



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

Cultura celular tridimensional: desenvolvimento de modelo *in vitro* de adenocarcinoma de próstata para avaliação de efeito quimioterápico e radioionizante.

CAMILA SILVA BEZERRA

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do Grau de Mestre Profissional em Tecnologia das Radiações em Ciências da Saúde na Área de Concentração Radiofarmácia e Medicina Nuclear.

Orientador: Prof. Dr. Daniel Perez Vieira

São Paulo

2022

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

Cultura celular tridimensional: desenvolvimento de modelo *in vitro* de adenocarcinoma de próstata para avaliação de efeito quimioterápico e radioionizante.

CAMILA SILVA BEZERRA

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do Grau de Mestre Profissional em Tecnologia das Radiações em Ciências da Saúde na Área de Concentração Radiofarmácia e Medicina Nuclear.

Orientador: Prof. Dr. Daniel Perez Vieira

São Paulo

2022

Fonte de Financiamento: IPEN

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

Como citar: SILVA BEZERRA, C. ***Cultura celular tridimensional***: desenvolvimento de modelo in vitro de adenocarcinoma de próstata para avaliação de efeito quimioterápico e radioionizante. 2022. 45 f. Dissertação (Mestrado Profissional em Tecnologia das Radiações em Ciências da Saúde), 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).

Silva Bezerra, Camila
Cultura celular tridimensional: desenvolvimento de modelo in vitro de adenocarcinoma de próstata para avaliação de efeito quimioterápico e radioionizante / Camila Silva Bezerra; orientador Daniel Perez Vieira. -- São Paulo, 2022.
45 f.

Dissertação (Mestrado Profissional) - Programa de Pós-Graduação em Tecnologia das Radiações em Ciências da Saúde (Medicina Nuclear e Radiofarmácia) -- Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo, 2022.

1. esferoide. 2. cultura de células tridimensional. 3. LnCap. 4. câncer de próstata. 5. nanopartículas. I. Perez Vieira, Daniel, orient. II. Título.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Autor: Camila Silva Bezerra

Título: Cultura celular tridimensional: desenvolvimento de modelo *in vitro* de adenocarcinoma de próstata para avaliação de efeito quimioterápico e radioionizante.

Dissertação apresentada ao programa de pós-graduação em tecnologia nuclear da universidade de São Paulo para obtenção de título de mestre em Tecnologia das Radiações na área da Saúde.

Data: 22/11/2022

Banca examinadora

Prof. Dr.: Daniel Vieira Perez (Orientador)

Instituição IPEN

Julgamento: Aprovado

Prof. Dr.: Patrick Jack Spencer (Titular)

Instituição IPEN

Julgamento: Aprovado

Prof. Dra: Cibele Nunes Peroni (Suplente)

Instituição: IPEN

Julgamento: Aprovado

Prof. Dra.: Fernanda Agostini Rocha (Titular)

Julgamento: Aprovado

Instituição: Instituto Israelita de Ensino e Pesquisa Albert Einstein

Prof Dra: Eliza Higuti Sousa (Suplente)

Julgamento: Aprovado

Instituição: Instituto Butantan

AGRADECIMENTO

A Deus por ter me dado saúde e força para superar as dificuldades.

Ao meu orientador, Dr. Daniel Perez Vieira pela paciência, didática, acolhimento, compreensão e ter me permitido fazer parte do centro de pesquisa CEBIO com seus melhores alunos.

Serei eternamente grata a Ma. Ana Cristina Nascimento, assim como a Giovana Dias, Leonardo Wilians e a Noemy, sem vocês eu não conseguiria desenvolver completamente esse trabalho. Obrigada por fazerem dessa jornada mais leve.

Agradeço ao centro de pesquisa CEBIO, ao grupo de Radiobiologia assim como o IPEN, pela estrutura, os professores e a oportunidade de realizar essa conquista.

À minha família, minha mãe e irmã, que com muito amor e paciência me ouviram e apoiaram a vida inteira. Sem vocês eu não teria a coragem de trilhar novos sonhos e desafios.

RESUMO

BEZERRA, CAMILA S. ***Cultura celular tridimensional: desenvolvimento de modelo in vitro de adenocarcinoma de próstata para avaliação de efeito quimioterápico e radioionizante.*** 2022. 43p. Dissertação (Mestrado Profissional em Tecnologia das Radiações em Ciências da Saúde) – Instituto de Pesquisa Energéticas e Nucleares – IPEN-CNEN/SP. São Paulo.

O câncer de próstata é o segundo maior incidente na população brasileira masculina, apesar da variedade de tratamento, os efeitos colaterais podem ter um impacto imensurável na qualidade de vida dos pacientes. O desenvolvimento de cultivo de células tridimensionais visa similar o mais próximo possível de um microambiente tumoral, como sua fisiologia e patologia. Este trabalho tem como objetivo o desenvolvimento e padronização de cultura tridimensional, utilizando esferoides de células de adenocarcinoma de próstata (LnCap), através de técnica de levitação magnética. A mortalidade das células nos esferoides produzidos foi avaliada após irradiações em 0, 2 e 4 Gy (^{60}Co), após 24, 48 e 72 horas e após tratamento com agentes quimioterápicos. As análises foram realizadas por microscopia de fluorescência, com incidências de luz branca, violeta e azul para viabilidade celular, além de ensaios de citotoxicidade por meio de espectrofotometria à 490nm. Posteriormente os esferóides foram submetidos a avaliação por microscopia de fluorescência em equipamento automatizado. O estudo se mostrou eficaz e reprodutível, como alternativa viável para estudos *in vitro* de tumores de próstata.

Palavras-chave: esferoide, cultura de células tridimensional, LnCap, câncer de próstata, nanopartículas.

ABSTRACT

BEZERRA, CAMILA S. **Three-dimensional cell culture: development of an in vitro model of prostate adenocarcinoma to evaluate the chemotherapeutic and radioionizing effect.** 2022. 43p. Dissertation (Professional Master's in Radiation Technology in Health Sciences) – Energy and Nuclear Research Institute – IPEN-CNEN/SP. São Paulo.

Prostate cancer is the second largest incident in the Brazilian male population, despite the variety of treatment, side effects can have an immeasurable impact on patients' quality of life. The development of three-dimensional cell culture aims to resemble as closely as possible a tumor microenvironment, such as its physiology and pathology. This work aims to develop and standardize a three-dimensional culture, using spheroids from prostate adenocarcinoma cells (LnCap), through magnetic levitation technique. Cell mortality in the spheroids produced was evaluated after irradiation at 0, 2 and 4 Gy (^{60}Co), after 24, 48 and 72 hours and after treatment with chemotherapeutic agents. The analyzes were performed by fluorescence microscopy, with incidences of white, violet and blue light for cell viability, in addition to cytotoxicity assays by means of spectrophotometry at 490nm. Subsequently, the spheroids were submitted to evaluation by fluorescence microscopy in an automated equipment. The study proved to be effective and reproducible, as a viable alternative for in vitro studies of prostate tumors.

Keywords: spheroid, three-dimensional cell culture, LnCap, prostate cancer, nanoparticles.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Anatomia da Prostata.....	15
Figura 2 Análise de Microscopia de Fluorescência.....	22
Figura 3 Análise de Microscopia de Fluorescência via <i>INCell Analyzer</i>	23
Figura 4 Estado geral dos esferóides de 72 a 96 horas.....	26
Figura 5 - Análise do volume dos núcleos das células dos esferóides de LNCap, em 0, 24, 48 e 72 horas após irradiação.	27
Figura 6. - Volume dos núcleos de células mortas em 24 h, 48 h, 72 h.....	28
Figura 7 - Viabilidade celular em diversas concentrações de Camptotecina.	29
Figura 8 - Viabilidade celular em diversas concentrações de Mitomicina.	29

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 OBJETIVOS	13
3 JUSTIFICATIVA	14
4 REVISÃO DE LITERATURA	15
4.1 Anatomia da Próstata	15
4.2 Câncer de Próstata	15
4.3 Radiação Ionizante	16
4.4 Radioterapia	17
4.5 Tratamentos quimioterápicos	17
4.6 Cultura de células 2D e 3D	18
4.7 Linhagem de células LnCap	19
5 MATERIAL E MÉTODOS	19
5.1 Cultura Celular	19
5.2 Síntese de Nanopartículas	20
5.3 Adsorção de Nanopartículas de magnetita na superfície das células LnCaP	20
5.4 Produção de esferoides	20
5.5 Irradiações	21
5.6 Ensaio de microscopia de fluorescência	21
5.7 Análise de microscopia de fluorescência via INCell Analyzer	22
5.8 Análise de edição de imagens	23
5.9 Tratamento com quimioterápico e Ensaio de citotoxicidade	24
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
7 CONCLUSÃO	32
REFERÊNCIAS	33
APÊNDICE	39

1 INTRODUÇÃO

O câncer de próstata é o segundo tipo de câncer mais comum no sexo masculino no Brasil e o quinto em todo o mundo. A prevalência desse tipo de câncer normalmente é encontrada em homens com idade de 65 anos ou mais, histórico familiar, homens de raça negra e em alguns casos o estilo de vida e a alimentação podem estar relacionados ao risco (CZORNY et al., 2017; LIMA et al., 2018).

Segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA), em 2018 houve uma mortalidade de 15.576 pacientes com câncer de próstata e estima-se 65.840 novos casos entre os anos de 2020 e 2022. Em todas as regiões brasileiras, há um risco estimado de 72,35/100 mil habitantes na Região Nordeste; de 65,29/100 mil na Região Centro-Oeste; de 63,94/100 mil na Região Sudeste; de 62,00/100 mil na Região Sul; e de 29,39/100 mil na Região Norte.

O tratamento para o câncer de próstata pode ser realizado por meio de radioterapia, quimioterapia, hormonioterapia e prostatectomia radical, e a escolha do tratamento depende do nível de estadiamento de cada paciente, além de poderem ser combinados para melhor resultado (DAMIÃO et al., 2015).

Atualmente existem diversas possibilidades de pesquisa para se compreender o desenvolvimento do câncer, como o modelo *in vitro* de cultura celular, que tem o objetivo de mimetizar o microambiente tumoral e identificar a ação e respostas de fármacos antitumorais e efeitos da radiação ionizante, por meio da suspensão de células é possível avaliar crescimento, diferenciação e morte celular (CAVALHEIRO et al, 2018; SEKIMOTO, 2016).

O principal método utilizado é a monocultura (cultura celular bidimensional ou 2D). Esse modelo possui uma maior facilidade para sua confecção, pois basicamente essa cultura se apresenta em células se multiplicando em uma única camada sem a presença de matriz extracelular (MORAIS, 2018). Apesar da cultura 2D ser viável e ainda muito eficiente, sua característica possui limitações para expressar os efeitos esperados em modelos *in vivo* (SALEH, 2017; SANTOS, 2020).

