



INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES

Mestrado Profissional em Tecnologia das Radiações em Ciências da Saúde

Desenvolvimento de modelo de cultivo celular tridimensional para estudos *in vitro* de adenocarcinoma intestinal

LARISSA DA SILVA GUIMARÃES

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 Processos de Radiação na Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Daniel Perez Vieira

São Paulo

2022

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES

Mestrado Profissional em Tecnologia das Radiações em Ciências da Saúde

Desenvolvimento de modelo de cultivo celular tridimensional para estudos *in vitro* de adenocarcinoma intestinal

LARISSA DA SILVA GUIMARÃES

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 Processos de Radiação na Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Daniel Perez Vieira

São Paulo

2022

Fonte de Financiamento: Próprio

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

Como citar:

GUIMARÃES, L. d. S. . ***Desenvolvimento de modelo de cultivo tridimensional para estudos in vitro de adenocarcinoma intestinal***. 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).

Guimarães, Larissa da Silva

Desenvolvimento de modelo de cultivo tridimensional para estudos in vitro de adenocarcinoma intestinal / Larissa da Silva Guimarães; orientador Daniel Perez Vieira. -- São Paulo, 2022.

45 f.

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

1. Esferoide. 2. Adenocarcinoma intestinal. 3. HT29-MTX.
I. Vieira, Daniel Perez, orient. II. Título.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Autora: Larissa da Silva Guimarães

Título: Desenvolvimento de modelo de cultivo celular tridimensional para estudos in vitro de adenocarcinoma intestinal

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do Grau de Mestre pelo programa de Pós-Graduação Stricto-Sensu – Mestrado Profissional de Tecnologia das Radiações na Saúde ao IPEN-CNEN/SP na área de concentração de Processos de Radiação na Saúde.

Data: 27/07/2022

Banca Examinadora

Prof.Dr. Daniel Vieira Perez (Orientador)

Instituição: IPEN

Julgamento: Aprovado

Prof. Dr. Orlando Rodrigues Junior

Instituição: IPEN

Julgamento: Aprovado

Dra. Ana Eduarda Zulim de Carvalho

Instituição: Instituto Butantan

Julgamento: Aprovado

Prof. Dr. Patrick Jack Spencer (suplente)

Instituição: IPEN

Dra. Eliza Higuti Sousa (suplente)

Instituição: Instituto Butantan

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha família, por sempre apoiar meus sonhos, por sempre acreditar em mim, na minha força e capacidade de chegar até aqui, tudo isso é por vocês.

Agradeço à família Cissoto Ramos, por ter me recebido de braços abertos, por ter me dado tanto amor e carinho nessa caminhada, vocês foram essenciais pra que eu chegasse até, especialmente Débora Cissoto.

Agradeço ao meu orientador, que foi sempre incansável em me dar todo o suporte intelectual que precisei, e a todos os amigos do CEBIO, Léo, Giovanna, Ana, May, Alex e Camila.

Por fim, agradeço a IPEN pela oportunidade de ouro em fazer parte deste programa de mestrado.

RESUMO

A prevalência dos cânceres do trato gastrointestinal vem aumentando nos primeiros anos do século XXI na população brasileira. Há a necessidade de ampliar os estudos desta patologia, sobretudo num contexto de cultivo celular tridimensional, que possibilita a formação de modelos celulares que emulem, mesmo que minimamente, a fisiologia dos tecidos ou tumores *in vivo*. O trabalho pretendeu padronizar a produção de agregados celulares (esferoides) de células de adenocarcinoma intestinal (HT29-MTX) utilizando técnicas de levitação magnética. Esferoides formados desta forma, foram avaliados por microscopia de fluorescência e os parâmetros morfológicos foram comparados. Os experimentos mostraram a possibilidade de formação de tais agregados celulares e sua manutenção *in vitro*.

Palavras chave: Esferoide, adenocarcinoma intestinal, HT29-MTX.

ABSTRACT

The prevalence of cancers of the gastrointestinal tract has been increasing in the first years of the 21st century in the Brazilian population. There is a need to expand the studies of this pathology, especially in a context of three-dimensional cell culture, which allows the formation of cell models that emulate, even if minimally, the physiology of tissues or tumors *in vivo*. The work aimed to standardize the production of cell aggregates (spheroids) of intestinal adenocarcinoma cells (HT29-MTX) using magnetic levitation techniques. Spheroids formed in this way were evaluated by fluorescence microscopy and morphological parameters were compared. The experiments showed the possibility of formation of such cell aggregates and their maintenance *in vitro*.

Keywords: Spheroid, intestinal adenocarcinoma, HT29-MTX.

Sumário

1	INTRODUÇÃO.....	8
2	OBJETIVO.....	12
2.1	Geral.....	12
2.2	Específicos.....	12
3	JUSTIFICATIVA.....	13
4	REVISÃO DE LITERATURA.....	14
4.1	Adenocarcinoma intestinal.....	14
4.2	Linhagem HT29-MTX.....	15
5	MATERIAL E MÉTODOS.....	16
5.1	Cultura celular.....	16
5.2	Produção de nanopartículas de magnetita (Fe ₃ O ₄).....	16
5.3	Adsorção de nanopartículas de magnetita na superfície das células HT29-MTX.....	16
5.4	Produção de esferoides.....	17
5.5	Ensaio de microscopia de fluorescência.....	18
5.6	Análise e edição de imagens.....	19
5.7	Tratamento com agentes quimioterápicos e Ensaio de citotoxicidade.....	20
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	22
6.1	Cultura de HT29-MTX com nanopartículas de óxido de ferro.....	22
6.2	Avaliação dos esferoides por microscopia de fluorescência.....	23
6.3	Avaliação da viabilidade dos esferoides.....	25
6.4	Avaliação dos esferoides após irradiação.....	29
7	CONCLUSÕES.....	36
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	37
	APÊNDICE A.....	48
	APÊNDICE B.....	49
	APÊNDICE C.....	55

1 INTRODUÇÃO

Modelos de cultivo celular *in vitro* tradicionais, baseados majoritariamente em cultivos em monocamada, vem sendo comparados com sistemas celulares cuja construção permite a organização tridimensional das células. Assim, as interações entre as células são favorecidas e aumentam as possibilidades de formação de nichos que imitem a (ou se aproximem da) distribuição espacial natural de tecidos. A disposição das células em três dimensões proporciona certa dispersão de forças mecânicas que se relacionam com sua morfogênese (PAPUSHEVA; HEISENBERG, 2010). Em outros termos, pode-se considerar que o comportamento fisiológico de um agrupamento celular é resultante não só do tipo celular em questão, mas também, da organização espacial dessas células (GALLE ET AL., 2006) e também da distribuição das zonas de comunicação existentes nas suas superfícies (MANZ; GROVES, 2010).

No processo de desenvolvimento de novas drogas, observa-se baixo percentual de sucesso apesar de muitas moléculas apresentarem significativa atividade antitumoral em ensaios pré-clínicos. De fato, o que se observa é que menos de 5% das moléculas com efeito antitumoral *in vitro* demonstram capacidade antitumoral em ensaios clínicos (HUTCHINSON; KIRK, 2011). Este fenômeno é atribuído à incapacidade dos modelos bidimensionais de simularem adequadamente a fisiologia tumoral (HICKMAN ET AL., 2014).

Algumas metodologias são capazes de criar agrupamentos tridimensionais de células e estão em desenvolvimento. A forma mais simples de cultivo de tais agrupamentos é constituída pela deposição das células em substratos cuja carga elétrica seja não-adesiva ou repelente às células. Tradicionalmente, a cobertura de placas ou garrafas de cultura com agarose permite a formação de esferoides, que são agregados celulares com formato característico (KUWASHIMA ET AL., 1993). Esferoides também podem ser formados em garrafas rotativas, cujo movimento impede a adesão das células no substrato, causando a agregação celular (SONG ET AL., 2004). Além da

organização em esferoides, as células podem ser cultivadas em substratos porosos (*scaffolds*), compostos de polímeros biocompatíveis (JANORKAR, 2010), organizados em redes compostas por derivados do ácido hialurônico (VINDIGNI ET AL., 2009), fibroína (GOTOH ET AL., 2004), hidrogéis de alginato (BALAKRISHNAN; JAYAKRISHNAN, 2005) ou polietilenoglicol (PEG) (UNDERHILL ET AL., 2007), entre outras técnicas possíveis (NATH; DEVI, 2016).

Uma alternativa para o cultivo tridimensional, é a levitação de células cultivadas na interface ar-líquido (SOUZA ET AL., 2010). A suspensão das células se dá pela internalização de micropartículas paramagnéticas biocompatibilizadas (JEONG ET AL., 2016) ou pela adesão de nanopartículas na superfície celular (HAISLER ET AL., 2013; SENSENIG et al., 2012; SOUZA ET AL., 2006, 2008, 2010).

Sem induzir toxicidade significativa nas células, o cultivo por levitação magnética pode produzir esferoides de até vários milímetros de diâmetro e mantidos por até quatro semanas em cultura (JEONG ET AL., 2016), em escala de tempo e dimensões físicas impraticáveis em cultivos bidimensionais. Sua estrutura e sua capacidade de manutenção em cultivo tornam os esferoides candidatos a análises prolongadas em relação às usuais 4 ou 24 horas de exposição a compostos-teste. São, portanto, adequados modelos para estudos *in vitro* de tumores.

De acordo com as estimativas do Instituto Nacional do Câncer (INCA) para 2020, eram esperados aproximadamente 320.000 novos casos de neoplasias (exceto pele não melanoma), e entre estes, 40.990 (17,70%) seriam casos de câncer de cólon e /ou reto. (20.470 em mulheres e 20.520 em homens). É o segundo tipo mais frequente entre as mulheres e o terceiro mais comum entre os homens e, no geral, é o terceiro tipo de câncer mais prevalente no Brasil, ficando atrás apenas de próstata e mama. A incidência da doença está relacionada diretamente à idade, dieta, estilo de vida, sedentarismo e fatores hereditários.

Entre os tipos de tumores intestinais, há os adenocarcinomas, os carcinóides, os estromais gastrointestinais (GIST), e os linfomas e sarcomas. A maioria dos casos (cerca de 95%) é do tipo adenocarcinoma (NEGOI ET AL., 2015). A origem de tais tumores é costumeiramente associada à aparição de pequenos pólipos, daí a sua importância como achado endoscópico típico. Há então o acúmulo de transformações malignantes nas células destes aglomerados, até a evolução para o estágio de adenocarcinoma. Instala-se então a fase sintomática, com sangramentos pela mucosa, fraqueza, anemia e diversas alterações na composição das fezes (KHARARJIAN ET AL., 2019). O tratamento destes cânceres é baseado na remoção cirúrgica de áreas afetadas, especialmente quando no cólon (WU ET AL., 2013).

Ainda assim é protocolar a utilização de quimioterapia baseada em agentes citotóxicos como capecitabina, 5-fluoracil, irinotecano, bevacizumabe, cetoximabe panitumumabe (MÁRMOL ET AL., 2017). Embora existam vários tipos de tratamentos disponíveis envolvendo a combinação de cirurgia e quimioterapia, essas estratégias terapêuticas apresentam algumas desvantagens. Por exemplo, a cirurgia não é efetiva em casos de metástases e o tratamento quimioterápico pode levar à resistência, além da baixa especificidade, que pode atingir células saudáveis e provocar muitas reações indesejáveis e até mesmo fatais para o paciente (MATHIJSEN ET AL., 2014).

É importante a introdução de melhorias que permitam a produção de modelos *in vitro* que representem melhor tais patologias, com o intuito de melhorar a avaliação experimental de drogas antitumorais e assim, aumentar as chances de sobrevivência de pacientes acometidos.

Há modelos de cultivos tridimensionais em esferoides que visam a produção de sistemas-teste dedicados aos estudos dos cânceres intestinais usando linhagens estabelecidas (FAN ET AL., 2011; RIEDL et al., 2017) ou células primárias de pacientes acometidos (JEPPESEN ET AL., 2017; MIYOSHI ET AL., 2018). Há estudos que avaliaram os efeitos tóxicos de fármacos diversos (ACHARYA ET AL., 2020) e das radiações (BRÜNINGK ET AL., 2020), ou em

conjunto (KARLSSON ET AL., 2019; PONNURANGAM ET AL., 2012). Embora relativamente bem estudados, tais modelos possuem complexidades variáveis, sendo desejável a padronização de um modelo de baixo custo e fácil realização.

