



PLANO DE TRABALHO

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES – CNEN/IPEN

EDITAL COPDE 6/2020

2020.06.IPEN.12.PD

DADOS DO PROJETO

DESCRIÇÃO DO PROJETO

Título do Projeto:

“Produção de tumoroides de adenocarcinoma prostático humano para testes de antitumorais carregados por nanoestruturas de óxido de grafeno”.

Prazo Execução:

19 meses

Objetivo Geral (Objeto da Proposta):

O estudo dos tumores prostáticos é de grande interesse na área da Saúde Humana. Técnicas de cultivos *in vitro* que possam produzir esferóides de células de tumores prostáticos de maneiras reprodutíveis e praticáveis podem fornecer material experimental em quantidades suficientes para a pesquisa da fisiologia tumoral em larga escala, utilizando tecnologias disruptivas de cultivos celulares tridimensionais. Geral – Produzir modelo de cultivo celular tridimensional de adenocarcinoma de próstata, contendo células tumorais e não-tumorais, a saber: linhagem de adenocarcinoma prostático humano (LnCap), linhagem epitelial prostática humana (RWPE-1), linhagem fibroblástica prostática humana (WPMY-1), linhagem endotelial (HUVEC) com o mínimo de suplementação química possível.

Metas

1 – Desenvolvimento de modelo reprodutível para estudos de tumores *in vitro*.

2- Desenvolvimento de um modelo *in vitro* inovador de tumor de próstata humano

3- Desenvolvimento de Teste de eficácia de fármacos por carreamento por óxido de grafeno nanoestruturado.

4 – Utilização da estrutura para testes de fármacos antitumorais diversos

5 – Formação de recursos humanos para o desenvolvimento de novas tecnologias no IPEN.



PLANO DE TRABALHO

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES – CNEN/IPEN

EDITAL COPDE 6/2020

2020.06.IPEN.12.PD

Justificativa Resumida:

Embora utilizados há várias décadas, e exibindo várias qualidades, os cultivos celulares em monocamadas apresentam deficiências de representatividade em relação aos seus tecidos de origem.

A diferente distribuição espacial das células, a proporção reduzida de interações físicas entre elas e especialmente a ausência de gradientes de gases respiratórios, nutrientes e produtos do metabolismo são fatores que direcionam a fisiologia celular em cultura de maneira incompleta, fazendo com que não haja reprodução correta das condições fisiológicas em cultura.

O presente projeto propõe a utilização de estratégias de cultivos celulares tridimensionais que, ao emular características fisiológicas de tecidos compostas por células de mamíferos, permitam a produção em escala de esferóides de células de adenocarcinoma prostático humano que sejam modelos representativos da fisiologia tumoral (tumoroides), facilitando estudos *in vitro*.

Palavras-chave: cultivo tridimensional; tumoroides, câncer de próstata; bioimpressão; óxido de grafeno

e) Qualificação do principal problema a ser abordado

e.1) Cultivos celulares em 2D e 3D

Cultivos celulares *in vitro* fornecem configurações biológicas e fisiológicas mínimas necessárias para estudos de diversos tecidos. O fornecimento adequado de nutrientes e gases, promove a capacidade de linhagens celulares se reproduzirem, com o intuito de utilizá-las para sistemas-teste em quantidades suficientes para estudos em diversas áreas do conhecimento. Os protocolos usuais baseiam-se no denominado cultivo em monocamada, onde as células reproduzem-se aderidas em superfícies de vidro ou plástico, se dispondo de forma lateral umas às outras.

