São Paulo, 27 de Outubro de 2016

À
Diretoria de Pesquisa, Desenvolvimento e Ensino IPEN/CNEN-SP
Ref.: Encaminhamento de Projeto de Pesquisa Chamada de seleção ao Edital Interno Radiofarmácia - IPEN Nº 3/2016

Prezada Diretoria e Comissão Julgadora

Em nome de todos os envolvidos, encaminho para apreciação pelos senhores o projeto de pesquisa intitulado "*Desenvolvimento de modelos de cultivo tridimensional in vitro de células tumorais como sistema-teste para avaliação de eficácia de radiofármacos produzidos pelo IPEN*.", em observância ao Item 2 do presente Edital. O projeto em questão pretende atender às necessidades previstas no Item 1d do Regulamento publicado pela DPDE e homologado pela Superintendência em 27/07/2016. Caso contemplado, contará com equipe que envolve grande parte dos pesquisadores do Centro de Biotecnologia e alguns pesquisadores do Centro de Radiofarmácia, além de uma colaboração com o Laboratório de Lasers e Óptica Biomédica Aplicada da Universidade Federal de São Paulo, devidamente oficializada segundo o Item 5.1d do Regulamento.

Para realizar o proposto, o orçamento foi previsto para concorrer à Faixa A de financiamento. Há uma certa elevação deste valor, a qual acreditamos estar devidamente justificada e que esperamos que seja digna de avaliação positiva por parte de V. Sas.

Muito Obrigado,
Atenciosamente,

Daniel Perez Vieira, Ph.D.
Pesquisador - Laboratório de Radiobiologia
CB - Centro de Biotecnologia
IPEN-CNEN/SP
www.ipen.br
Tel.: 55 + 11 3133-9708

Título: Desenvolvimento de modelos de cultivo tridimensional *in vitro* de células tumorais como sistema-teste para avaliação de eficácia de radiofármacos produzidos pelo IPEN.

Participantes: - Pesquisadores do Centro de Biotecnologia (CB) e do Centro de Radiofarmácia (CR) IPEN

- Pesquisadores e Colaboradores do Lab. Biosintesis

- Pesquisadores do Depto. De Ciências Exatas e da Terra da Universidade Federal de São Paulo - UNIFESP

Objetivos: Atendimento ao Edital Interno Radiofarmácia - IPEN Nº 3/2016, referente à demanda " d) Cultivo de células e desenvolvimento de modelos tumorais. "

Resumo: Testes de fármacos com atividade antitumoral vem sendo realizados em modelos *in vitro* tridimensionais, em detrimento aos modelos bidimensionais. O Centro de Radiofarmácia IPEN/CNEN-SP é o principal produtor de radiofármacos do país. O processo de avaliação da atividade desses radiofármacos depende de modelos experimentais e se faz presente tanto nos produtos já em seu portfólio, quanto naqueles em desenvolvimento. O projeto propõe a uma rede de trabalho composta principalmente por pesquisadores do CB e CR com objetivo principal de desenvolver na qual modelos de cultivo celular suspenso capazes de fornecer esferóides tumorais. A utilização desses esferóides apresenta expressivas vantagens em relação ao cultivo tradicional, uma vez que reproduzem o formato e as interações célula-célula existentes em tumores sólidos *in vivo*. Além disso, durante o decorrer do projeto o CB continuará colaborando com cultivos tradicionais em placas (2D) de células de interesse do CR, cultivo esse que deverá ser realizado de forma mais centralizada e seguindo normas de qualidade.

Identificação da proposta; Área de atuação do CR

A presente proposta de projeto de pesquisa pretende atender ao Item 1-d) do Edital Interno Radiofarmácia - IPEN Nº 3/2016, a saber: "Cultivo de células e desenvolvimento de modelos tumorais. Cultivar células tumorais, com possibilidade de determinação da expressão de receptores de membrana. As células serão utilizadas em estudos *in vitro* de ligação e internalização de radiofármacos tumor-específicos. Desenvolver, a partir das células tumorais, modelos tumorais em animais de experimentação para atendimento aos projetos de pesquisa de novos radiofármacos do CR."

Os principais objetivos neste sentido são:

a) Cultivar células tumorais, com possibilidade de determinação da expressão de receptores de membrana. Para isto as células serão utilizadas em estudos in vitro de ligação e internalização de radiofármacos tumor-específicos.
b) Desenvolver, a partir das células tumorais, modelos tumorais em animais de experimentação para atendimento aos projetos de pesquisa de novos radiofármacos do CR."

a) Qualificação do principal problema a ser abordado

O cultivo *in vitro* de células tumorais fornece a configuração biológica mínima necessária para o estudo da fisiologia dos tumores. A capacidade que linhagens tumorais possuem de, mediante fornecimento adequado de nutrientes e gases, reproduzir-se em recipientes é utilizada para obter estes sistemas-teste em quantidades suficientes para estudos pré-clínicos de diversas moléculas, com o intuito de se observar atividade antitumoral.

Os protocolos usuais baseiam-se no denominado cultivo em monocamada, onde as células reproduzem-se aderidas em superfícies de vidro ou plástico, dispondo-se de forma lateral umas às outras. No decorrer de alguns dias, as células cobrem a superfície de cultivo formando uma estrutura que lembra um "tapete".