2 OBJETIVO

2.1 Geral

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

2.2 Específicos

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

Avaliar a ação de dois fármacos consagrados (camptotecina e mitomicina C) em esferoides de células de adenocarcinoma de cólon no que se refere à mortalidade celular, e comparação com os mesmos efeitos em culturas bidimensionais.

3 JUSTIFICATIVA

Conforme descrito, o número de casos de cânceres do trato digestivo encontra-se em expansão. É importante que sejam direcionados esforços para estudos de cânceres além dos mais estudados (mama e próstata), 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 colorretais, oferecendo um modelo simples e factível de produção de microtumores *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 microtumores 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 Adenocarcinoma intestinal

O câncer de cólon e reto é aquele que se inicia na parte do intestino grosso (chamada cólon) e no reto (final do intestino) e também no ânus. A maioria desses tumores inicia-se a partir de pólipos, que são lesões benignas que podem crescer na parede interna do intestino grosso (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER, Brasil). Grande parte dos cânceres colorretais são adenocarcinomas, e se iniciam nas células mucosas responsáveis por lubrificar o interior do cólon e do reto, e além do adenocarcinoma, existem outros tipos de câncer que acometem essa porção do intestino, sendo alguns eles, os tumores carcinoides, que costumam se originar nas células produtoras de hormônios no intestino delgado ou grosso; o tumor estromal gastrointestinal (GIST), que é um tipo de tumor raro no cólon e se origina nas células presentes na parede dos órgãos do trato digestivo, chamadas de células intersticiais de Cajal que são responsáveis por enviar os sinais de contração e relaxamento que guiam os alimentos e líquidos ao longo do intestino; os linfomas, que ocorrem nas células do sistema linfático, começam principalmente nos gânglios, mas também podem acontecer no cólon, reto e outros órgãos; e o sarcoma, que geralmente tem início nos vasos sanguíneos, tecidos muscular ou conjuntivo, mas que também podem se originar no cólon ou reto. (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2020).

Segundo dados do Instituto Nacional de Câncer (INCA), esse é o terceiro tipo mais frequente em homens, o segundo entre as mulheres, e o terceiro mais incidente na população geral, ficando atrás somente dos casos de próstata e mama. A estimativa é de que quase 41 mil casos novos sejam diagnosticados no Brasil no triênio 2020/2022. A tendência no aumento no número de casos gera preocupação em investir na atenção primária e detecção precoce para reduzir a incidência e mortalidade da doença no Brasil, a estimativa é que até 2030 o número de casos triplique em homens e mulheres (INCA).

Os principais fatores que podem ser responsáveis pelo aumento do risco de desenvolver câncer de cólon e reto, estão intimamente ligados ao estilo

de vida, inatividade física, obesidade, consumo excessivo de carne vermelha ou alimentos ultraprocessados, abuso de álcool, tabagismo e alimentação pobre em alimentos ricos em fibras, fatores hereditários e condições genéticas também aumentam os riscos para o desenvolvimento da doença (MARLEY AR, NAN H, 2016).

4.2 Linhagem HT29-MTX

A linhagem celular de adenocarcinoma do cólon, HT29, foi originalmente isolada de um tumor primário humano em 1964, e é um tipo celular que retém características das células de origem, constituindo-se como modelo ideal para estudar mecanismos e aspectos moleculares da tumorigênese (MARTÍNEZ-MAQUEDA, D., MIRALLES, B., RECIO, I., 2015).

Um dos diferenciais dessa linhagem celular é a sua capacidade de produzir mucina em um nível relativamente alto. A adaptação gradual de células HT29 à concentrações crescentes de metotrexato (MTX) resulta, após uma fase de alta mortalidade, no surgimento de células diferenciadas secretoras de muco (LESUFFLEUR ET AL. 1990), como acontece em outras condições de estresse metabólico, como privação de glicose e produção de ácido láctico, fazendo com que essas células *in vitro* tenham comportamento semelhante ao *in vivo* e sejam ideais para produção de esferoides.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Cultura celular

Células de adenocarcinoma retal humano, linhagem HT29-MTX (ECACC HT29-MTX-E12 12040401), foram cultivadas em frascos de cultura celular de 25 cm² contendo meio RPMI 1640 (Sigma-Aldrich) suplementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino (Cultlab), e 1% (v/v) de solução de antibióticos (10.000 UI/ml de penicilina, 10 mg/ml de estreptomicina, Gibco) e mantidas em uma incubadora a 37°C, 5% de CO₂, com umidade controlada. O meio foi substituído por alíquotas frescas (5 mL) a cada 48 horas em cultivo. . Ao atingir a confluência entre 60-70%, as células foram lavadas com solução salina-fosfato tamponada (PBS), pH 7,4, estéril, com 0,05M de EDTA e destacadas com solução de tripsina-EDTA (Gibco).

5.2 Produção de nanopartículas de magnetita (Fe₃O₄)

Nanopartículas de magnetita com capacidade de adsorção pelas membranas das células são produzidas rotineiramente no Laboratório de Radiobiologia do Centro de Biotecnologia (CEBIO) do IPEN de acordo com modificações de protocolo estabelecido pelo grupo (BONFIM et al., 2019). Após crescimento dos cristais em meio alcalino, as partículas foram recuperadas com o auxílio de um ímã, protonadas por banho em ácido acético sob ultrassonicação e posterior adsorção de poli-L-lisina (pH 7,4). O colóide foi mantido a 4°C até o momento de uso.

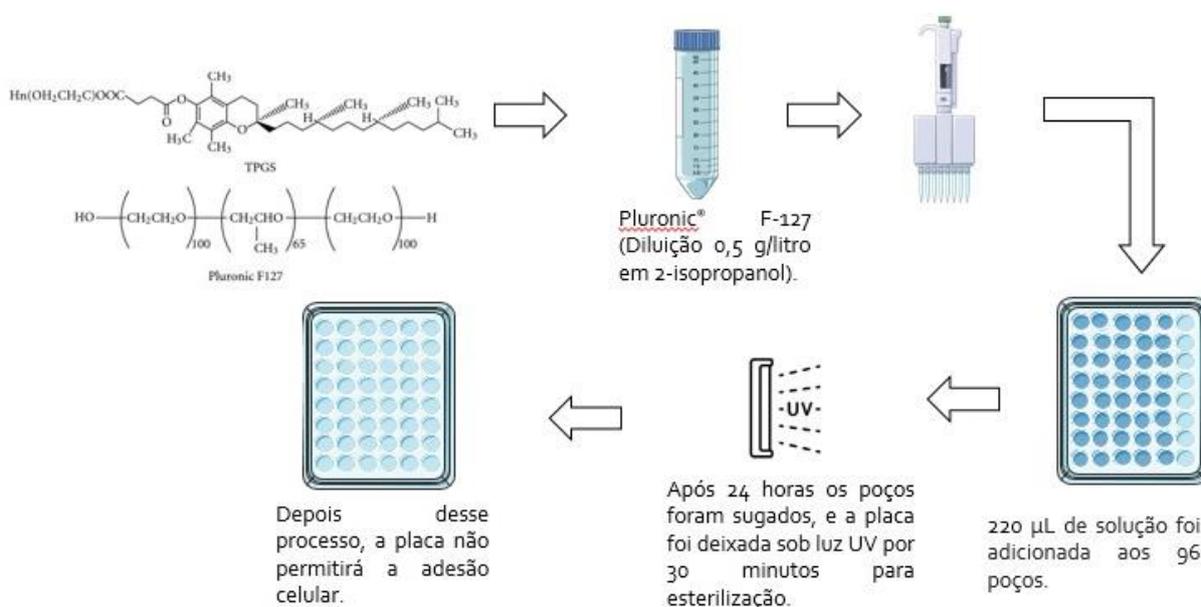
5.3 Adsorção de nanopartículas de magnetita na superfície das células HT29-MTX

A suspensão foi adicionada na proporção 0,012M de Fe (aproximadamente 20µL) para cada 2x10⁶ células em suspensão. As células foram centrifugadas (1500 rpm por 5 minutos) e ressuspendidas três vezes em meio de cultura com nanopartículas. Após este procedimento, foram mantidas em estufa incubadora por 24 horas conforme descrito.

5.4 Produção de esferoides

Placas de cultura celular de 96 poços foram pré-tratadas com solução de Pluronic® F-127 (0,5g / mL em 2-propanol). Cada poço recebeu 220 µL da solução e permaneceu em temperatura ambiente por 24 horas. Após este período, o líquido foi retirado por sucção e as placas foram postas para secagem em capela de fluxo laminar estéril e sob irradiação UV 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) 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 arranjados em placa plástica comercial (*Magnetic Drive, Greiner BioOne*).

Figura 1 – Fluxograma da adição de Pluronic® F- 127 à placa de 96 poços.



Cada um dos 96 ímãs cilíndricos do arranjo tem 1,5 mm de diâmetro, produzindo campos magnéticos individuais que incidem em cada um dos poços. 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. Versões alternativas deste experimento foram realizadas utilizando placas de 24 poços tratados com 2200µL de Pluronic® F-127, e 5×10^5 células em 2mL de meio de cultura.

5.5 Ensaios de microscopia de fluorescência

Após sete dias em cultura, esferoides foram corados com solução de Hoescht 33342 (10µg/mL) ou laranja de acridina (10µg/mL) em meio de cultura por 60 minutos a 37°C. Após 30 minutos foi adicionada solução de brometo de etídio (2µg/mL). O material foi visualizado nos aumentos 4, 10 ou 20X, dependendo do experimento, no microscópio Nikon Ts100 existente na Sala de Cultura Celular I do Centro de Biotecnologia (CEBIO/IPEN). Os esferoides foram fotografados com luz branca e excitação em violeta (evidenciando todos os núcleos em azul, marcados pelo Hoescht 33342) e em verde (evidenciando os núcleos de células inviáveis em vermelho, marcados pelo brometo de etídio), ou em azul, conforme especificado a seguir.

A proporção entre núcleos marcados em azul e em vermelho foi um parâmetro semi-quantitativo de viabilidade das células do esferoide. Também foram realizadas aquisições de imagens pelo equipamento *INCell Analyzer 2500 HS* (Cytiva Lifesciences) presente no Laboratório de Microscopia do CEBIO. Pilhas (“*stacks*”) de no mínimo 20 imagens (eixo de profundidade; z) com espaçamento máximo de 10µm foram adquiridas para o registro das emissões do Hoechst 33342 (Sigma-Aldrich, “azul”), SYTOX® Green (Thermo Fisher, “verde”) e campo claro (discriminado pelo software de aquisição como “laranja”). A incorporação de Hoechst 33342 foi utilizada como marcadora pan-nuclear, aproveitando a capacidade do corante em se associar ao DNA dupla-fita de qualquer tipo. SYTOX® Green só é permeável a membranas de células

despolarizadas e, portanto, inviáveis, sendo utilizado como marcador de células mortas.

5.6 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. Após 3 e 6 dias de incubação, 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 pelo plugin “*3D Objects Counter*” (<https://imagej.net/plugins/3d-objects-counter>) no canal que capturou o sinal dos núcleos marcados com SYTOX® Green (células inviáveis) para a quantificação do número de células mortas em cada uma das aquisições.

O canal de aquisição do sinal de Hoechst 33342 foi tratado com o comando “*Image → Adjust → Threshold*” para delimitação apenas da área do esferoide, excetuando-se as regiões do fundo do material. Após este

procedimento, as imagens foram binarizadas com o comando “*Process → Binary → Make Binary*”, o que produziu imagens em apenas duas cores: branco (fundo) e preto (esferoide). Após binarização, a área (em μm^2), o perímetro (em μm) e os parâmetros de circularidade e redondeza foram avaliados pelo comando “*Analyze → Analyze Particles*”. 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%.

Preparação para visualização/apresentação: 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 em página impressa. As figuras foram organizadas em tábuas utilizando o *software* GIMP versão 2.10 (<https://www.gimp.org/>). Adicionalmente, as “*stacks*” das aquisições em verde foram renderizadas em projeções tridimensionais com o comando “*Image → Stacks → 3D Project*”, com interpolação entre as camadas. Os arquivos renderizados foram armazenados como vídeos em contêineres extensão .AVI, sem compressão a 7 fps (frames por segundo).

5.7 Tratamento com agentes quimioterápicos e Ensaios de citotoxicidade

Mitomomicina C 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 mitomomicina C possui uma IC₅₀ (concentração inibitória de 50%) de 0,0607 μM , e a camptotecina 0,1172 μM . Os esferoides foram incubados por 24 horas com o fármaco nestas concentrações. Após este período, foram avaliados por espectrofotômetro em absorvância de 490nm.