No decorrer de alguns dias, as células cobrem a superfície de cultivo formando uma estrutura semelhante a um “tapete”. Entre as aplicações mais frequentes dos cultivos celulares estão as que se dedicam ao estudo da fisiologia tumoral *in vitro*, geralmente com o intuito de se estudar os fenômenos de suscetibilidade a terapêuticos antitumorais (BLUMENTHAL; GOLDENBERG, 2007; KATT et al., 2016; LIPPERT et al., 2011; SU, 2014; UNGER et al., 2015). Embora se faça a utilização em larga escala desses sistemas há cerca de 50 anos (EAGLE; FOLEY, 1958; HIRSCHBERG, 1958), evidências científicas atuais demonstram que a disposição bidimensional impede com que as células expressem suas características de forma análoga à encontrada no organismo (GRIFFITH; SWARTZ, 2006). Para que tais linhagens se comportem de maneira próxima àquelas observadas *in vivo*, se é proposto modelos em que ocorra interação tridimensional entre células (ANTONI et al., 2015). Desta forma, favorecendo a produção e certo nível de encapsulamento promovendo interação com proteínas da matriz extracelular (DOYLE; YAMADA, 2016; GOLDBIRSCHE et al., 2013; HARUNAGA; YAMADA, 2011; LIN; CHANG, 2008). Nos cultivos em 2D, o nível de interação célula-célula, apresenta-se meramente lateral, impossibilitando com que seja formado um nicho que simule a distribuição espacial natural das células nos tecidos (FOGLIETTA et al., 2020). 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 (NAVA et al., 2020; NESTORBERGMANN et al., 2019). 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 (BAKER; CHEN, 2012), da distribuição das zonas de comunicação existentes nas suas superfícies (MANZ; GROVES, 2010). Além disso, o estresse mecânico oriundo do agrupamento celular, parece conferir funções fisiológicas muito próximas das apresentadas pelos tecidos *in vivo* (LAGIES et al., 2020; RIEDL et al., 2017). A forma mais simples e tradicionalmente mais utilizada de cultivo de agrupamentos celulares é a formação de esferóides em placas de cultura que impedem a adesão celular. A cobertura de placas ou garrafas de cultura com agarose permite a formação de esferóides, que são agregados celulares com formato característico (KUWASHIMA et al., 1993). Outra alternativa para o cultivo tridimensional, é a levitação

magnética de células em meio de cultura (BONFIM et al., 2019; HAISLER et al., 2013; 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 (SENSENI et al., 2012; SOUZA et al., 2006). O sistema apresenta muitas vantagens em relação ao apresentado anteriormente. Nele, não são necessários equipamentos especiais para agitação de culturas, mais sim, ímãs com fluxo magnético moderado ou forte; além disso possibilitam e estimulam as células a produzirem sua própria matriz extracelular. Além da organização em esferóides, as células podem ser cultivadas em substratos porosos (scaffolds), compostos de polímeros biocompatíveis e hidrogéis diversos (BALAKRISHNAN; JAYAKRISHNAN, 2005; GOTOH, YOHKO; NIIMI, SHINGO; HAYAKAWA, TAKAO; MIYASHITA, 2004; JANORKAR, 2010; NATH; DEVI, 2016; UNDERHILL et al., 2007; VINDIGNI et al., 2009). Embora tais matrizes exógenas possam ser úteis para cultivos, é racional a utilização ou ao menos a adição de componentes próprios das matrizes extracelulares encontradas em tumores, como colágenos, proteoglicanos, ácido hialurônico, fibronectina, lamininas (HENKE et al., 2020; MALANDRINO et al., 2018), os quais são componentes majoritários de tais matrizes, ou outros (mucinas, fibrinogênio, vitronectina). (NALLANTHIGHAL et al., 2019). Estas matrizes compostas também permitem a retenção de fatores de crescimento (como FGF, fibroblast growth factor), citocinas e metaloproteinasas (TGF- β , transforming growth factor -beta) (POLTAVETS et al., 2018), o que inclusive pode ser determinante para as condições de malignância, invasividade e metastatização (ODENTHAL et al., 2016; XIONG; XU, 2016).