Apesar da utilização em larga escala e há cerca de 50 anos (1,2), já há consistente evidência científica de que a disposição bidimensional impede que

as células tumorais expressem suas características de forma análoga à encontrada no organismo (3). Para que tais linhagens se comportem de maneira mais próxima àquelas observadas diretamente *in vivo*, é necessária a interação tridimensional entre células (4). Desta forma, fica favorecida a produção e certo nível de encapsulamento e interação com as proteínas da matriz extracelular (5).

De muitas formas, a literatura recente vem descrevendo os modelos bidimensionais como compostos por complexidade insuficiente. Nestes cultivos, o nível de interação célula-célula, meramente lateral, impede que seja formado um nicho que simule a distribuição espacial natural dos tumores. Por sua vez, a disposição das células de maneira tridimensional em determinado agrupamento tecidual forma uma dispersão de forças mecânicas que se relacionam com sua morfogênese (6). 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 (7), da distribuição das zonas de comunicação existentes nas suas superfícies (8). Além disso, o estresse mecânico oriundo do agrupamento celular, parece conferir funções fisiológicas muito próximas das apresentadas pelos tumores *in vivo*.

No processo de desenvolvimento de novas drogas, observa-se baixa percentual de sucesso apesar de muitas moléculas apresentaram 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 (9). Este fenômeno é atribuído à incapacidade dos modelos bidimensionais em simularem adequadamente a fisiologia tumoral (10).

Com o intuito de solucionar a problemática exposta no parágrafo acima, várias metodologias, capazes de criar agrupamentos tridimensionais de células, vem sendo desenvolvidas. 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 esferóides, que são agregados celulares com formato caraterístico (11). Esferóides também podem ser formados em garrafas rotativas, cujo movimento impede a adesão das células no substrato, causando a agregação celular (12).

Além da organização em esferóides, as células podem ser cultivadas em substratos porosos (*scaffolds*), compostos de polímeros biocompatíveis (13), organizados em redes compostas por derivados do ácido hialurônico (14), fibroína (15), hidrogéis de alginato (16) ou polietilenoglicol (PEG) (17), entre outras técnicas possíveis (18).

O emprego de uma mistura de proteínas produzida pelo sarcoma murino do tipo Engelbreth-Holm-Swarm (nome comercial: Matrigel® – BD Biosciences) é muito usual. Esta mistura é composta majoritariamente por laminina, mas também apresenta vários componentes próprios de matrizes extracelulares encontradas em tumores, como colágeno IV e heparan-sulfato (19). Essa mistura adquire a forma de gel em temperaturas de cultura celular (até 37ºC), e além de oferecer suporte físico ao crescimento celular, também é proficiente em reter fatores de crescimento e adesão celular. Desta forma, a mistura é adequada ao crescimento tridimensional de tumores.

Outra alternativa para o cultivo tridimensional, é a levitação de células cultivadas na interface ar-líquido (20). A suspensão das células se dá pela internalização de micropartículas paramagnéticas biocompatibilizadas (21) ou pela adesão de nanopartículas na superfície celular (20,22–25). O sistema apresenta muitas vantagens em relação ao apresentado anteriormente. Nele, não se necessita de equipamentos especiais para agitação de culturas, mais sim, ímãs com fluxo magnético moderado ou forte; além disso possibilita e estimula as células a produzirem sua própria matriz extracelular (22).

Sem induzir toxicidade significativa nas células, o cultivo por levitação magnética pode produzir esferóides de até 1mm de diâmetro e mantidos por até quatro semanas em cultura (26), em escala de tempo e dimensões físicas impraticáveis em cultivos bidimensionais. Sua estrutura e sua capacidade de manutenção em cultivo torna os esferóides candidatos a análises prolongadas em relação às usuais 4 ou 24 horas de exposição a compostos-teste (27). A capacidade de um composto-teste em penetrar várias camadas celulares também pode ser avaliada (28).

Em relação à difusão de nutrientes e gases ao interior dos esferóides, é aceita a noção de que os mesmos podem ser transportados passivamente em profundidades de até 200μm (5). Em corpos com 500-1000μm de diâmetro, há a

formação de um núcleo necrótico, com dinâmica de difusão parecida com a presente em micro metástases (29).

Além das vantagens mencionadas nos parágrafos anteriores, a levitação magnética ainda parece ser capaz de possibilitar a organização espontânea de várias linhagens celulares em culturas organotípicas. Células de melanoma murino (B16F10) apresentam redução da produção de melanina em culturas bidimensionais. Quando cultivadas por levitação magnética, retomam a produção desta molécula (21). Adipócitos cultivados por levitação magnética são capazes de produzir perilipina, um marcador de adipogênese, ao contrário de sua contraparte bidimensional. A co-cultura destes adipócitos com linhagens endoteliais dá ao esferóide uma configuração natural, com as últimas expressando CD31, o que indica atividade angiogênica (30). Outra publicação relata a formação de unidades mínimas bronquiolares em culturas suspensas compostas por linhagens de quatro tipos celulares diferentes (epiteliais, musculares lisas, fibroblásticas pulmonares e endoteliais pulmonares). Os resultados deste estudo mostraram a organização espacial espontânea das quatro linhagens sem a utilização de fatores de crescimento ou de citocinas quimiotácticas (31).