Como controle negativo, uma solução de NaCl estéril foi utilizada de forma a adicionar o sal em meio de cultura na concentração 0,045%. Solução de dimetilsulfóxido (DMSO) a 20% em meio de cultura foi utilizada como controle positivo.

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 (metosulfato 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.

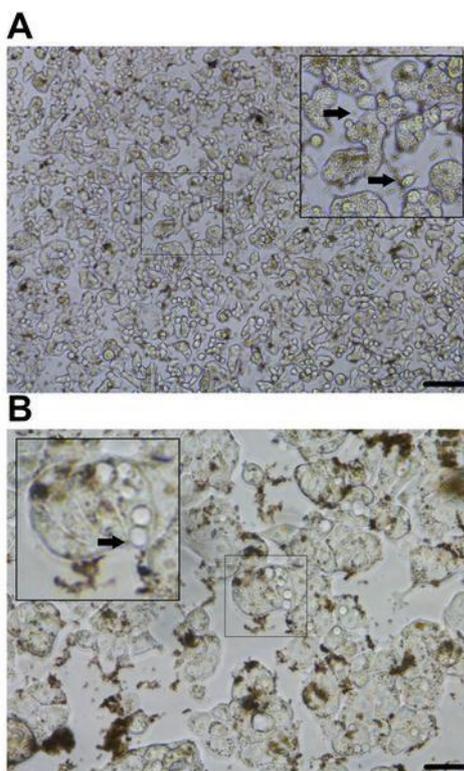
A viabilidade dos esferoides que foram submetidos a condições experimentais (fármacos) foi determinada pela sua absorvância em relação à absorvância de esferoides não tratados (% dos controles não tratados).

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Cultura de HT29-MTX com nanopartículas de óxido de ferro

Cultivos em 2D de células HT29-MTX foram expostos por 24 horas à suspensão de nanopartículas de magnetita funcionalizadas com poli-L-lisina. A Figura 2 mostra o aspecto típico das culturas utilizadas.

Figura 2 - Aspecto típico de culturas de HT29-MTX com nanopartículas de magnetita adsorvidas e observadas campo claro em aumento de 10X (A) e 40X (B). Barras: 200 μ m (A), 100 μ m (B).

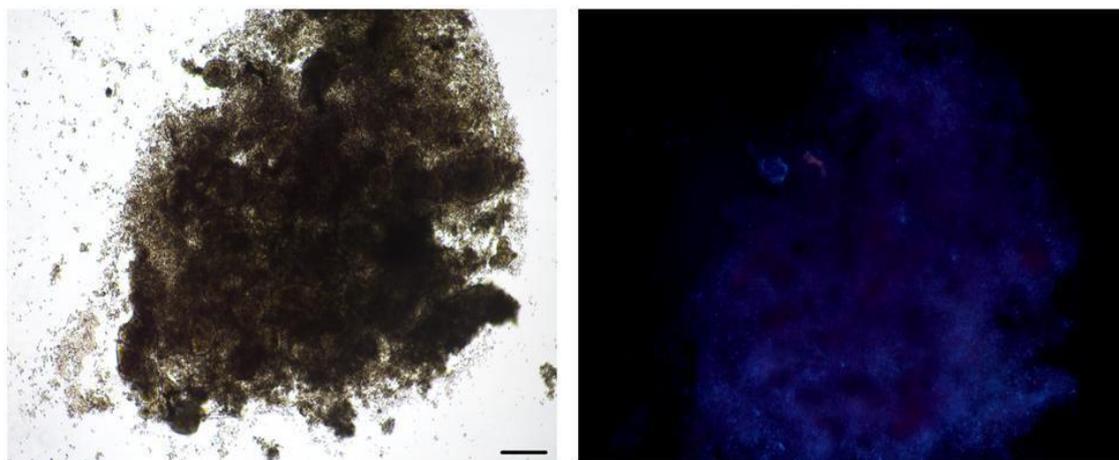


Conforme relatado anteriormente em trabalhos do grupo (BONFIM et al., 2019), as partículas formam micro-agregados de coloração castanha visíveis na superfície das células por microscopia óptica, em aumentos triviais, mais facilmente observáveis nos destaques.

6.2 Avaliação dos esferoides por microscopia de fluorescência

Os esferoides foram corados com Hoechst 33342 ou laranja de acridina conforme descrito. Foi constatado que não foi possível obter resolução satisfatória mediante a coloração com Hoechst 33342. Embora seja um corante com afinidade ao DNA em dupla-fita (BUCEVIČIUS et al., 2018; CHAZOTTE, 2011; LIN; GOODELL, 2011), aparentemente o protocolo adotado não foi capaz de destacar apenas os núcleos celulares do material. A Figura 3 mostra núcleos reduzidos e pouco marcados em azul, além de coloração bastante difusa no espaço intercelular, dificultando a obtenção de imagens com grau científico adequado. Algumas regiões emitiram fluorescência em vermelho, indicando incorporação de brometo de etídio e, portanto, células inviáveis. No entanto, não foi possível discriminar com nitidez a ocorrência de tais células.

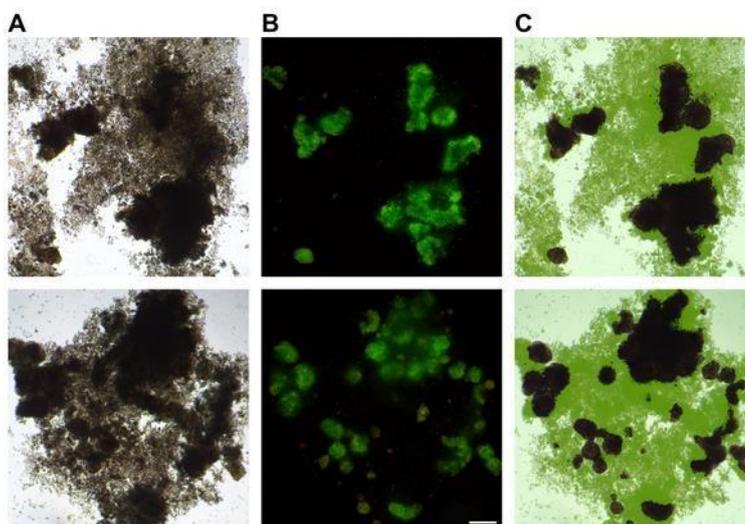
Figura 3: Esferoide de células HT29-MTX obtido por levitação magnética (sete dias em cultura). Esquerda: campo claro. Direita: fluorescência do esferoide corado com Hoechst 33342 (azul) e brometo de etídio (vermelho). Aumento: 10X. Barra: 200µm.



Esferoides marcados com laranja de acridina apresentaram melhor resolução nos experimentos realizados. Foi possível discriminar agregados celulares aprisionados em matriz amorfa. A matriz extracelular de tumores colônicos é composta majoritariamente por colágeno tipo IV, laminina e fibronectina (ONFROY-ROY ET AL., 2020), e embora não tenham sido utilizados

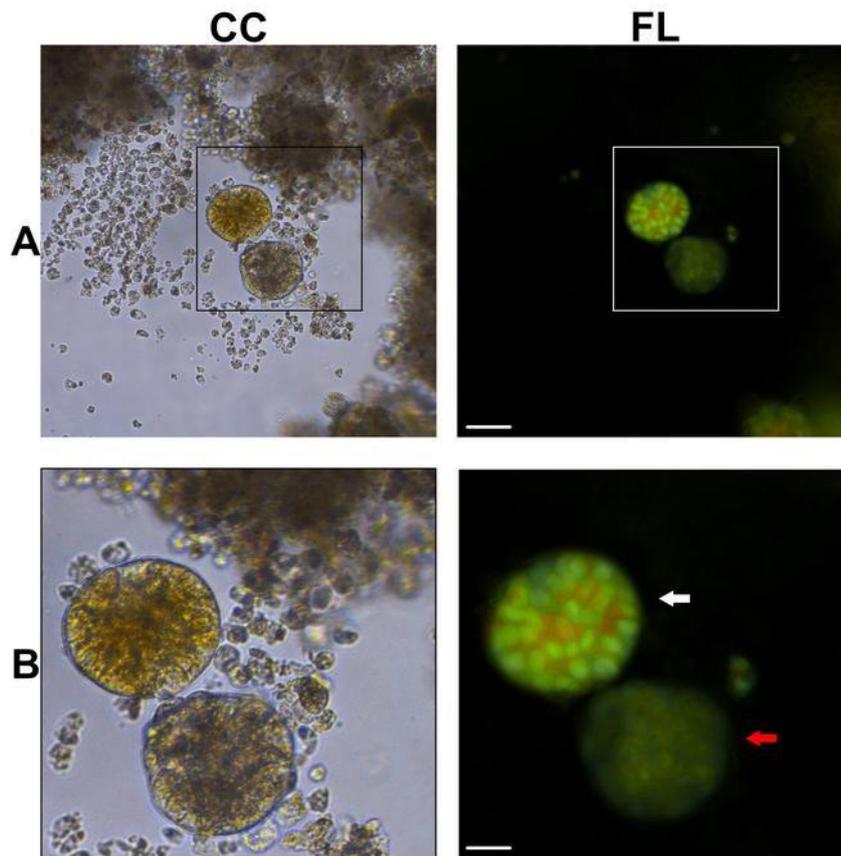
protocolos específicos para evidênciação destas proteínas, a matéria amorfa que circunda os agregados celulares na Figura 4 foi considerada putativamente matriz extracelular. Usando o software ImageJ foi possível demarcar as áreas com agregados celulares e diferenciá-las das áreas de matriz extracelular.

Figura 4: Esferoides de células HT29-MTX obtidos por levitação magnética (sete dias em cultura). (A): campo claro. (B): fluorescência do esferoide corado com laranja de acridina (verde) e brometo de etídio (vermelho). (C): agregados celulares (escuro) em circundados por matriz extracelular (verde). Aumento: 10X. Barra: 200 μ m.



Considerando a diferença de performance das duas colorações, a coloração por laranja de acridina foi utilizada em experimentos posteriores. A Figura 5 mostra dois esferoides de HT29-MTX aprisionados em matriz extracelular com aspecto típico.

Figura 5: Esferoides de células HT29-MTX obtidos por levitação magnética (sete dias em cultura). (CC): campo claro. (FL): fluorescência do esferoide corado com laranja de acridina (verde) e brometo de etídio (vermelho). (A): aumento 10X. (B): zoom digital 2,4X (24X). agregados celulares (escuro) em circundados por matriz extracelular (verde). Barras: 100 μ m (A), 240 μ m.



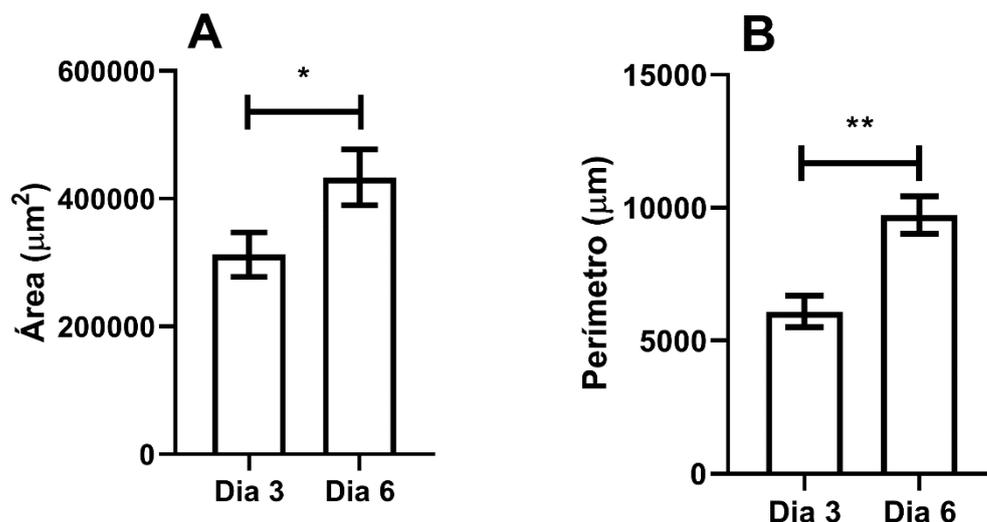
Utilizando o software ImageJ, foi possível calcular o diâmetro do esferoide marcado com a seta branca ($d=151,106\mu\text{m}$) e vermelha ($d=132,064\mu\text{m}$).

