

## Efeitos da Terapia Fotodinâmica associada a fotossensibilizador nanoestruturado em Cultura celular 3D

**Aveline Ventura, Cristina Pacheco Soares, Giulia Capizzani Gonçalves, Vitor Luca Moura Marmo, Sônia Khouri Sibelino, Leandro Raniero.**

Universidade do Vale do Paraíba/Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, Laboratório de Nanossensores, Avenida Shishima Hifumi, 2911, Urbanova - 12244-000 - São José dos Campos SP, Brasil, aveline.ventura@hotmail.com, cpsoares@univap.br, giulia.engquimica@gmail.com, vitorl.mmarmo@gmail.com, skkhour@gmail.com, Iraniero@univap.br.

### Resumo

Dentre os tipos de tratamentos convencionais do câncer, ressalta-se os severos efeitos colaterais, o que indica a necessidade de novas terapias, quando pode-se citar a Terapia Fotodinâmica (TFD). Esta é uma modalidade terapêutica que se destaca pelo baixo nível de toxicidade cumulativa. Um dos métodos que possibilitam o estudo da eficiência da TFD é a cultura celular (2D). Esse procedimento não torna possível mimetizar o modelo *in vivo* de forma autêntica, pois as células possuem uma morfologia em monocamada. Sendo assim, uma alternativa para obter resultados mais coerentes com o modelo *in vivo* é o modelo de cultura celular tridimensional (3D), por permitirem as interações célula-célula e posteriormente por ligações com a matriz extracelular produzida por elas. Neste contexto, este estudo apresenta os resultados dos efeitos da TFD associados a fotossensibilizador nanoestruturados no câncer de mama triplo negativo, sendo o subtipo de pior prognóstico, em cultura 3D. Os testes mostraram resultados muito similares aos estudos *in vivo* publicados na literatura, sendo bastante promissor para alcançar um modelo mais semelhante ao tratamento real.

**Palavras-chave:** Cultura celular. Câncer de mama. Nanomedicina. Terapia Fotodinâmica. Fotossensibilizador.

**Curso:** Graduação - Biomedicina.

### Introdução

Segundo o Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA), o câncer perdura entre as quatro principais causas de morte prematura, representando um problema de importância mundial. Dentre os fatores associados ao aumento da incidência e mortalidade destaca-se o envelhecimento, além do crescimento populacional adjuntos à incorporação de maus hábitos como o sedentarismo, alimentação inadequada, estilo de vida pouco saudável, entre outros. Anualmente, mais de 1,5 milhão de mulheres apresentam diagnóstico positivo para o câncer de mama, sendo 25% de todas as mulheres com esta enfermidade. A metástase desse tumor maligno é responsável por mais de 90% dos óbitos por câncer, tornando o diagnóstico precoce essencial no prognóstico preciso e uma alta taxa de sobrevivência (CHEN et al., 2021; SUN et al., 2017).

Atualmente, os quimioterápicos utilizados no tratamento de tumores malignos apresentam baixa especificidade e alta toxicidade, atingindo células cancerosas e saudáveis. Isso ocorre em virtude da ampla ação destes fármacos, os quais atravessam o endotélio de quase todas as regiões do organismo, vislumbrando a necessidade do aperfeiçoamento de novos métodos terapêuticos (VIEIRA et al., 2017). Nesse âmbito, a nanomedicina tem se destacado em diversas áreas da saúde, com o desenvolvimento de nanomateriais para o aprimoramento dos processos terapêuticos, que visam a redução dos efeitos adversos para os pacientes. Uma das inovações na área da pesquisa é o uso de nanopartículas ou nanossondas funcionalizadas com agentes terapêuticos. Esses sistemas auxiliam no direcionamento de fármacos e toxicidade específicos em células cancerosas, objetivando restringir a terapia em células saudáveis (VIEIRA; GAMARRA, 2016).