A implantação de tais procedimentos de cultura pelo Centro de Biotecnologia IPEN/CNEN-SP já está em andamento, com algumas etapas da prova de conceito já concluídas. É do entendimento dos envolvidos no estudo que o modelo trará benefícios não só ao Centro de Radiofarmácia, mas a todos os pesquisadores do IPEN que trabalham com modelos tumorais *in vitro*. Também faz parte dessa noção a ideia que o conhecimento adquirido a partir da padronização do modelo de cultivo tridimensional é crucial e estritamente necessário para a criação de culturas organotípicas mais avançadas, como as denominadas "*organ-on-a-chip*".

b) Objetivos a serem alcançados

Geral

- Produção por levitação magnética em formato unitário (em placas de cultura de 60mm^2 de área de cultivo) e coletivo (em placas de 24 poços) de esferóides de linhagens de tumores humanos de próstata (LnCAP e PC3), avaliando sua sustentabilidade em cultivo e a produção de proteínas de matriz extracelular.

Específicos

- Produção de nanoesferas cobertas com aminoácidos (lisina), associadas ou não a outro coloidal que possam ser aderidas às membranas celulares e possibilitar a suspensão magnética de massas celulares.
- Testes de eficácia: Avaliação da capacidade de radiofármacos ou seus constituintes em reduzir o diâmetro de esferóides
- Testes de ligação: Avaliação da capacidade de radiofármacos ou seus constituintes em penetrar e ser retidos em esferóides, mesmo em condições de deslocamento (*competititive kinetic binding assay* / retenção de radioatividade).
- Comparação histológica e imunohistoquímica entre cultivos bidimensionais, tridimensionais e modelos de tumores induzidos *in vivo*, visando ressaltar diferenças e semelhanças da expressão de proteínas de matriz extracelular
- Fornecimento de células tumorais cultivadas em monocamada de acordo com as necessidades do CR.
- Treinamento sistemático de pesquisadores/estudantes no cultivo de células.

c) Metodologia a ser empregada

Linhagens celulares

Células de tumores humanos prostáticos (LnCAP e PC3) serão mantidas em monocamadas bidimensionais aderidas em garrafas de 25cm^2 de área de cultivo (Corning) em incubadoras específicas (37º C, 5% CO_2) pelo Laboratório Biosintesis Ltda. Ambas serão cultivadas em meio RPMI 1640 (Life Technologies) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Life Technologies) e mistura de antibióticos (penicilina e estreptomicina, 10.000U/mL, Life Technologies). Após 60-70% de confluência, as células serão destacadas com o uso de solução de tripsina e EDTA (0,25%, 0,05M) e semeadas em novas garrafas. Caso seja necessário, no decorrer do projeto poderão ser utilizadas outras linhagens celulares, de preferência obtidas de fonte conhecida e com qualidade controlada.

Fármaco – PSMA

PSMA (*Prostate-specific membrane antigen*) é uma glicoproteína transmembrana com um domínio extracelular (32), expressa na superfície de células tumor de próstata. As estratégias de terapia e diagnóstico exploram sua característica de ser internalizada após ligação ao alvo específico. É superexpressa em tumores prostáticos mestastáticos insensíveis a androgênios e não expressa em formações benignas ou células prostáticas saudáveis (33).

Formulações de PSMA, livre ou associado isótopo 177 do Lutécio (^{177}Lu) serão testadas em concentrações a ser determinadas pelo Centro de Radiofarmácia – IPEN/CNEN-SP. ^{177}Lu é um isótopo com meia-vida de 6,65 dias, e que emite partículas β (beta) com energias entre 175 e 497 keV, e γ (gama) 113 e 208 keV. A partir destas energias, os ensaios serão realizados de forma a radioatividade de uma amostra não invadir a cultura adjacente na placa ou estufa.

Nanoesferas biocompatíveis

Nanoesferas (30nm) de óxido de ferro (Fe_3O_4, Sigma-Aldrich, nº 747335) são disponíveis comercialmente em formato funcionalizado, associado ao ácido carboxílico. Suspensões destas esferas serão associadas à lisina ou outros aminoácidos pelo grupo de pesquisadores do Departamento de Ciências Exatas e da Terra da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), coordenados pela Profª Drª Lilia Coronato Courrol, colaboradora do estudo, segundo protocolo descrito anteriormente (34). A formulação já foi testada, e demonstrou sucesso ao aderir nas membranas citoplasmáticas e magnetizar células. Durante o desenvolvimento do trabalho, as partículas serão associadas a partículas de ouro coloidal, conforme descrito na literatura (35). Outras formulações serão testadas como parte da padronização do modelo. Brevemente, está prevista a preparação das nanoesferas de óxido de ferro a partir do seguinte procedimento experimental:

12mL de solução aquosa de $FeCl_3$ de 0,2 M serão misturados com 12mL de 0,5 M da solução de NH_4OH sob sonicação à temperatura ambiente por 2 minutos. Nesta etapa o colóide $Fe(OH)_3$ é formado. Em seguida sob sonicação, serão adicionados 6mL de solução aquosa de 0,2 M de $FeCl_2$ e 36mL de 0,5 M de solução aquosa de NH_4OH. Após 15 minutos em repouso a magnetita resultante será magneticamente separada repetidamente (de 7 a 10 vezes) com lavagem (com deionizada para remover todas as impurezas (NH_4Cl) remanescentes após a síntese). Finalmente, 1,5mL de citrato de sódio 0,1 M serão adicionados sob sonicação, e a magnetita será oxidada pela adição lenta de 1mL de solução de hipoclorito de sódio 5% para melhorar a estabilidade redox do maghemite. O procedimento de lavagem descrito acima será repetido para produzir o coloide primário.

A funcionalização das soluções coloidais de ferro será obtida adicionando 0,2 mL de L-lisina aquosa ou outros aminoácidos (concentração de 1 mg/mL) gota a gota, agitando a 10 mL de óxido de ferro coloidal primário, diluído a uma concentração de óxido de ferro de 2,2 mg/mL. A mistura obtida será lisada por 5 min e utilizada em experiências.

