-102, 2014.

CAMIZ, S.; PILLAR, V.D. Identifying the Informational/Signal Dimension in Principal Component Analysis. *Mathematics*, v. 6, n. 11, 2018.

CANGELOSI, R.; GORIELY, A. Component retention in principal component analysis with application to cDNA microarray data. *Biology Direct volume*, v. 2, n. 2, 2007.

CANTWELL, H.; NURSE, P. Unravelling nuclear size control. *Current Genetics*, v. 65, p. 1281–1285, 2019.

CARDOSO, F.; MCCARTNEY, A.; PONTI, A.; MAROTTI, L.; VRIELLING, C.; ENIU, A.; SOUSA, B.; RIPAMONTI, C.; TRAVADO, L.; SPITZ, S.; JOLLY, E.; CURIGLIANO, G.; PENALT-LLORCA, F.; LECOUVET, F.; RUBIO, I. T.; BIGANZOLI, L. European Society of Breast Cancer Specialists/Advanced Breast Cancer Global Alliance quality indicators for metastatic breast cancer care. *European Journal of Cancer*, v. 187, p. 105-113, 2023.

CARON, P-O. A Monte Carlo examination of the broken-stick distribution to identify components to retain in principal component analysis. *Journal of Statistical Computation and Simulation*, v. 86, n. 12, p. 2405-2410, 2016.

CHAKRABORTY, A.; BOER, J. C.; SELOMULYA, C.; PLEBANSKI, M. Amino Acid Functionalized Inorganic Nanoparticles as Cutting-Edge Therapeutic and Diagnostic Agents. *Bioconjugate Chemistry*, v. 29, n. 3, p. 657-671, 2017.

CHAN, C. J.; LI, W.; COJOC, G.; GUCK, J. Volume Transitions of Isolated Cell Nuclei Induced by Rapid Temperature Increase. *Biophysical Journal*, v.112, n. 6, p. 1063-1076, 2017.

CHHETRI, A.; CHITTIBOYINA, S.; ATRIAN, F.; BAI, Y.; DELISI, D. A.; RAHIMI, R.; GARNER, J.; EFREMOV, Y.; PARK, K.; TALHOUK, R.; LEVIÈVRE, S. A. Cell Culture and Coculture for Oncological Research in Appropriate Microenvironments. *Current Protocols*, v. 11, n. 2, 2019.

CHHRETRI, A.; RISPOLI, J. V.; LEVIÈVRE, S. A. 3D Cell Culture for the Study of Microenvironment-Mediated Mechanostimuli to the Cell Nucleus: An Important Step for Cancer Research. *Frontiers in Molecular Biosciences*, v. 8, 2021.

CHIARAVALLI, J.; GLICKMAN, J. F. A High-Content Live-Cell Viability Assay and Its Validation on a Diverse 12K Compound Screen. *SLAS Discovery*, v. 22, n. 9, p. 1120-1130, 2017.

CHOLKAR, K.; HIRANI, N. D.; NATARAJAN, C. Chapter 14 - Nanotechnology-Based Medical and Biomedical Imaging for Diagnostics. *Emerging Nanotechnologies for Diagnostics, Drug Delivery and Medical Devices*, p 355-374, 2017.



CLEMONS, T. D.; KERR, R. H.; JOOS, A. 3.10 - Multifunctional Magnetic Nanoparticles: Design, Synthesis, and Biomedical Applications. **Comprehensive Nanoscience and Nanotechnology**, 2nd ed., v. 3, p. 193-210, 2019.

COMSA, S.; CÎMPEAN, A. M.; RAICA, M. The Story of MCF-7 Breast Cancer Cell Line: 40 years of Experience in Research. **Anticancer Research**, v. 35, n. 6, 2015.

COSTARD, L. S.; HOSN, R. R.; RAMANAYAKE, H.; O'BRIEN, F. J.; CURTIN, C. M. Influences of the 3D microenvironment on cancer cell behaviour and treatment responsiveness: A recent update on lung, breast and prostate cancer models☆. **Acta Biomaterialia**, v. 132, p. 360-378, 2021.

CULLITY, B. D.; GRAHAM, C. D. **Introduction to Magnetic Materials**. 2nd ed. John Wiley & Sons, Canada, 2009.

D'Agostino, R. B. **'Tests for normal distribution.'** In **Goodness-of-fit Techniques**, New York: Marcel Decker, 1986.

DÄSTER, S.; AMATRUDA, N.; CALABRESE, D.; IVANEK, R.; TURRINI, E.; DROESER, R. A.; ZAJAC, P.; FIMOIGNARI, C.; SPAGNOLI, G. C.; IEZZI, G.; MELE, V.; MURARO, M. G. Induction of hypoxia and necrosis in multicellular tumor spheroids is associated with resistance to chemotherapy treatment. **Oncotarget**, v. 8, n. 1, p. 1725-1736, 2017.

DE AMORIM GARCIA FILHO, C. A.; YEHOHUA, Z.; GREGORI, G.; PULIAFITO, C. A.; ROSENFELD, P. J. Chapter 3 - Optical Coherence Tomography, **Retina (Fifth Edition)**, v. 1, p. 82-110, 2013.

DESAI, P. K.; TSENG, H.; SOUZA, G. R. Assembly of Hepatocyte Spheroids Using Magnetic 3D Cell Culture for CYP450 Inhibition/Induction. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 5, 2017.

DING, C.; REN, T. Near infrared fluorescent probes for detecting and imaging active small molecules. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 482, 2023.

DINNO, A. Exploring the Sensitivity of Horn's Parallel Analysis to the Distributional Form of Random Data. **Multivariate Behavioral Research**, v. 44, n. 3, p. 362-388, 2009.

DLUDLA, P. V.; JACK, B.; VARARAGAVAN, A.; PHEIFFER, C.; JOHNSON, R.; LOUW, J.; MULLER, C. J. F. A dose-dependent effect of dimethyl sulfoxide on lipid content, cell viability and oxidative stress in 3T3-L1 adipocytes. **Toxicology Reports**, p. 1014-1020, 2018.

DLUDLA, P. V.; NKAMBULE, B. B.; MAZIBUKO-MBEJE, E. S.; NYAMBUYA, T. M.; SILVESTRI, S.; ORLANDO, P.; MXINWA, V.; LOUW, J.; TIANO, L. Chapter 25 - The impact of dimethyl sulfoxide on oxidative stress and cytotoxicity in various experimental models. **Toxicology**, p. 243-261 2021.

DOCTOR, A.; SEIFERT, V.; ULLRICH, M.; HAUSER, S.; PIETZSCH, J.

Three-Dimensional Cell Culture Systems in Radiopharmaceutical Cancer Research. **Cancers**, v. 12, n. 10, 2020.

DOLS-PEREZ, A.; FORNAGUERA, C.; FEINER-GRACIA, N.; GRIJALVO, S.; SOLANS, C.; GOMILA, G. Effect of surface functionalization and loading on the mechanical properties of soft polymeric nanoparticles prepared by nano-emulsion templating. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 222, 2023.

DOMINGUES, M.; PEREIRA, C. L.; SARMENTO, B.; CASTRO, F. Mimicking 3D breast tumor-stromal interactions to screen novel cancer therapeutics. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 190, 2023.

DRAGIEV, P.; NADON, R.; MAKARENKOV, V. Systematic error detection in experimental high-throughput screening. **BMC Bioinformatics volume**, v. 12, n. 25, 2011.

DROUTSAS, I. CHALLINOR, A. J.; DEVA, C. R.; WANG, E. Integration of machine learning into process-based modelling to improve simulation of complex crop responses. **In silico Plants**, v. 4, n. 2, 2022.

DUGGAN, C.; TRAPANI, D.; ILBAWI, A. M.; FIDAROVA, E.; LAVERSANNE, M.; CURIGLIANO, G.; BRAY, F.; ANDERSON, B. O. National health system characteristics, breast cancer stage at diagnosis, and breast cancer mortality: a population-based analysis. **The Lancet Oncology**, v. 22, n. 11, p. 1632-1642, 2021.

DUTTA, S.; DIXIT, R.; SHARMA, R. K. Chapter 7 - Remediation of heavy metals with nanomaterials. **Separation Science and Technology**, v. 15, p. 97-138, 2022.

EFREMOV, A.K.; YAN, J.; HOVAN, L. Nucleus size and its effect on nucleosome stability in living cells. **Biophysical Journal**, v. 121, n. 21, p. 1-16, 2022.