Assim, o uso combinado de nanomateriais associados aos conhecimentos da biofísica permite notórios progressos em diversas áreas, como por exemplo, o da oncologia. Desta forma, é possível entender que os nanomateriais podem ser empregados na modulação de processos biológicos,

podendo ser associados a terapias alternativas, como a Terapia Fotodinâmica (TFD). Essa terapia vem sendo estudada como uma alternativa no tratamento do câncer, quando um fotossensibilizador é ativado por uma radiação de comprimento de onda adequado e, na presença de oxigênio, permite produzir espécies reativas capazes de reduzir/eliminar as células tumorais malignas (BAYDA et al., 2020; CONTERA; DE LA SERNA; TETLEY, 2021; PELAZ et al., 2017).

Um dos métodos que possibilita o estudo da eficiência de novas técnicas diagnósticas e terapêuticas é a cultura celular *in vitro*. Esse procedimento envolve o crescimento celular em superfícies planas e sólidas, formando monocamadas em formato bidimensional (2D), no entanto, esse cultivo não torna possível mimetizar o modelo *in vivo* de forma autêntica, isso ocorre, pois, um dos lados da superfície se encontra aderido ao substrato, obrigando as células a assumirem uma morfologia em monocamadas (GONÇALVES et al., 2020, p. 27). Sendo assim, uma alternativa para obter resultados mais coerentes com o modelo *in vivo* é o modelo de cultura celular tridimensional (3D), por serem incapazes de se aderir ao hidrogel, as células interagem entre si, primeiramente por interações célula-célula e posteriormente por ligações com a matriz extracelular produzida por elas. Neste contexto, o objetivo deste estudo foi o cultivo 3D de microtumores da linhagem de câncer de mama triplo negativo e a avaliação da Terapia Fotodinâmica (TFD) associada a um fotossensibilizador (FS) nanoestruturado, constituído por nanopartículas de ouro (AuNPs) funcionalizadas com clorina e6 (Ce6).

## Metodologia

O desenvolvimento deste projeto foi realizado por meio de protocolos estabelecidos no Laboratório de Nanossensores (LNS), disponíveis para execução desta pesquisa. Portanto, foi estudada a influência destes associados a TFD em cultura 3D. A síntese do fotossensibilizador nanoestruturado não fez parte do desenvolvimento deste trabalho.

## Cultura celular 2D e 3D

Inicialmente, foi realizada a cultura celular em monocamadas utilizando a linhagem de adenocarcinoma mamário MDA-MB-468, oriunda do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ). A cultura foi mantida em frascos para cultivos de 25 cm<sup>2</sup> contendo meio de cultura L-15 completo (Leibovitz, Sigma Life Science, L4386), suplementado com 10% (v/v) de Soro Fetal Bovino (Life Technologies, 16000-044). As células foram incubadas a 37 °C em uma atmosfera com 95% de umidade relativa, livre de CO<sub>2</sub>, utilizando uma incubadora com banho-maria de água (ThermoFisher Scientific, série 8000 Water-Jacketed CO<sub>2</sub> Incubator). O meio de cultura foi substituído a cada dois dias, quando o frasco atingiu a confluência, as células foram tripsinizadas com uma solução de Tripsina EDTA a 0,025%, quantificadas na câmara de Neubauer e, em seguida, subcultivadas aproximadamente a cada 15 dias.

A cultura celular tridimensional (3D) foi empregada para formar esferoides da linhagem supracitada. Utilizou-se agarose ultrapura micromoldada (3D Petri Dish®; MicroTissues, Inc.) nas concentrações de 1,5% e 2% em solução de 0,9% NaCl. O gel de agarose foi aquecido a uma temperatura de 60-70°C e, em seguida, pipetado nos micromoldes estéreis. Após a solidificação, os mesmos foram removidos com cuidado e transferidos para as placas de cultivo, que foram expostas à luz UV por 30 minutos para esterilização. Todo o processo foi feito em fluxo laminar, para evitar contaminações. Os micromoldes foram então equilibrados com meio de cultura completo. Após o equilíbrio, as células foram coletadas das garrafas de monocultura com Tripsina-EDTA a 0,025%, centrifugadas a 2000 rpm por 10 minutos, e o pellet foi ressuspenso em meio de cultura. O cálculo da densidade celular foi mensurado por meio da câmara de Neubauer, ajustando a suspensão para 10<sup>5</sup> células/mL, conforme a recomendação para de utilização dos micromoldes. Um volume de 190µL foi adicionado a câmara de semeadura dos moldes, deixando em incubação por aproximadamente 40 dias, quando acontece a formação dos esferoides nas microcavidades.