Para simular o microambiente tumoral de forma mais fidedigna, há o desenvolvimento de culturas celulares tridimensionais (3D). Esse tipo de modelo possibilita reproduzir o ambiente celular mais próximo de um modelo animal, ou seja, é possível observar interações célula-célula e célula-matriz celular, recriando a função, arquitetura e a heterogeneidade do tecido tumoral estudado (CAVALHEIRO, 2018; MORAIS, 2018).

Existem algumas abordagens de cultura celular 3D, entre elas esferoides, órgão em um chip (*organ on a chip*), suportes de hidrogéis e suportes porosos (*scaffolds*) (MORAIS, 2018; SANTOS, 2020). Os esferoides são modelos onde as células tumorais podem ser multiplicadas em pequenas esferas que, por fim, se agregarão na conformação 3D, contendo células proliferativas, quiescentes e necróticas (SALEH, 2017).

Dentre as possibilidades dos modelos de cultivo 3D, uma das metodologias mais abordadas é o método de levitação magnética, que destaca-se por ser relativamente econômico, rápido e simples. A metodologia torna possível a formação de esferoides em ampla faixa de micrômetros e produção de matriz extracelular. Este se baseia no acréscimo de partículas magnéticas que permitem às células levitar no meio de cultura por meio da ação de um campo magnético externo, normalmente um ímã. A força magnética empregada é suficiente para promover agregação celular sem danificá-las (BALTEIRO, 2018; CAMPOS, 2019; SEKIMOTO, 2016).

A organização dos esferoides geralmente ocorre formando zonas de proliferação em uma região periférica e em uma zona interna das células, isso se dá por pouca presença de oxigênio e nutriente, fazendo com que se assemelhe a um tumor sólido, tornando-se ideal para avaliação de substâncias antitumorais e radiotoxicidade (CAVALHEIRO et al, 2018; TAKAGI, 2007, ZANONI, 2016).

Sendo assim o estudo e desenvolvimento contínuo de modelos de cultura celular 3D se tornam necessários, para que seja possível a sua aplicabilidade e reprodução, visando um microambiente tumoral ideal que mimetize a função das células e otimize o tratamento para o câncer.

2 OBJETIVOS

- **Geral**

- Produzir modelo de cultivo celular tridimensional de adenocarcinoma de próstata por meio de sistema de levitação magnética;

- **Específicos**

- Avaliar a ação de radiação ionizante por Cobalto-60 (^{60}Co) em esferoides celulares de adenocarcinoma de próstata;
- Avaliar a ação dos agentes quimioterápicos mitomicina e camptotecina em esferoides celulares de adenocarcinoma de próstata.
- Elaboração de procedimento operacional padrão (POP) para a realização de cultivos esferoides de células LNCap formados por levitação magnética

3 JUSTIFICATIVA

Conforme descrito, o número de casos de cânceres de próstata é bastante significativo. É importante que sejam direcionados esforços para estudos de outros cânceres (mama e cólon), sem, no entanto, enfraquecer os grupos que os estudam. O trabalho se coloca como consolidação da intenção do grupo de pesquisa em questão (Laboratório de Radiobiologia, CEBIO) em compor tais esforços.

1) Impacto: Assim que concluído, o estudo pretende contribuir com os estudos que buscam combater os tumores prostáticos, oferecendo um modelo simples e factível de produção de micro tumores *in vitro*. A solução tem a vantagem de ser potencialmente mais semelhante a um tumor *in vivo* dada a sua configuração tridimensional. Há ainda a expectativa de redução do uso de animais experimentais pela sua substituição por um modelo *in vitro* mais representativo. Finalmente, o produto do trabalho ajudará futuros pesquisadores a trabalhar com cultivos tridimensionais.

2) Aplicabilidade: O trabalho propõe a construção de micro tumores em alguns dias, aumentando a quantidade de pontos de dados utilizados em pesquisas.

3) Inovação: O cultivo celular tridimensional é condição mínima para a interface das tecnologias aditivas com biosistemas. Embora praticado há décadas, seu desenvolvimento passa por um período de grande salto tecnológico, inclusive sendo uma das propostas da denominada “Indústria 4.0”.

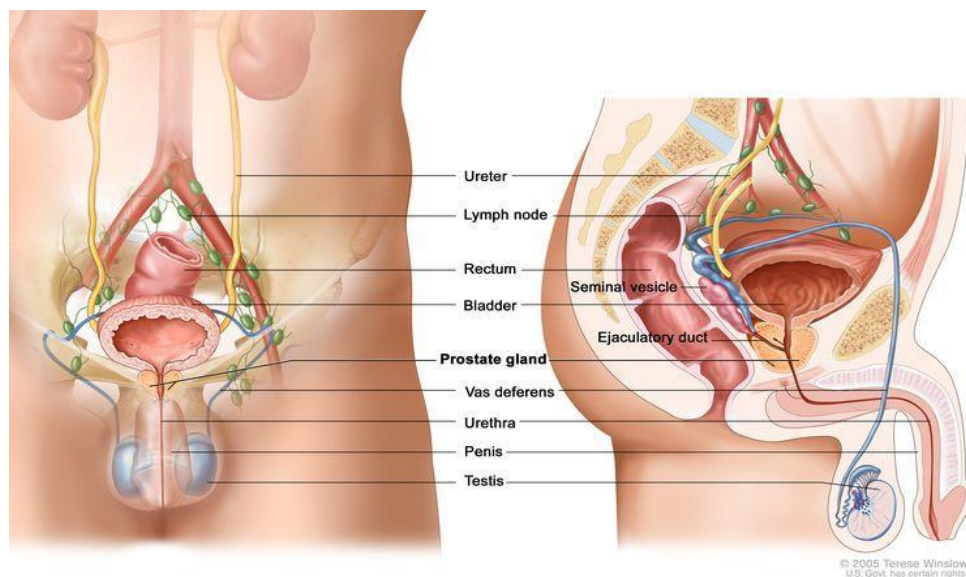
4) Complexidade: O trabalho relaciona conhecimentos em Biologia Celular, Oncologia e Nanotecnologia.

4 REVISÃO DE LITERATURA

4.1 Anatomia da Próstata

A próstata é uma glândula pertencente ao sistema reprodutor masculino, localizada inferiormente à bexiga e anterior ao reto. Responsável por produzir e armazenar parte do líquido seminal e do sêmen, fluidos espessos liberados durante o ato sexual, que possuem presença de espermatozoides. A próstata ainda envolve um segmento da uretra, no qual haverá eliminação de urina e sêmen. Com o avanço da idade, é relatado o aumento da próstata, apresentando aumento de massa para até 20 gramas (Figura 1) (BRAVO, 2022)

Figura 1- Anatomia da Próstata



Fonte: VIEIRA, 2013.

4.2 Câncer de Próstata

De forma generalista, os cânceres caracterizam-se como as doenças nas quais ocorre a multiplicação exagerada de algumas células presentes no tecido, as quais podem se diferenciar e adquirir a capacidade de se multiplicar e invadir estruturas sadias (VIEIRA, 2013). As causas destas mudanças na fisiologia

celular são bem descritas, embora não constituam certezas diagnósticas. Pode haver, por exemplo, alterações no DNA celular que promovam a capacidade de multiplicar e originar uma massa tumoral. Conforme a célula adquire a característica de malignidade ocorrem inúmeras mutações, independentemente do tipo celular primário sadias (VIEIRA, 2013; SANTOS, SOUZA 2016).

Os cânceres de próstata tem seu desenvolvimento lento, ou seja, podem demorar em média 4 a 10 anos para que uma célula produza um tumor de aproximadamente 1 cm, num perfil de crescimento que pode levar o órgão a atingir massa entre 60 a 100 gramas (SANTOS, SOUZA 2016). A graduação da escala do câncer de próstata é feita por avaliação histológica e varia de 1 a 5, com o grau 5 sendo a forma mais agressiva da doença.

Tabela 1- Avaliação do câncer de próstata conforme alteração histológica.

Grau 1	Formato das células uniformes e pequenas e formando glândulas regulares, com pouca variação de tamanho e forma, com bordos bem definidos, densamente agrupados, distribuídos homoganeamente e com muito pouco estroma entre si.
Grau 2	As células variam mais em tamanho e forma e as glândulas, ainda uniformes, mostram-se frouxamente agrupadas e com bordos irregulares.
Grau 3	As células variam ainda mais em tamanho e forma, constituindo glândulas muito pequenas, uniformes, anguladas ou alongadas, individualizadas e anarquicamente espalhadas pelo estroma. Podem formar também massas fusiformes ou papilíferas, com bordas lisas.
Grau 4	Células estão fusionadas em grandes massas amorfas ou formando glândulas irregulares, que são distribuídas anarquicamente, exibindo infiltração irregular e invadindo os tecidos adjacentes. As glândulas podem apresentar, ainda, células pálidas e grandes, com padrão hipernefróide.
Grau 5	A maioria das células estão agrupadas em grandes massas que invadem demais tecidos ou órgãos. As massas de células podem exibir necrose central, com padrão de comedocarcinoma. Muitas vezes, a diferenciação glandular pode não existir: padrão de crescimento infiltrativo tipo cordonal ou de células soltas.

Fonte: Tabela adaptada, VIEIRA, 2013.

4.3 Radiação ionizante

Em 1895, Wilhelm Röntgen iniciou os estudos do uso da radiação ionizante como forma de medicina diagnóstica, sendo pioneiro em sua área. Radiação ionizante é quando há propagação de energia por meio da matéria e do espaço.

As radiações podem ser classificadas em ionizantes e não ionizantes, de acordo com sua capacidade de doar energia à matéria e causar ou não ionizações e excitações eletrônicas (DEWJI, 2021).

Quando tratado de radiação ionizante, há a formação do par íon negativo e íon positivo. O íon negativo é ejetado e o segundo é o átomo que perde elétron. Estes por sua vez estão relacionados aos átomos com cargas elétricas de valores diferentes, conforme sua localização. Quanto mais próximo o átomo está do núcleo, maior é a força de atração do elétron (PINO, GIOVEDIC, 2005; OKUNO, 2013).

Os principais tipos de radiação ionizante são os raios X, os raios gama e o feixe de elétrons. Os raios gama são fótons de alta energia sem carga elétrica e sem massa (ondas eletromagnéticas), ou seja, intensamente penetrantes, produzidos em processos nucleares, como a fissão nuclear, decaimento de radioisótopos ou até mesmo na indústria (PINO, GIOVEDI, 2005; OKUNO, 2013).

4.4 Radioterapia

A radioterapia é um dos tipos de tratamento utilizado para destruição das células cancerígenas. O tratamento faz uso de feixes de radiação de alta intensidade produzidos por radioisótopos (braquiterapia) ou acelerador linear (teleterapia) (BRUM *et al.*, 2020).