Soluções bimetálicas de ferro e ouro coloidais em ácido aminlevulínico (ALA) - ALA:AuNPs, ou metil aminolevulínico (MALA) - MALA:AuNPs serão preparadas acrescentando ao ALA/MALA: 0,0135 g, o HAuCl4: 0,0045 g , a limalha de ferro: 0,0135 g, o polietileno glicol: 0,02 g em 30 mL de deionizada. A solução será então iluminada com lâmpada de Xenônio de 300 W por 10 minutos.

As técnicas de caracterização dos materiais empregadas serão: Difração de Raios-X, Uv-Vis, FIT-IR, Zeta potencial e análises de microscopia eletrônica de transmissão.

Ímãs

Ímãs anelares de neodímio enclausurados em aço inoxidável, denominados fixadores magnéticos serão utilizados para suspensão das células. Nas culturas em placas de $60mm^2$, ímãs com 32mm de diâmetro externo (Imashop) e fluxo magnético de ao menos 6000G na superfície serão utilizados. Para cultivos em placas de 24 poços, ímãs cilíndricos com cerca de 10mm de diâmetro e fluxo mínimo de 50G na superfície serão dispostos sobre os poços da placa de 24 poços, conforme descrito na literatura (35).

Esferóides – Magnetização das células e cultivo

As células serão associadas às esferas paramagnéticas segundo dois protocolos distintos. O primeiro consiste em adicionar a suspensão de esferas com lisina às culturas bidimensionais e manter por 24 horas. Após a tripsinização, as células ($5x\ 10^4$ a $5x\ 10^5$ /mL) serão depositadas em placas repelentes à adesão celular (Nunc), ou pré-tratadas com agarose (1,5%) em solução salina fosfato tamponada (PBS). Os ímãs serão posicionados imediatamente após a deposição em placa, e as culturas permanecerão em incubação conforme descrito por 96 horas, quando haverá a troca de meio de cultura. Nestas ocasiões, os ímãs serão posicionados abaixo das placas, para

que a remoção do meio de cultura envelhecido não atinja os esferóides formados. Após a troca de meio de cultura, os ímãs serão reposicionados acima das placas e as trocas serão feitas a cada 4 dias em cultura. Os esferóides serão cultivados até atingirem 200µm de diâmetro, avaliado mediante aquisição de imagens por microscopia em microscópio invertido Nikon Eclipse TS100, ou por período ou diâmetro a ser estabelecido durante o estudo.

Caracterização da matriz extracelular

Esferóides serão retirados das culturas após atingirem diâmetros ou tempo de cultura padronizados. Na etapa inicial do projeto, serão coletados esferóides a cada 4 dias, a partir do 12º dia em cultura, fixados em solução de metanol e ácido acético ou paraformaldeído a 4% em solução salina-fosfato tamponada (PBS), emblocados em parafina e cortados histologicamente em micrótomo (Leica RM2245).

Após pré-processamento adequado (remoção de parafina, exposição/ recuperação antigênica e bloqueio de epítopos inespecíficos), os cortes histológicos serão submetidos a ligação com anticorpos específicos para laminina, colágeno tipo I e fibronectina, para avaliação da formação de matriz extracelular durante o crescimento do esferóide. A expressão destas proteínas será detectada após ligação dos anticorpos específicos a anticorpos secundários fluorescentes, contra-coloração do DNA nuclear com DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) e observação em microscópio de fluorescência (Nikon 80i).

Teste de eficácia – Diâmetro dos esferóides

Esferóides cultivados como descrito serão submetidos a concentrações a serem determinadas de radiofármacos candidatos a teste e disponíveis para estudo no Centro de Radiofarmácia IPEN/CNEN-SP. O modelo tumoral escolhido é o de próstata, que compreende cerca de 50% dos casos em homens e terá um crescimento absoluto em cerca de 60.000 novos casos em 2016 (36). Desta forma, o primeiro fármaco a ser testado será o PSMA (prostate specific membrane antigen), marcado ou não com o isótopo 177 do Lutécio (^{177}Lu). O

diâmetro dos esferóides será avaliado em períodos entre 5 a 24 dias após atingirem o diâmetro padrão determinado anteriormente. Reduções do diâmetro de esferóides significarão controle da proliferação do tumor.

Ensaio de ligação/deslocamento cinético (kinetic binding assay)

A capacidade de penetração de compostos nos esferóides será comprovada a partir de um ensaio de incorporação de Dextran® associado a um fluorocromo (FITC ou TRITC). Esferóides serão incubados em solução contendo o composto fluorescente por até 120 minutos. A fluorescência será monitorada a cada 10 minutos mediante aquisição de imagens com filtros específicos de fluorescência em microscópio invertido (Nikon TS100). A quantidade arbitrária de fluorescência de cada esferóide será avaliada por densitometria óptica das imagens, utilizando o *software* ImageJ.

Após avaliação da penetração de Dextran®, os esferóides serão avaliados segundo sua capacidade de reter a radioatividade do fármaco a ser testado (PSMA-^{177}Lu), seguindo protocolo já descrito (37). Resumidamente, 10-25 esferóides/amostra serão expostos 24 com concentrações variadas (a ser determinadas) de PSMA-^{177}Lu ou PSMA livre. Após a incubação, serão lavados em solução salina-fosfato tamponada (PBS) e a radioatividade retida será medida em detector específico. Alíquotas distintas de esferóides serão dissociadas previamente para a contabilização da fração de viabilidade celular (células viáveis / total), por exclusão do corante azul de tripano, ou outra metodologia disponível. A atividade medida em cada esferóide será corrigida para a unidade “atividade/1000 células viáveis” e comparada com os controles.