## Marcação por imunofluorescência

Os esferoides foram submetidos à análise por marcação de imunofluorescência, estes foram fixados com paraformaldeído a 4% durante 15 minutos. Em seguida, lavados com tampão para citoesqueleto (CSK) com pH 6,8, contendo NaCl 0,05 M, sacarose 0,15 M, MgCl<sub>2</sub> 0,03 M, base Trizma 0,05 M e 0,5% de Triton X-100, durante 20 minutos, para aumentar sua permeabilidade. As amostras foram então

incubadas com rodamina-faloidina (1:100) por 1 hora e contrastadas com meio de montagem contendo DAPI. As estruturas do citoesqueleto e núcleo celular foram visualizadas por meio de microscopia confocal. As fotomicrografias foram registradas no microscópio de fluorescência confocal ZEISS LSM 700 laser-scanning (Carl Zeiss AG, Germany), utilizando a objetiva Zeiss Plan-apochromat 63x/1.4 Oil Iris M27.

### Atividade mitocondrial celular

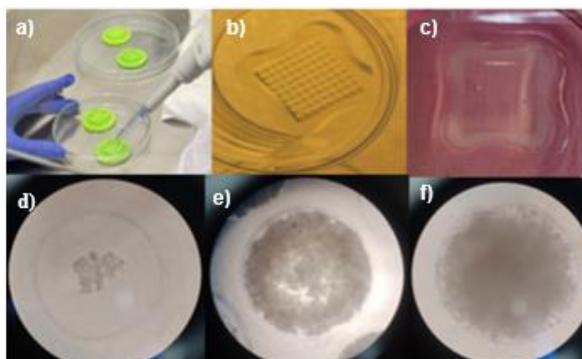
Nestes ensaios foram utilizados os seguintes grupos experimentais: o controle, contendo apenas esferoides; os ensaios de TFD associados a nanopartículas de ouro funcionalizadas com Ce6 (FS), denominados de 1º ensaio e 2º ensaio, que foram feitos de forma independente; os ensaios no escuro, onde os esferoides foram incubados com os FS, mas não foram irradiados para avaliar a atividade mitocondrial, denominados por citotoxicidade 1 e citotoxicidade 2. Portanto, a atividade mitocondrial celular foi avaliada em dois ensaios experimentais independentes, cada ensaio foi realizado em triplicata e sob condições padronizadas e, o método utilizado foi o ensaio colorimétrico MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio, Sigma Aldrich, M5655). Nos micromoldes de agarose, contendo meio de cultura completo, foram adicionados FS a uma concentração de 2 µg/mL e incubado por 2 horas sob condições de cultivo. Após esse período, o meio foi removido, os micromoldes foram cuidadosamente lavados com solução salina tamponada (PBS) e um novo meio completo foi adicionado. Para a irradiação, as placas experimentais foram posicionadas a uma distância de 1,5 cm do LED Irrad-Led (Biopdi), com comprimento de onda de 660 nm e potência de 25 mW, aplicando uma dose de 25 J/cm<sup>2</sup>. Decorridas 20 horas da aplicação da TFD, 50 µL da solução de MTT a 2 mg/mL foi adicionada aos micromoldes, que já continham 140 µL do meio de cultura completo L-15. Os cultivos foram então incubados por 4 horas a 37°C em um ambiente com 95% de umidade e livre de CO<sub>2</sub>, a formação de cristais de formazana ocorreu devido à redução do sal tetrazólio pelas desidrogenases mitocondriais das células metabolicamente ativas. Na etapa final do experimento, os esferoides foram removidos dos micromoldes de agarose e transferidos para placas de 96 poços contendo 600 µL de dimetilsulfóxido (DMSO), que dissolveu os cristais formados. As leituras foram medidas utilizando um espectrofotômetro, e os resultados foram expressos como porcentagem em comparação com os níveis de absorbância dos três poços de controle.