e.2) Tumores de próstata/adenocarcinomas prostáticos

A próstata é uma glândula piramidal com cerca 15-20g de massa quando saudável, e que se situa abaixo da bexiga masculina, envolvendo a uretra. Sua função majoritária é produzir o líquido prostático, principal componente do fluido ejaculado. Histologicamente, o órgão é composto por duas matrizes, uma muscular lisa e uma glandular (ITTMANN, 2018). A matriz glandular é caracterizada por estruturas ductais acinares, separadas da matriz muscular por um epitélio pseudoestratificado formado por células basais cubóides e células secretoras colunares, polarizadas para o interior dos ácinos. Tais estruturas são delimitadas por lâmina basal própria, e povoam todo o parênquima do órgão (SHAH; ZHOU, 2012). As neoplasias malignas de próstata, juntamente às da mama, são os tipos de cânceres mais frequentes no Brasil, com número de casos previstos para 2020 (“INCA - Instituto Nacional de Câncer |”, [S.d.]) de 65840 para próstata e 66280 para mama. Entre homens, o câncer de próstata é o mais comum, e sua incidência (29,2%) é mais de três vezes maior do que a do segundo grupo mais incidente, o de cólon e reto (9,1%, em homens). Os tumores de próstata são mais frequentes na zona periférica (cerca de 75%), seguida da zona transicional (20%) e da zona central (5%) (SATHIANATHEN et al., 2018).

Tumores prostáticos podem ter início em regiões diversas do parênquima do órgão. De acordo com a sua origem, são classificados como: carcinoma de células escamosas, adenocarcinomas basais, carcinomas neuroendócrinos, adenocarcinomas luminiais e carcinomas de células pequenas (WANG et al., 2018). Por sua vez, os adenocarcinomas são bastante diversos, se desenvolvendo em várias tipagens morfológicas (VAKAR-LOPEZ; TRUE, 2018). A patologia tumoral padrão é caracterizada pela fusão das estruturas acinares normais, com redução drástica da luz interna (HUMPHREY, P. A., 2007). As células epiteliais distribuem-se de maneira difusa pelo parênquima do órgão, comprimindo a matriz muscular, predominando sobre a mesma (HUMPHREY, PETER A., 2017).

e.3) Tumoroides prostáticos humanos

Tumores respondem ao tecido circunvizinho de maneiras diversas, interagindo fisiologicamente de forma a comportar-se como quasi-órgãos, contendo mais tipos celulares, além dos propriamente tumorais que suportam o desenvolvimento do tecido tumoral resultante, tais como fibroblastos, adipócitos, endoteliais, células-tronco da medula óssea e diversas populações do sistema imunológico, entre outras (BALKWILL et al., 2012), sendo as linhagens epiteliais relacionadas a limitações ao crescimento das áreas tumorais.(EGEBLAD et al., 2010). Estas formações celulares são produtos do