Modelo in vivo

Camundongos atímicos e imunodeficientes (*nude*), criados e mantidos no Biotério IPEN/CNEN-SP serão utilizados para a produção de modelos tumorais prostáticos humanos. É importante ressaltar que a importação de uma nova colônia desses animais já está em tramitação via projeto de auxílio FAPESP, coordenado pela Dr. Cibele Nunes Peroni, pesquisadora do CB Durante o

desenvolvimento do projeto, será escolhido ou um modelo xenólogo subcutâneo que, embora não apresente evolução metastática, fornecerá tumores sólidos mensuráveis e com características morfológicas avaliáveis (38,39). Ao menos 10^6 células tumorais viáveis serão injetadas subcutaneamente na região subescapular dos camundongos imunodeficientes. O tamanho do nódulo formado será acompanhado a cada 48 horas com o uso de um paquímetro. Os camundongos serão sacrificados humanitariamente após os nódulos atingirem $2cm^3$ ou apresentarem sinais de erosão cutânea ou inflamação, segundo protocolo já descrito (40). Nódulos retirados serão processados para microscopia óptica de fluorescência com o mesmo protocolo utilizado para os esferóides. Detalhamento sobre manutenção, número de animais e uso de anestesia será discutido junto aos pesquisadores do Biotério do IPEN, que é coordenado pela Dra. Nanci do Nascimento. O projeto será submetido à Comissão de Ética em Experimentação Animal do IPEN.

d) Principais contribuições científicas do trabalho

- Instauração de modelos de cultura celular tridimensional para estudos de fisiologia tumoral *in vitro*;

- Desenvolvimento de novas nanopartículas paramagnéticas para o cultivo suspenso de tecidos (Potencial inovação tecnológica);

- Instauração de modelos de cultura celular tridimensional para testes de eficácia de qualquer outro fármaco ou bioproduto produzido pelo IPEN, tais como nanocompostos, polímeros biocompatíveis, biofármacos, fármacos de origem natural, novos marcadores tumorais, etc;

- Base científica e tecnológica para exploração futura de modelos com maior complexidade, como as culturas organotípicas em microcircuitos fluídicos.

- Abrir possibilidades de interação com outros pesquisadores de outros centros e/ou instituições, que tenham interesse no cultivo tridimensional.

- É importante ressaltar o nosso forte interesse na produção científica e tecnológica decorrente desse projeto, assim como o compromisso de buscar fomento externo para complementar o desenvolvimento desse projeto.

e) Orçamento detalhado

Recurso Permanente	Utilidade no projeto	Quantidade	Preço (US$)
Estação automatizada para manipulação de culturas celulares em placas e microplacas (PIPETMAX Gilson)	Manipulação precisa e reprodutível de culturas celulares em microplacas	1	30000,00
Estufa incubadora (Thermo)	Manutenção dos cultivos *in vitro*	1	7000,00
Agitador orbital (Thermo)	Necessário para o processo de aderência das partículas na superfície das células	1	1300,00
Muse Cell Analyzer (Millipore)- Analisador de viabilidade celular e insumos	Analisador de viabilidade celular	1	15000,00
Lâmpada Cermax Excelitas de Xenônio 300 Watts (PE 300BF), sistema de refrigeração e fonte de alimentação (CEP301AXE) com módulo de acoplamento para fibra óptica.	Sinterização das nanopartículas utilizadas no trabalho	1	7000,00
		Total (US$)	**60300,00**

Consumível	Utilidade no projeto	Preço (R$)
Anticorpos primários e secundários para detecção de matriz extracelular	Manutenção dos cultivos *in vitro* e condução de bioensaios	4000,00
Dextran TRITC		3000,00
Material plástico para cultura celular		3000,00
Reagentes para cultivo celular (meio de cultura, soro fetal, antibióticos)		10000,00
Lâminas histológicas para imunofluorescência		1000,00
Navalhas para micrótomo		4000,00
Reserva técnica - Assistência e serviços		10000,00
Citometria de fluxo - viabilidade celular		3500,00
Ímãs de neodímio circulares, anelares e encabeçados. Fluxos magnéticos na superfície entre 50 a 9000G	Levitação magnética das culturas	3000,00
$FeCl_3$	Produção das nanopartículas	5000,00
NH_4OH		
$FeCl_2$		
Citrato de sódio		
L-lisina		
Ácido cloroáurico ($HAuCl_4$)		
Ácido 5-aminolevulínico (ALA)		
Metil aminolevulínico (MALA)		
Polietilenoglicol		
	Total (R$)	**46500,00**

f) Cronograma Físico

	Trimestre							
	1º	**2º**	**3º**	**4º**	**5º**	**6º**	**7º**	8º
Cultura bidimensional	X	X	X	X	X	X	X	X
Produção de nanoesferas	X		X		X		X	
Produção de esferóides	X	X	X	X	X	X	X	X
Imunohistoquímica de esferóides			X	X	X			
Ensaios de eficácia				X	X	X		
Ensaios de captação radioativa				X	X	X		
Indução tumoral em camundongos			X	X	X	X		
Imunohistoquímica de tumores in vivo				X	X	X	X	