Este tipo de tratamento radioterápico pode ser associado com outros tratamentos, como a quimioterapia e a cirurgia, visando aumento de sobrevida e condições de cura. As altas doses de radiação ionizante promovem danificação ao DNA celular, induzindo a apoptose ou redução da multiplicação celular cancerígena (BRUM *et al.*, 2020).

4.5 Tratamentos quimioterápicos

A quimioterapia é uma das opções de escolha no tratamento para a maioria dos casos de câncer, visando diminuir a possibilidade de recidiva e

aumentar a sobrevida dos pacientes. A principal finalidade da quimioterapia é evitar as micrometástases, diminuindo a chance de recidiva tumoral (SILVA, 2022).

No caso do câncer de próstata, usualmente a quimioterapia é iniciada com docetaxel em conjunto com prednisona. Caso não haja resposta aos antitumorais, inicia-se o tratamento com cabazitaxel. Estes medicamentos podem promover a diminuição do crescimento tumoral, visando à qualidade de vida (AMC, 2019).

Este estudo optou por utilizar os medicamentos antitumorais camptotecina e mitomicina C, ambos já muito utilizados na literatura em culturas bidimensionais. A camptotecina é um alcaloide extraído da *Camptotheca acuminata* (MARQUES, LOPES), 2015, seu mecanismo é inibir a topoisomerase I promovendo a morte celular apoptótica, ao inibir a ativação da caspase ocasiona necrose celular (OLIVEIRA, 2018).

A mitomicina C, é um fármaco de característica antibiótica, produzido pelo microorganismo *Streptomyces caespitosus*, este como já citado possui ação antineoplásica assim como antiproliferativa. Seu mecanismo de ação antineoplásico funciona como um agente alquilante que causará uma ligação cruzada do DNA, inibirá o RNA e por fim a síntese proteica (ALMODIN, 2021).

4.6 Culturas de células 2D e 3D

A cultura celular bidimensional ainda é muito utilizada como forma de ferramenta de pesquisa, devido a sua facilidade de replicação, resultados e sua viabilidade celular. Estas são cultivadas aderidas a placas de plástico ou vidro, numa conformação horizontal célula-célula, sem a presença massiva de matriz extracelular. Apesar de um método funcional, muito se perde nas possibilidades de sinalização e resposta celular (MORAIS, 2018; MENTI, 2021).

Cultivos tridimensionais constituem propostas de avaliação de respostas levando em consideração as tais relações de célula-célula e célula-matriz extracelular. Os métodos por sua vez tem a facilidade de reproduzir microambientes de células *in vivo*, tanto normais quanto patológicas. Ainda é

possível estimulá-las bioquimicamente ou fisiologicamente, realizar testes farmacológicos, citotóxicos, mudanças de pH, temperatura e nutrientes a fim de avaliar a dinâmica e comportamento da sinalização celular (MORAIS, 2018; MENTI, 2021). Diversos métodos de cultura tridimensional foram desenvolvidos, entre eles o de levitação magnética que possibilita a formação de esferoides com adição de nanopartículas, método abordado neste trabalho (MORAIS, 2018; MENTI, 2021).

Os esferoides são agregados de células com adesão entre si. Em sua camada periférica há a presença maior de oxigênio, ATP e nutrientes e no seu centro, uma zona necrótica, com a presença de gás carbônico e ácidos, mimetizando um ambiente *in vivo* tumoral (MORAIS, 2018; MENTI, 2021).

4.7 Linhagem de células LnCap

Na realização deste trabalho foi utilizado a linhagem celular humana de adenocarcinoma de próstata de característica metastática linfática (LnCap), esta linhagem celular expressa receptores hormonais, ou seja sensíveis a andrógenos (SANTO, 2017).

5 . MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Cultura celular

Células de linhagem de câncer de próstata humano (LnCap, ATCC CRL-1740) foram cultivadas em incubadora à 37°C, 5% CO₂, em frascos de 25 cm² utilizando meio Opt-Mem (Thermo Fisher Scientific), suplementado com glutamina (GlutaMAX – I, Thermo Fisher Scientific), soro fetal bovino (10%, Cultilab) e solução de antibióticos contendo penicilina e estreptomicina (10.000 UI/mL e 10mg / L, Thermo Fisher Scientific). O meio de cultura foi substituído a cada 48 horas. Ao confirmar a confluência celular de 70-80%, as células eram destacadas usando solução de tripsina com 0,25% de EDTA e subcultivadas.

5.2 Síntese de nanopartículas de óxido de ferro

Nanopartículas de magnetita (Fe_3O_4) com propriedade de adesão às membranas das células foram produzidas conforme protocolo modificado e estabelecido por pesquisa anterior (BONFIM et al., 2019). Ferro bivalente (Fe^{2+}) proveniente do sulfato ferroso heptahidratado foi reduzido pela ação de energia em micro-ondas à 5 minutos em pH 12 e na presença de glicina. A glicina adiciona grupos amina na superfície das partículas, os quais são protonáveis após dispersão em ácido acético por 5 minutos em banho ultrassônico. Após separação magnética, o precipitado recebeu solução de poli-L-lisina em pH 7,4 e retornou ao banho ultrassônico por mais 5 minutos. A poli-L-lisina se liga às aminas protonadas na superfície das partículas, conferindo-lhes carga positiva em pH fisiológico. O precipitado foi concentrado por separação magnética e dispersado em banho ultrassônico em 2 mL de água deionizada estéril. A suspensão foi mantida a 4°C até o uso.

5.3 Adsorção de nanopartículas de magnetita na superfície das células LnCap

O colóide foi adicionado na proporção 0,012M de Fe (aproximadamente 20 μL) para cada 2×10^6 células em suspensão. As células foram centrifugadas (1500 rpm, 5 min) e ressuspendidas três vezes em meio de cultura com nanopartículas. Após este procedimento, foram postas em cultura conforme descrito por 24 horas.

5.4 Produção de esferoides

Placas de cultura celular com 96 poços foram pré-tratadas com solução de Pluronic[®] F-127 (0,5g/mL em 2-propanol, Sigma-Aldrich). Cada poço recebeu 180 μL da solução e permaneceu em temperatura ambiente por 24 horas. Após este período, o volume de líquido foi retirado e as placas foram postas para secar em capela de fluxo laminar estéril e sob irradiação UV para eliminação do risco de contaminação por 30 minutos. Com este procedimento, as moléculas do copolímero se arranjam em configuração “pancake” (NEJADNIK et al., 2009), com

sua porção hidrofóbica direcionada para o centro do poço, impedindo assim a adesão celular no plástico de cultura. Em cada poço foi adicionado meio de cultura (100 µL/poço nas placas de 96 poços) com 5×10^3 células com nanopartículas por poço. Os agregados celulares foram formados por ação de ímãs de neodímio posicionados em cada poço para unir as células sob campo magnético. Placas adquiridas comercialmente (Magnetic drive, Greiner BioONE) foram também utilizadas. As células foram mantidas sob a ação dos campos por no mínimo 48 horas, ou até a agregação ser mantida sem a ação do campo magnético.

5.5 Irradiações

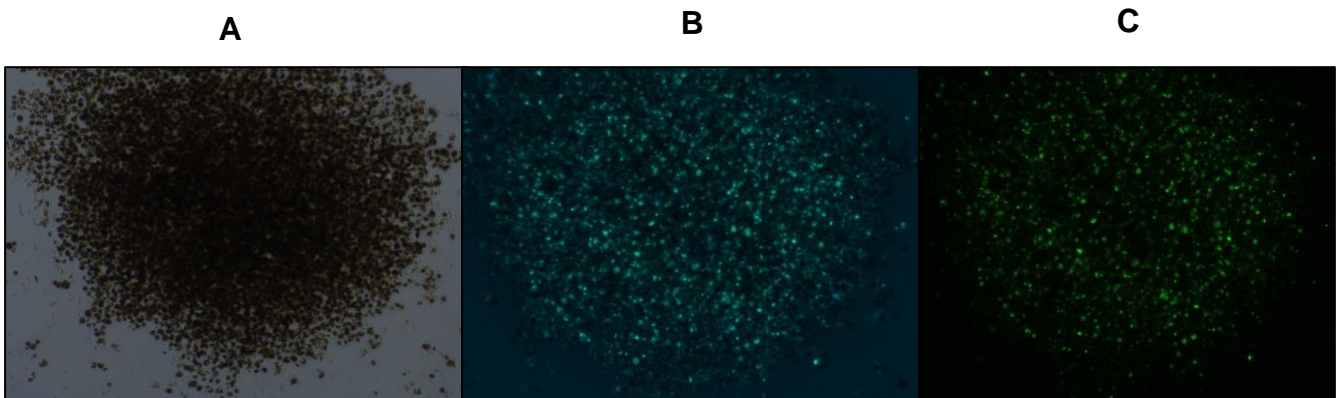
Esferoides produzidos em placas de 96 poços e mantidos em cultura por 3 dias foram irradiados por fonte de ^{60}Co (GammaCell) (radiação gama) presente no Centro de Tecnologia das Radiações (CETER/IPEN), sob supervisão da Eng^a Elizabeth Somessari. As doses utilizadas foram, 2 e 4Gy na taxa de 90Gy / h. Controles não irradiados (0Gy) compostos por esferoides processados igualmente, também foram avaliados para estabilidade. Decorridos 24, 48 e 72h após a irradiação, os esferoides foram avaliados por microscopia de fluorescência.

5.6 Ensaios de microscopia de fluorescência

Os esferoides foram corados com solução de Hoescht 33342 (20µL / poço) e SYTOX[®] Green (20µL / poço) em meio de cultura. Os corantes foram adicionados ao meio em que os esferoides estavam cultivados e as células foram incubadas na estufa como descrito por 30 minutos. O material foi visualizado nos aumentos 4 e 10X, no microscópio Nikon Ts100 existente na Sala de Cultura Celular I do Centro de Biotecnologia (CEBIO/IPEN). Os esferoides por sua vez foram fotografados com luz branca e excitação em violeta (evidenciando todos os núcleos em azul, marcados pelo Hoescht 33342) e em excitação azul (evidenciando os núcleos de células inviáveis em verde, marcados pelo SYTOX[®]

Green). A proporção entre núcleos marcados em azul e em verde resultou em um parâmetro semi-quantitativo de viabilidade das células.

Figura 2 – Visualização em Campo Claro (A), excitação em luz violeta com solução hoescht 33342 (B) e excitação em luz azul com solução SYTOX[®] Green (C) em análise de microscopia de fluorescência.