EHRMANN, R. L.; GEY, G. O. The Growth of Cells on a Transparent Gel of Reconstituted Rat-Tail Collagen. **JNCI: Journal of the National Cancer Institute**, v. 16, n. 6, p. 1375-1403, 1956.

EI-SADEK, I. A.; MIYAZAWA, A.; SHEN, L. T.; MAKITA, S.; FUKUDA, S.; YAMASHITA, T.; OKA, Y.; MUKHERJEE, P.; MATSUSAKA, S.; OSHIKA, T.; KANO, H.; YASUNO, Y. Optical coherence tomography-based tissue dynamics imaging for longitudinal and drug response evaluation of tumor spheroids. **Biomedical Optics Express**, v. 11, n. 11, p. 6231-6248, 2020.

EI-SADEK, I. A.; MIYAZAWA, A.; SHEN, L. T.; MAKITA, S.; MUKHERJEE, P.; LICHTENEGGER, A.; MATSUSAKA, S.; YASUNO, Y. Three-dimensional dynamics optical coherence tomography for tumor spheroid evaluation. **Biomedical Optics Express**, v. 12, n. 11, p. 6844-6863, 2021.

EKE, G.; VAYSSE, L.; YAO, X.; ESCUDERO, M.; CARRIÈRE, A.; TREVISIOL, E.; VIEU, C.; DANI, C.; CASTEILLA, L.; MALAQUIN, L. Cell Aggregate Assembly through Microengineering for Functional Tissue Emergence. **Cells**, v. 11, n. 9, 2022.

ENGELBRECHT, L.; OLLEWAGEN, T.; DE SWARDT, D. Advances in fluorescence microscopy can reveal important new aspects of tissue regeneration. *Biochimie*, v. 196, p. 194-202, 2022.

EPHERRE, R.; GOGGIO, G.; MORNET, S.; DUGUEST, E. 4.39 Nanopartículas magnéticas híbridas para entrega direccionada. *Biomaterials Abrangentes II*, v. 4, p. 750-771, 2017.

ERIQUEZ-NAVAS, P. M.; GARCIA-MARTIN, M. L.; Chapter 9 - Application of Inorganic Nanoparticles for Diagnosis Based on MRI. *Frontiers of Nanoscience*, v. 4, p. 233-245, 2012.

ETHER, S.; SAIF-UR-RAHMAN, K. M. A systematic rapid review on quality of care among non-communicable diseases (NCDs) service delivery in South Asia. *Public Health in Practice*, v. 2, 2021.

EZEALIGO, B. N.; EZEALIGO, U. S.; IGHODALO, K. I.; EZEMA, F. I. 11 - Iron oxide nanoparticles: current and future applications in nanomedicine. *Fundamentals and Industrial Applications of Magnetic Nanoparticles*, p. 349-392, 2022.

FANG, Y. P.; HU, P. Y.; HUANG, Y. B. Diminishing the side effect of mitomycin C by using pH-sensitive liposomes: in vitro characterization and in vivo pharmacokinetics. *Drug Des Devel Ther*, v. 15, n. 12, p. 159-169, 2018.

FAVELA-CAMACHO, S. R.; SAMANIEGO-BENÍTEZ, E. J.; GODÍNEZ-GARCÍA, A.; AVILÉS-ARELLANO, L. M.; PÉREZ-ROBLES, J. F. How to decrease the agglomeration of magnetite nanoparticles and increase their stability using surface properties. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, v. 574, p. 29-35, 2019.

FAZEL, M.; MEHNATI, P.; BARADARAN, B.; PIRAYESH, J. Evaluation of gamma radiation-induced cytotoxicity of breast cancer cells Is there a time-dependent dose with high efficiency?. *Indian Journal of Cancer*, v. 53, n. 1, p. 25-28, 2016.

FERREIRA, L. P.; GASPAR, V. M.; MANO, J. F. Design of spherically structured 3D in vitro tumor models -Advances and prospects. *Acta Biomaterialia*, v.15, p.11-34 2018.

FISCHER, L. M.; VÁSQUEZ, J. L.; GEHL, J.; HERMANN, G. G.; LARSEN, N. B. Exploration of two methods for quantitative Mitomycin C measurement in tumor tissue in vitro and in vivo. *Biological Procedures Online*, v. 15, n. 12, 2013.

FLECK, N.; AMLI, H.; DHANAK, V.; AHMED, W. Chapter 11 - Characterization techniques in energy generation and storage. *Emerging Nanotechnologies for Renewable Energy*, p. 259-285, 2021.

FONTOURA, J. C.; VIEZZER, C.; DOS SANTOS, F. G.; LIGABUE, R. A.; WEINLICH, R.; PUGA, R. D.; SEVERINO, P.; BONORINO, C. Comparison of 2D and 3D cell culture models for cell growth, gene expression and drug resistance. *Materials Science and Engineering: C*, v. 107, 2020.

FORSMAN, N.; LOZHECHNIKOVA, A.; KHAKALO, A.; JOHANSSON, L. S.; VARTIAINEN, J.; OSTERBERG, M. Layer-by-layer assembled hydrophobic coatings for cellulose nanofibril films and textiles, made of polylysine and natural wax particles. *Carbohydrate Polymers*, v. 173, p. 392-402, 2017.

FRANKLIN, S. B.; GIBSON, D. J.; ROBERTSON, P. A.; POHLMANN, J. T.; FRALISH, J. S. Parallel Analysis: a method for determining significant principal components. *Journal of Vegetation Science*, v. 6, n. 1, p. 99-106, 1995.

FRONTIER, S. Étude de la décroissance des valeurs propres dans une analyse en composantes principales: Comparaison avec le modèle du bâton brisé. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, v. 25, n. 1, p. 67-75, 1979.

GASIOR, K.; HAUCK, M.; BHATTACHARYA, S. Modeling the influence of cell-cell contact and TGF- $\beta$  signaling on the epithelial mesenchymal transition in MCF7 breast carcinoma cells. *Journal of Theoretical Biology*, v. 546, 2022.

GASIOR, K.; WAGNER, N. J.; CORES, J.; CASPAR, R.; WILSON, A.; BHATTACHARYA, S.; HAUCK, M. L. The role of cellular contact and TGF-beta signaling in the activation of the epithelial mesenchymal transition (EMT). *Cell Adhesion & Migration*, v. 13, n. 1, p. 63 -75 2018.

GAZIANO, T. A.; BITTON, A.; ANAND, S.; ABRAHAMS-GESSEL, S.; MURPHY, A. Growing Epidemic of Coronary Heart Disease in Low- and Middle-Income Countries. *Current Problems in Cardiology*, v. 35, n. 2, p. 72-115, 2010.

GILAZIEVA, Z.; PONOMAREV, A.; RUTLAND, C.; RIZVANOV, A.; SOLOVYEVA, V. Promising Applications of Tumor Spheroids and Organoids for Personalized Medicine. *Cancers*, v. 12, n. 10, 2020.

GONZALEZ-PECH, N. I.; GRASSIAN, V. H. Surface Chemical Functionalities of Environmental Nanomaterials. *Encyclopedia of Interfacial Chemistry*, p. 817-828, 2018.

GORETZKO, D.; BÜHNER, M. Factor Retention Using Machine Learning With Ordinal Data. *Applied Psychological Measurement*, v. 46, n. 5, p. 406-421, 2022.

GROSSER, S.; LIPPOLDT, J.; OSWALD, L.; MERKEL.; SUSSMAN, D. M.; RENNER, F.; GOTTHEIL, P.; MORAWETZ, E. W.; FUHS, T.; XIE, X.; PAWLIZAK, S.; FRITSCH, A. W.; WOLF, B.; HORN, L-C.; BRIEST, S.; AKTAS, B.; MANNING, M. L.; KÄS, J. A. Cell and Nucleus Shape as an Indicator of Tissue Fluidity in Carcinoma. *Physical Review X*, 2021.

GUPTA, T.; AITHAL, S.; MISHRIKI, S.; SAHU, P. R.; GENG, F.; PURI, I. K. Label-Free Magnetic-Field-Assisted Assembly of Layer-on-Layer Cellular Structures. *ACS Biomater. Sci. Eng.*, v. 6, n. 7, p. 4294-4303, 2020.

GUYON, L.; LAJAUNIE, C.; FER, F.; BHAJUN, R.; SULPICE, E.; PINNA, G.; CAMPALANS, A.; RADICELLA, J. P.; ROUILLIER, P.; MARY, M.; COMBE, S.;



OBEID, P.; VERT, J-P.; GIDROL, X.  $\Phi$ -score: A cell-to-cell phenotypic scoring method for sensitive and selective hit discovery in cell-based assays. **Scientific Reports** *volume*, v. 5, n. 14221, 2015.