6.3 Avaliação da viabilidade dos esferoides

Os esferoides foram corados com Hoechst 33342 e SYTOX[®] Green diluídos em meio de cultura, e colocados na estufa por 24 horas. Após o período, foram feitas aquisições de imagens através do INCell Analyzer 2500 HS, onde foi realizada a comparação do crescimento e da morte celular. Pela utilização dos corantes Hoechst e SYTOX[®] Green, foi possível visualizar e contabilizar células vivas e mortas, já que o primeiro quando associado ao DNA nucleico das células emite fluorescência em azul, e o segundo penetra a célula cuja teve sua membrana rompida, emitindo fluorescência verde. Sendo assim, por fluorescência, as azuis são células vivas e as verdes células mortas. Após avaliação pelo software ImageJ, os dados sobre áreas e perímetros (Figura 6),

circularidade e redondeza (Figura 7) e número de células mortas (positivas para SYTOX Green; Figura 8) foram analisadas.

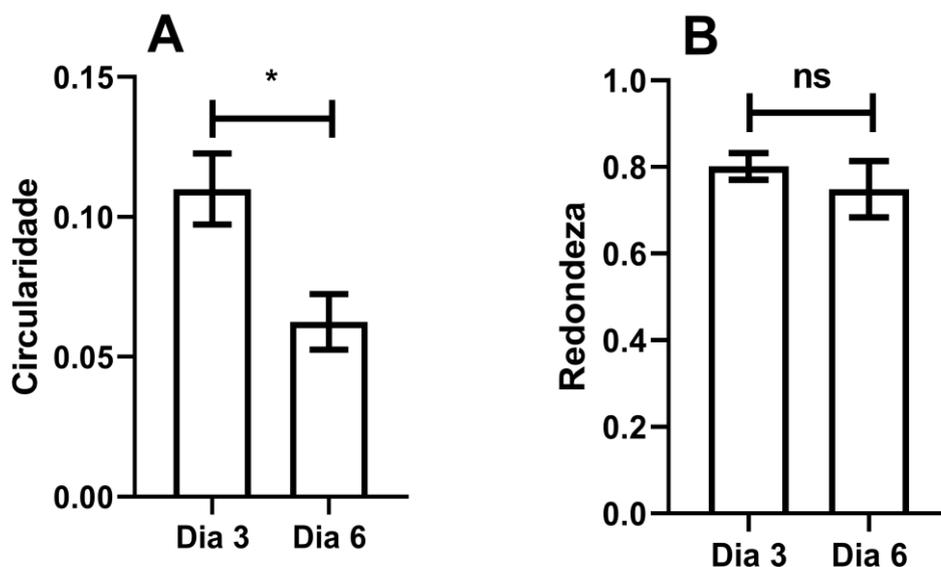
Figura 6: Médias das áreas (A) e dos perímetros (B) de esferoides de células HT29-MTX obtidos por levitação magnética em cultura. Barras: Erro padrão das médias (SEM). (*): $p < 0,05$. (): $p < 0,01$.**



Foi observado um aumento das áreas e dos perímetros dos esferoides entre os dias 3 e 6 após a levitação magnética (Figura 6), o que pode ser explicado pela própria multiplicação celular das células (VIRGONE-CARLOTTA ET AL., 2017).

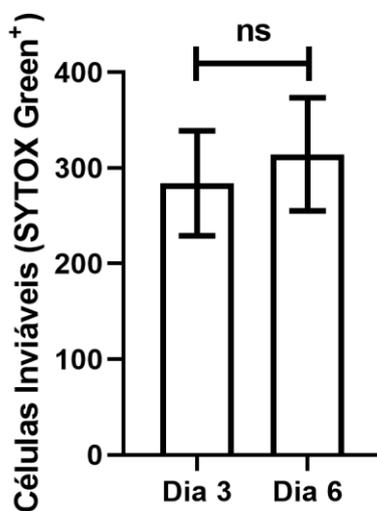
A Figura 7 mostra as quantificações de circularidade e redondeza dos esferoides, onde os parâmetros avaliados se mostraram satisfatórios para um esferoide. Apesar da diminuição das médias para circularidade, a redondeza, que é a medida de quão próxima a forma de um objeto se aproxima de um círculo, teve apenas ligeira diminuição, mostrando-se apta para experimentos.

Figura 7: Médias da circularidade (A) e redondeza (B) de esferoides de células HT29-MTX obtidos por levitação magnética em cultura. Barras: Erro padrão das médias (SEM). (*): $p < 0,05$. (ns): não significante.



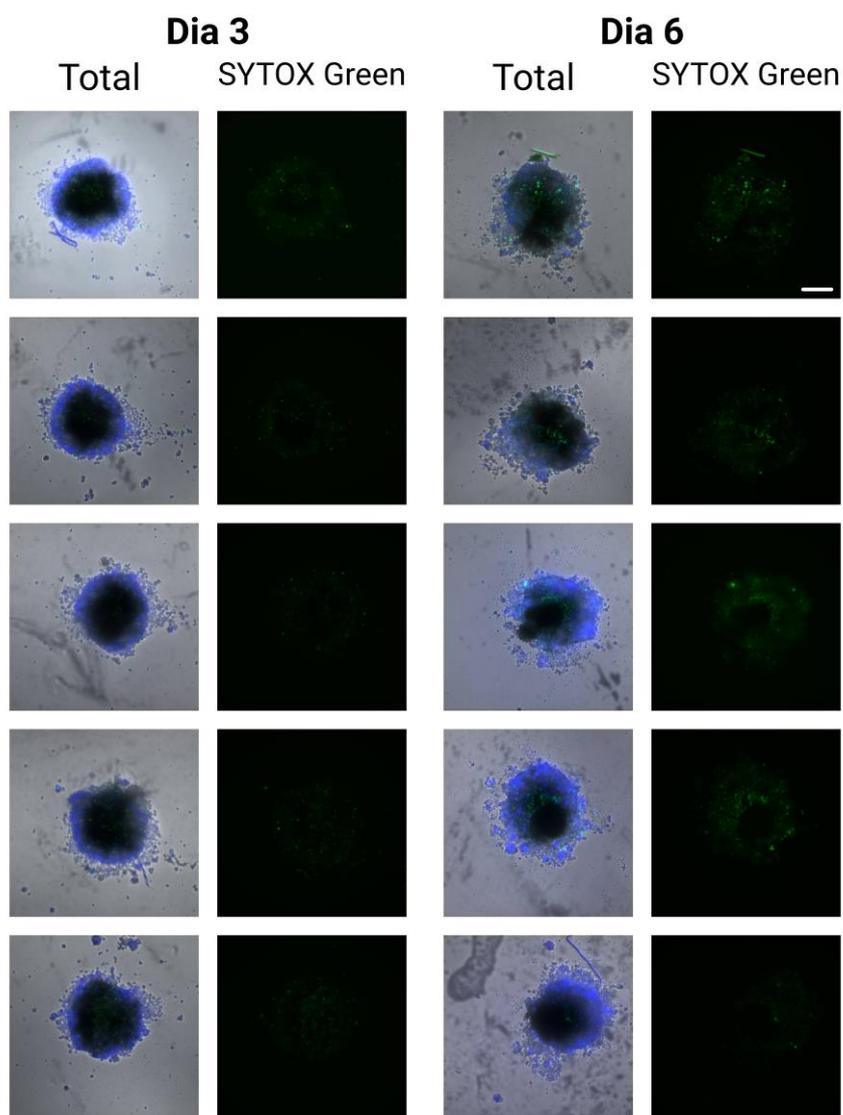
A Figura 8 mostra a quantidade de células inviáveis nos esferoides nos dias 3 e 6 após a levitação. Houve um discreto aumento de células inviáveis, o que pode ser explicado pela degradação natural do meio de cultura causando morte natural das células.

Figura 8: Médias do número de células inviáveis em esferoides de células HT29-MTX obtidos por levitação magnética em cultura dias 3 e 6. Barras: Erro padrão das médias (SEM) não significante.



A Figura 9 contém um compilado mostrando o aspecto típico dos esferoides analisados.

Figura 9: Médias do número de células inviáveis em esferoides de células HT29-MTX obtidos por levitação magnética em cultura dias 3 e 6 horas após levitação magnética, em campo claro e microscopia de fluorescência. Azul: Hoechst 33342 (marcador pan-nuclear). Verde SYTOX® Green (inviáveis). Barra: 200 μ m.



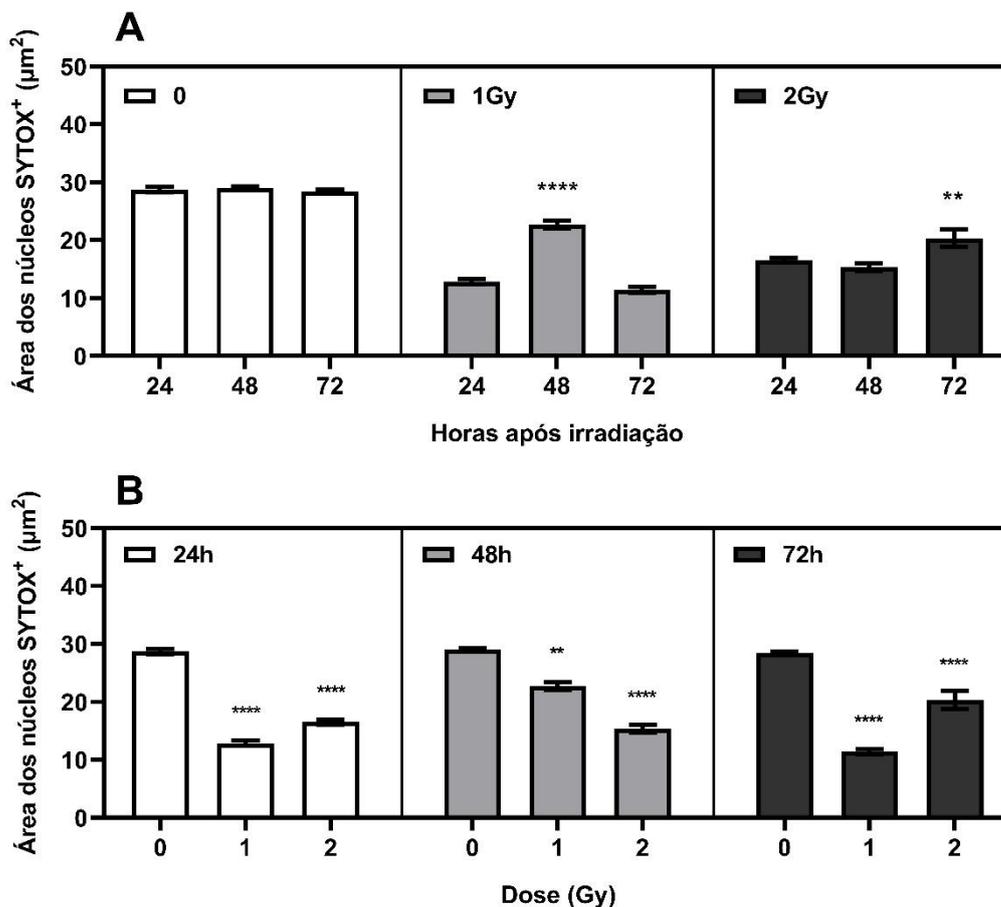
Renderizações em 3D de esferoides de 3 e de 6 dias em cultura foram realizadas, e os links para os resultados em vídeo estão acessíveis através das URL's e/ou códigos QR no apêndice A.

6.4 Avaliação dos esferoides após irradiação

Com o objetivo de avaliar a mortalidade das células após irradiação, os esferoides de HT29-MTX foram expostos a radiação gama em fonte de ^{60}Co através do *Gammacell* no Centro de Tecnologia das Radiações IPEN/CNEN – SP, em temperatura ambiente, com 1Gy e 2Gy respectivamente e taxa de dose de 120 Gy/h. Após a irradiação, as placas foram incubadas e foram feitas fotos com 24, 48 e 72 horas, com adição do corante SYTOXTM Green, e duas horas antes da aquisição das fotos, com adição do corante Hoechst 33342. As fotos foram feitas no microscópio Nikon Ts100 existente na Sala de Cultura Celular I do Centro de Biotecnologia (CEBIO/IPEN), a partir da análise e edição de imagens, foram obtidos gráficos no software GraphPad Prism® 9 onde as análises estatísticas foram feitas por meio da 2way-ANOVA.

A Figura 10 mostra as áreas dos núcleos não irradiados e após irradiação por 1Gy 2Gy.