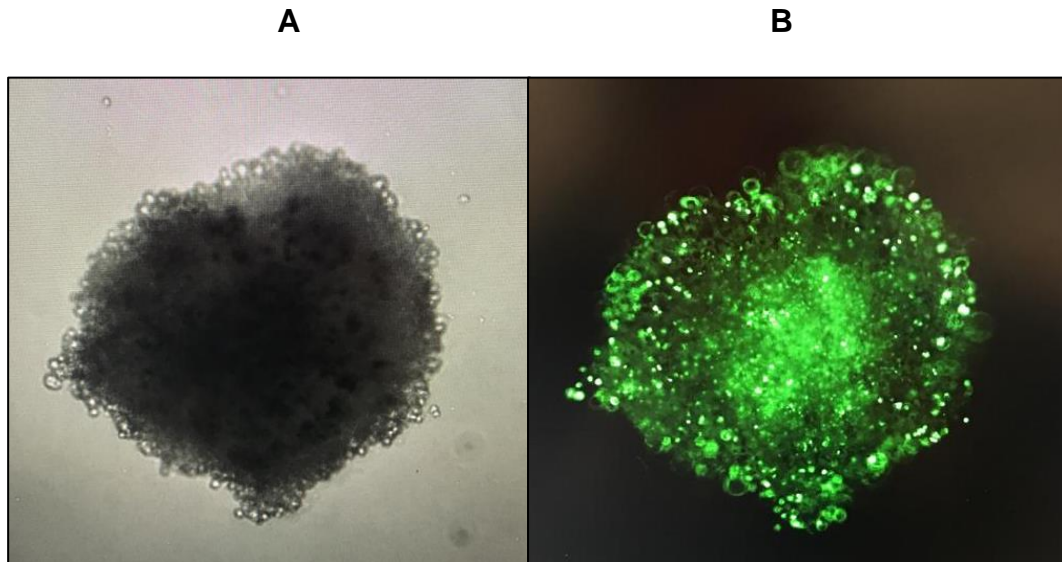


Fonte: autor da tese.

5.7 Análise de microscopia de fluorescência via INCell Analyzer

Para avaliar e obter imagens em plano tridimensional, os esferoides foram colocados no equipamento INCell Analyzer HS 2500 (Cytiva) após acréscimo dos corantes como citado no tópico anterior, nos períodos de tempo 24h, 48h e 72h após a irradiação. Gerando *stacks* de imagens com intervalo de 4 μm , desde do inferior do poço até a periferia do esferoide, estes foram submetidos a comprimentos de onda onde no canal azul (*blue*) foi possível a visualização da fluorescência do Hoescht 33342, no canal verde (*green*) captou-se os núcleos corados por SYTOX[®] Green e por fim no canal *brightfield* os esferoides em campo claro. O equipamento foi calibrado para lente de aumento em 10x e com algoritmo de deconvolução.

Figura 3 – Visualização em Campo Claro (A) – *brightfield* e em canal verde (B) – *green* após análise de microscopia de fluorescência via *INCell Analyzer*.



Fonte: autor da tese.

5.8 Análise e edição de imagens

Imagens de microscopia de fluorescência (RGB) foram tratadas com o software ImageJ versão 1.52 (<https://imagej.nih.gov/ij/>), com pacote de plugins Fiji (<https://imagej.net/software/fiji/>) pré-instalado. Foi feita a redução de sinal no fundo das imagens com o comando “*Process >> Subtract Background*”, sem suavização (parâmetro “*Disable Smoothing*” habilitado) e “*Rolling Ball Radius*” ajustado em 50 pixels. Após este tratamento, as imagens foram decompostas em seus canais de cor (R, G e B, correspondendo aos canais Vermelho, Verde e Azul, respectivamente).

Para os experimentos com Hoechst 33342, a imagem apresentada é resultado da sobreposição dos canais G e B obtidos por excitação por violeta e o canal R obtido com excitação em verde. As imagens finais são resultados dos canais G e B obtidos por excitação em verde e o canal R obtido por excitação em azul. Desta forma, buscou-se evidenciar o máximo de emissão de cada fluorocromo com o mínimo de interferência dos espectros de excitação utilizados dentro das

capacidades do equipamento e da técnica utilizada. Pilhas (“*stacks*”) de imagens obtidas pelo *INCell Analyzer 2500 HS* foram analisadas também utilizando o pacote de plugins *Bio-Formats* (<https://www.openmicroscopy.org/bio-formats/>) para carregamento dos arquivos. Após tratamento de background e remoção de sinais espúrios de fluorescência, as “*stacks*” foram avaliadas. Após aquisição das imagens (*stacks*), as mesmas foram apuradas pelo *software* INCarta 1.17 (Cytiva), sendo possível obter dados da esfericidade, volume e área das seções transversais dos esferoides. Dados foram colocados em gráficos usando o *software* Prism 9.01 (GraphPad). Possíveis diferenças estatisticamente significantes entre os grupos (dias 3 e 6 após a semeadura) foram avaliadas pelo teste não-paramétrico bicaudal Kolmogorov-Smirnov, intervalo de confiança de 95%. Para visualização/apresentação as imagens foram preparadas da seguinte forma: Canais “azul”, “verde” e “campo claro” de cada amostra foram separados em “*stacks*”, e cada conjunto foi processado com o comando “*Image → Stacks → Z Project*”), com a opção “*Sum Slices*”. O produto final representa a soma de todas as imagens num único plano bidimensional, facilitando a visualização de todos os eventos na página impressa. As figuras foram organizadas em tábuas utilizando o *software* GIMP versão 2.10 (<https://www.gimp.org/>).

5.9 Tratamento com agente quimioterápico e Ensaio de citotoxicidade

Mitomicina e Camptotecina foram adicionadas ao meio de cultura de esferoides em placas de 96 poços. De acordo com a base de dados “Genomics of Drug Sensitivity in Cancer” (disponível para consulta em www.cancerrxgene.org), a mitomicina possui uma IC_{50} para cultivos de LNCap em 2D (concentração inibitória de 50%) de 0,452324 μ M, e a camptotecina, 0,029177 μ M. Os esferoides foram incubados por 24 horas com o fármaco em concentrações 8, 4, 2, 1, 0,5, 0,25, 0,125 e 0,0625 vezes os valores de IC_{50} . Após este período, foram avaliados por espectrofotômetro em absorbância de 490 nm.

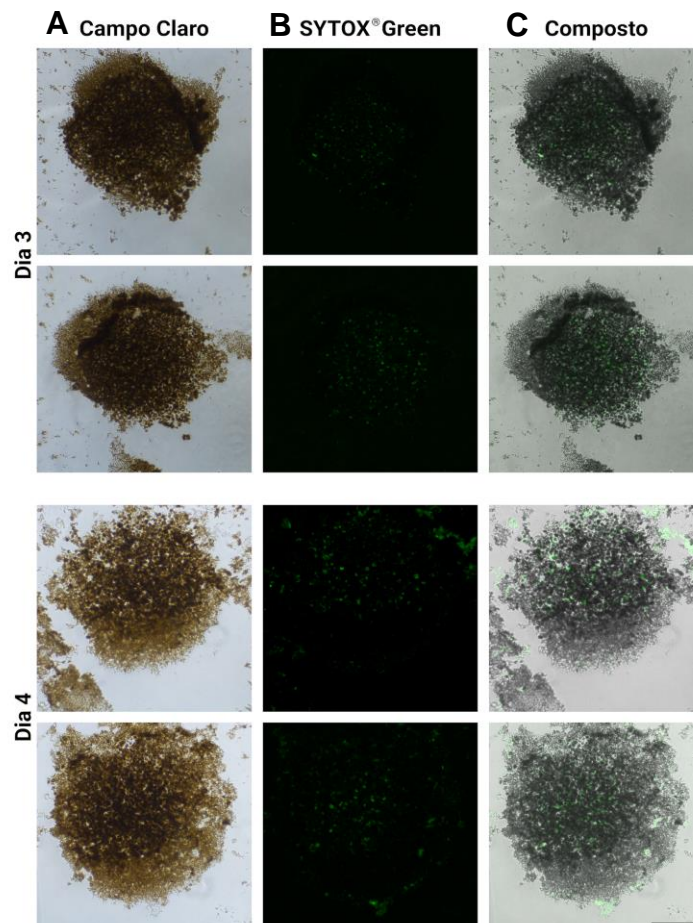
A viabilidade celular foi avaliada pela deposição do reagente MTS (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximethoxyphenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazólio) e do acoplador de elétrons PMS (metossulfato de fenazina) seguindo orientações do fabricante (CellTiter 96® Aqueous NonRadioactive Cell Proliferation Assay,

Promega). Após incubação por duas horas, a absorvância a 490nm foi medida em espectrofotômetro de placa. A viabilidade dos esferoides que foram submetidos a condições experimentais (fármacos) foi determinada pela sua absorvância em relação à absorvância de esferoides não tratados (% dos controles).

6 . RESULTADOS E DISCUSSÃO

Inicialmente foram realizados ensaios para avaliar a estabilidade dos esferoides após a adsorção de nanopartículas e posteriormente imagens obtidas em microscopia de fluorescência Nikon Ts100, sem irradiação, ou seja 0Gy, como demonstrado na Figura 4.

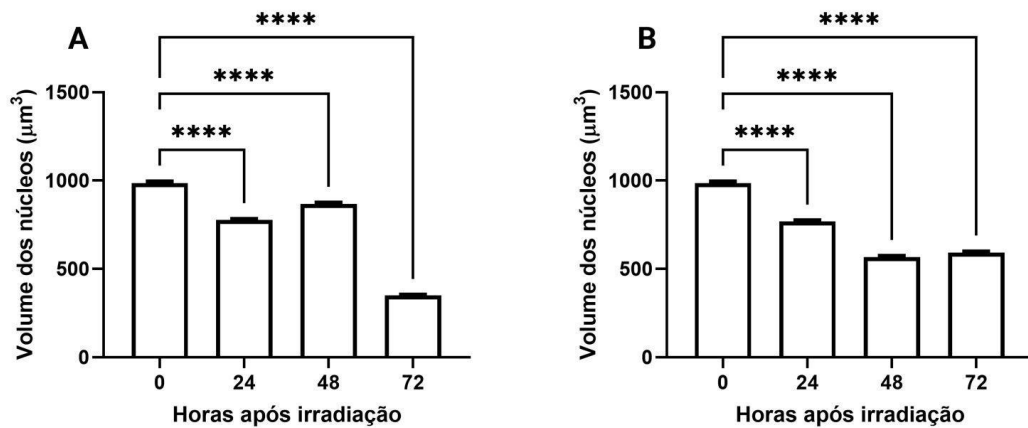
Figura 4. Estado geral dos esferoides com 72 e 96 horas após levitação magnética e adição de solução SYTOX® Green em placa de 96 poços. (A) Evidenciado em luz branca (campo claro). (B) Excitação em luz azul, evidenciando núcleos marcados em verde, considerados inviáveis. (C) Sobreposição das imagens A e B. Aumento 4X. Barra: 200µm.



Fonte: autor da tese.