HACKER, B. C.; LIN, E. J.; HERMAN, D. C.; QUESTELL, A. M.; MARTELLO, S. E.; HEDGES, R. J.; WALKER, A. J.; RAFAT, M. Irradiated Mammary Spheroids Elucidate Mechanisms of Macrophage-Mediated Breast Cancer Recurrence. **Cellular and Molecular Bioengineering**, 2023.

HANEY, S. A. Rapid Assessment and Visualization of Normality in High-Content and Other Cell-Level Data and Its Impact on the Interpretation of Experimental Results. **SLAS Discovery**, v. 19, n. 5, p. 672-684, 2014.

HARBECK, N.; PENAULT-LLORCA, F.; CORTES, J.; GNANT, M.; HOUSSAMI, N.; POORTMANS, P.; RUDDY, K.; TSANG, J.; CARDOSO, F. Breast cancer. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 5, n. 66, 2019.

HARRISON, R. G. Observations on the living developing nerve fiber. **Proceedings of the society for experimental biology and medicine**, v. 4, n. 1, p. 140-143, 1906.

HARTNETT, M. K.; LIGHTBODY, G.; IRWIN, G. W. Dynamic inferential estimation using principal components regression (PCR). **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 40, n. 2, p. 215-224, 1998.

HECKENBACH, I.; MKRTCHYAN, G. V.; EZRA, M. B.; BAKULA, D.; MADSEN, J. S.; NIELSEN, M. H.; ORÓ, D.; OSBORNE, B.; COVARRUBIAS, A. J.; IDDA, M. L.; GOROSPE, M.; MORTENSEN, L.; VERDIN, E.; WESTENDORP, R.; SCHEIBYE-KNUDSEN, M. Nuclear morphology is a deep learning biomarker of cellular senescence. **Nature Aging**, v. 2, p. 742-755, 2022.

HERIOT, A. G. 7 - Personalized Cancer Care. **Perioperative Care of the Cancer Patient**. p. 83-90, 2023.

HOLBAN, A. M.; GRUMEZESCU, A. M.; IORDACHE, F. Chapter 4 - Magnetite Nanostructures: Trends in Anti-Infectious Therapy. **Nanotechnology in Diagnosis, Treatment and Prophylaxis of Infectious Diseases**, p. 51-67, 2015.

HORN, J. L. A rationale and test for the number of factors in factor analysis. **Psychometrika**, v. 30, p. 179-185, 1965.

HOU, W.; WEI, Y. Evaluating the resolution of conventional optical microscopes through point spread function measurement. **ISCIENCE**, v. 26, n. 10, 2023.

HUANG, D.; SWANSON, E. A.; LIN, C. P.; SCHUMAN, J. S.; STINSON, W. G.; CHANG, W.; HEE, M. R.; FLOTTE, T.; GREGORY, K.; PULIAFITO, C. A.; FUJIMOTO, J. G. Optical Coherence Tomography. **Science**, v. 254, n. 5035, p. 1178-1181, 1991.

HUANG, X.; HUANG, Z.; GAO, W.; GAO, W. HE, R.; LI, Y.; CRAWFORD, R.; ZHOU, Y.; XIAO, L.; XIAO, Y. Current Advances in 3D Dynamic Cell Culture Systems. **Gels**,

v. 8, n. 12, 2022.

HUANG, Y.; WANG, S.; GUO, Q.; KESSEL, S.; RUBINOFF, I.; CHAN, L. L. Y.; LI, P.; LIU, Y.; QIU, J.; ZHOU, C. Optical Coherence Tomography Detects Necrotic Regions and Volumetrically Quantifies Multicellular Tumor Spheroids. *Cancer Research*, v. 77, n. 21, p. 6011-6020, 2017.

IGLEWICZ, B.; HOAGLIN, D. C. *The ASQC Basic References in Quality Control: Statistical Techniques*. E. F., Mykytka (Ed). How to detect and handle outliers, v. 16, 1993.

IGLEWICZ, B.; HOAGLIN, D. C. *Detection of Outliers. Engineering Statistical Handbook*. 1.3.5.17. Database Systems Group, 2010.

ILINA, O.; GRITSENKO, P. G.; SYGA, S.; LIPPOLDT, J.; LA PORTA, C. A. M.; CHEPIZHKO, O.; GROSSER, S.; VULLINGS, M.; BAKKER, G-J.; STARRUß, J.; BULT, P.; ZAPPERI, S.; KÄS, J. A.; DEUTSCH, A.; FRIEDL, P. Cell-cell adhesion and 3D matrix confinement determine jamming transitions in breast cancer invasion. *Nature Cell Biology*, v. 22, p. 1103-1115, 2020.

INCA/MS/ Estimativa de Câncer no Brasil, 2020. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/numeros-de-cancer>> Acesso em 15 de novembro de 2021.

INCA/MS/ Câncer de mama, 2021. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-de-mama>> Acesso em 15 de novembro de 2021.

INKSON, B. J. 2 - Scanning electron microscopy (SEM) and transmission electron microscopy (TEM) for materials characterization. *Materials Characterization Using Nondestructive Evaluation (NDE) Methods*, p. 17-43, 2016.

INOZEMTSEVA, O. A.; GERMAN, S. V.; NAVOLOKIN, N. A.; BUCHARSKAYA, A. B.; MASLYAKOVA, G. N.; GORIN, D. A. Chapter 6 - Encapsulated Magnetite Nanoparticles: Preparation and Application as Multifunctional Tool for Drug Delivery Systems. *Nanotechnology and Biosensors*, p. 175-192, 2018.

JACKA, F. N. Chapter 8 - Global and Epidemiological Perspectives on Diet and Mood. *The Gut-Brain Axis*, p. 141-158, 2016.

JACKSON, D. A. Stopping Rules in Principal Components Analysis: A Comparison of Heuristical and Statistical Approaches. *Ecology*, v. 74, n. 8, p. 2204-2214, 1993.

JAKOB, R. Disease Classification. *International Encyclopedia of Public Health (Second Edition)*, p. 332-337, 2017.

JASP Team (2023). JASP (Version 0.17.3) [Computer software].

JAYME, C. C.; PIRES, A. F.; FERNANDES, D. S.; BI, H.; TADESCO, A. C. DNA polymer films used as drug delivery systems to early-stage diagnose and treatment of breast cancer using 3D tumor spheroids as a model. *Photodiagnosis and*

**Photodynamic Therapy**, v. 37, p. 102575, 2022.

JENKINS, B. H.; BUCKINGHAM, J. F.; HANLEY, C. J.; THOMAS, G. J. Targeting cancer-associated fibroblasts: Challenges, opportunities and future directions. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 240, 2022.

JEVTIC, P.; EDENS, L. J.; LI, X.; NGUYEN, T.; CHEN, P.; LEVY, D. L. Concentration-dependent Effects of Nuclear Lamins on Nuclear Size in Xenopus and Mammalian Cells. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 290, n. 46, p. 27557-27571, 2015.

JIAO, Y.; CAO, F.; LIU, H. Radiation-induced Cell Death and Its Mechanisms. **Health Physics**, v. 123, n. 5, p. 376-386, 2022.

JOHNSON, A. A.; CUELLAR, T. L. Glycine and aging: Evidence and mechanisms. **Ageing Research Reviews**, v. 87, 2023.

JUAREZ-MORENO, K.; CHÁVEZ-GARCÍA, D.; HIRATA, G.; VAZQUEZ-DUHALT, R. Monolayer (2D) or spheroids (3D) cell cultures for nanotoxicological studies? Comparison of cytotoxicity and cell internalization of nanoparticles. **Toxicology in Vitro**, v. 85, 2022.

JUBELIN, C.; MUNOZ-GARCIA, J.; GRISCOM, L.; COCHONNEAU, D.; OLLIVIER, E.; HEYMANN, M-F.; VALLETE, F. M.; OLIVER, L.; HEYMANN, D. Three-dimensional in vitro culture models in oncology research. **Cell & Bioscience**, v. 12, 2022.

KAISER, H. F. The Application of Electronic Computers to Factor Analysis. **Educational and Psychological Measurement**, v. 20, n. 1, p. 141-151, 1960.

KAPALCZYNSKA, M.; KOLENDA, T.; PRZYBYLA, W.; ZAJACZKOWSKA, M.; TERESIAK, A.; FILIAS, V.; IBBS, M.; BLIZNIAK, R.; LUCZEWSKI, L.; LAMPERSKA, K. 2D and 3D cell cultures – a comparison of different types of cancer cell cultures. **Archives of Medical Science**, v. 14, n. 4, p. 910-919, 2018.