g) Identificação dos participantes

- Daniel Perez Vieira, Ph.D. – Pesquisador do Centro de Biotecnologia IPEN – Coordenador.
- Carlos Roberto Jorge Soares, Ph.D. – GERENTE e Pesquisador do Centro de Biotecnologia IPEN – Colaborador.
- Elaine Bortoleti de Araújo, Ph.D. - Pesquisadora do Centro de Radiofarmácia IPEN – Colaboradora
- Emerson Soares Bernardes, Ph.D. – Pesquisador do Centro de Radiofarmácia IPEN – Colaborador
- Fabiana Medeiros da Silva, Ph.D. – Diretora do Lab. Biosintesis – Colaboradora.
- Lilia Coronato Courrol, Ph.D. – Pesquisadora do Depto. de Ciências da Exatas e da Terra da UNIFESP – Colaboradora.
- Maria Helena Bellini Marumo, Ph.D. – Pesquisadora do Centro de Biotecnologia IPEN – Colaboradora.
- Nanci do Nascimento, Ph.D. – Pesquisadora do Centro de Biotecnologia IPEN – Colaboradora.
- Regina Affonso, Ph.D. – Pesquisadora do Centro de Biotecnologia IPEN – Colaboradora.
- Alunos de pós-graduação – 3 ME (Dr. Daniel Perez Vieira)

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO

UNIFESP

São Paulo, 26 de outubro de 2016.

Declaração

Declaro, para os devidos fins, que eu Lilia Coronato Courrol aceito colaborar com o projeto intitulado: "**Desenvolvimento de modelos de cultivo tridimensional in vitro de células tumorais como sistema-teste para avaliação de eficácia de radiofármacos produzidos pelo IPEN**". Declaro que receberei desse projeto, recursos para custear a síntese de nanopartículas de ferro e ferro-ouro funcionalizadas.

Atenciosamente,

Prof.ª Dra. Lilia Coronato Courrol
Departamento de Ciências Exatas e da Terra
UNIFESP - Campus Diadema

Profa. Dra. Lilia Coronato Courrol

h) Estrutura Física e Equipamentos

- Sala de cultura celular para manejo dos cultivos *in vitro* e devidamente autorizada para abrigar trabalhos com compostos radiomarcados;

- Citômetro de fluxo Accuri C6 para ensaios de viabilidade celular;

- Microscópio de fluorescência Nikon 80i;

- Microscópio invertido de fluorescência Nikon TS100;

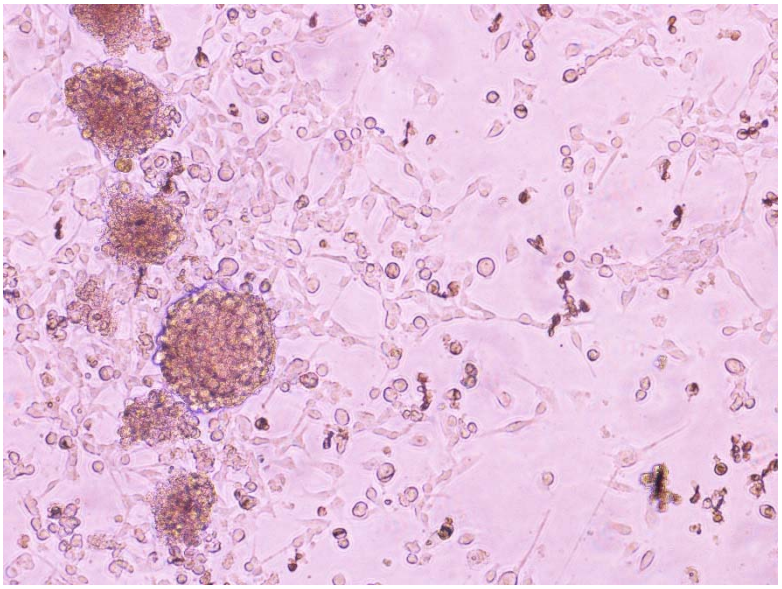
- Laboratório de histologia equipado com micrótomo Leica RM2245;

- Sala para esterilização de material;

- Sistema de descarte químico, biológico e radioativo adequado;

- Equipamentos triviais: centrífugas, banhos-maria, medidores de pH, agitadores, pipetadores.

i) Resultados preliminares



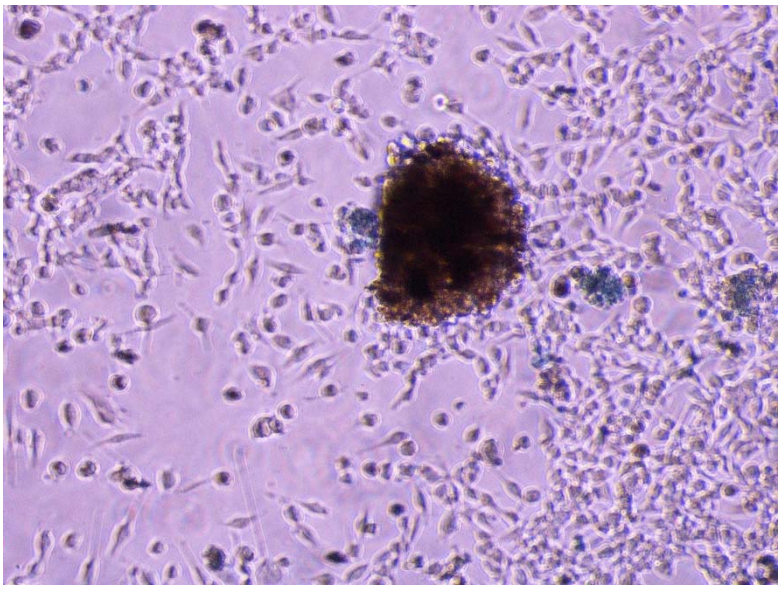


Figura 1 - Topo: Esferóides de célula de melanoma humano (SK-MEL-37) cultivados sem suspensão magnética. Baixo: esferóide cultivado suspenso por levitação magnética. Nota-se a melanização do esferóide levitado, caracterizada pela coloração castanha