Em seguida o experimento foi repetido para a formação de esferóides com nanopartículas, porém submetidos à radiação gama em doses de 2 e 4Gy, estes foram corados e avaliados no *INCell Analyzer* em 24, 48 e 72 horas a fim de acompanhar o volume de núcleos e a conformação dos esferóides após estresse radiológico. Essas imagens foram processadas no *INCarta* e demonstradas na Figura 5 abaixo.

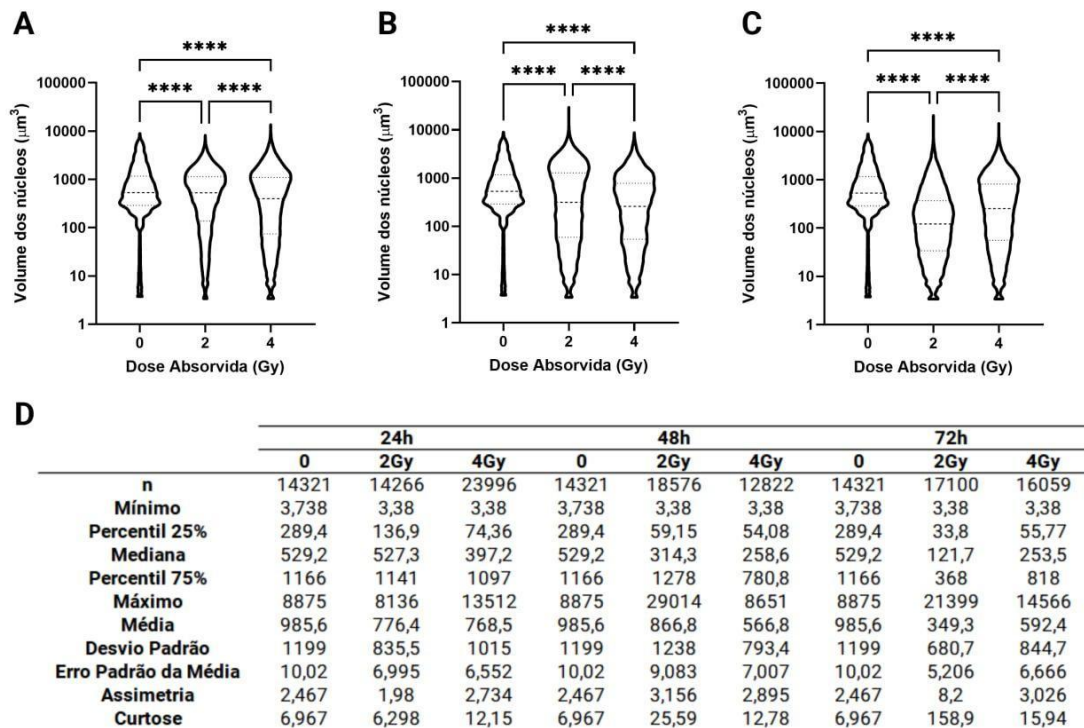
Figura 5. Análise do volume dos núcleos das células dos esferóides de LNCaP, em 0, 24, 48 e 72 horas após irradiação. (A) 2 Gy; (B) 4 Gy.



Fonte: autor da tese.

Ao avaliar o gráfico demonstrado na Figura 5, é possível visualizar que há uma grande variação em relação ao volume dos núcleos em ambas as doses. Por se tratar de um esferóide tumoral o esperado é que as áreas com menor concentração de oxigênio e nutrientes estejam localizadas na região central do esferóide e na região periférica uma maior oferta destes, ou seja, com o aumento dos dias a proliferação celular diminuiu, aumentando os núcleos (LUFT, 2013; FONTANA *et al*, 2020). Além disso, uma dose de radiação gama foi aplicada nesses esferóides, onde o aumento do volume de células não viáveis também era esperado.

Figura 6. Avaliação do volume dos núcleos de células mortas, após irradiações de 0, 2 e 4Gy. Nos tempos de (A) 24 horas. (B) 48 horas. (C) 72 horas. (D) Estatísticas descritivas dos valores obtidos. (****): $p < 0,0001$.

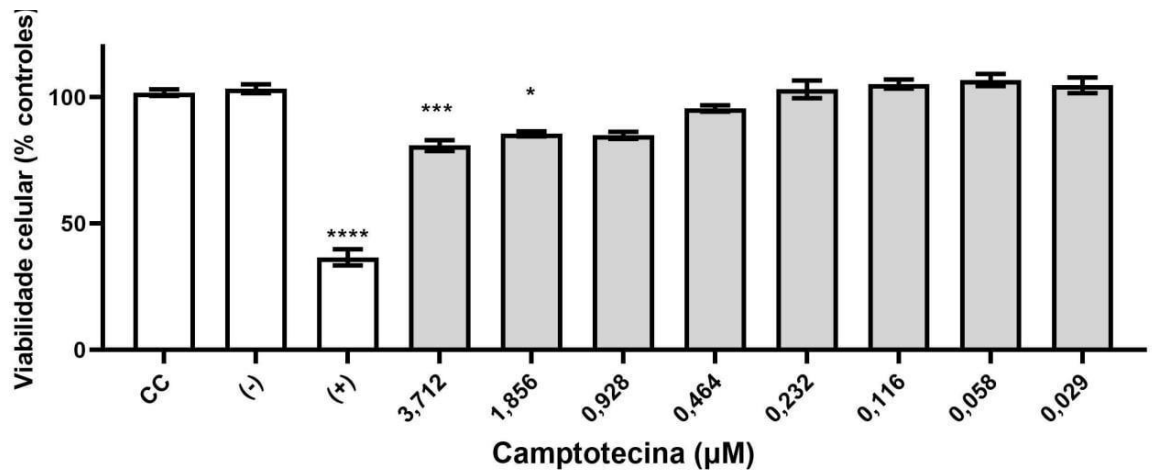


Fonte: autor da tese.

A Figura 6, acima mostra as variações de volume de núcleos dos esferoides de 0, 2 e 4 Gy, nos tempos 24, 48 e 72 horas, com um erro de desvio padrão considerável e em asterisco uma diferença estatística significativa ($p < 0,0001$). Analisando o efeito das doses *versus* tempo após irradiação, em todos há inicialmente um aumento em até 48 horas e posteriormente um declínio nos números do volume de núcleos. O esperado era que o número de células não viáveis fosse crescente devido às doses de radiação gama, porém a proliferação celular não foi avaliada.

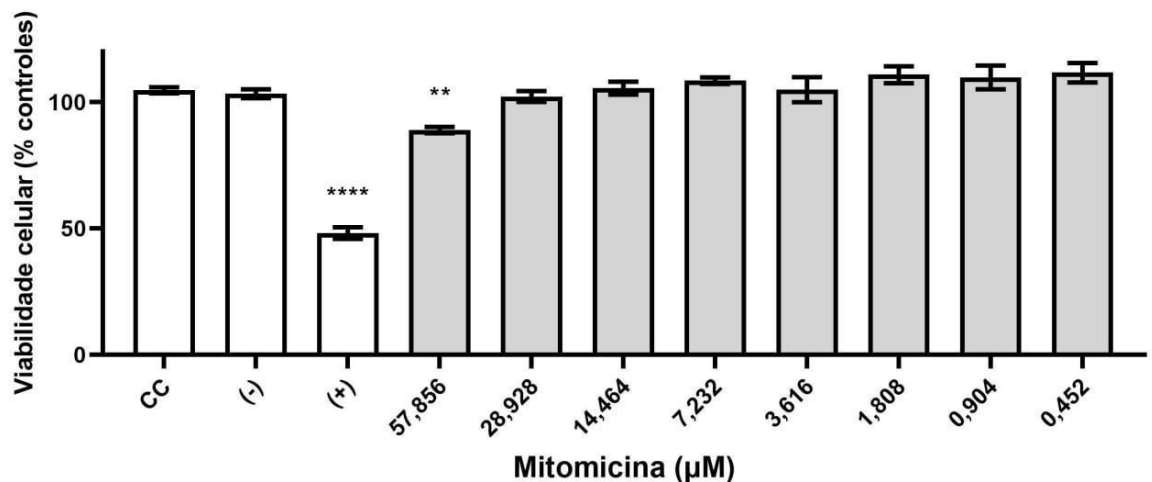
O tamanho dos núcleos de células tumorais é influenciado pela atividade de proteínas do envelope nuclear, especialmente lamininas formadoras dos andaimes proteicos da carioteca (JEVTIĆ, P, *et al* 2015) e por outras proteínas como as nesprinas, que interligam a carioteca ao citoesqueleto e tem relações com processos de ciclo celular (LU, W.; SCHNEIDER, M.; *et al.*, 2012). Em células de carcinomas de cólon, pulmões e próstata, a redução *in vitro* do volume nuclear mediante ação de fármacos anti-tumorais foi associada à perda de capacidade de migração (TOLLIS *et al*, 2022), o que poderia reduzir a possibilidade de progressões metastáticas.

Figura 7. Viabilidade celular em diversas concentrações de Camptotecina. Sendo CC (controle celular sem nenhum tratamento), (-) Controle Negativo com NaCl e (+) Controle positivo com DMSO



Fonte: autor da tese.

Figura 8. Viabilidade celular em diversas concentrações de Mitomicina. Sendo CC (controle celular sem nenhum tratamento), (-) Controle Negativo com NaCl e (+) Controle positivo com DMSO



Fonte: autor da tese.

Para o ensaio de citotoxicidade foi realizada a diluição seriada dos fármacos Camptotecina e Mitomicina, Figura 7 e 8 respectivamente. Era esperado a uma resposta que demonstrasse morte celular, uma vez que os seguintes fármacos induzem apoptose do tumor prostático em cultivos em 2D.

A camptotecina é um alcalóide inicialmente descoberto em extratos do caule da planta *Camptotheca acuminata* em meados do século XX (LI et al, 2017). A molécula e vários de seus análogos, bem como seus derivados, são descritos há anos como paralisantes do ciclo celular nas fases S (TSAO et al, 1992) e G2

(GOLDWASSER *et al*, 1996) devido ao seu efeito de bloqueio competitivo da DNA Topoisomerase I (LETEURTRE *et al*, 1993). Esta enzima é responsável pelo relaxamento do estado de super-enrolamento do DNA durante a divisão celular (CHAMPOUX, 2013), possibilitando sua duplicação e conseqüentemente a progressão da divisão celular. Ao se ligar a ela, a camptotecina impede a divisão celular (CHEN, 2019). Embora seja utilizada no tratamento de cânceres, apresenta alta toxicidade sistêmica (SCHMID *et al*, 2014), indução de resistência (MARTINO *et al*, 2017) e baixa solubilidade em meio aquoso (GHANBARI-MOVAHED *et al*, 2021).