Figura 10: Áreas dos núcleos das células mortas encontradas em esferoides de HT-29-MTX não irradiados ou irradiados por 1 ou 2Gy. Dados agrupados por tempo (A) ou dose (B) Barras: Erro padrão das médias (SEM). (): $p < 0,01$. (****): $p < 0,0001$; em relação aos controles (A: 24h; B:0Gy).**



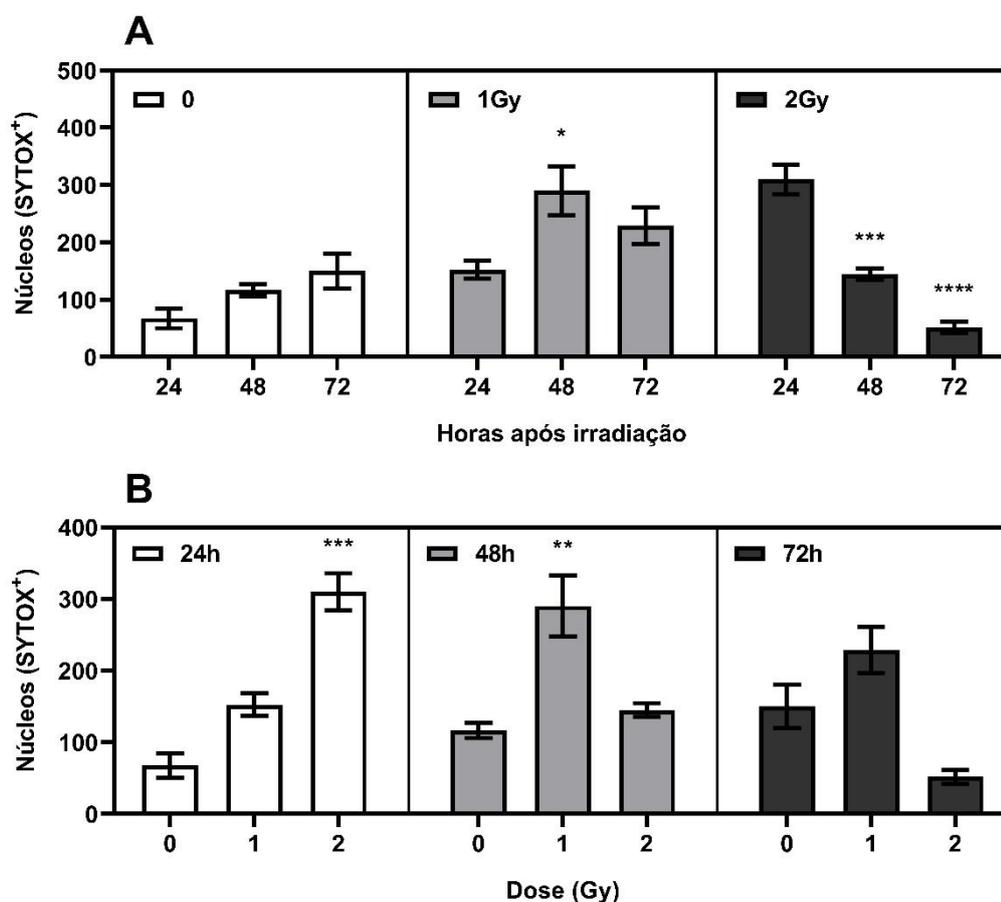
O tamanho dos núcleos de células tumorais é influenciado pela atividade de proteínas do envelope nuclear, especialmente lamininas formadoras dos andaimes proteicos da carioteca (JEVTIĆ, P.; EDENS, L. J.; LI, X.; NGUYEN, T.; CHEN, P.; LEVY, D. L. 2015) e por outras proteínas como as nesprinas, que interligam a carioteca ao citoesqueleto e tem relações com processos de ciclo celular (LU, W.; SCHNEIDER, M.; ET AL., 2012).

A quantidade de DNA parece não alterar o tamanho dos núcleos (CANTWELL, H.; NURSE, 2019), mas o processamento defeituoso de RNA, levando ao acúmulo de sequências não usadas no interior do núcleo (CANTWELL H., NURSE, P., 2017) pode ser o fenômeno que causou o efeito observado em células irradiadas a 1Gy após 48 horas e por 2Gy em 72 horas.

Outros trabalhos mostram que cadeias de RNA sofrem com a exposição às radiações ionizantes em doses comparáveis às utilizadas neste trabalho (TIE Y.; HU Z.; LÜ G.; ET AL., 2019), o que explicaria possível aumento de cadeias inúteis acumuladas, levando à expansão nuclear. Há inclusive evidência sobre a predominância da degradação encontrada na subunidade 16S do rRNA (RNA ribossômico) (GONG X.; TAO R.; LI Z., 2006).

A Figura 11 mostra as contagens de núcleos de células mortas em esferoides não irradiados ou após irradiação com 1Gy e 2Gy.

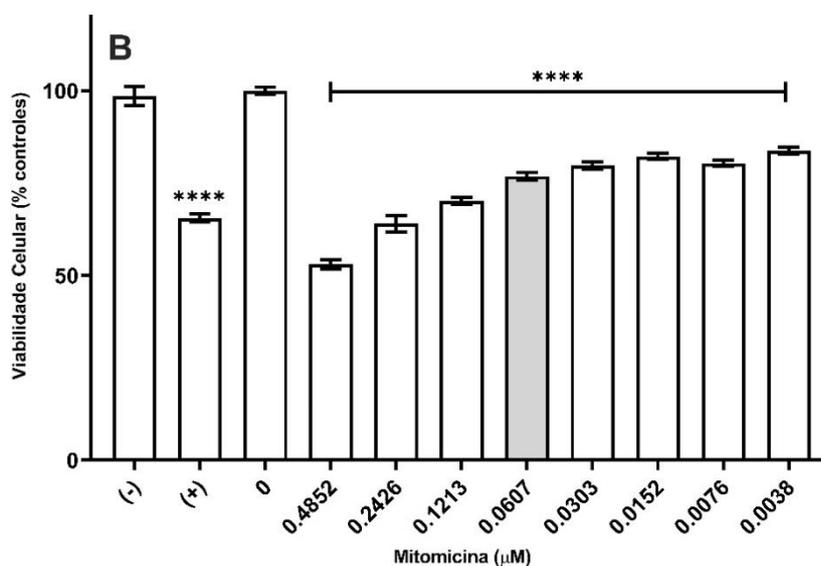
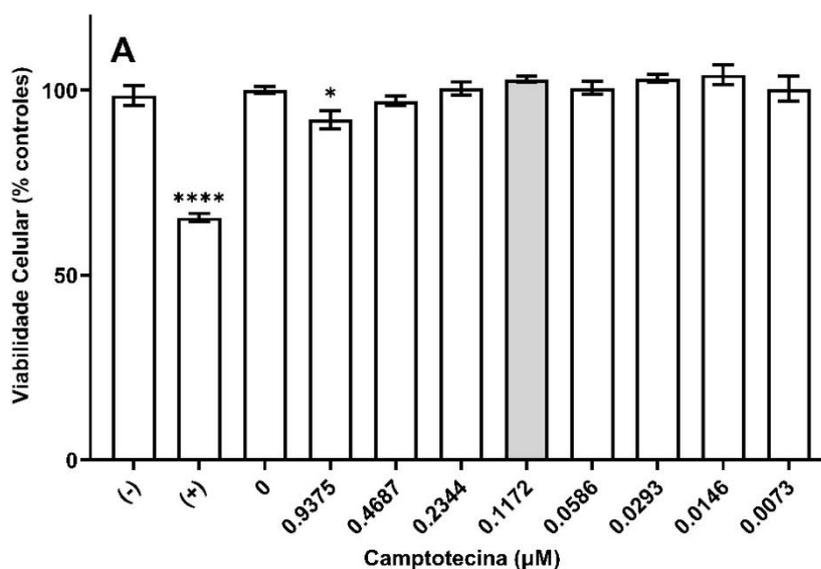
Figura 11: Quantidade de núcleos de células mortas (marcadas com SYTOX® Green) encontradas em esferoides de HT-29-MTX não irradiados ou irradiados por 1 ou 2Gy. Dados agrupados por tempo (A) ou dose (B) Barras: Erro padrão das médias (SEM). (*): $p < 0,05$. (): $p < 0,01$. (***): $p < 0,001$. (****): $p < 0,0001$; em relação aos controles (A: 24h; B:0Gy).**



A dose de 2Gy induz morte celular por apoptose em células HT-29 em cultivos em 2 ou 3 dimensões (HEHLGANS, S., OPPERMANN, J., REICHERT, S. ET AL., 2015), o que explicaria a onda de mortalidade com pico 24 horas após a irradiação e decréscimo até 72 horas, refletindo a frequência acumulativa dos eventos de morte. HT-29 é resistente a doses de 1Gy, ao menos em cultivos em 2D, conforme avaliado em outros trabalhos (LAMBIN, P.; COCO-MARTIN, J. ET AL., 1994 e Tao, Y.; Zhang, P. ET AL., 2007). O efeito observado de aumento de mortalidade 24 horas após irradiação com 1Gy não pode ser explicado pelos experimentos até o momento.

A Figura 12 mostra os resultados da citotoxicidade induzida por Camptotecina (A) e Mitomicina C (B) em esferoides de HT-29.

Figura 12: Citotoxicidade da Camptotecina (A) e da Mitomicina C (B) em esferoides de HT-29-MTX. Barras: Erro padrão das médias (SEM). (*): $p < 0,05$ (**): $p < 0,0001$; em relação aos controles ("0").**



A utilização de modelos celulares tridimensionais visa emular a fisiologia dos tecidos-modelo, e tal imitação acarreta também efeitos que, embora observáveis nos tecidos, são de certa forma indesejáveis.

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 colorretais (VENDITTO & SIMANEK, 2010), sua eficácia é prejudicada pela sua 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; WEN ET AL, 2017).

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 HT-29 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, é possível que o aumento da citotoxicidade da mitomicina C, que se apresentou tóxica em concentração 16 vezes menor que a IC50 para cultivos de HT-29 em duas dimensões, tenha ocorrido pela avançada redução da molécula no interior dos esferoides, aumentando assim sua atividade.

7 CONCLUSÕES

Os esferoides de HT-29-MTX mantêm viabilidade satisfatória por ao menos 6 dias em cultivo, ou seja, em intervalo de tempo em que experimentos (por exemplo, com irradiações) sejam factíveis.

São possíveis avaliações como área do esferoide, número de células mortas e área dos núcleos das células mortas, 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*.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACHARYA, S.; GHOSH, S.; MAJI, M.; PARAMBIL, A. R. U.; SINGH, S.; MUKHERJEE, A. Inhibition of 3d colon cancer stem cell spheroids by cytotoxic ruii-p-cymene complexes of mesalazine derivatives. **Chemical Communications**, v. 56, n. 40, p. 5421–5424, 2020.

AMERICAN CANCER SOCIETY. Colorectal cancer facts. **American Cancer Society**, 2020. Disponível em: <<https://www.cancer.org/cancer/colon-rectal-cancer/about/what-is-colorectal-cancer.html>> Acesso em 19 de abril de 2022.

BALAKRISHNAN, B.; JAYAKRISHNAN, A. Self-cross-linking biopolymers as injectable in situ forming biodegradable scaffolds. **Biomaterials**, v. 26, n. 18, p. 3941–3951, 2005.

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.; 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. **Applied Nanoscience (Switzerland)**, v. 9, n. 8, p. 1707–1717, 2019.

BRÜNINGK, S. C.; RIVENS, I.; BOX, C.; OELFKE, U.; TER HAAR, G. 3D Tumour spheroids for the prediction of the effects of radiation and hyperthermia treatments. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 1–13, 2020.

BUCEVIČIUS, J.; LUKINAVIČIUS, G.; GERASIMAITĖ, R. The use of hoechst dyes for dna staining and beyond. **Chemosensors**, v. 6, n. 2, p. 18, 2018.

CANTWELL, H.; NURSE, P. Unravelling Nuclear Size Control. *Current Genetics*. v.65, p. 1281-1285, 2019.

CANTWELL H.; NURSE, P. A systematic genetic screen identifies essential factors involved in nuclear size control. ***PLoS genetics***, v. 15, n. 12, 2017.

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.

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

CHAZOTTE, B. Labeling nuclear DNA with Hoechst 33342. ***Cold Spring Harbor Protocols***, v. 6, n. 1, 2011.

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.

FAN, X.; OUYANG, N.; TENG, H.; YAO, H. Isolation and characterization of spheroid cells from the ht29 colon cancer cell line. ***International Journal of Colorectal Disease***, v. 26, n. 10, p. 1279–1285, 2011.