KASHYAP, Y.; SHUKLA, S.; SHUKLA, M.; ROY, T.; SINGH, P. Characterization of instrumental PSF in neutron imaging experiments using logarithmic power spectral plot method. **NDT & E International**, v. 139, 2023.

KAUR, I. P.; SINGH, J.; GOEL, S.; JAIN, S.; SINGH, A.; PANDIT, C.; ALLURI, P.; SONI, U.; BARNWAL, R. P.; BHATIA, A.; SINGH, G. Chapter 7 - Nanotechnology based docetaxel: upcoming avenue for breast cancer management. **Unraveling the Complexities of Metastasis**, p. 105-124, 2022.

KAVARTHAPU, R.; ANBAZHAGAN, R.; DUFAU, M. L. Crosstalk between PRLR and EGFR/HER2 Signaling Pathways in Breast Cancer. **Cancers**, v. 13, n. 18, 2021.

KETTELER, R.; KRISTON-VIZI, J. High-Content Screening in Cell Biology. **Encyclopedia of Cell Biology (Second Edition)**, v. 6, p. 472-483, 2023.

KISHI, S. Impact of swept source optical coherence tomography on ophthalmology. *Taiwan Journal of Ophthalmology*, v. 6, n. 2, p. 58-68, 2016.

KHAN, H. N.; IMRAN, M.; SANAUULLAH, I.; KHAN, I. U.; SABRI, A. N.; NASEEM, S.; RIAZ, S. In vivo biodistribution, antioxidant and hemolysis tendency of superparamagnetic iron oxide nanoparticles – Potential anticancer agents. *Arabian Journal of Chemistry*, v. 16, n. 4, 2023.

KHANNA, S.; CHAUHAN, A.; BHATT, A. N.; DWARAKANATH, B. S. R. Chapter 13 - Multicellular tumor spheroids as in vitro models for studying tumor responses to anticancer therapies. *Animal Biotechnology (Second Edition)*, p. 251-268, 2020.

KHATIWADA, B.; RAJBHANDARI, B.; MISTRY, S. K.; PARSEKAR, S.; YADAV, U. N. Prevalence of and factors associated with health literacy among people with Noncommunicable diseases (NCDs) in South Asian countries: A systematic review. *Clinical Epidemiology and Global Health*, v. 18, 2022.

KLEIN, O. J.; JUNG, Y. K.; EVANS, C. L. Longitudinal, quantitative monitoring of therapeutic response in 3D in vitro tumor models with OCT for high-content therapeutic screening. *Methods*, v. 66, n. 2, p. 299-311, 2014.

KOHN-LUQUE, A.; MYKLEBUST, E. M.; TADELE, D. S.; GILIBERTO, M.; SCHMIESTES, L.; NOORY, J.; HARIVEL, E.; ARSENTEVA, P.; MUMENTHALER, S. M.; SCHJESVOLD, F.; TASKÉN, K.; ENSERINK, J. M.; LEDER, K.; FRIGESSI, A.; FOO, J. Phenotypic deconvolution in heterogeneous cancer cell populations using drug-screening data. *Cell Reports Methods*, v. 3, n. 3, 2023.

KOLA-MUSTAPHA, A. T. Chapter 10 - Microscopy of Nanomaterial for Drug Delivery. *Characterization and Biology of Nanomaterials for Drug Delivery*, p. 265-280, 2019.

KOLMOGOROV, A. N. *Sulla Determinazione Empirica di una Legge di Distribuzione*, Giornale dell'Istituto Italiano degli Attuari, vol. 4, p. 83-91, 1933.

KOSTYUKHIN, E. M.; KUSTOV, L. M. Microwave-assisted synthesis of magnetite nanoparticles possessing superior magnetic properties. *Mendeleev Communications*, v. 28, n. 5, p. 559-561, 2018.

KUETE, V.; KARAOSMANOGLU, O.; SIVAS, H. Chapter 10 - Anticancer Activities of African Medicinal Spices and Vegetables. *Medicinal Spices and Vegetables from Africa*, p. 271-297, 2017.

KUNDU, B.; REIS, R. L.; KUNDU, S. C. Chapter 9 - Metastasis in three-dimensional biomaterials. *Biomaterials for 3D Tumor Modeling*, p. 191-216, 2020.

KWON, H-K.; LEE, J-H.; SHIN, H-J.; KIM, J-H.; CHOI, S. Structural and functional analysis of cell adhesion and nuclear envelope nano-topography in cell death. *Scientific Reports*, v. 5, n. 15623, 2015.

LAMICHHANE, N.; SHARIFABAD, M. E.; HODGSON, B.; MERCER, T.; SEN, T.



Chapter 13 - Superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs) as therapeutic and diagnostic agents. **Nanoparticle Therapeutics**, p. 455-497, 2022.

LANGHANS, S. A. Three-dimensional in vitro cell culture models in drug discovery and drug repositioning. **Frontiers in Pharmacology**, v. 9, 2018.

LAPAN, P.; ZHANG, J.; PAN, J.; HILL, A.; HANEY, S. A. Single cell cytometry of protein function in RNAi treated cells and in native populations. **BMC Cell Biology**, v. 9, 2008.

LAZZARI, G.; NICOLAS, V.; MATSUSAKI, M.; AKASHI, M.; COUVREUR, P.; MURA, S. Multicellular spheroid based on a triple co-culture: A novel 3D model to mimic pancreatic tumor complexity. **Acta Biomaterialia**, v. 78, p. 296-307, 2018.

LEBEAUPIN, T.; SMITH, R.; HUET, S. 9 - The Multiple Effects of Molecular Crowding in the Cell Nucleus: From Molecular Dynamics to the Regulation of Nuclear Architecture. **Nuclear Architecture and Dynamics**, p.209-232, 2018.

LEE, S. Y.; KOO, I. S.; HWANG, H. J.; LEE, D. W. In Vitro three-dimensional (3D) cell culture tools for spheroid and organoid models. **SLAS Discovery**, 2023.

LEVENTAL, K. R.; YU, H.; KASS, L.; LAKINS, J. N.; EGEBLAD, M.; ERLER, J. T.; FONG, S. F. T.; CSISZAR, K.; GIACCIA, A.; WENINGER, W.; YAMAUCHI, M.; GASSER, D. L.; MEAVER, V. M. Matrix crosslinking forces tumor progression by enhancing integrin signaling. **CELL.**, v. 139, n. 5, p. 891-906, 2009.

LI, H.; DENG, Z.; ORABY, E.; EKSTEEN, J. Amino acids as lixivants for metals extraction from natural and secondary resources with emphasis on glycine: A literature review. **Hydrometallurgy**, v. 216, 2023.

LI, N. T.; CO, I. L.; LANDON-BRACE, N.; LATOUR, S.; MCGUIGAN, A. P. Chapter 19 - Tissue-engineered 3D cancer microenvironment for screening therapeutics. **Biomaterials for 3D Tumor Modeling**, p. 453-479, 2020.

LI, Y.-N.; WELLSTEIN, A. Chapter 5 - Cell migration. **Cell Movement in Health and Disease**, p. 67-82, 2022.

LIBERMAN, J. Building a law and NCDs workforce: A necessity for global cancer and NCD prevention and control. **Journal of Cancer Policy**, v. 12, p. 72-74, 2017.

LIM, C. S.; KIM, E. S.; KIM, J. Y.; HONG, S. T.; CHUN, H. J.; KANG, D. E.; CHO, B. R. Measurement of the Nucleus Area and Nucleus/Cytoplasm and Mitochondria/Nucleus Ratios in Human Colon Tissues by Dual-Colour Two-Photon Microscopy Imaging. **Scientific Reports**, v. 5, n. 18521, 2015.

LIU, X.; RAJU, P. 5.42 - In Vitro Cancer Model for Drug Testing. **Comprehensive Biotechnology (Second Edition)**, v. 5, p. 543-549, 2011.

LOVITT, R. W.; WRIGHT, C. J. MICROSCOPY | Light Microscopy. **Encyclopedia of Food Microbiology (Second Edition)**, p. 684-692, 2014.

LU, W.; SCHNEIDER, M.; NEUMANN, S.; JAEGER, V. M.; TARANUM, S.; MUNCK, M.; CARTWRIGHT, S.; RICHARDSON, C.; CARTHEW, J.; NOH, K.; GOLDBERG, M.; NOEGEL, A. A.; KARAKESISOGLOU, I. Nesprin interchain associations control nuclear size. *Cellular and Molecular Life Sciences*, v. 69, n. 20, p. 3493-3509, 2012.