### Resultados

#### Cultivo e desenvolvimento celular 3D

No decorrer de 40 dias, os esferoides foram cultivados e monitorados. A Figura 01 apresenta os passos deste procedimento, desde a fabricação dos moldes até o fim do cultivo dos esferoides. Sendo: 01a) fabricação dos micromoldes, 01b) molde já fabricado com as microcavidades onde as células foram depositadas, e em 01c) o molde está equilibrado em meio de cultura completo. As Figuras 01d), 01e) e 01f) apresentam as fases do desenvolvimento do esferoide ao longo do período de incubação.

Figura 01 - Processo de cultivo dos Esferoides: a) pitagem da agarose nos moldes; b) moldes de agarose; c) micromoldes equilibrados com meio de cultura completo; d) 7 dias de cultivo; e) 20 dias de cultivo; f) 40 dias de cultivo.

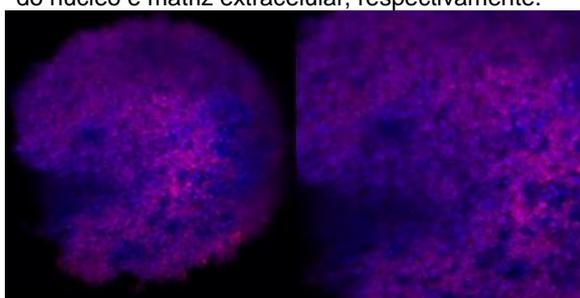


Fonte: A autora, 2024.

### Análise por microscopia de fluorescência confocal

Com o objetivo de avaliar os parâmetros e a formação do cultivo celular 3D, os esferoides foram caracterizados por meio da imunofluorescência, focando-se em proteínas representativas da matriz extracelular (MEC), e proteínas de junção celular. A Figura 02 ilustra a coloração da estrutura celular obtida com o corante rodamina faloidina, que apresenta coloração roxa e marca o citoesqueleto celular. A faloidina é um peptídeo bicíclico derivado do cogumelo venenoso *Amanita phalloides*, amplamente utilizado em técnicas de imagem, devido à sua alta afinidade pelos filamentos de actina. O corante 4,6-diamino-2-fenilindol (DAPI), que exibe coloração azul, é utilizado para identificar o núcleo celular, também sendo altamente empregado em microscopia de fluorescência devido à sua afinidade por regiões ricas em adenina e timina presentes no DNA.

Figura 02 - Esferoide em marcação de imunofluorescência, a coloração azul e roxa apresenta as marcações do núcleo e matriz extracelular, respectivamente.

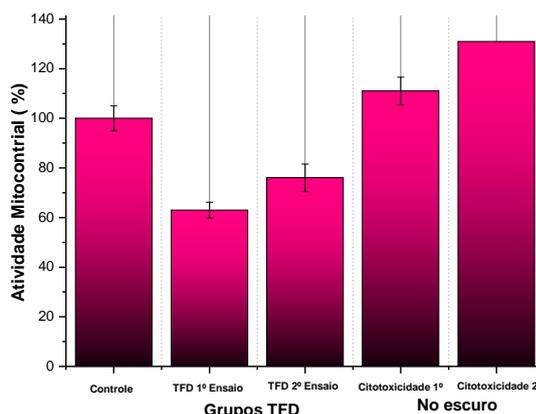


Fonte: A autora, 2024.

### Avaliação da atividade mitocondrial

Os efeitos citotóxicos da TFD nos esferoides foram avaliados utilizando o ensaio colorimétrico de MTT, com um período de incubação de 2 horas, após a aplicação do FS. Este ensaio baseia-se na redução do sal tetrazólio a cristais de formazana por desidrogenases mitocondriais dependentes de NADH, resultando na mudança de cor de amarela para azul escuro. Conforme a norma ISO 10993-5/2009, as substâncias que demonstrarem atividades metabólicas abaixo de 70% em testes *in vitro* são consideradas citotóxicas (INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION, 2009). O gráfico abaixo na Figura 03 apresenta os resultados de dois ensaios, com taxas de 63% e 76% no primeiro e segundo ensaio experimental, respectivamente. Estes resultados indicam um potencial citotóxico apenas no primeiro teste. Além disso, o gráfico inclui os dados das amostras não irradiadas (no escuro), cujas análises também estão conforme a norma mencionada, que determina que a viabilidade das amostras seja igual ou superior à do grupo controle.