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

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

GALLE, J.; AUST, G.; SCHALLER, G.; BEYER, T.; DRASDO, D. Individual cell-based models of the spatiotemporal organization of multicellular systems—achievements and limitations. **Cytometry Part A**, v. 69A, n.7, p. 704–710, 2006.

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.

GONG X, TAO R, LI Z. Quantification of RNA damage by reverse transcription polymerase chain reactions. **Analytical Biochemistry**, v. 357, n. 1, p. 58–67, 2006.

GOTOH, Y.; NIIMI, S.; HAYAKAWA, T.; MIYASHITA, T. Preparation of lactose–silk fibroin conjugates and their application as a scaffold for hepatocyte attachment. **Biomaterials**, v. 25, n. 6, p. 1131–1140, 2004.

HAISLER, W. L.; TIMM, D. M.; GAGE, J. A.; TSENG, H.; KILLIAN, T. C.; SOUZA, G. R. Three-dimensional cell culturing by magnetic levitation. **Nature Protocols**, v. 8, n. 10, p. 1940–1949, 2013.

HEHLGANS, S., OPPERMAN, J., REICHERT, S., ET AL. The SMAC mimetic BV6 sensitizes colorectal cancer cells to ionizing radiation by interfering with DNA repair processes and enhancing apoptosis. **Radiation Oncology**. v. 198, n.10, 2015.

HICKMAN, J. A.; GRAESER, R.; DE HOOGT, R.; VIDIC, S.; BRITO, C.; GUTEKUNST, M.; VAN DER KUIP, H.; IMI PREDECT CONSORTIUM. Three-

dimensional models of cancer for pharmacology and cancer cell biology: Capturing tumor complexity in vitro/ex vivo. **Biotechnology Journal**, v. 9, n. 9, p. 1115–1128, 2014.

HUTCHINSON, L.; KIRK, R. High drug attrition rates - Where are we going wrong? *Nature Reviews* **Clinical Oncology**, v. 8, n. 4, p. 189–190, 2011.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (Brasil). Tendência de aumento do número de casos de câncer de intestino exige estratégias de prevenção. 2021. <<https://www.inca.gov.br/noticias/tendencia-de-aumento-do-numero-de-casos-de-cancer-de-intestino-exige-estrategias-de>> Acesso em 19 de abril de 2022.

JANORKAR, A. V. Review: Polymeric scaffold materials for two-dimensional and three-dimensional in vitro culture of hepatocytes. **ACS Symposium Series**, v. 1054, p. 1–32, 2010.

JEONG, Y. G.; LEE, J. S.; SHIM, J. K.; HUR, W. A scaffold-free surface culture of B16F10 murine melanoma cells based on magnetic levitation. **Cytotechnology**, v. 68, n. 6, p. 2323–2334, 2016.

JEPPESEN, M.; HAGEL, G.; GLENTHOJ, A.; VAINER, B.; IBSEN, P.; HARLING, H.; THASTRUP, O.; JØRGENSEN, L. N.; THASTRUP, J. Short-term spheroid culture of primary colorectal cancer cells as an in vitro model for personalizing cancer medicine. **PLoS ONE**, v. 12, n. 9, p. e0183074, 2017.

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.

KARLSSON, H.; SENKOWSKI, W.; FRYKNÄS, M.; MANSOORI, S.; LINDER, S.; GULLBO, J.; LARSSON, R.; NYGREN, P. A novel tumor spheroid model

identifies selective enhancement of radiation by an inhibitor of oxidative phosphorylation. **Oncotarget**, v. 10, n. 51, p. 5372–5382, 2019.

KHARARJIAN, A.; MANNAN, R.; BYRNES, K.; BARKER, N.; VOLTAGGIO, L. Are Upfront Levels for Colon “Polyps” Necessary? A Pragmatic Review. **International Journal of Surgical Pathology**, v. 27, n. 1, p. 15– 18, 2019.

KUWASHIMA, Y.; YAMADA, T.; SAIO, M.; TAKAMI, T. Formation and growth of multicellular spheroids in media containing low concentrations of agarose. **Cancer Letters**, v. 71, n. 1–3, p. 31–33, 1993.

LAMBIN, P.; COCO-MARTIN, J.; LEGAL, J. D.; BEGG, A. C.; PARMENTIER, C.; JOINER, M. C.; MALAISE, E. P. Intrinsic Radiosensitivity and Chromosome Aberration Analysis Using Fluorescence In Situ Hybridization in Cells of Two Human Tumor Cell Lines. **Radiation Research**, v. 138, n. 1, 1994.

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

LESUFFLEUR T, BARBAT A, DUSSAULX E, ZWEIBAUM A. Growth adaptation to methotrexate of HT-29 human colon carcinoma cells is associated with their ability to differentiate into columnar absorptive and mucus-secreting cells. **Cancer Research**, v. 50, n. 19, p. 6334-6343, 1990.

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.

LIN, K. K.; GOODELL, M. A. Detection of Hematopoietic Stem Cells by Flow Cytometry. *Methods In Cell Biology*. **Methods in Cell Biology**, v. 103., p. 21–30, 2011.

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.

MANZ, B. N.; GROVES, J. T. Spatial organization and signal transduction at intercellular junctions. *Nature Reviews* **Molecular Cell Biology**, v. 11, n. 5, p. 342–352, 2010.

MARLEY AR, NAN H. Epidemiology of colorectal cancer. **International Journal Of Molecular Epidemiology Genetics**. n.7, v.3, p.105 - 114, 2016.

MÁRMOL, I.; SÁNCHEZ-DE-DIEGO, C.; DIESTE, A. P.; CERRADA, E.; YOLDI, M. J. R. Colorectal carcinoma: A general overview and future perspectives in colorectal cancer. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 1, 2017.

MATHIJSEN, R. H. J.; SPARREBOOM, A.; VERWEIJ, J. Determining the optimal dose in the development of anticancer agents. **Nature Reviews Clinical Oncology**, v. 11, n. 5, p. 272–281, 2014.

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.

MARTÍNEZ-MAQUEDA, D., MIRALLES, B., RECIO, I. HT29 Cell Line. **The Impact of Food Bioactives on Health**. n. 1, p. 113-124, 2015.

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.

MIYOSHI, H.; MAEKAWA, H.; KAKIZAKI, F.; YAMAURA, T.; KAWADA, K.; SAKAI, Y.; TAKETO, M. M. An improved method for culturing patient-derived colorectal cancer spheroids. **Oncotarget**, v. 9, n. 31, p. 21950–21964, 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.

NATH, S.; DEVI, G. R. Three-dimensional culture systems in cancer research: Focus on tumor spheroid model. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 163, p. 94–108, 2016.

NEGOI, I.; PAUN, S.; HOSTIUC, S.; STOICA, B.; TANASE, I.; NEGOI, R.; BEURAN, M. Most small bowel cancers are revealed by a complication. **Einstein (São Paulo, Brazil)**, v. 13, n. 4, p. 500–505, 2015.

NEJADNIK, M. R.; OLSSON, A. L. J. J.; SHARMA, P. K.; VAN DER MEI, H. C.; NORDE, W.; BUSSCHER, H. J. 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.

ONFROY-ROY, L.; HAMEL, D.; FONCY, J.; MALAQUIN, L.; FERRAND, A. Extracellular matrix mechanical properties and regulation of the intestinal stem cells: when mechanics control fate. **Cells**, v. 12, n.9, p. 2629, 2020.

PAPUSHEVA, E.; HEISENBERG, C. P. Spatial organization of adhesion: force-dependent regulation and function in tissue morphogenesis. **The EMBO Journal**, v. 29, n. 16, p. 2753-2768, 2010.

PONNURANGAM, S.; MAMMEN, J. M. V.; RAMALINGAM, S.; HE, Z.; ZHANG, Y.; UMAR, S.; SUBRAMANIAM, D.; ANANT, S. Honokiol in combination with radiation targets notch signaling to inhibit colon cancer stem cells. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 11, n. 4, p. 963–972, 2012.

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

RIEDL, A.; SCHLEDERER, M.; PUDELKO, K.; STADLER, M.; WALTER, S.; UNTERLEUTHNER, D.; UNGER, C.; KRAMER, N.; HENGSTSCHLÄGER, M.; KENNER, L.; PFEIFFER, D.; KRUPITZA, G.; DOLZNIG, H. Comparison of cancer cells in 2D vs 3D culture reveals differences in AKT-mTOR-S6K signaling and drug responses. **Journal of Cell Science**, v. 130, n. 1, p. 203–218, 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.

SENSENG, R.; SAPIR, Y.; MACDONALD, C.; COHEN, S.; POLYAK, B. Magnetic nanoparticle-based approaches to locally target therapy and enhance tissue regeneration in vivo. **Nanomedicine**, v. 7, n. 9, p. 1425–1442, 2012.

SHEN, C.-H. Nucleic Acids: DNA and RNA. **Diagnostic Molecular Biology**, 1–25, 2019

SONG, H.; DAVID, O.; CLEJAN, S.; GIORDANO, C. L.; PAPPAS-LEBEAU, H.; XU, L.; O'CONNOR, K. C. Spatial Composition of Prostate Cancer Spheroids in Mixed and Static Cultures. **Tissue Engineering**, v. 10, n. 7–8, p. 1266–1276, 2004.

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.

SOUZA, G. R.; CHRISTIANSON, D. R.; STAQUICINI, F. I.; OZAWA, M. G.; SNYDER, E. Y.; SIDMAN, R. L.; MILLER, J. H.; ARAP, W.; PASQUALINI, R. Networks of gold nanoparticles and bacteriophage as biological sensors and cell-targeting agents. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 5, p. 1215–1220, 2006.

SOUZA, G. R.; MOLINA, J. R.; RAPHAEL, R. M.; OZAWA, M. G.; STARK, D. J.; LEVIN, C. S.; BRONK, L. F.; ANANTA, J. S.; MANDELIN, J.; GEORGESCU, M. M.; BANKSON, J. A.; GELOVANI, J. G.; KILLIAN, T. C.; ARAP, W.; PASQUALINI, R. Three-dimensional tissue culture based on magnetic cell levitation. **Nature Nanotechnology**, v. 5, n. 4, p. 291–296, 2010.

SOUZA, G. R.; YONEL-GUMRUK, E.; FAN, D.; EASLEY, J.; RANGEL, R.; GUZMAN-ROJAS, L.; MILLER, J. H.; ARAP, W.; PASQUALINI, R. Bottom-up assembly of hydrogels from bacteriophage and Au nanoparticles: The effect of Cis- and trans-acting factors. **PLoS ONE**, v. 3, n. 5, 2008.

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

TAO, Y.; ZHANG, P.; GIRDLER, F.; FRASCOGNA, V.; CASTEDO, M.; BOURHIS, J.; DEUTSCH, E. Enhancement of radiation response in p53-deficient cancer

cells by the Aurora-B kinase inhibitor AZD1152. **Oncogene**, v. 27, p. 23, p. 3244–3255, 2007.

TIE Y, HU Z, LÜ G X, ET AL. A novel method for ionizing radiation-induced RNA damage detection by poly (A)-tailing RT-PCR. **Chinese Sci Bull**, v.56, n. 30, p. 3172–3177, 2011.

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

UNDERHILL, G. H.; CHEN, A. A.; ALBRECHT, D. R.; BHATIA, S. N. Assessment of hepatocellular function within PEG hydrogels. **Biomaterials**, v. 28, n. 2, p. 256–270, 2007.

VENDITTO VJ, SIMANEK EE. Cancer therapies utilizing the camptothecins: a review of the in vivo literature. **Mol. Pharmaceutics**, v.1, n.2, p. 307-349, 2010.

VINDIGNI, V.; CORTIVO, R.; IACOBELLIS, L.; ABATANGELO, G.; ZAVAN, B. Hyaluronan benzyl ester as a scaffold for tissue engineering. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 10, n. 7, p. 2972–2985, 2009.

VIRGONE-CARLOTTA, A., LEMASSON, M., MERTANI, H. C., DIAZ, J. J., MONNIER, S., DEHOUX, T., DELANOË-AYARI, H., RIVIÈRE, C., & RIEU, J. P. In-depth phenotypic characterization of multicellular tumor spheroids: Effects of 5-Fluorouracil. **PLoS ONE**, v. 12, n.11, 1–18, 2017.

WU, S.; WANG, X.; CHEN, J.; CHEN, Y. Autophagy Of Cancer Stem Cells Is Involved With Chemoresistance Of Colon Cancer Cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 434, n. 4, p. 898–903, 2013.