LUCY, L. B. An iterative technique for the rectification of observed distributions. *Astronomical Journal*, v. 79, p. 745, 1974.

LUO, H-B.; DU, M-Y.; LIU, Y-Y.; WANG, M.; QING, H-M.; WEN, Z-P.; XU, G-H.; ZHOU, P.; REN, J. Differentiation between Luminal A and B Molecular Subtypes of Breast Cancer Using Pharmacokinetic Quantitative Parameters with Histogram and Texture Features on Preoperative Dynamic Contrast-Enhanced Magnetic Resonance Imaging. *Academic Radiology*, v. 27, n. 3, p. 35-44, 2020.

LYTVYN, S.; VAZHNIChAYA, E.; KURAPOV, Y.; SEMAKA, O.; BABIChUCK, L.; ZUBOV, P. Cytotoxicity of magnetite nanoparticles deposited in sodium chloride matrix and their functionalized analogues in erythrocytes. *OpenNano*, v. 11, 2023.

MAGIDSON, V.; KHODJAKOV, A. Chapter 23 - Circumventing Photodamage in Live-Cell Microscopy. *Methods in Cell Biology*, v. 114, p. 545-560, 2013.

MALATESTA, M. Transmission Electron Microscopy as a Powerful Tool to Investigate the Interaction of Nanoparticles with Subcellular Structures. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 22, n. 23, 2021.

MALICH, G.; MARKOVIC, B.; WINDER, C. The sensitivity and specificity of the MTS tetrazolium assay for detecting the in vitro cytotoxicity of 20 chemicals using human cell lines. *Toxicology*, v. 124, p. 179-192, 1997.

MALO, N.; HANLEY, J. A.; CERQUOZZI, S.; PELLETIER, J.; NADON, R. Statistical practice in high-throughput screening data analysis. *Nature Biotechnology*, v. 24, p. 167-175, 2006.

MANFIOLLI, A. O.; AMARAL, R.; CALIARI-OLIVEIRA, C. Chapter 10 - Stem cells, organoids, and cellular therapy. *Nanotechnology and Regenerative Medicine*, p. 233-263, 2023.

MAO, X.; XU, J.; WANG, W.; LIANG, C.; HUA, J.; LIU, J.; ZHANG, B.; MENG, Q.; YU, X.; SHI, S. Crosstalk between cancer-associated fibroblasts and immune cells in the tumor microenvironment: new findings and future perspectives. *Molecular Cancer*, 2021.

MARCOM, P. K. Chapter 10 - Breast Cancer. *Genomic and Precision Medicine (Third Edition)*, p. 181-194, 2017.

MARGHUSSIAN, V. 4 - Magnetic Properties of Nano-Glass Ceramics. *Nano-Glass Ceramics*. p. 181-223, 2015.

MARRESE, M.; ANTONOVAITE, N.; NELEMANS, B. K. A.; SMIT, T. H.; IANNUZZI,

D. Micro-indentation and optical coherence tomography for the mechanical characterization of embryos: Experimental setup and measurements on chicken embryos. *Acta Biomaterialia*, v. 97, p. 524-534, 2019.

MAYEEN, A.; SHAJI, L. K.; NAIR, A. K.; KALARIKKAL, N. Chapter 12 - Morphological Characterization of Nanomaterials. *Characterization of Nanomaterials*, p. 335-364, 2018.

MAZIO, C.; CASELE, C.; IMPARATO, G.; URCIUOLO, F.; NETTI, P. A. Recapitulating spatiotemporal tumor heterogeneity in vitro through engineered breast cancer microtissues. *Acta Biomaterialia*, v. 73, p. 236-249, 2018.

MCKEON, G.; PAPADOPOULOS, E.; FIRTH, J.; JOSHI, R.; TEASDALE, S.; NEWBYU, J.; ROSENBAUM, S. Social media interventions targeting exercise and diet behaviours in people with noncommunicable diseases (NCDs): A systematic review. *Internet Interventions*, v. 27, 2022.

MERCHANT, F. A.; DIASPRO, A. Chapter Eleven - Three-Dimensional Imaging. *Microscope Image Processing (Second Edition)*, p. 247-317, 2023.

MERENICH, D.; MANEN-BRUSH, K. E. V.; JANETOPOULOS, C.; MYERS, K. A. Chapter 18 - Advanced microscopy techniques for the visualization and analysis of cell behaviors. *Cell Movement in Health and Disease*, p. 303-321, 2022.

MERUGU, R.; GOTHALWAL, R. Microscopic techniques for characterisation of nanomaterials: A minireview. *Materials today: Proceedings*, v. 47, p. 4753-4757, 2021.

MIERKE, C. T. Physical and biological advances in endothelial cell-based engineered co-culture model systems☆. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, v. 147, p. 58-69, 2023.

MILLER, S.; MOSS, W.; MUNK, B.; MUNK, S.; HART, C.; SPELLMEYER, D. Chapter 12 - Drug discovery processes: When and where the rubber meets the road. *Managing the Drug Discovery Process (Second Edition)*, p. 339-415, 2023.

MIRKOVIC, M.; MILANOVIC, Z.; PERIC, M.; VRANJES-DURIC, S.; OGNJANOVIC, M.; ANTIC, B.; KURAICA, M.; KRSTIC, I.; KUBOVCIKOVA, M.; ANTAL, I.; SOBOTOVA, R.; ZAVISOVA, V.; JURIKOVA, A.; FABIAN, M.; KONERACKA, M. Design and preparation of proline, tryptophan and poly-l-lysine functionalized magnetic nanoparticles and their radiolabeling with <sup>131</sup>I and <sup>177</sup>Lu for potential theranostic use. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 628, 2022.

MLODZIANOSKI, M. J.; VALLES, M. M.; HESS, S. T. Super Resolution Fluorescence Localization Microscopy. *Encyclopedia of Cell Biology (Second Edition)*, v. 2, p. 86-92, 2023.

MONGERA, A.; ROWGHANIAN, P.; GUSTAFSON, H. J.; SHELTON, E.; KEALHOFER, D. A.; CARN, E. K.; SERWANE, F.; LUCIO, A. A.; GIAMMONA, J.; CAMPÁS, O. A fluid-to-solid jamming transition underlies vertebrate body axis

elongation. *Nature*, v. 561, p. 401-405, 2018.

MONTEIRO, N. O.; FANGUEIRO, J. F.; REIS, R. L.; NEVES, N. M. Replication of natural surface topographies to generate advanced cell culture substrates. *Bioactive Materials*, v. 28, p. 337-347, 2023.

MORANDI-MEHR, S.; KHADEMY, M.; AKBARI-BIRGANI, S.; KAFIAN, H.; LALENEJAD, M.; ABDOLLAHPOUR, D.; MOGHIMI, M. Comparative evaluation of the therapeutic strategies using a minimal model of luminal-A breast cancer. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 666, p. 107-114, 2023.

MORGA, M.; ADAMCZYK, Z.; KOSIOR, D.; KUJDA-KRUK, M. Kinetics of Poly-L-lysine Adsorption on Mica and Stability of Formed Monolayers: Theoretical and Experimental Studies. *Langmuir*, v. 35, p. 12042-12052, 2019.

MORTENSEN, A. C. J.; MORIN, E.; BROWN, C. J.; LANE, D. P.; NESTOR, M. Enhancing the therapeutic effects of in vitro targeted radionuclide therapy of 3D multicellular tumor spheroids using the novel stapled MDM2/X-p53 antagonist PM2. *EJNMMI Research volume*, v. 10, n. 38, 2020.

MPINDI, J-P.; SWAPNIL, P.; DMITRII, B.; JANI, S.; SAEED, K.; WENNERBERG, K.; AITTOKALLIO, T.; ÖSTLING, P.; KALLIONIEMI, O. Impact of normalization methods on high-throughput screening data with high hit rates and drug testing with dose-response data. *Bioinformatics*, v. 31, n. 23, p. 3815-3821, 2015.

MUKHERJEE, P.; MIYAZAWA, A.; FUKUDA, S.; YAMASHITA, T.; LUKMANTO, D.; OKADA, K.; EI-SADEL, I. A.; ZHU, L.; MAKITA, S.; OSHIKA, T.; YASUNO, Y. Label-free functional and structural imaging of liver microvascular complex in mice by Jones matrix optical coherence tomography. *Scientific Reports*, v. 11, n. 20054, 2021.