VÍDEO 1 – ATRAÇÃO MAGNÉTICA DE CÉLULA: http://goo.gl/9gxhfH

VÍDEO 2– ATRAÇÃO MAGNÉTICA DE ESFERÓIDE: goo.gl/U0wJKw

j) Referências Bibliográficas

1. Eagle H, Foley GE, Foley E. Cytotoxicity in Human Cell Cultures as a Primary Screen for the Detection of Anti-Tumor Agents Cytotoxicity in Human Cell Cultures as a Primary Screen for the Detection of Anti-Tumor Agents *. 1958;1017–25.
2. HIRSCHBERG E. Tissue culture in cancer chemotherapy screening. Cancer Res [Internet]. 1958 Sep;18(8 Part 1):869–78. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13573357
3. Griffith LG, Swartz MA. Capturing complex 3D tissue physiology in vitro. Nat Rev Mol Cell Biol. 2006;7(March):211–24.
4. Antoni D, Burckel H, Josset E, Noel G. Three-Dimensional Cell Culture : A Breakthrough in Vivo. 2015;5517–27.
5. Lin RZ, Chang HY. Recent advances in three-dimensional multicellular spheroid culture for biomedical research. Vol. 3, Biotechnology Journal. 2008. p. 1172–84.
6. Papusheva E, Heisenberg C-P. Spatial organization of adhesion: force-dependent regulation and function in tissue morphogenesis. EMBO J [Internet]. Nature Publishing Group; 2010;29(16):2753–68. Available from: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2924654&tool=pmcentrez&rendertype=abstract
7. Galle J, Aust G, Schaller G, Beyer T, Drasdo D. Individual cell-based models of the spatial-temporal organization of multicellular systems--achievements and limitations. Cytometry A [Internet]. 2006 Jul;69(7):704–10. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16807896
8. Manz BN, Groves JT. Spatial organization and signal transduction at intercellular junctions. Nat Rev Mol Cell Biol [Internet]. Nature Publishing Group; 2010;11(5):342–52. Available from: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3693730&tool=pmcentrez&rendertype=abstract

9. Hutchinson L, Kirk R. High drug attrition rates—where are we going wrong? Nat Publ Gr [Internet]. Nature Publishing Group; 2011;8(4):189–90. Available from: http://dx.doi.org/10.1038/nrclinonc.2011.34

10. Hickman JA, Graeser R, de Hoogt R, Vidic S, Brito C, Gutekunst M, et al. Three-dimensional models of cancer for pharmacology and cancer cell biology: Capturing tumor complexity in vitro/ex vivo. Biotechnol J. 2014;9(9):1115–28.

11. Kuwashima Y, Yamada T, Saio M, Takami T. Formation and growth of multicellular spheroids in media containing low concentrations of agarose. Cancer Lett [Internet]. 1993 Jul 30;71(1–3):31–3. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8364895

12. Song H, David O, Clejan S, Giordano CL, Pappas-Lebeau H, Xu L, et al. Spatial composition of prostate cancer spheroids in mixed and static cultures. Tissue Eng [Internet]. 2004;10(7–8):1266–76. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15363181

13. Janorkar A V. Review: Polymeric scaffold materials for two-dimensional and three-dimensional in vitro culture of hepatocytes. ACS Symp Ser. 2010;1054:1–32.

14. Vindigni V, Cortivo R, Iacobellis L, Abatangelo G, Zavan B. Hyaluronan benzyl ester as a scaffold for tissue engineering. Int J Mol Sci. 2009;10(7):2972–85.

15. Gotoh Y, Niimi S, Hayakawa T, Miyashita T. Preparation of lactose-silk fibroin conjugates and their application as a scaffold for hepatocyte attachment. Biomaterials. 2004;25(6):1131–40.

16. Balakrishnan B, Jayakrishnan A. Self-cross-linking biopolymers as injectable in situ forming biodegradable scaffolds. Biomaterials. 2005;26(18):3941–51.

17. Underhill GH, Chen AA, Albrecht DR, Bhatia SN. Assessment of hepatocellular function within PEG hydrogels. Biomaterials. 2007;28(2):256–70.