PLANO DE TRABALHO

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES – CNEN/IPEN

EDITAL COPDE 6/2020

2020.06.IPEN.12.PD

relativamente bem descrito microambiente tumoral (WHITESIDE, 2008), que pode conter quantidades variáveis de células tumorais maduras ou quiescentes (stem cells tumorais) (BAGHBAN et al., 2020), fibroblastos (CAF's, cancer associated fibroblasts) (SAHAI et al., 2020), células endoteliais (HIDA et al., 2018) e células do sistema imune como macrófagos M2 e linfócitos B e T-auxiliadores (ARNETH, 2019). Além disso, os tecidos normais adjacentes aos tumores (Normal tissues adjacent to the tumors, NAT's) apresentam perfil transcricional próprio, distinto dos encontrados em tecidos normais alienados aos tumores e os dos próprios tumores (ARAN et al., 2017). Há, portanto, evidência *in vivo* das relações entre tumores e células não tumorais. São então denominados tumoroides as estruturas multi-celulares compostas de várias populações celulares e que funcionam como órgãos tumorais *in vitro* (FINNBERG et al., 2017; KAUSHIK et al., 2018). O termo vem sendo usado também para designar estruturas provenientes de biópsias tumorais de pacientes em tratamento, e é uma promissora técnica de medicina especializada (BARTLETT et al., 2014; BROUTIER et al., 2017; FAN et al., 2019; KIM et al., 2019; LEWIS; TAKEBE, 2018). A produção de tumoroides de próstata humana vem sendo estudada em especial utilizando explantes de pacientes (DROST et al., 2016; GAO et al., 2014; PUCA et al., 2018; VAN HEMELRYK; VAN WEERDEN, 2020), podendo envolver inclusive passagens em animais experimentais (patient derived xenograft) (ELBADAWY et al., 2020), mas é possível desenvolver tais estruturas utilizando linhagens estabelecidas (GLEAVE et al., 2020; KARTHAUS et al., 2014; WEEBER et al., 2017), mesmo que implique em suplementação massiva do meio de cultura com diversos fatores de crescimento ou hormônios, como EGF (epidermal growth factor), FGF (fibroblast growth factor) e testosterona. No entanto, tais cultivos não foram desenvolvidos em vista diversidade de populações celulares; são estruturados com matriz extracelular exógena disponível comercialmente, compostos de poucos tipos celulares e desenvolvidos em poucos micrômetros, embora longevos em cultura (PUCA et al., 2018). Seria interessante a estudos deste porte desenvolver tumoroides de próstata humana que, por conter várias populações celulares, dependa em menor medida de suplementos estimulantes. A adição de fibroblastos e células endoteliais que após estabelecimento poderiam assumir o papel de CAF's e de endotélio tumoral poderia, em tese, basear um sistema de estimulação intrínseca, reduzindo a importância dos suplementos, ao mesmo tempo em que poderia estruturar o suporte físico aos tecidos pela produção de matriz extracelular. Ainda, a utilização de técnicas de bioimpressão poderia ajudar a organização de tumoroides que, embora com dimensões ampliadas, ultrapassando a marca de milímetros, poderiam conter várias estruturas celulares e assim emulariam com mais fidelidade o órgão tumoral para que sejam adequados aos testes de fármacos utilizando técnicas inovadoras de drug delivery, tais como as baseadas em associação ao óxido de grafeno como carreador (JONOUSH et al., 2020; ZHENG et al., 2016).

f) Objetivos a serem alcançados

O estudo dos tumores prostáticos é de grande interesse na área da Saúde Humana.

Técnicas de cultivos *in vitro* que possam produzir esferóides de células de tumores prostáticos de maneiras reprodutíveis e praticáveis podem fornecer material experimental em quantidades suficientes para a pesquisa da fisiologia tumoral em larga escala, utilizando tecnologias disruptivas de cultivos celulares tridimensionais.

Geral – Produzir modelo de cultivo celular tridimensional de adenocarcinoma de próstata, contendo células tumorais e não-tumorais, a saber: linhagem de adenocarcinoma prostático humano (LnCap), linhagem epitelial prostática humana (RWPE-1), linhagem fibroblástica prostática humana (WPMY-1), linhagem endotelial (HUVEC) com o mínimo de suplementação química possível.

Específicos – Avaliar linhagens celulares distintas e sua capacidade de gerar e manter tumoroides prostáticos humanos; Avaliar metodologia de bioimpressão para a confecção dos tumoroides; Avaliar composições de matriz extracelular exógena para a estruturação dos tumoroides; Avaliar drogas anti-tumorais com eficácia contra adenocarcinomas prostáticos em formulações inovadoras com óxido de grafeno como carreador; Avaliar efeitos de doses controladas de radiação ionizante