YAN, W., YINGZE, W., XIAOLI, L., WEI, Z., XINHE, X., ZHONGXIAO, H., & XINGJIE, L. Camptothecin-based nanodrug delivery systems. **Cancer Biology & Medicine**, v.14, p. 363, 2017.

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

APÊNDICE A

APÊNDICE A - Renderizações em 3D de esferoides de 3 e de 6 dias em cultura foram realizadas

Dias de cultivo

URL

Código QR

3

<https://www.youtube.com/watch?v=72NHtobfUx8>



6

<https://www.youtube.com/watch?v=vbsvplnJ1g>



APÊNDICE B

APÊNDICE B – Imagens produzidas a partir dos experimentos para avaliação dos esferoides.

FIGURA 1 - Aspecto típico de culturas de HT29-MTX com nanopartículas de magnetita adsorvidas e observadas campo claro em aumento de 10X (A) e 40X (B).

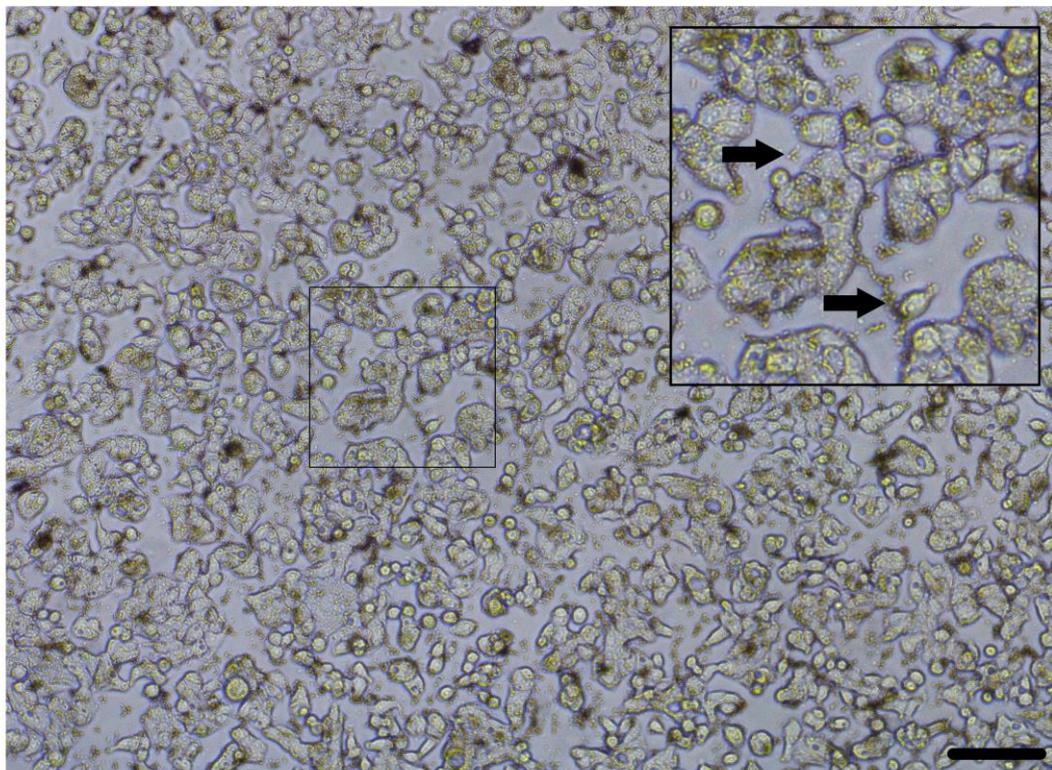
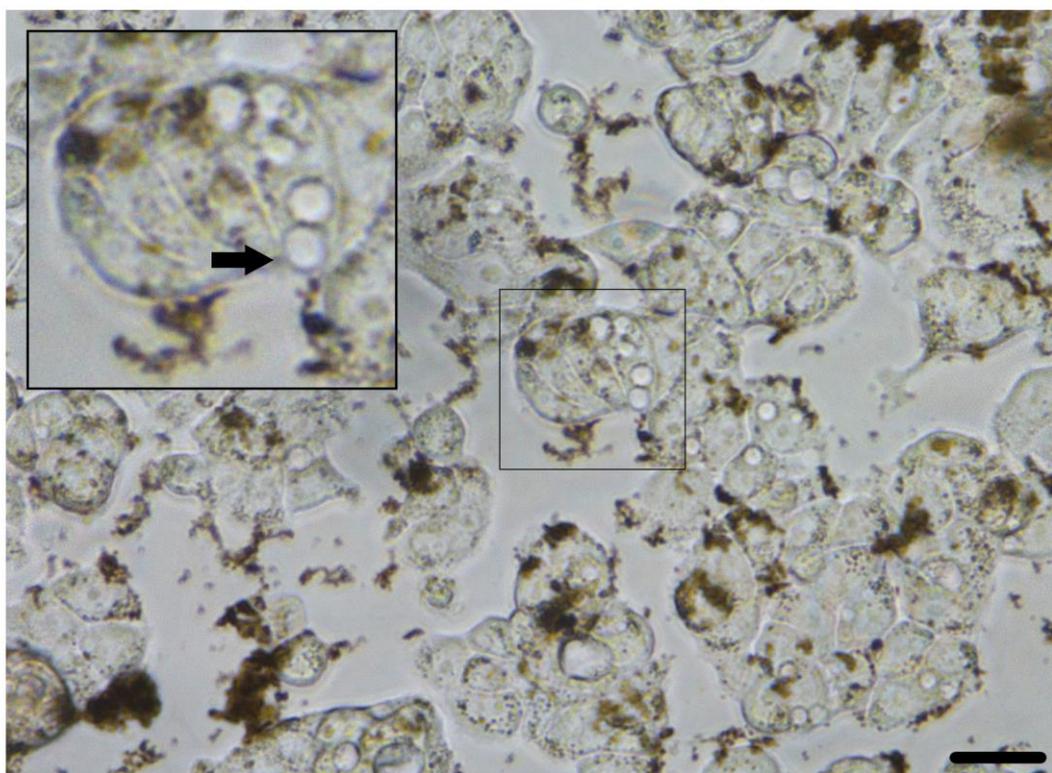
A**B**

FIGURA 2 - Esferoide de células HT29-MTX obtido por levitação magnética (sete dias em cultura). Abaixo: campo claro. Acima: fluorescência do esferoide corado com Hoechst 33342 (azul) e brometo de etídio (vermelho). Aumento: 10X. Barra: 200 μ m.

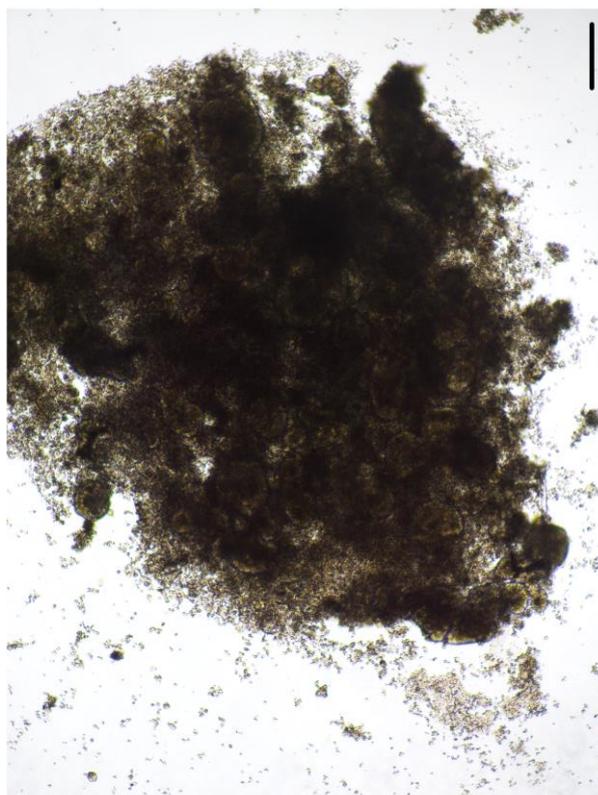
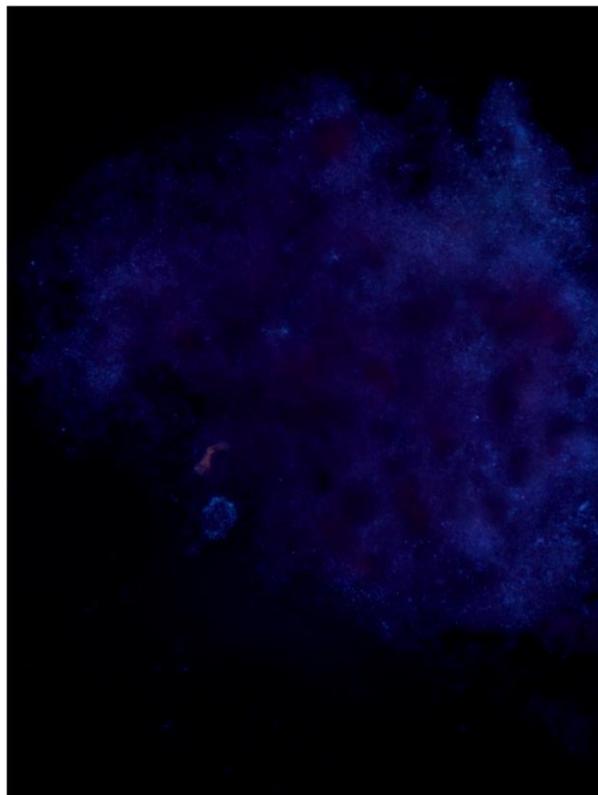


FIGURA 3 - Esferoides de células HT29-MTX obtidos por levitação magnética (sete dias em cultura). (A): campo claro. (B): fluorescência do esferoide corado com laranja de acridina (verde) e brometo de etídio (vermelho). (C): agregados celulares (escuro) em circundados por matriz extracelular (verde). Aumento: 10X.

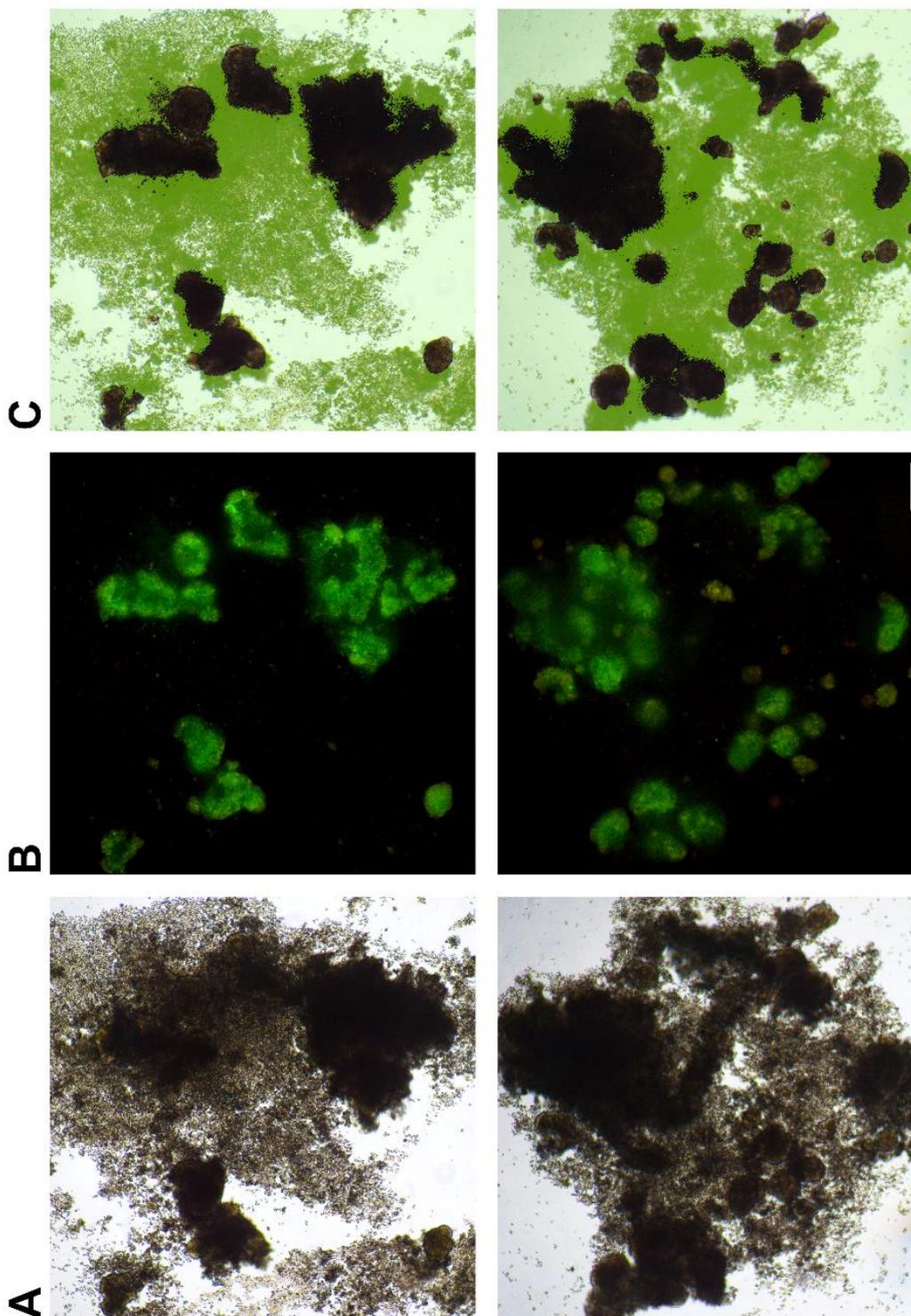


FIGURA 4 - Esferoides de células HT29-MTX obtidos por levitação magnética (sete dias em cultura). (CC): campo claro. (FL): fluorescência do esferoide corado com laranja de acridina (verde) e brometo de etídio (vermelho). (A): aumento 10X. (B): zoom digital 2,4X (24X). agregados celulares (escuro) em circundados por matriz extracelular (verde).