Figura 03: Gráfico dos resultados do ensaio de MTT para os grupos experimentais de esferoides: controle, apenas os esferoides; TFD feitos em dois ensaios independentes; no escuro, dois ensaios independentes.



Fonte: A autora, 2024.

## Discussão

Importante ressaltar que o cultivo celular 3D tem resultados mais promissores que os da cultura 2D, pois permite uma resposta farmacológica mais próxima ao ambiente *in vivo*. Entretanto, o cultivo 3D é bastante laborioso e dispendioso, pois é necessário a utilização de micromoldes, agarose de alta pureza e, a formação do microtumor acontece em aproximadamente 40 dias, que exige mais cuidado no preparo e manutenção da cultura para evitar contaminações por bactéria ou fungos. A formação de esferoides ocorre em células derivadas de diversos subtipos de câncer, incluindo carcinomas mamários. Esse fenômeno motivou o início de pesquisas para explorar semelhanças entre esses esferoides *in vitro* e os modelos encontrados *in vivo*, desta forma, este estudo buscou otimizar os parâmetros de cultivo celular 3D, utilizando a técnica de fabricação de micromoldes de agarose. Esta técnica permitiu a formação de esferoides ao evitar a adesão celular nas paredes dos micromoldes (AMARAL, 2010). Conforme o tempo do cultivo aumentava, observou-se um crescimento progressivo dos esferoides, indicando uma proliferação celular contínua. Esta primeira etapa experimental confirmou a eficácia da otimização do método de cultivo, uma vez que os resultados demonstraram a viabilidade dos esferoides formados.

Conforme descrito por (CORRÊA, 2015), a microscopia confocal utiliza a iluminação por varredura a laser para examinar estruturas biológicas, que comumente são tratadas ou marcadas com compostos fluorescentes. Alguns fluoróforos excitados por luz ultravioleta (UV) podem também ser ativados por comprimentos de onda dentro do espectro da luz visível. Dentro destes parâmetros estão os marcadores Rodamina/Faloidina e DAPI, para identificar proteínas estruturais e de formação da MEC. Sendo assim, após emprego da imunofluorescência para técnica de filamentos de actina, a fluorescência azul destacou o núcleo das células, simultaneamente, a fluorescência vermelha destacou as características do citoesqueleto. Estes achados indicam que os esferoides cultivados exibiram características morfológicas apropriadas.

O ensaio MTT foi utilizado para avaliar a variação da atividade mitocondrial após a TFD e na ausência da irradiação (grupos, no escuro). Embora exista informações controversas sobre a interpretação dos resultados deste ensaio (GHASEMI, Mahshid et al., 2021), pode-se citar um estudo recente que utiliza o ensaio como forma de avaliar a viabilidade celular, publicado na Nature, Scientific Reports em 2024 (TALEBPOUR, A. et al., 2024). Neste contexto, este ensaio foi utilizado para avaliar os resultados da TFD associadas ao FS em esferoides, mas cabe ressaltar que a padronização de parâmetros é fundamental para obter resultados confiáveis, quando pode-se destacar fatores como o número de células, a concentração de MTT, o tempo de incubação e a medição óptica (GHASEMI, Mahshid et al., 2021).

De acordo com (VIEIRA, 2023), a Ce6 tem demonstrado efeitos colaterais reduzidos em comparação com os fotossensibilizadores convencionais baseados em hematoporfirina. Neste contexto, a combinação de AuNPs funcionalizadas com Ce6 e EGF (nanossonda) tem apresentado melhorias nos resultados experimentais da terapia fotodinâmica. De modo correspondente, um estudo realizado por (DOS SANTOS JESUS et al., 2022) relata condições experimentais em que a aplicação das nanossondas em cultivo celular 2D demonstrou redução significativa na atividade mitocondrial celular. No entanto, a mesma técnica, quando analisada *in vivo*, evidencia que após uma única aplicação não houve redução no volume do tumor nos camundongos, contudo, foi possível observar lesões necróticas na superfície tumoral comprovando a eficácia da TFD.