PLANO DE TRABALHO

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES – CNEN/IPEN

EDITAL COPDE 6/2020

2020.06.IPEN.12.PD

g) Metodologia a ser empregada Cultura celular: Para expansão inicial em cultivos bidimensionais, linhagem de células de adenocarcinoma prostático humano LnCap (ATCC CRL-1740), fibroblastos prostáticos humanos WPMY-1 (ATCC CRL-2854) (DENT et al., 2019; KETTELER et al., 2019), células prostáticas epiteliais humanas não-tumorais RWPE-1 (ATCC CRL-11609) serão cultivadas em frascos de cultura celular de 25 cm² contendo meio RPMI 1640 suplementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino, e 1% (v/v) de solução de antibióticos (10.000 UI/mL de penicilina, 10 mg/mL de estreptomicina e 1 mg/mL de anfotericina B) e mantidas em uma incubadora a 37°C, 5% de CO₂ com umidade controlada. Ao atingir a confluência entre 60-70%, as células serão lavadas com solução salina-fosfato tamponada (PBS), pH 7,4, estéril, com 0,05 M de EDTA e destacadas com solução de tripsina. Células endoteliais humanas HMEC-1 (ATCC CRL-3243) (HSU et al., 2011; XU, H. et al., 2007) serão cultivadas da mesma forma, mas em meio MCDB131 suplementado com fator de crescimento epidermal (EGF), 10 ng/mL, hidrocortisona (1 µg/mL), Glutamina (10mM) e soro fetal bovino e antibióticos como descrito. Meios de cultura: Poderão ser utilizados os meios de cultura: I) RPMI-1640 (10% soro fetal bovino); II) MCDB131 suplementado com fator de crescimento epidermal (EGF), 10ng/mL, hidrocortisona (1µg /mL), Glutamina (10 mM) e soro fetal bovino; III) K-SFM suplementado com 0,05 mg/mL de extrato pituitário bovino e 5 ng/mL de EGF; IV) DMEM modificado (ADMEM) contendo, B27, N-acetilcisteína (1,25 mM), EGF (50 ng/mL), FGF (20 ng/mL), nicotinamida (10 mM), (di-hidro) testosterona (1 nM), PGE2 (prostaglandina-2, 1 µM), além dos inibidores de ciclo celular A-83-01 (500 nM) e SB202190 (10 µM), conforme descrito (PUCA et al., 2018). Todos os experimentos subsequentes poderão utilizar estes meios ou misturas dos mesmos, a depender da padronização. Produção de tumoroides por agregação: Placas de Petri (60 mm de diâmetro) serão pré-tratadas com solução de Pluronic® F-127 (0,5 g/mL em 2-propanol). Cada placa receberá 3mL desta solução e permanecerá fechada em temperatura ambiente por 24 horas. Após este período, o máximo possível de líquido será retirado por sucção e as placas serão postas para secagem em capela de fluxo laminar estéril e sob irradiação UV para eliminar o risco de contaminação por 30 minutos. Com este procedimento, as moléculas do copolímero se arranjam em configuração “pancake” (NEJADNIK et al., 2009), com sua porção hidrofóbica direcionada para o centro do poço, impedindo assim a adesão celular no plástico de cultura. Em cada placa será adicionado meio de cultura (2000 µL) com misturas de células RWPE-1, WPMY-1, HMEC-1 e LnCap em proporções a ser determinadas pelo estudo e emblocadas em matriz extracelular exógena formada por colágeno tipo IV (CAZZANIGA et al., 2016). Seguindo a experiência do laboratório, o número total de células não deve exceder 5x10⁵ /placa. Serão formados tumoroides que serão mantidos em suspensão em meio de cultura específico enquanto os experimentos durarem ou até sua degeneração.