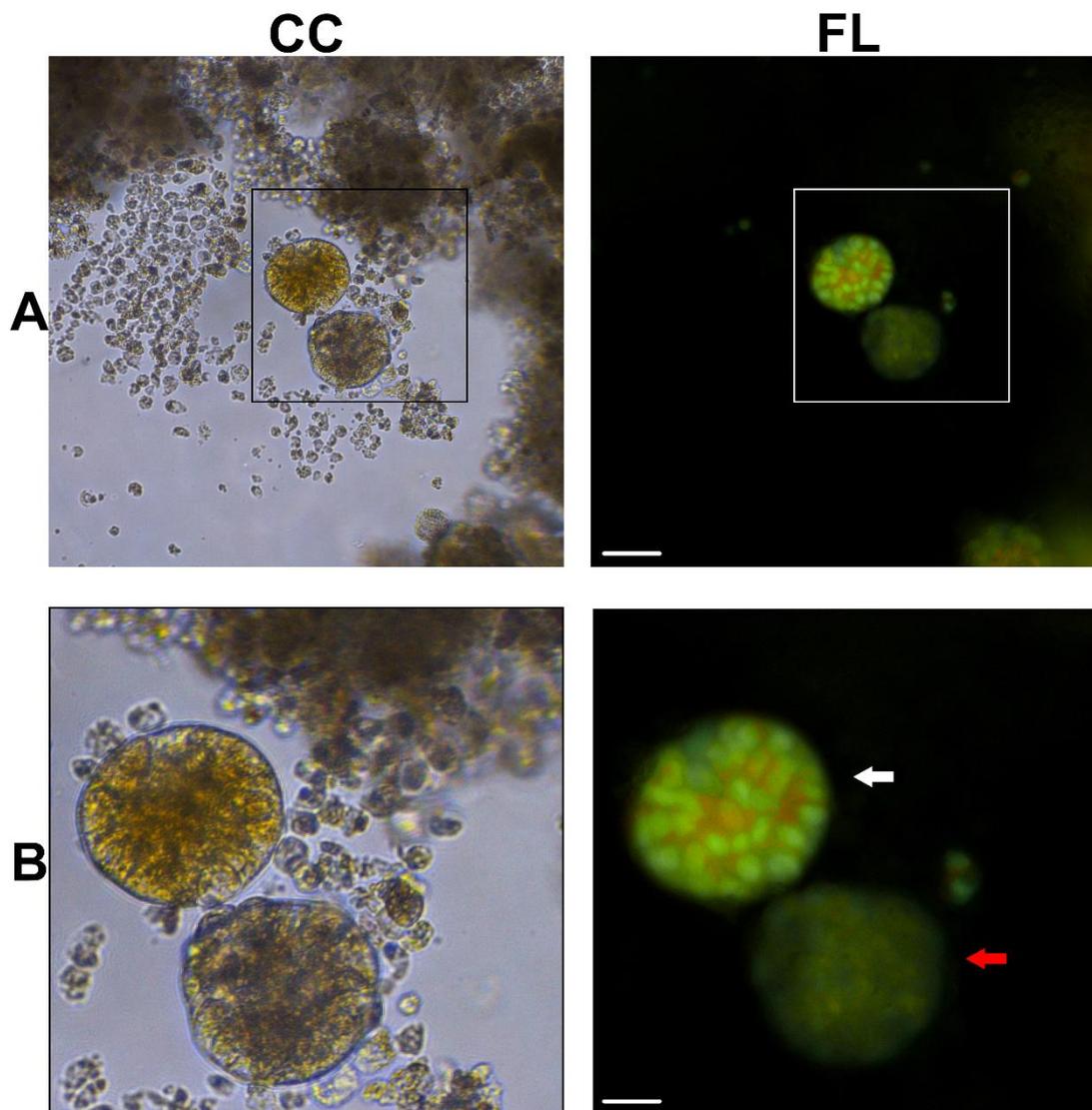
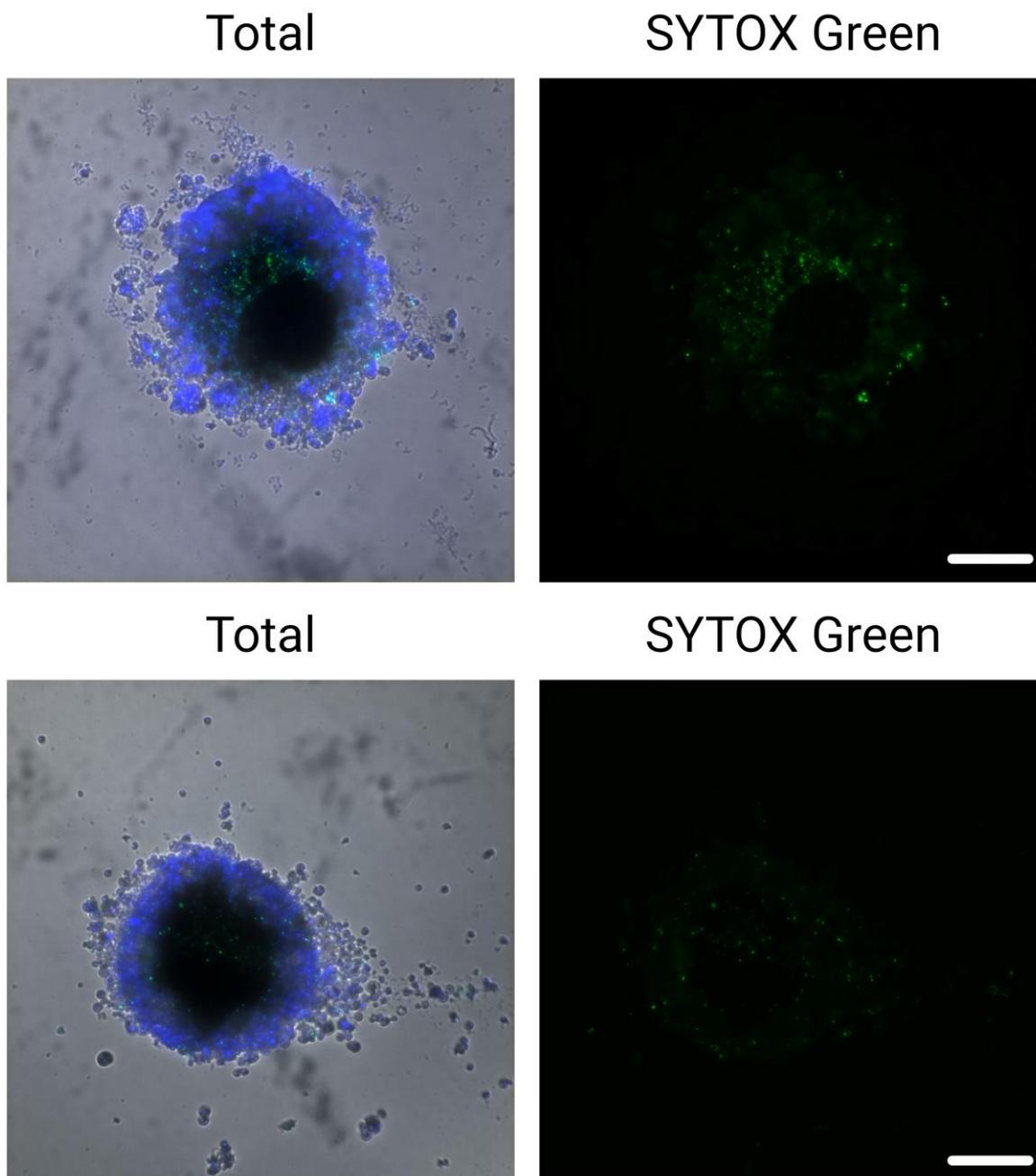


FIGURA 5 - Médias do número de células inviáveis em esferoides de células HT29-MTX obtidos por levitação magnética em cultura dias 3 e 6 horas após levitação magnética, em campo claro e microscopia de fluorescência. Azul: Hoechst 33342 (marcador pan-nuclear). Verde SYTOX® Green (inviáveis).



APÊNDICE C

APÊNDICE C – Procedimento Operacional Padrão (POP) para geração de esferoides de células de adenocarcinoma de cólon humano HT29-MTX.

	Procedimento Operacional Padrão (POP) para geração de esferoides de células de adenocarcinoma de cólon humano HT29-MTX	Código:
		Emissão: 27/07/2022
		Revisão: 01
		Página: 1 de 62
		Elaborado por: Larissa Guimarães; Daniel Perez Vieira
		Verificado por: -
		Aprovado por: Daniel P.V.

OBJETIVO

Produção de modelo tumoral tridimensional *in vitro* de células de adenocarcinoma de cólon humano, 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 Fe₃O₄ com capacidade de adsorção a membranas

- Glicina (C₂H₅NO₂)
- Hidróxido de sódio (NaOH) em lentilhas
- Solução de hidróxido de sódio (NaOH) 2M (8g NaOH em 100mL de água deionizada)
- Sulfato Ferroso Heptahidratado (Fe₂SO₄.7H₂O)
- Poli-L-lisina, hidrobrometo, massa molecular > 300.000 (Sigma-Aldrich, P1524)
- Ácido acético glacial
- Água deionizada
- Nitrogênio gasoso (N₂)
- Béquer 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 (HT29-MTX, ECACC General Cell Collection: HT29-MTX-E12) em meio de cultura celular à escolha

	Procedimento Operacional Padrão (POP) para geração de esferoides de células de adenocarcinoma de cólon humano HT29-MTX	Código:
		Emissão: 27/07/2022
		Revisão: 01
		Página: 2 de 62
		Elaborado por: Larissa Guimarães; Daniel Perez Vieira
		Verificado por: - Aprovado por: Daniel P.V.

- 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 HT29 – MTX 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 coloide por agregação com ímãs e re suspensão em água deionizada até obtenção de pH próximo a 7;

	Procedimento Operacional Padrão (POP) para geração de esferoides de células de adenocarcinoma de cólon humano HT29-MTX	Código:
		Emissão: 27/07/2022
		Revisão: 01
		Página: 3 de 62
		Elaborado por: Larissa Guimarães; Daniel Perez Vieira
		Verificado por: - Aprovado por: Daniel P.V.

- 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 re suspender 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 HT29-MTX em meio de cultura

- Adicionar 10-20 µL 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 re suspender 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.

	Procedimento Operacional Padrão (POP) para geração de esferoides de células de adenocarcinoma de cólon humano HT29-MTX	Código:
		Emissão: 27/07/2022
		Revisão: 01
		Página: 4 de 62
		Elaborado por: Larissa Guimarães; Daniel Perez Vieira
		Verificado por: -
		Aprovado por: Daniel P.V.

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)

	Procedimento Operacional Padrão (POP) para geração de esferoides de células de adenocarcinoma de cólon humano HT29-MTX	Código:
		Emissão: 27/07/2022
		Revisão: 01
		Página: 5 de 62
		Elaborado por: Larissa Guimarães; Daniel Perez Vieira
		Verificado por: - Aprovado por: Daniel P.V.

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 >> Substract 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 binarização, a área (em µm²), o perímetro (em µm) e os parâmetros de circularidade de redondeza devem 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.