18. Nath S, Devi GR. Three-dimensional culture systems in cancer research: Focus on tumor spheroid model. Pharmacol Ther [Internet]. Elsevier Inc.; 2016 Jul;163:94–108. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.pharmthera.2016.03.013

19. Benton G, Arnaoutova I, George J, Kleinman HK, Koblinski J. Matrigel: From discovery and ECM mimicry to assays and models for cancer research. Adv Drug Deliv Rev [Internet]. Elsevier B.V.; 2014;79:3–18. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2014.06.005

20. Souza GR, Molina JR, Raphael RM, Ozawa MG, Stark DJ, Levin CS, et al. Three-dimensional tissue culture based on magnetic cell levitation. Nat Nanotechnol [Internet]. Nature Publishing Group; 2010;5(4):291–6. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20228788%5Cnhttp://dx.doi.org/10.1038/nnano.2010.23

21. Jeong YG, Lee JS, Shim JK, Hur W. A scaffold-free surface culture of B16F10 murine melanoma cells based on magnetic levitation. Cytotechnology [Internet]. Springer Netherlands; 2016; Available from: http://link.springer.com/10.1007/s10616-016-0026-7

22. Haisler WL, Timm DM, Gage JA, Tseng H, Killian TC, Souza GR. Three-dimensional cell culturing by magnetic levitation. Nat Protoc [Internet]. 2013;8(10):1940–9. Available from: http://search.proquest.com/docview/1432084398/abstract/E125992C5B1F4616PQ/8?accountid=46407\nhttp://media.proquest.com/media/pq/classic/doc/3070525831/fmt/pi/rep/NONE?hl=&cit:auth=Haisler,+William+L;Timm,+David+M;Gage,+Jacob+A;Tseng,+Huber

23. Sensenig R, Sapir Y, MacDonald C, Cohen S, Polyak B. Magnetic nanoparticle-based approaches to locally target therapy and enhance tissue regeneration in vivo. Nanomedicine (Lond) [Internet]. 2012;7(9):1425–42. Available from: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3543693&tool=pmcentrez&rendertype=abstract

24. Souza GR, Christianson DR, Staquicini FI, Ozawa MG, Snyder EY, Sidman RL, et al. Networks of gold nanoparticles and bacteriophage as biological sensors and cell-targeting agents. Proc Natl Acad Sci USA [Internet]. 2006;103(5):1215–20. Available from: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1346765&tool=pmcentrez&rendertype=abstract

25. Souza GR, Yonel-Gumruk E, Fan D, Easley J, Rangel R, Guzman-Rojas L, et al. Bottom-up assembly of hydrogels from bacteriophage and Au nanoparticles: The effect of Cis- and trans-acting factors. PLoS One. 2008;3(5).

26. Lee JH, Hur W. Scaffold-free formation of a millimeter-scale multicellular spheroid with an internal cavity from magnetically levitated 3T3 cells that ingested iron oxide-containing microspheres. Biotechnol Bioeng [Internet]. 2014 May;111(5):1038–47. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24254251

27. Guideline O, The FOR, Of T. Oecd guideline for the testing of chemicals. 2010;(July).

28. Jaganathan H, Gage J, Leonard F, Srinivasan S, Souza GR, Dave B, et al. Three-Dimensional In Vitro Co-Culture Model of Breast Tumor using Magnetic Levitation. Sci Rep. 2014;4:6468.

29. Antoni D, Burckel H, Josset E, Noel G. Three-dimensional cell culture: a breakthrough in vivo. Int J Mol Sci [Internet]. 2015 Mar 11;16(3):5517–27. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25768338

30. Daquinag AC, Souza GR, Kolonin MG. Adipose tissue engineering in three-dimensional levitation tissue culture system based on magnetic nanoparticles. Tissue Eng Part C Methods [Internet]. 2013;19(5):336–44. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23017116%5Cnhttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3603558/pdf/ten.tec.2012.0198.pdf

31. Tseng H, Gage JA, Raphael RM, Moore RH, Killian TC, Grande-Allen KJ, et al. Assembly of a three-dimensional multitype bronchiole coculture

model using magnetic levitation. Tissue Eng Part C Methods [Internet]. 2013 Sep;19(9):665–75. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23301612

32. Eder M, Eisenhut M, Babich J, Haberkorn U. PSMA as a target for radiolabelled small molecules. Eur J Nucl Med Mol Imaging. 2013;40(6):819–23.

33. Ghosh A, Heston WDW. Tumor target prostate specific membrane antigen (PSMA) and its regulation in prostate cancer. J Cell Biochem. 2004;91(3):528–39.

34. Babic M, Horák D, Trchová M, Jendelová P, Glogarová K, Lesný P, et al. Poly(L-lysine)-modified iron oxide nanoparticles for stem cell labeling. Bioconjug Chem [Internet]. 2008;19(3):740–50. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18288791

35. Tseng H, Balaoing LR, Grigoryan B, Raphael RM, Killian TC, Souza GR, et al. A three-dimensional co-culture model of the aortic valve using magnetic levitation. Acta Biomater [Internet]. Acta Materialia Inc.; 2014;10(1):173–82. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2013.09.003

36. Instituto Nacional do Câncer. INCA - Estimativa do número de casos novos de câncer no Brasil - 2016. 2016.

37. Ingargiola M, Runge R, Heldt JM, Freudenberg R, Steinbach J, Cordes N, et al. Potential of a Cetuximab-based radioimmunotherapy combined with external irradiation manifests in a 3-D cell assay. Int J Cancer. 2014;135(4):968–80.

38. Xinyu Wu, Shiaoching Gong, Pradip Roy-Burman, Peng Lee ZC. Current mouse and cell models in prostate cancer research. Endocr relat cancer. 2014;20(4):1–26.

39. Kerbel RS. Human tumor xenografts as predictive preclinical models for anticancer drug activity in humans: better than commonly perceived-but they can be improved. Cancer Biol Ther. 2003;2(4 Suppl 1).

40. Lange T, Ullrich S, Muller I, Nentwich MF, Stubke K, Feldhaus S, et al. Human Prostate Cancer in a Clinically Relevant Xenograft Mouse Model: Identification of (1,6)-Branched Oligosaccharides as a Marker of Tumor Progression. Clin Cancer Res. 2012;18(3):1364–73.