Produção de tumoroides por levitação magnética: Os cultivos serão desenvolvidos em placas de 6 poços, repelente a células (Greiner BioOne). As células serão pré-tratadas com nanopartículas de magnetita (BONFIM et al., 2019) cobertas com poli-l-lisina, as quais são adsorvidas pelas células, tornando-as responsivas a campos magnéticos. Os agregados celulares serão formados por ação de ímãs de neodímio N35 (1,5 cm de diâmetro, 6,5 kg de força magnética) posicionados em cada poço para unir as células sob campo magnético. As células serão mantidas sob a ação dos campos por no mínimo 48 horas, ou até a agregação ser mantida sem a ação do campo magnético. Esta formulação não requer a adição de colágeno. Produção de tumoroides por bioimpressão: Os tumoroides serão previamente desenhados e transferidos com os programas livres “Pronterface e Slic 3R/Cura” em computador acoplado à bioimpressora Octopus da empresa 3DBS, contendo duas seringas de injeção, onde em uma será adicionada a mistura de células a serem estudadas e na outra serão testadas algumas biotintas naturais como colágeno ou poliméricas para formação de hidrogéis biocompatíveis após fotocura UV ou outro agente reticulante como por exemplo cloreto de cálcio (no caso da adição simultânea de células), que propiciem o melhor nicho para a proliferação dos diferentes tipos celulares. Poderão ser adicionados fatores de crescimento antes ou após a formação dos arcabouços (scaffolds). Este sistema de bioimpressão é um equipamento multiusuário que se encontra em funcionamento no Laboratório de Efeitos da Radiação em Tecidos e Microorganismos, do Centro de Tecnologia das Radiações – CETER.



PLANO DE TRABALHO

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES – CNEN/IPEN

EDITAL COPDE 6/2020

2020.06.IPEN.12.PD

Experimentos de prevalência de populações: Os traçadores fluorescentes CellVue® Claret Far Red Fluorescent Cell Linker ou PKH67 Green Fluorescent Cell Linker (Sigma-Aldrich) serão adsorvidos por células LnCap, WPMY-1, RWPE-1 ou HMEC-1, cada cultivo separado das demais linhagens. Em observações separadas e independentes em microscópio de fluorescência, cada linhagem será rastreada e quantificada ao decorrer de vários dias de experimento, com o intuito de se observar proliferação, localização ou extinção de cada uma em tumoroides produzidos por cada metodologia. Fármacos consagrados escolhidos: De acordo com a base de dados “Genomics of Drug Sensitivity in Cancer” (disponível para consulta em www.cancerrxgene.org), a vinblastina tem alta atividade (IC50: 0,008 μM) contra as células LnCap cultivadas em duas dimensões. A rapamicina (IC50: 0,135 μM) tem atividade de magnitude menor. Os dois fármacos serão testados livres ou em formulações com óxido de grafeno como carreador em cultivos tridimensionais. Síntese do óxido de grafeno (OG): O óxido de grafeno será sintetizado a partir do pó do grafite (Merck Millipore com 99,99% de pureza) utilizando o método de Hummers modificado (HUMMERS; OFFEMAN, 1958). O grafite (3 g) será adicionado a um balão contendo 140 mL de H_2SO_4 e 3 g de NaNO_3 , a 0°C . A mistura será mantida sob agitação e, em seguida, serão adicionados 18 g de KMnO_4 e a temperatura será mantida a 35°C por uma hora. Após a adição de 100 mL de água destilada a mistura será aquecida, sob agitação, a 100°C por cerca de 3 horas. Ao final da reação serão adicionados 100 mL de água deionizada e H_2O_2 , até que a solução da mistura passe de marrom para amarelo. O óxido de grafite será lavado com solução 1M NaOH, 1M de HCl, as lavagens serão seguidas por centrifugação a 12.000 rpm e, por fim com água deionizada até atingir o pH 7 e o óxido de grafeno será obtido após a esfoliação utilizando um equipamento de ultrassom por 45 min. O óxido de grafeno será manuseado em glove box e com as EPI's necessárias para manutenção da segurança do usuário.