MUKHORTOVA, Y. R.; PRYADKO, A.; CHERNOZEM, R. V.; PARIY, I. O.; AKOULINA, E. A.; DEMIANOVA, I. V.; ZHARKOVA, I. I.; IVANOV, Y. F.; WAGNER, D. V.; BONARTSEV, A. P.; SURMENEV, R. A.; SURMENEVA, M. A. Fabrication and characterization of a magnetic biocomposite of magnetite nanoparticles and reduced graphene oxide for biomedical applications. *Nano-Structures & Nano-Objects*, v. 29, 2022.

MULENS-ARIAS, V.; ROJAS, J. M.; BARBER, D. F. The intrinsic biological identities of iron oxide nanoparticles and their coatings: unexplored territory for combinatorial therapies. *Nanomaterials (Basel)*, v. 10, n. 5, p. 837, 2020.

MURTHY, S.; EFFIONG, P.; FEI, C. C. 11 - Metal oxide nanoparticles in biomedical applications. *Metal Oxide Powder Technologies*, p. 233-251, 2020.

NADAR, S. S.; PATIL, S. P.; KELKAR, R. K.; PATIL, N. P.; PISE, P. V.; TIWARI, M. S.; PHIRKE, A. N.; PATIL, P. D. Chapter 7 - Nanobiomaterials for bioimaging. *Nanotechnology in Medicine and Biology*, p. 189-234, 2022.



NASROLLAHZADEH, M.; ATAROD, M.; SAJJADI, M.; SAJADI, S. M.; ASSAABADI, Z. Chapter 6 - Plant-Mediated Green Synthesis of Nanostructures: Mechanisms, Characterization, and Applications. *Interface Science and Technology*, v. 28, p. 199-322, 2019.

NAZLAMOVA, L.; THOMAS, N. S.; CHEUNG, M. K.; LEGERBEKE, J.; LORD, J.; PENGELLY, R. J.; TAPPER, W. J.; WHEWAY, G. A CRISPR and high-content imaging assay compliant with ACMG/AMP guidelines for clinical variant interpretation in ciliopathies. *Human Genetics*, v. 140, p. 593-607, 2021.

NICULESCU, A-G.; CHIRCOV, C.; GRUMEZESCU, A. M. Magnetite nanoparticles: Synthesis methods – A comparative review. *Methods*, v. 199, p. 16-27, 2022.

NKURIKIYIMFURA, I.; WANG, Y.; SAFARI, B.; NSHINGABIGWI, E. Temperature-dependent magnetic properties of magnetite nanoparticles synthesized via coprecipitation method. *Journal of Alloys and Compounds*, v. 846, 2020.

NILES, A. L.; KUPCHO, K. R.; RISS, T. L.; LAZAR, D. F.; CALI, J. J. Abstract 710: Real-time apoptosis and necrosis detection in 3D spheroid cellmodels. *Cancer Research*, v. 79, n. 13, 2019.

NÚÑEZ, R.; SANCHO-MARTÍNEZ, S. M.; NOVOA, J. M. L.; LÓPEZ-HERNÁNDEZ, F. J. Apoptotic volume decrease as a geometric determinant for cell dismantling into apoptotic bodies. *Cell Death & Differentiation volume*, v. 17, p. 1665-1671, 2010.

ORRANTIA-BORUNDA, E.; ACHONDO-NUÑEZ, P.; ACUÑA-AGUILAR, L. E.; GÓMEZ-VALLES, F. O.; RAMÍREZ-VALDESPINO, C. A. Chapter 3 Subtypes of Breast Cancer. *BREAST CANCER*, 2022.

PAMPALONI, F.; REYNAUD, E. G.; STELZER, E. H. K. The third dimension bridges the gap between cell culture and live tissue. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, v. 8, p. 839-845, 2007.

PAHO. Pan American Health Organization. *Noncommunicable Diseases*, 2023. Disponível em: <<https://www.paho.org/en/topics/noncommunicable-diseases>> Acesso em 27 de maio de 2023.

PAPA, F.; BORRI, A.; PALUMBO, P. Tumour growth control: analysis of alternative approaches. *Journal of Theoretical Biology*, v. 562, 2023.

PARSONS, R. Chapter 2 - The Oncogenetic Basis of Breast Cancer. *Breast Cancer (Second Edition)*, p. 15-26, 2005.

PASZEK, M. J.; ZAHIR, N.; JOHNSON, K. R.; LAKINS, J. N.; ROZENBERG, G. I.; GEFEN, A.; REINHART-KING, C. A.; MARGULIES, S. S.; DEMBO, M.; BOETTIGER, D.; HAMMER, D. A.; WEAVER, V. M. Tensional homeostasis and the malignant phenotype. *Cancer Cell*, v.8, n. 3, p. 241-254, 2005.

PATEL, T.; SKORUPA, M.; SKONIECZNA, M.; TURCZYN, R.; KRUKIEWICZ, K. Surface grafting of poly-L-lysine via diazonium chemistry to enhance cell adhesion to

biomedical electrodes. *Bioelectrochemistry*, v. 152, 2023.

PATTERSON, N.; PRICE, A. L.; REICH, D. Population Structure and Eigenanalysis. *Plos Genetics*, v. 2, n. 12, 2006.

PAWLIZAK, S.; FRITSCH, A. W.; GROSSER, S.; AHRENS, D.; THALHEIM, T.; RIEDEL, S.; KIEßLING, T. R.; OSWALD, L.; ZINK, M.; MANNING, M. L. Testing the differential adhesion hypothesis across the epithelial-mesenchymal transition. *New Journal of Physics*, v.17, 2015.

PEARSON, Y. E.; KREMB, S.; BUTTERFOSS, G. L.; XIE, X.; FAHS, H.; GUNSALUS, K. C. A statistical framework for high-content phenotypic profiling using cellular feature distributions. *Communications Biology*, v. 5, n. 1409, 2022.

PIRNIA, F.; SCHNEIDER, E.; BETTICHER, D. C.; BORNER, M. M. Mitomycin C induces apoptosis and caspase-8 and -9 processing through a caspase-3 and Fas-independent pathway. *Cell Death & Differentiation volume*, v. 9, p. 905-914, 2002.

POZZI, S.; SCOMPARIN, A.; DANGOOR, S. I.; AJAMIL, D. R.; OFEK, P.; NEUFELD, L.; KRIVITSKY, A.; VASKOVICH-KOUBI, D.; KLEINER, R.; DEY, P.; KOSHVSKI-MICHAEL, S.; REISMAN, N.; SATCHI-FAINARO, R. Meet me halfway: Are in vitro 3D cancer models on the way to replace in vivo models for nanomedicine development?. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 175, 2021.

PU, H.; WEN, X.; LUO, D.; GUO, Z. Regulation of progesterone receptor expression in endometriosis, endometrial cancer, and breast cancer by estrogen, polymorphisms, transcription factors, epigenetic alterations, and ubiquitin-proteasome system☆. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, v. 227, 2023.

QU, H.; MA, H.; ZHOU, W.; O'CONNOR, C. J. In situ surface functionalization of magnetic nanoparticles with hydrophilic natural amino acids. *Inorganica Chimica Acta*, v. 389, p. 60-65, 2012.

RAGHAVENDRA RAO, N. Chapter 3 - Designing a conceptual model in the artificial intelligence environment for the health care sector. *Novel AI and Data Science Advancements for Sustainability in the Era of COVID-19*, p. 67-87, 2022.

RAY, R. S.; RANA, B.; SWAMI, B.; VENU, V.; CHATTERJEE, M. Vanadium mediated apoptosis and cell cycle arrest in MCF7 cell line. *Chemico-Biological Interactions*, v. 163, n. 3, p. 239-247, 2006.

RICHARDSON, W. H. Bayesian-Based Iterative Method of Image Restoration. *Journal of the Optical Society of America*, v. 62, n. 1, p. 55-59, 1972.

RODRIGUEZ, A. F. R.; DOS SANTOS, C. C.; LUDTKE-BUZUG, K.; BAKENECKER, A. C.; CHAVES, Y. O.; MARIÚBA, L. A. M.; BRANDT, J. V.; AMANTEA, B. E.; DE SANTANA, R. C.; MARQUES, R. F. C.; JAFELICCI, M.; MOPRALES, M. A.

Evaluation of antiplasmodial activity and cytotoxicity assays of amino acids functionalized magnetite nanoparticles: Hyperthermia and flow cytometry applications. *Materials Science and Engineering: C*, v. 125, 2021.