A mitomicina C é um composto isolado do fungo *Streptomyces caespitosus* e que possui, além de atividade antibiótica, uma característica atividade antitumoral (YONEDA *et al*, 2010). Seu mecanismo de ação é baseado na sua capacidade de inibição da síntese de DNA e indução de *cross-linking* de fitas, especialmente durante a transição da fase G1 para a fase S do ciclo celular, podendo também afetar as cadeias de RNA (GAD, 2014). Tal capacidade é derivada dos fenômenos de alquilação que levam à ruptura de uma ou as duas fitas de DNA (FINCH, BURNS-NAAS, 2014). Ao contrário da camptotecina, é altamente solúvel em meio aquoso, (MYERS *et al*, 2017). Sua atividade antineoplásica é bastante aumentada em ambiente hipóxico (SONG *et al*, 2015; STRESE *et al*, 2013; MISTRY *et al*, 2017, CHEN *et al*, 2019).

Fatores solúveis tendem a atingir as camadas externas dos esferoides, sem penetrar nas camadas mais profundas (LANGHANS, 2018). A concentração máxima de camptotecina utilizada neste estudo é oito vezes maior do que a IC₅₀ para LNCap cultivadas em duas dimensões, e é a única que foi capaz de induzir citotoxicidade estatisticamente relevante (e menor que 10%). A baixa solubilidade da camptotecina em meio aquoso, além da configuração de cultivo tridimensional que prejudica sua absorção, podem ter reduzido a citotoxicidade do fármaco em cultura.

Esferoides multicelulares, com vários micrômetros de diâmetro, apresentam hipóxia interna (LEEK *et al*, 2016; BHATTACHARYA *et al*, 2020; CLOSE, JOHNSTON, 2022; REFET-MOLLOF *et al*, 2021). Dada a alta solubilidade em meio aquoso e sua atividade aumentada em ambiente hipóxico, era esperado um

aumento da citotoxicidade da mitomicina C, mas este efeito só foi observado esferoides tratados com concentração 8 vezes maior que a IC_{50} para cultivos de LNCap em duas dimensões, trazendo necessidade de novos estudos para avaliação da toxicidade da mitomicina C no presente modelo.

Estudos como de Ziaee e colaboradores (2015) avaliaram diversas linhagens de células de câncer de próstatas e metodologias de cultura de células tridimensionais, os autores relatam que apesar dessa metodologia se mostrar promissora, os mecanismos para testes farmacológicos precisam ser mais elucidados para garantia de resultado visando à qualidade do tratamento dos pacientes.

Os autores Ishiguro e colaboradores (2017) sugerem que o uso de esferoides por cultura 3D é altamente eficaz em relação aos testes de drogas para o tratamento de câncer de próstata. Além disso, os autores citam a possibilidade de realizar a culturas com células derivadas dos pacientes viabilizando o tratamento individual e personalizado para cada perfil tumoral. Este estudo ainda direciona a possibilidade futura de uso de organóides para que o microambiente tumoral simule de forma ainda mais fidedigna os tumores, com presença de secreção de PSA, assim como marcadores imunológicos e teciduais.

Em 2019, um estudo realizado por Namekawa e colaboradores, reforça o uso de células de enxerto de paciente e o uso de cultura 3D como eficaz, além do de ferramentas de biologia molecular para estudar a fundo a responsividade e viabilidade de diversas linhagens de câncer de próstata.

Fontana e colaboradores (2020) descrevem o quanto as culturas tridimensionais para o câncer de próstata podem ser relevantes pensando em testes com fármacos, quimioterapia e radioterapia. Os autores visam que experimentos que possam testar a resposta tecidual, biomarcadores e marcadores tumorais podem auxiliar o uso pré-clínico de cultura 3D e a substituição ou redução do uso de animais para tal.

7 . CONCLUSÃO

A produção de um modelo de cultivo celular tridimensional se mostrou eficaz e de fácil reprodução. Imagens obtidas por microscopia de fluorescência se demonstraram essenciais, além de práticas para processar a quantidade de informações, células e núcleos obtidos por amostra. As mesmas posteriormente trabalhadas em *software* trouxeram dados relevantes, mesmo que o volume esferoidal e dos núcleos não apresentaram grandes alterações.

Os esferoides de LNCap mantiveram sua viabilidade satisfatória por ao menos 4 dias em cultivo, ou seja, em intervalo de tempo em que experimentos (por exemplo, com irradiações) foram factíveis.

São possíveis avaliações como área do esferoide e área dos núcleos das células, possibilitando estudos fisiológicos por meio da microscopia de fluorescência.

O modelo *in vitro* proposto mostrou-se responsivo a agressão por radiação ionizante e por fármacos com diferentes mecanismos de ação (inibição enzimática e alquilação), permitindo sua utilização como plataforma de testes para tratamentos antitumorais. Foi possível inclusive observar efeitos de citotoxicidade discrepantes dos encontrados em modelos bidimensionais, confirmando a diferenciação fisiológica dos esferoides e sua suposta aproximação das situações *in vivo*.

REFERÊNCIAS

ALMODIN, Juliana Motta. **Resultado da ação da ciclofosfamida x mitomicina c em coelhos submetidos à trabeculectomia**. 2021. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

AMERICAN CANCER SOCIETY (org.). **Chemotherapy for Prostate Cancer**. 2019. Disponível em: <https://www.cancer.org/cancer/prostate-cancer/treating/chemotherapy.html>. Acesso em: 05 dez. 2022.

BALTEIRO, Gonçalo Jorge dos Santos. **Rádio-223 no tratamento do carcinoma da próstata metastático: estudo dos efeitos em linhas celulares normais**. 2018. 125 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia Biomédica, Física, Universidade de Coimbra, Coimbra, 2018.

BHATTACHARYA, S., CALAR, K., & DE LA PUENTE, P. **Mimicking tumor hypoxia and tumor-immune interactions employing three-dimensional *in vitro* models**. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, v.39, n.1, 2020.

BONFIM, L. *et al*. Microwave-mediated synthesis of iron-oxide nanoparticles for use in magnetic levitation cell cultures. **Applied Nanoscience (Switzerland)**, v. 9, n. 8, p. 1707–1717, 2019

BRAVO, Barbara Silva *et al*. Câncer de Próstata: revisão de literatura / prostate cancer. **Brazilian Journal Of Health Review**, [S.L.], v. 5, n. 1, p. 567-577, 12 jan. 2022. South Florida Publishing LLC. <http://dx.doi.org/10.34119/bjhrv5n1-047>.

BRUM, Fagner *et al*. A Radioterapia Do Câncer De Próstata: uma revisão da literatura dos principais avanços e métodos de tratamento. **Disciplinarum Scientia: Naturais e Tecnológicas**, Santa Maria, v. 21, n. 1, p. 31-44, jan. 2020.

CAMPOS, Carolina de Paula. **Investigação de terapia fotodinâmica em culturas 3D de tumor de mama crescidas pelo método de levitação magnética**. 2019. 93 f. Tese (Doutorado) - Curso de Física Aplicada, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2019.

CAVALHEIRO, Marianna *et al*. Modelos tridimensionais de cultura de células: aproximando o *in vitro* do *in vivo*. **Visa em Debate, Sociedade, Ciência e Tecnologia**. Rio de Janeiro, p. 72-83. 2018. Disponível em: <https://visaemdebate.incqs.fiocruz.br/index.php/visaemdebate/article/download/1047/564/>. Acesso em: 10 nov. 2020.

CHAMPOUX, J. **DNA Topoisomerases: Type I**. *Encyclopedia of Biological Chemistry*, v. 4, n.2, p. 157–162, 2013.

CHEN FYS, CHI CW, SHIEH HR, LIN CP, KO CC, CHUNG YC, LAI JCY, TAI HC, CHEN YJ. **Mitomycin C modulates tumor microenvironment and enhances radiosensitivity in rectal cancer.** *Ther Radiol Oncol*, v.3, 2019.

CLOSE DA, JOHNSTON PA. **Detection and impact of hypoxic regions in multicellular tumor spheroid cultures formed by head and neck squamous cell carcinoma cells lines.** *SLAS Discovery : Advancing Life Sciences R & D*, v. 27, p. 39-54, 2022.

CZORNY, Rildo César Nunes *et al.* Fatores de risco para o câncer de próstata: população de uma unidade básica de saúde. **Cogitare Enferm.** São Jose do Rio Preto, p. 1-10. 2017.

DAMIÃO, Ronaldo *et al.* Câncer de próstata. **Revista Hupe.** Rio de Janeiro, p. 80-86. jul. 2016.

DEWJI, S. A. Ionizing Radiation: Discovery and Dose Quantities. **Encyclopedia of Nuclear Energy**, p. 701–715, 1 jan. 2021.

FINCH, G. L., & BURNS-NAAS, L. A. Cancer Chemotherapeutic **Agents.** **Encyclopedia of Toxicology**, n.3, p. 630–64, 2014

FONTANA, Fabrizio; RAIMONDI, Michela; MARZAGALLI, Monica; SOMMARIVA, Michele; GAGLIANO, Nicoletta; LIMONTA, Patrizia. Three-Dimensional Cell Cultures as an In Vitro Tool for Prostate Cancer Modeling and Drug Discovery. **International Journal Of Molecular Sciences**, [S.L.], v. 21, n. 18, p. 6806, 16 set. 2020. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms21186806>.

GAD, S. E. **Mitomycin C.** **Encyclopedia of Toxicology**, p. 354–356, 2014.

GHANBARI-MOVAHED, M., KACELI, T., MONDAL, A., FARZAEI, M. H., & BISHAYEE, A. **Recent Advances in Improved Anticancer Efficacies of Camptothecin Nano-Formulations: A Systematic Review.** **Biomedicines**, v.9, p.480, 2021.

GOLDWASSER F, SHIMIZU T, JACKMAN J, HOKI Y, O'CONNOR PM, KOHN KW, POMMIER Y. **Correlations between S and G2 arrest and the cytotoxicity of camptothecin in human colon carcinoma cells.** *Cancer Research*, v.56, p. 4430–4437, 1996.

INCA. Instituto Nacional do Câncer. Ministério da Saúde. **Estatísticas de câncer:** incidência estimada conforme a localização primária do tumor e sexo. 2020.

Disponível em: <https://www.inca.gov.br/numeros-de-cancer>. Acesso em: 12 nov. 2020.

ISHIGURO T, OHATA H, SATO A, YAMAWAKI K, ENOMOTO T, OKAMOTO K. Tumor-derived spheroids: **Relevance to cancer stem cells and clinical applications**. *Cancer Sci*. 2017 Mar;108(3):283-289. doi: 10.1111/cas.13155. PMID: 28064442; PMCID: PMC5378268.

JEVTIĆ, 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.

LANGHANS, S. A. **Three-Dimensional in Vitro Cell Culture Models in Drug Discovery and Drug Repositioning**. *Frontiers in Pharmacology*, v. 9, 2018.