Funcionalização do óxido de grafeno com polietilenoglicol (PEG): A funcionalização do OG com PEG, seguir-se-á a síntese proposta por Mutter (MUTTER, 1978), na qual o PEG é submetido a um processo de secagem e realiza-se a reação com excesso de TsCl na presença de CH_2Cl_2 (diluído a 2% m/v piridina, 12 h). O produto obtido (2) é tratado inicialmente com Kftalimida em DMF (120°C , 3h, N_2) e após reação com hidrazina (refluxo, 3h) levará a formação do PEG-NH₂ (amino-PEG) que será purificado com éter e recristalização. A funcionalização será realizada posteriormente utilizando a polietilenoamina e o cloreto de N-(3-Dimethylaminopropil)-N'-ethylcarbodiimida (EDC) (XU, Z. et al., 2014). Em 10 mL de solução de OG, na concentração de 10 mg/mL, adiciona-se 1,8 g de NaOH. A mistura é aquecida a 55°C durante 4 h. Na sequência adiciona-se 37% (vol/vol) de uma solução de HCl (6-7 mL) para neutralizar o NaOH. Para remover o sal, o produto será lavado quatro vezes com água deionizada. O produto será recolhido durante a lavagem com uma velocidade de centrifugação de 9.000 g durante 5 min, e receberá 25 mg de PEG-NH₂ na solução tratada com OG (1mg ml⁻¹, 5mL) em um frasco de vidro de 25 mL. Em um sonificador de banho, a temperatura ambiente, será sonificado o frasco vigorosamente durante 15 min. e, em seguida serão adicionados 5 mg de EDC, seguido por mais sonificação por 30 min em temperatura ambiente, e na sequência serão acrescentados mais 5 mg de EDC. A mistura passará por sonificação por mais 20 min. e será mantida sob agitação overnight em temperatura ambiente. Para remoção de quaisquer agregados a solução será centrifugada a uma velocidade de 21.000 g durante 30 min.

O sobrenadante será recolhido e filtrado em filtro específico para centrifugação. Após a lavagem final, será adicionada água e a solução de nOG-PEG será armazenada a solução a 4°C . Incorporação dos fármacos: As incorporações dos fármacos serão executadas pela agitação de solução dos fármacos dissolvidos em DMSO com uma solução aquosa de NGO-PEG (LIU et al., 2008). O excesso de fármaco desacoplado será removido por centrifugação. Lavagens e filtrações repetidas serão usadas para remover DMSO e qualquer fármaco livre residual. A avaliação de incorporação será efetuada por Espectroscopias de Raman, Infravermelho e Ultra Violeta, Termogravimetria e Microscopias de Varredura e de Força Atômica. Exposições aos fármacos livres ou carreados: Tumoroides serão expostos aos fármacos livres ou incorporados a nanopartículas de óxido de grafeno em concentrações entre 100 e 0,1 vezes suas IC50 determinadas em cultivos de 2D, por 4 ou 20 horas. Após este período, o meio de cultura será removido e



PLANO DE TRABALHO

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES – CNEN/IPEN

EDITAL COPDE 6/2020

2020.06.IPEN.12.PD

os tumoroides serão lavados em PBS e receberão meio de cultura fresco. Serão avaliados quanto à sua viabilidade e morfologia por período de tempo a ser estabelecido no decorrer do projeto. Ensaio de microscopia eletrônica de transmissão: Esferoides serão fixados em glutaraldeído e preparados conforme necessário para visualização por microscopia eletrônica de transmissão. Ensaio de viabilidade por microscopia de fluorescência: Tumoroides serão corados com o reagente LIVE/DEAD™ Cell Imaging (Thermo Fisher), de acordo com as orientações do fabricante.

A proporção entre as células marcadas em verde (viáveis) e vermelho (inviáveis) será avaliada periodicamente durante o decorrer dos cultivos, e será um parâmetro semiquantitativo de viabilidade das células dos tumoroides. Para a avaliação da oxigenação, será utilizado o reagente Cell Rox™ Deep Red (Thermo Fisher) de acordo com as instruções do fabricante em conjunto com Hoescht 33342 (10 µg/mL) em meio de cultura por 60 minutos. O corante será adicionado ao meio em que os tumoroides serão cultivados, e o material será levado à estufa incubadora. O meio de cultura será removido e substituído por PBS. A proporção entre núcleos marcados em azul e a fluorescência em vermelho será avaliada para a observação da formação de áreas de hipóxia. O material poderá ser 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).