RODRIGUES-FERREIRA, S.; NAHMIAS, C. Predictive biomarkers for personalized medicine in breast cancer. *Cancer Letters*, v. 545, 2022.

ROJAS-CALDERÓN, E. L.; ÁVILA, O.; FERRO-FLORES, G. Monte Carlo calculations of the cellular S-values for  $\alpha$ -particle-emitting radionuclides incorporated into the nuclei of cancer cells of the MDA-MB231, MCF7 and PC3 lines. *Applied Radiation and Isotopes*, v. 135, p. 1-6, 2018.

ROVETTA, A. Raiders of the Lost Correlation: A Guide on Using Pearson and Spearman Coefficients to Detect Hidden Correlations in Medical Sciences. *Cureus*, v. 12, n. 11, 2020.

ROY, M.; FOWLER, A. M.; ULANER, G. A.; MAHAJAN, A. Molecular Classification of Breast Cancer. *PET Clinics*, 2023.

RUSSEL, W. M. S.; BURCH, R. L. *The principles of humane experimental technique*. Wheathampstead (UK): Universities Federation for Animal Welfare, 1959.

SADLONOVA, A.; NOVAK, Z.; JOHNSON, M. R.; BOWE, D. B.; GAULT, S. R.; PAGE, G. P.; THOTTASSERY, J. V.; WELCH, D. R.; FROST, A. R. Breast fibroblasts modulate epithelial cell proliferation in three-dimensional in vitro co-culture. *Breast Cancer Research*, 2004.

SAGE, D.; DONATI, L.; SOULEZ, F.; FORTUN, D.; SCHMIT, G.; SEITZ, A.; GUIET, R.; VONESCH, C.; UNSER, M. DeconvolutionLab2: An open-source software for deconvolution microscopy. *Methods*, v. 115, p. 28-41, 2017.

SALMENPERÄ, P.; KARHEMO, P.-R.; RÄSÄNEN, K.; LAAKKONEN, P.; VAHERI, A. Fibroblast spheroids as a model to study sustained fibroblast quiescence and their crosstalk with tumor cells. *Experimental Cell Research*, v. 345, n. 1, p. 17-24, 2016.

SARASWATHIBHATLA, A.; NOTBOHM, J. Traction and Stress Fibers Control Cell Shape and Rearrangements in Collective Cell Migration. *Physical Review X*, v. 10, n. 1, 2020.

SARKAR, S.; HORN, G.; MOULTON, K.; OZA, A.; BYLER, S.; KOKOLUS, S.; LONGACRE, M. Cancer development, progression, and therapy: an epigenetic overview. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 14, p. 21087-21113, 2013.

SCHMID, B.; SCHINDELIN, J.; CARDONA, A.; LONGAIR, M.; HEISENBERG, M. A high-level 3D visualization API for Java and ImageJ. *BMC Bioinformatics*, v. 11, n. 274, 2010.

SEABRA, A. B.; PELEGRINO, M. T.; HADDAD, P. S. Chapter 24 - Antimicrobial Applications of Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles: Perspectives and

Challenges. *Nanostructures for Antimicrobial Therapy*, p. 531-550, 2017.

SELVARAJ, R.; PAI, S.; VINAYAGAM, R.; VARADAVENKATESAN, T.; KUMAR, P. S.; DUC, P. A.; RANGASAMY, G. A recent update on green synthesized iron and iron oxide nanoparticles for environmental applications. *Chemosphere*, v. 308, 2022.

SIA, J.; SZMYD, R.; HAU, E.; GEE, H. E. Molecular Mechanisms of Radiation-Induced Cancer Cell Death: A Primer. *Front Cell Dev Biol*, 2020.

SILVA, R.; OLIVEIRA, D.; SANTOS, D. P.; SANTOS, L. F. D.; WILSON, R. E.; BEDO, M. Criteria for choosing the number of dimensions in a principal component analysis: An empirical assessment. **2020: ANAIS DO XXXV SIMPÓSIO BRASILEIRO DE BANCOS DE DADOS**, Evento Online, Porto Alegre: Sociedade Brasileira de Computação, p. 145-150, 2020.

SISAN, D. R.; HALTER, M.; HUBBARD, J. B.; PLANT, A. L. Predicting rates of cell state change caused by stochastic fluctuations using a data-driven landscape model. *PNAS*, v. 109, n. 47, p. 19262-19267, 2012.

SHIN, C.; RYU, H.; CHO, E-S.; HAN, S.; LEE, K-H.; KIM, C-H.; YOON, Y-G. Three-dimensional fluorescence microscopy through virtual refocusing using a recursive light propagation network. *Medical Image Analysis*, v. 82, 2022.

SHIRWAIKER, R. A.; PURSER, M. F.; WYSK, R. A. 6 - Scaffolding hydrogels for rapid prototyping based tissue engineering. *Rapid Prototyping of Biomaterials. Principles and Applications*, p. 176-200, 2014.

SHITSU, I. G.; KATIBI, K. K.; TAURA, L. S.; MUHAMMAD, A.; CHIROMAWA, I. M.; ADAMU, S. B.; IYA, S. G. D. X-ray diffraction (XRD) profile analysis and optical properties of Klockmannite copper selenide nanoparticles synthesized via microwave assisted technique. *Ceramics International*, v. 49, n. 8, p. 12309-12326, 2023.

SHYAM, R.; REDDY, L. V. K.; PALANIAPPAN, A. Fabrication and Characterization Techniques of In Vitro 3D Tissue Models. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 24, n. 3, 2023.

SMIRNOV, N. Table for Estimating the Goodness of Fit of Empirical Distributions. *The Annals of Mathematical Statistics*, v. 19, n. 2, p. 279-281, 1948

SNIJDER, B.; PELKMANS, L. Origins of regulated cell-to-cell variability. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, v. 12, p. 119-125, 2011.

STORME, G. A.; MAREEL, M. M.; DRAGONETTI, C. H. Recovery from growth inhibition in irradiated M04 spheroids: Suspension cultures versus explanted cultures. *Cell Biology International Reports*, v. 7, n. 2, p. 99-107, 1983.

SUBRAMANIAM, V.; RAVI, P. V.; PICHUMANI, M. Structure co-ordination of solitary amino acids as ligands in metal-organic frameworks (MOFs): A comprehensive review. *Journal of Molecular Structure*, v. 1251, 2022.



SUNG, H.; FERLAY, J.; SIEGEL, R. L.; LAVERSANNE, M.; SOERJOMATARAM, I.; JEMAL, A.; BRAY, F. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 71, n. 3, p. 209-249, 2021.

TABÁR, L.; DEAN, P. B.; TUCKER, F. L.; YEN, A. M-F.; FANN, J. C-Y.; LIN, A. T-Y.; SMITH, R. A.; DUFFY, S. W.; CHEN, T. H-H. Breast cancers originating from the terminal ductal lobular units: In situ and invasive acinar adenocarcinoma of the breast, AAB. **European Journal of Radiology**, v. 152, 2022.

TANNENBAUM, J.; BENNETT, B. T. Russell and Burch's 3Rs Then and Now: The Need for Clarity in Definition and Purpose. **Journal of the American Association for Laboratory Animal Science : JAALAS**, v. 54, n. 2, p. 120-132, 2015.

TEVIS, K. M.; CECCHI, R. J.; COLSON, Y. L.; GRINSTAFF, M. W. Mimicking the tumor microenvironment to regulate macrophage phenotype and assessing chemotherapeutic efficacy in embedded cancer cell/macrophage spheroid models. **Acta Biomaterialia**, v. 50, p. 271-279, 2017.

THANKUR, G; BOK, E. Y.; KIM, S. B.; JO, C. H.; OH, S. J.; BAEK, J. C.; PARK, J. E.; KANG, Y. H.; LEE, S. L.; KUMAR, R.; RHO, G. J. Scaffold-free 3D culturing enhance pluripotency, immunomodulatory factors, and differentiation potential of Wharton's jelly-mesenchymal stem cells. **European Journal of Cell Biology**, v. 101, n. 3, 2022.

THORLABS. **Vega™ Series SS-OCT Systems**. Imageamento OCT. Disponível em: [https://www.thorlabs.com/newgrouppage9.cfm?objectgroup\\_id=9533#12531](https://www.thorlabs.com/newgrouppage9.cfm?objectgroup_id=9533#12531). Acesso em 16 de junho de 2023.

TIWARI, A. K.; YADAV, P. K.; MISHRA, K.; SINGH, P. K.; CHOURASIA, M. K. Chapter 10 - Magnetic nanoparticles: challenges and practical considerations. **Multifunctional Nanocarriers**, p. 235-257, 2022.