LEEK, R., GRIMES, D. R., HARRIS, A. L., & MCINTYRE, A. **Methods: Using Three-Dimensional Culture (Spheroids) as an In Vitro Model of Tumour Hypoxia**. *Tumor Microenvironment*, v.899, p. 167–196, 2016

LETEURTRE F, FESEN M, KOHLHAGEN G, KOHN K, POMMIER Y. **Specific interaction of camptothecin, a topoisomerase I inhibitor, with guanine residues of DNA detected by photoactivation at 365 nm**. *Biochemistry*, v. 32, p. 8955–8962, 1993.

LI F, JIANG T, LI Q, LING X. **Camptothecin (CPT) and its derivatives are known to target topoisomerase I (Top1) as their mechanism of action: did we miss something in CPT analogue molecular targets for treating human disease such as cancer?** *American Journal Cancer*, v.12. p. 2350-2394, 2017.

LIMA, Alisson Padilha de et al . Prevalência e fatores associados à realização de exames de câncer de próstata em idosos: estudo de base populacional. **Rev. bras. geriatr. gerontol.**, Rio de Janeiro , v. 21, n. 1, p. 53-59, fev. 2018

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

LUFT, Karolina Kretschmer. **Padronização das condições de adesão células de hiperplasia prostática benigna (HPB) em matrizes tridimensionais**. 2013. 49 f. TCC (Graduação) - Curso de Biomedicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2013.

MARQUES, João Paulo; LOPES, Gisely Cristiny. Alcaloides como agentes antitumorais: considerações químicas e biológicas. **Uningá Review**, v. 24, n. 1, 2015.

MARTINO, E., DELLA VOLPE, S., TERRIBILE, E., BENETTI, E., SAKAJ, M., CENTAMORE, A., COLLINA, S. (2017). **The long story of camptothecin: From traditional medicine to drugs**. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v.27, p. 701–707, 2016.

MENTI, Luiza Deitos. **Modelo De Esferoide Tumoral**: uma abordagem tridimensional para triagem de drogas in vitro. 2021. 36 f. TCC (Graduação) - Curso de Odontologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2021.

MISTRY, I. N., THOMAS, M., CALDER, E. D. D., CONWAY, S. J., & HAMMOND, E. M. **Clinical Advances of Hypoxia-Activated Prodrugs in Combination With Radiation Therapy**. **International Journal of Radiation Oncology Biology Physics**, v.98, 1183–1196, 2017.

MORAIS, Thayz Ferreira Lima. **Desenvolvimento de modelo de cultura celular tridimensional (3d) e de plataforma microfluida de cultura de células para avaliação de viabilidade celular após terapia fotodinâmica**. 2018. 79 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Bioengenharia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, São Carlos, 2018.

MYERS, A. L., ZHANG, Y.-P., KAWEDIA, J. D., ZHOU, X., SOBOCINSKI, S. M., METCALFE, M. J. KAMAT, A. M. **Solubilization and Stability of Mitomycin C Solutions Prepared for Intravesical Administration**. **Drugs in R&D**, v.17, p.297–304, 2017.

NEJADNIK, M. R *et al.* Adsorption of pluronic F-127 on surfaces with different hydrophobicities probed by quartz crystal microbalance with dissipation. **Langmuir**, v. 25, n. 11, p. 6245–6249, 2009.

NAMEKAWA T, IKEDA K, HORIE-INOUE K, INOUE S. **Application of Prostate Cancer Models for Preclinical Study: Advantages and Limitations of Cell Lines, Patient-Derived Xenografts, and Three-Dimensional Culture of Patient-Derived Cells**. *Cells*. 2019 Jan 20;8(1):74. doi: 10.3390/cells8010074. PMID: 30669516; PMCID: PMC6357050.

OKUNO, Emico. Efeitos biológicos das radiações ionizantes: acidente radiológico de goiânia. **Estudos Avançados**, [S.L.], v. 27, n. 77, p. 185-200, 2013. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0103-40142013000100014>.

OLIVEIRA, Artur de Santana. **Desenvolvimento de novos nanocarreadores para liberação controlada de Olanzapina e Camptotecina**. 2018. 141f. Tese (Doutorado em Química) - Centro de Ciências Exatas e da Terra, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2018.

PINO, Eddy Segura; GIOVEDI, Claudia. Radiação ionizante e suas aplicações na indústria. **UNILUS Ensino e Pesquisa**, v. 2, n. 2, p. 47-52, 2013.

REFET-MOLLOF *et al.* **Hypoxic Jumbo Spheroids On-A-Chip (HOnAChip): Insights into Treatment Efficacy. Cancers**, v.13, 2021.

SALEH, Najla Adel. **Cultura Celular Tridimensional**: desenvolvimento de um modelo para avaliação da relação entre o microambiente tumoral e a ação de novos agentes antitumorais. 2017. 112 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Farmacia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2017.

SANTO, Ricardo Pereira. **Resposta Celular à Radiação Ionizante**: estudos in vitro em linhas celulares do carcinoma da próstata humana. 2017. 117 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Bioquímica, Universidade de Coimbra, Coimbra, 2017.

SANTOS, Kelvin Sousa dos. **Desenvolvimento de modelo tridimensional de cultura celular para estudos de interação fungo-hospedeiro**. 2020. 43 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências Farmacêuticas, Biociências e Biotecnologia Aplicadas À Farmácia, Unesp, Araraquara, 2020. Disponível em: <https://repositorio.unesp.br/handle/11449/194156>. Acesso em: 11 nov. 2020.

SANTOS, Jozelia Pereira dos; SOUZA, Anderson Pereira. Considerações sobre o Câncer de Próstata:: revisão de literatura. **Id On Line Multidisciplinary And Psychology Journal**. Brasil, p. 100-115. jan. 2017.

SCHMID, D., JARVIS, G., FAY, F. ET AL. **Nanoencapsulation of ABT-737 and camptothecin enhances their clinical potential through synergistic antitumor effects and reduction of systemic toxicity**. *Cell Death Dis*, v. 10, 2014.

SEKIMOTO, Larissa Satiko Alcantara. **Avaliação de Terapia fotodinâmica em cultivo celular tridimensional de melanoma humano**. 2016. 105 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Física Aplicada, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2016.

SILVA, Ideson Rafael da. **Câncer de próstata na qualidade de vida de homens no Brasil**: revisão integrativa da literatura. 2022. 28 f. TCC (Graduação) - Curso de Enfermagem, Universidade Federal de Pernambuco, Vitória de Santo Antão, 2022.

SONG, X., DILLY, A.-K., CHOUDRY, H. A., BARTLETT, D. L., KWON, Y. T., & LEE, Y. J. Hypoxia **Promotes Synergy between Mitomycin C and Bortezomib through a Coordinated Process of Bcl-xL Phosphorylation and Mitochondrial Translocation of p53**. *Molecular Cancer Research*, v.13, n.12, p. 1533–1543, 2015.

STRESE S., *et al.* **Effects of hypoxia on human cancer cellline chemosensitivity**. *BMC Cancer*, v13, 2013.

TAKAGI, Akimitsu *et al.* Three-dimensional **Cellular Spheroid Formation Provides**
<http://ar.iijournals.org/content/27/1A/45.long>. Acesso em: 11 nov. 2020.

TOLLIS S, Rizzotto A, *et al.* **Chemical Interrogation of Nuclear Size Identifies Compounds with Cancer Cell Line-Specific Effects on Migration and Invasion**. *ACS Chem Biol*. 2022 Mar 18;17(3):680-700. doi: 10.1021/acscchembio.2c00004. Epub 2022 Feb 24. PMID: 35199530; PMCID: PMC8938924.

TSAO YP, D'ARPA P, LIU LF. **The involvement of active DNA synthesis in camptothecin-induced G2 arrest**: altered regulation of p34cdc2/cyclin B. *American Association for Cancer Research*, v. 52, n. 7, p. 1823–1829, 1992

VIEIRA, Elisana Aguiar. **Prevenção Do Câncer De Próstata**. 2013. 91 f. TCC (Graduação) - Curso de Enfermagem, Faculdade Católica Salesiano do Espírito Santo, Vitória, 2013.

YONEDA, K. Y., & CROSS, C. E. **The Pulmonary Toxicity of Anticancer Agents**. *Comprehensive Toxicology*, p. 477–510, 2010.

ZANONI, Michele *et al.* 3D tumor spheroid models for in vitro therapeutic screening: a systematic approach to enhance the biological relevance of data obtained. *Nature*. p. 2-11. jan. 2016.

ZIAEE S, CHU GC, HUANG JM, SIEH S, CHUNG LW. **Prostate cancer metastasis: roles of recruitment and reprogramming, cell signal network and three-dimensional growth characteristics**. *Transl Androl Urol*. 2015 Aug;4(4):438-54. doi: 10.3978/j.issn.2223-4683.2015.04.10. PMID: 26816842; PMCID: PMC4708593.

APÊNDICE

APÊNDICE – Procedimento Operacional Padrão (POP) para geração de esferoides de células de adenocarcinoma humano de próstata – LNCap.

OBJETIVO

Produção de modelo tumoral tridimensional *in vitro* de células de adenocarcinoma humano de próstata, utilizando linhagem estabelecida e sistema de agregação/levitação magnética. Após a produção dos agregados (nomeados “esferoides”), os mesmos são utilizados como modelo de exposição à radiação ionizante e a drogas antitumorais. A viabilidade celular em tais agregados pode ser avaliada por incorporação de corantes fluorescentes e visualização em microscópio de fluorescência, ou por redução de sal de tetrazólio (MTS), avaliado por espectrofotometria.

MATERIAL NECESSÁRIO

Produtos químicos, reagentes, consumíveis ou equipamentos podem ser adquiridos de qualquer fornecedor idôneo, salvo quando indicado o modelo e o fabricante.

Parte 1: Produção de nanopartículas de Fe_3O_4 com capacidade de adsorção a membranas

- Glicina ($C_2H_5NO_2$)
- Hidróxido de sódio (NaOH) em lentilhas
- Solução de hidróxido de sódio (NaOH) 2M (8g NaOH em 100mL de água deionizada)
- Sulfato Ferroso Heptahidratado ($Fe_2SO_4 \cdot 7H_2O$)
- Poli-L-lisina, hidrobrometo, massa molecular > 300.000 (Sigma-Aldrich, P1524)
- Ácido acético glacial
- Água deionizada
- Nitrogênio gasoso (N_2)
- Béquero de vidro (200mL)
- Proveta graduada: 100 e 500mL
- Agitador ultrassônico (banho)
- Agitador magnético
- Barra magnética para agitador
- Garrafa de vidro estéril para estoque de soluções para cultura celular, vidro Pyrex[®], 500mL
- Forno de micro-ondas (doméstico)
- pHmetro de sonda

Parte 2: Produção de placas de cultivo celular antiaderentes.