Neste estudo os experimentos revelaram uma média de 69% na atividade mitocondrial, indicando citotoxicidade dentro dos parâmetros estabelecidos pela norma ISO 10993-5/2009, esta observação é muito similar aos resultados obtidos na TFD *in vivo*, quando a TFD deve ser administrada mais de uma vez para eliminação do tecido tumoral. Em contraste, as amostras não irradiadas apresentaram um aumento significativo na atividade mitocondrial, com valor médio de 121% em comparação com as amostras do grupo controle, mostrando ausência de citotoxicidade no escuro.

## Conclusão

Inicialmente, foram realizados ensaios para avaliar a estabilidade dos micromoldes e o desenvolvimento dos esferoides, após a absorção do meio de cultura completo. A condição geral dos esferoides foi então avaliada por meio de imunofluorescência, demonstrando resultados promissores. Em experimentos subsequentes, a TFD foi aplicada para investigar seu impacto sobre a atividade mitocondrial celular. O grupo controle (escuro) não apresentou evidência de citotoxicidade, sendo um

bom resultado. Quanto aos grupos TFD, os resultados mostraram uma diminuição da atividade mitocondrial, mas mostrando que uma única aplicação não é suficiente para erradicação do microtumor. Este resultado é similar aos estudos *in vivo* publicados na literatura, sendo um resultado promissor para alcançar um modelo mais semelhante ao tratamento real. No entanto, é necessário mais estudos e a utilização de outros ensaios biológicos para uma avaliação mais completa sobre os impactos da TFD.

## Referências

- AMARAL, Jonatas Bussador do. **Células MCF-7 como modelo 3D no estudo de câncer de mama humano**. 2010. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.
- BAYDA, Samer et al. The history of nanoscience and nanotechnology: from chemical–physical applications to nanomedicine. **Molecules**, v. 25, n. 1, p. 112, 2019.
- CHEN, Xishan et al. Prognostic role of EGFR/p-EGFR in patients with nasopharyngeal carcinoma: a meta-analysis. **Frontiers in Oncology**, v. 11, p. 697369, 2021.
- CONTERA, Sonia; BERNARDINO DE LA SERNA, Jorge; TETLEY, Teresa D. Biotechnology, nanotechnology and medicine. **Emerging Topics in Life Sciences**, v. 4, n. 6, p. 551-554, 2020.
- CORRÊA, Jose R. **Microscopia Confocal Básica**. 2015. Tese de Doutorado. Universidade de Brasília.
- DOS SANTOS JESUS, Viviane Paula et al. Triple-negative breast cancer treatment in xenograft models by bifunctional nanoprobe combined to photodynamic therapy. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 38, p. 102796, 2022.
- GHASEMI, Mahshid et al. The MTT assay: utility, limitations, pitfalls, and interpretation in bulk and single-cell analysis. **International journal of molecular sciences**, v. 22, n. 23, p. 12827, 2021.
- GONÇALVES, Juan Carlos Ramos; SOBRAL, Marianna Vieira. Cultivo de células: da teoria à bancada. **Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa. EDITORA UFPB**, 2020.
- PELAZ, Beatriz et al. Diverse applications of nanomedicine. **ACS nano**, v. 11, n. 3, p. 2313-2381, 2017.
- SUN, Yi-Sheng et al. Risk factors and preventions of breast cancer. **International journal of biological sciences**, v. 13, n. 11, p. 1387, 2017.
- TALEBPOUR, A. et al. **Facilitating long-term cell examinations and time-lapse recordings in cell biology research with CO2 mini-incubators**. Sci Rep 14, 3418 (2024).
- VIEIRA, D. B.; GAMARRA, L. F. Advances in the use of nanocarriers for cancer diagnosis and treatment, Einstein (Sao Paulo) 14 (2016) 99–103.
- VIEIRA, L. et al. Synthesis and characterization of gold nanostructured chorin e6 for photodynamic therapy. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 18, p. 6-11, 2017.
- VIEIRA, Paula Fonseca Antunes Vieira. **Aplicação de bionanossensor para diagnóstico da superexpressão do EGFR *in vitro***. 2023. Dissertação de Mestrado. Universidade do Vale do Paraíba – UNIVAP.

## Agradecimentos

Os autores agradecem ao CNPq, o suporte financeiro concedido por meio do projeto nº 302158/2022-7.