TULCHINSKY, T. H.; VARAVIKOVA, E. A.; COHEN, M. J. Chapter 5 - Noncommunicable diseases and conditions. **The New Public Health (Fourth Edition)**, p. 367-466, 2023a.

TULCHINSKY, T. H.; VARAVIKOVA, E. A.; COHEN, M. J. Chapter 13 - National health systems. **The New Public Health (Fourth Edition)**, p. 875-986, 2023b.

UPADHYAY, A. Cancer: An unknown territory; rethinking before going ahead. **Genes & Diseases**, v. 8, n. 5, p. 655-661, 2021.

VAN DE WALLE, A.; WILHELM, C.; LUCIANI, N. 3D Magnetic Stem Cell Aggregation and Bioreactor Maturation for Cartilage Regeneration. **Journal of Visualized Experiments**, v. 122, 2017.

VAZHNIKHAYA, E.; LYTVYN, S.; KURAPOV, Y.; SEMAKA, O.; LUTSENKO, R.; CHUNIKHIN, A. The influence of pure (ligandless) magnetite nanoparticles functionalization on blood gases and electrolytes in acute blood loss. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 50, 2023.

VIEIRA, V. M. N. C. S. Permutation tests to estimate significances on Principal Components Analysis. *Computational Ecology and Software*, v. 2, n. 2, p. 103-123, 2012.

VINCENT, J.; PRESTON, M.; MOUCHET, E.; LAUGIER, N.; CORRIGAN, A.; BOULANGER, J.; BROWN, D. G.; CLARK, R.; WIGGLESWORTH, M.; CARTER, A. P.; BULLOCK, S. L. A High-Throughput Cellular Screening Assay for Small-Molecule Inhibitors and Activators of Cytoplasmic Dynein-1-Based Cargo Transport. *SLAS Discovery*, v. 25, n. 9, p. 985-999, 2020.

VIOTA, J. L.; ARROYO, F. J.; DELGADO, A. V.; HORNO, J. Electrokinetic characterization of magnetite nanoparticles functionalized with amino acids. *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 344, n. 1, p. 144-149, 2010.

WANG, S.; LARINA, I. V. 8 - High-resolution imaging techniques in tissue engineering. *Monitoring and Evaluation of Biomaterials and their Performance In Vivo*, p. 151-180, 2017.

WEIERGRABER, O. H.; SCHWARTEN, M.; STRODEL, B.; WILLBOLD, D. Chapter Eight - Investigating Structure and Dynamics of Atg8 Family Proteins. *Methods in Enzymology*, v. 587, p. 115-142, 2017.

WHITFORD, M. K. M.; MCCAFFREY, L. Chapter Nine - Polarity in breast development and cancer. *Current Topics in Developmental Biology*, v. 154, p. 245-283, 2023.

WHO. World Health Organization. *Noncommunicable diseases progress monitor 2022*. pp. 233, 2022. Disponível em: <<https://www.who.int/publications/i/item/9789240047761>> Acesso em 24 de maio de 2023.

WINTER, J. C. F.; GOSLING, S. D.; POTTER, J. Comparing the Pearson and Spearman correlation coefficients across distributions and sample sizes: A tutorial using simulations and empirical data. *Psychological Methods*, v. 21, n.3, p. 273-290, 2016.

XIA, Y. Chapter Eleven - Correlation and association analyses in microbiome study integrating multiomics in health and disease. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, v. 171, p. 309-491, 2020.

XIAO, W.; GU, H.; LI, D.; CHEN, D.; DENG, X.; JIAO, Z.; LIN, J. Microwave-assisted synthesis of magnetite nanoparticles for MR blood pool contrast agents. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, v. 324, n. 4, p. 488-494, 2012.

XING, Y.; ZHANG, L.; YU, L.; SONG, A.; HU, J. pH-Responsive foams triggered by particles from amino acids with metal ions. *Journal of Molecular Liquids*, v. 367, 2022.

YAN, F.; GUNAY, G.; VALERIO, T. I.; WANG, C.; WILSON, J. A.; HADDAD, M. S.; WATSON, M.; CONNELL, M. O.; DAVIDSON, N.; FUNG, K-M.; ACAR, H.; TANG, Q.

Characterization and quantification of necrotic tissues and morphology in multicellular ovarian cancer tumor spheroids using optical coherence tomography. *Biomed. Opt. Express*, v. 12, n. 6, p. 3352-3371, 2021.

YANG, S.; WANG, L.; CHEN, Q.; XU, M. In situ process monitoring and automated multi-parameter evaluation using optical coherence tomography during extrusion-based bioprinting. *Additive Manufacturing*, v. 47, 2021.

YEW, Y. P.; SHAMELI, K.; MIYAKE, M.; KHAIRUDIN, N. B. A.; MOHAMAD, S. E.; NAIKI, T.; LEE, K. X. Green biosynthesis of superparamagnetic magnetite Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles and biomedical applications in targeted anticancer drug delivery system: A review. *Arabian Journal of Chemistry*, v. 13, n. 1, p. 2287-2308, 2020.

YIN, X.; GOUDRIAAN, J.; LANTINGA, E. A.; VOS, J.; SPIERTZ, H. J. A Flexible Sigmoid Function of Determinate Growth. *Annals of Botany*, v. 91, n. 3, p. 361-371, 2003.

ZANONI, M.; CORTESI, M.; ZAMAGNI, A.; ARIENTI, C.; PIGNATTA, S.; TESEI, A. Modeling neoplastic disease with spheroids and organoids. *Journal of Hematology & Oncology*, v. 13, n. 97, 2020.

ZHANG, W.; LI, C.; BAGULEY, B.C.; ZHOU, F.; ZHOU, W.; SHAW, J.P.; WANG, Z.; WU, Z.; LIU, J. Optimization of the formation of embedded multicellular spheroids of MCF-7 cells: How to reliably produce a biomimetic 3D model. *Analytical Biochemistry*, v. 515, p. 47-54, 2016.

ZHANG, X.; VIITALA, T.; HARJUMAKI, R.; KARTAL-HODZIC, A.; VALLE-DELGADO, J. J.; OSTERBERG, M. Effect of laminin, polylysine and cell medium components on the attachment of human hepatocellular carcinoma cells to cellulose nanofibrils analyzed by surface plasmon resonance. *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 584, p. 310-319, 2021.

ZHANG, Y.; LIN, X.; YAO, Z.; SUN, D.; LIN, X.; WANG, X.; YANG, C.; SONG, J. Deconvolution algorithms for inference of the cell-type composition of the spatial transcriptome. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, v. 21, p. 176-184, 2023.

ZHAO, H.; ZHUANG, Y.; LI, R.; LIU, Y.; MEI, Z.; HE, Z.; ZHOU, F.; ZHOU, Y. Effects of different doses of X-ray irradiation on cell apoptosis, cell cycle, DNA damage repair and glycolysis in HeLa cells. *Oncology Letters*, v. 17, n.1, 2019.

ZHOU, H.; SUZUKI, M.; GEARD, C. R.; HEI, T. K. Effects of irradiated medium with or without cells on bystander cell responses. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, v. 499, n. 2, p. 135-141, 2002.

ZHOU, Q. M.; SUN, Y.; LU, Y. Y.; ZHANG, H.; CHEN, Q. L.; SU, S. B. Curcumin reduces mitomycin C resistance in breast cancer stem cells by regulating Bcl-2 family-mediated apoptosis. *Cancer Cell International volume*, v. 17, n. 84, 2017.

ZHU, N.; JI, H.; YU, P.; NIU, J.; FAROOQ, M. U.; AKRAM, M. W.; UDEGO, I. O.; LI,

H.; NIU, X. Surface Modification of Magnetic Iron Oxide Nanoparticles. *Nanomaterials*, v. 8, n.10, p. 810, 2018.

ZIEGLER, U.; GROSCURTH, P. Morphological features of cell death. *News Physiol Sci.*, 2004



**INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES**  
**Diretoria de Pesquisa, Desenvolvimento e Ensino**  
**Av. Prof. Lineu Prestes, 2242 – Cidade Universitária CEP: 05508-000**  
**Fone/Fax(0XX11) 3133-8908**  
**SÃO PAULO – São Paulo – Brasil**  
**<http://www.ipen.br>**

**O IPEN é uma Autarquia vinculada à Secretaria de Desenvolvimento,  
associada  
à Universidade de São Paulo e gerida técnica e administrativamente pela  
Comissão Nacional de Energia Nuclear, órgão  
do Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações.**