- Placa de cultivo celular de 96 poços, estéril e com tampa⁽¹⁾
- Pluronic[®] F-127 (Sigma-Aldrich, P2443)
- Isopropanol P.A. (para análise)
- Garrafa de vidro estéril para estoque de soluções para cultura celular, vidro Pyrex[®], 500mL
- Proveta graduada– 500 ou 1000mL
- Balança adequada (resolução em mg)

Parte 3: Cultivo celular em duas dimensões (2D)

- Suspensão de células de adenocarcinoma de cólon humano (LNCap Clone FGC, ATCC® CRL-1740) em meio de cultura celular à escolha
- Meio de cultura celular à escolha ⁽²⁾
- Garrafas plásticas estéreis para cultura celular – 25cm² de área de cultivo
- Tubos plásticos cônicos estéreis para cultura celular – 15mL
- Meio de cultivo celular
- Solução de Tripsina/EDTA (0,05%)
- Pipetas sorológicas plásticas estéreis – 5mL
- Ponteiras plásticas estéreis com ou sem filtro para micropipetadores – 200 e 1000 µL
- Banho-maria a 37° C
- Estufa incubadora (37° C, atmosfera com 5% de CO₂)
- Centrífuga com capacidade para tubos de 15mL e velocidade máxima de 5000 rpm

Parte 4: Produção de cultivos tridimensionais (3D)

- Suspensão de nanopartículas de óxido de ferro produzidas conforme descrito na Parte 1
- Placas de 96 poços produzidas conforme descrito na Parte 2
- Cultivo celular de LNCap em 2D produzido conforme descrito na Parte 3, devidamente preparado em suspensão celular (“single cell suspension”) em meio de cultura estéril
- Placa com 96 ímãs – 96-well Spheroid Drive (Greiner Bio-One, 655830).

PROCEDIMENTO

Produção

Dia 1:

a) Produção de nanopartículas de Fe₃O₄ com capacidade de adsorção a membranas

Protocolo originalmente publicado em:

Bonfim, L., de Queiroz Souza Passos, P., de Oliveira Gonçalves, K. et al. Microwave-mediated synthesis of iron-oxide nanoparticles for use in magnetic levitation cell cultures. *Appl Nanosci* 9, 1707–1717 (2019). <https://doi.org/10.1007/s13204-019-00962-1>

- Dissolver em agitador magnético 0,905 g de sulfato de ferro II hepta hidratado (Fe₂SO₄.7H₂O) e 0,439 g de Glicina (C₂H₅NO₂) em 90 mL de água deionizada desoxigenada pelo borbulhamento de nitrogênio gasoso (N₂) por 15 minutos anteriormente à adição dos reagentes;
- Sob agitação e sob avaliação do pH por um pHmetro de sonda, adicionar vagarosamente por gotejamento a solução de NaOH 2M até a obtenção de pH 12;
- Ajustar o volume para 100mL com água deionizada;
- Transferir para garrafa Pyrex® e levar ao forno de micro-ondas (potência máxima: 930 W) por 2,5 minutos, monitorando possível fervura;

- Lavar o colóide por agregação com ímãs e re suspensão em água deionizada até obtenção de pH próximo a 7;
- Adicionar 15 mL de ácido acético e a solução mantida em ultrassom por 5 minutos para dispersão;
- Separar as nanopartículas com o auxílio de um ímã e adicionar vagarosamente solução de bromidrato de poli-L-lisina a 0,02 µg/mL em água ultrapura a pH 7,0 sob agitação em ultrassom;
- Retirar a solução e ressuspender em 2 mL de água deionizada estéril adicionada para armazenagem em geladeira.

b) Produção de placas de cultivo celular antiaderentes.

- Dissolver Pluronic® F-127 (0,5g / mL) em 2-propanol em banho-maria (37°C) até obtenção de solução completamente cristalina;
- Adicionar 200 µL da solução em cada poço da placa de cultura de 96 poços. Manter a placa fechada em ambiente estéril overnight (14-20 horas) e temperatura ambiente;
- Remover completamente o líquido com pipeta ou bomba sugadora e manter a placa aberta sob luz ultravioleta e ambiente estéril (capela de fluxo laminar) por 30 minutos;
- Fechar a placa e armazenar em temperatura ambiente por até uma semana antes do uso.

c) Cultivo celular em duas dimensões (2D)

Necessária suspensão de células de LNCap em meio de cultura

- Adicionar 10-20µL do colóide de nanopartículas de ferro a 5mL de suspensão celular (esta quantidade de colóide é suficiente para 10⁶ células). Homogeneizar por inversão;
- Centrifugar (5 minutos, 1400 rpm) e ressuspender o *pellet* de células sem descartar a solução. Repetir 3 vezes o procedimento;
- Re suspender mais uma vez e depositar todo o conteúdo numa garrafa de cultura de 25cm²;
- Manter a garrafa em estufa incubadora (37°C, 5% de CO₂) até o dia seguinte

Dia 2:

d) Produção de cultivos tridimensionais (3D)

- Preparar suspensão de células com nanopartícula de acordo com o protocolo do laboratório, utilizando solução de Tripsina/EDTA, Versene®, *cell scraper* ou qualquer outra metodologia;
- Preparar uma suspensão de 8,4x10⁴ células viáveis / mL em 10 mL de meio de cultura, utilizando metodologia vigente no laboratório (azul de tripano, vermelho neutro ou qualquer outra metodologia);
- Posicionar a placa com 96 ímãs – 96-well Spheroid Drive (Greiner Bio-One, 655830) encaixada abaixo da placa tratada com Pluronic® F-127 produzida na Parte 2;
- Pipetar 60 µL da suspensão celular em cada poço, completando 5x10³ células / poço;

- Manter em estufa incubadora por 4 dias, com a placa de ímãs posicionada abaixo da placa de 96 poços por ao menos as primeiras 48 horas após a semeadura.

Experimentação

Após 96 horas em cultivo, verificar por microscopia se os esferoides estão coesos e íntegros. Caso positivo, proceder com a experimentação.

I) Citotoxicidade - Exposição a agentes químicos⁽³⁾

- Diluições de agentes químicos (substâncias-teste) e dos controles positivos e negativos devem ser feitas no mesmo meio de cultura utilizado para a manutenção das células e esferoides;
- As concentrações necessárias devem ser realizadas para que apenas 20 µL de cada agente seja adicionado por poço;
- As incubações devem ser feitas conforme o protocolo utilizado;
- Reagente revelador (MTS, MTT, XTT, NTB, Resazurina, etc.) deve ser adicionado nos poços na concentração recomendada e no volume de apenas 20 µL;
- A citotoxicidade deve ser calculada de acordo com o protocolo escolhido.

II) Análise por microscopia de fluorescência

- Hoechst 33324 (10 µg / mL, Sigma-Aldrich, B2261) e SYTOX[®] Green (5µM, Thermo-Fisher, S7020) devem ser diluídos em meio de cultura num volume de 20 µL / poço;
- Após receber os corantes, os esferoides devem ser incubados a 37° C e 5% de CO₂ por 45 a 90 minutos;
- A observação por microscopia de fluorescência deve ser feita em campo claro e nos comprimentos de onda específicos para excitação e emissão de Hoechst 33324 e SYTOX[®] Green;
- As imagens serão analisadas com *softwares* específicos, (usualmente ImageJ) e avaliarão áreas do esferoide e dos núcleos das células, viáveis ou não (positivas para SYTOX[®] Green), bem como suas quantidades⁽⁴⁾.

NOTAS

(1): Não há modelo ou fabricante específico de placas para este procedimento. No entanto, produtos do fabricante Sarstedt não apresentaram bons resultados de recobrimento por Pluronic[®] F-127 em experimentos prévios realizados no laboratório (até Agosto/2022).

(2): Meios de cultura (e fornecedores) testados com sucesso:

- *RPMI 1640*: Meio RPMI 1640 (Cultilab, Sigma-Aldrich ou Gibco), suplementado com 10% de soro fetal bovino (Cultilab), 0,001% m/v de bicarbonato de sódio (NaHCO₃) e 1% de solução de penicilina (10.000 U / mL) e estreptomicina (10.000 µg / mL), filtrado para esterilização (0,22µm)

- *Opti-MEM™ I Reduced Serum Medium, GlutaMAX™ Supplement (Thermo Fisher, 51985091)* suplementado com 5% de soro fetal bovino (Cultilab) e 1% de solução de penicilina (10.000 U / mL) e estreptomicina (10.000 µg / mL).

(3) Protocolo testado com sucesso:

Os esferoides recebem 2 mg / mL de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -5- (3-carboximetoxifenil) -2- (4-sulfofenil) - 2H-tetrazólio (CellTiter 96® Aqueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay (MTS), Promega) e 0,9% de metossulfato de fenazina (PMS, Sigma-Aldrich, CAS 299-11-6) diluídos em meio de cultura (20 µL / poço). O volume será adicionado e a placa será incubada por 60 a 120 minutos e submetida a análise espectrofotométrica a 490 nm de comprimento de onda em espectrofotômetro de placa (Nota: o laboratório utiliza o equipamento Multiskan EX, Thermo-Scientific). Como controle positivo será utilizado DMSO 5% e negativo 1µL de solução de NaCl 0,9%.

(4) Protocolo de análise de imagens

- Imagens de microscopia de fluorescência (RGB) devem ser tratadas com o software ImageJ versão 1.52 ou superior (<https://imagej.nih.gov/ij/>), com pacote de plugins Fiji (<https://imagej.net/software/fiji/>) pré-instalado;

- Deve ser feita a redução de sinal no fundo das imagens com o comando “Process >> Subtract Background”, sem suavização (parâmetro “Disable Smoothing” habilitado) e “Rolling Ball Radius” ajustado em 50 pixels;

- Após este tratamento, as imagens serão decompostas em seus canais de cor (R, G e B, correspondendo aos canais Vermelho, Verde e Azul, respectivamente). Para os experimentos com Hoechst 33342, a imagem apresentada é resultado da sobreposição dos canais G e B obtidos por excitação por violeta e o canal R obtido com excitação em verde;

- Cada uma das imagens geradas deve ser binarizada com o comando “Process → Binary → Make Binary”, o que produz imagens em apenas duas cores: branco (fundo) e preto (esferoide). Após a binarização, a área (em µm²), o perímetro (em µm) e os parâmetros de circularidade de redondeza devem ser avaliados pelo comando “Analyze → Analyze Particles”.

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
Diretoria de Pesquisa, Desenvolvimento e Ensino
Av. Prof. Lineu Prestes, 2242 – Cidade Universitária CEP: 05508-000
Fone (11) 2810-1570 ou (11) 2810-1572
SÃO PAULO – São Paulo – Brasil
<http://mprofissional.ipen.br>

Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN) é uma Autarquia vinculada à Secretaria de Desenvolvimento Econômico do Governo do Estado de São Paulo e gerida técnica e administrativamente pela Comissão Nacional de Energia Nuclear (CNEN), órgão do Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovações (MCTI) do Governo Federal.