O equipamento é acoplado a uma fonte de excitação Lumencor® Mira Light Engine (4-NII-FA), com capacidade de excitação na faixa entre 380 a 650 nm, e filtros de emissão para observação entre 350 e 700 nm. Ensaio de citotoxicidade: A viabilidade celular será avaliada pela deposição do reagente MTS (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazólio) e do acoplador de elétrons PMS (metossulfato de fenazina) seguindo orientações do fabricante (CellTiter 96® Aqueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay, Promega). Após incubação por duas horas, a absorvância a 490 nm será medida em espectrofotômetro de placa. A viabilidade dos tumoroides que serão submetidos a condições experimentais (radiação ionizante ou fármacos) será determinada pela sua absorvância em relação à absorvância de tumoroides não tratados (% dos controles). Controles positivos serão os tumoroides que receberão meio de cultura com 20% de dimetil-sulfóxido (DMSO, Sigma-Aldrich) por 4 ou 24 horas. Controles negativos serão os tumoroides que receberão solução de NaCl em meio de cultura na concentração final de 0,9%. Irradiações: Tumoroides serão coletados cuidadosamente, depositados em placas de Petri contendo PBS em temperatura ambiente e serão irradiados por radiação gama em fonte de ⁶⁰Co (GammaCell) presente no Centro de Tecnologia das Radiações (CETER/IPEN), sob supervisão da Eng^a Elizabeth Somessari. As doses utilizadas serão 0,5, 1, 2 e 4 Gy. Controles não irradiados (0 Gy) serão compostos por tumoroides processados como descrito, mas mantidos durante o tempo de irradiação do lado de fora da fonte. Os tumoroides serão depositados em novas placas com meio de cultura fresco e após decorridas 24, 48 e 72 h após a irradiação, a viabilidade das células que os compõem será avaliada pela redução de MTS em formazan e pela avaliação pelo LIVE/DEAD™ Cell Imaging conforme descrito. O acúmulo de espécies reativas de oxigênio será avaliado pela coloração por Hoescht 33342 e CellROX® Deep Red Reagent (Thermo Fisher) de acordo com as instruções do fabricante, por microscopia de fluorescência. Avaliação do potencial genotóxico dos fármacos e da radiação ionizante nos tumoroides: Após os experimentos, as células dos tumoroides serão coletadas após incubação com papaína (Sigma-Aldrich) (FISCHER et al., 2018; RAWAL et al., 2017). Tumoroides serão incubados com 1 mL de solução de papaína (3 U/mL) em solução de sais balanceada segundo Hank (HBSS) por 20 minutos a 37 °C, com leve agitação a cada 5 minutos. Serão adicionados 5mL de meio de cultura RPMI 1640 com 10% de soro fetal para inativar a enzima. O material será centrifugado e ressuspendido em PBS com 1% de soro fetal bovino e será avaliado por microscopia óptica para a confirmação da formação de suspensão celular (single cell suspension). As células serão submetidas a protocolo de lise e marcação com SYTOX® Green e EMA para quantificação de micronúcleos (AVLASEVICH et al., 2011; DE CARVALHO; VIEIRA, 2020). Células serão semeadas em placas de 96 poços e centrifugadas (1500 rpm, em 10 min) e receberão uma solução de corante monoazida de brometo de etídio (EMA) (Thermo-Fisher Scientific, E1374) em uma concentração de 8,5 µg/ml diluída em PBS suplementado com 2% de soro bovino fetal. As placas de cultura serão abertas e expostas a uma fonte de luz de led azul por 30



PLANO DE TRABALHO

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES – CNEN/IPEN

EDITAL COPDE 6/2020

2020.06.IPEN.12.PD

minutos para a fotoativação do composto, o que associa o corante irreversivelmente ao DNA das células inviáveis, que possuem a membrana com a integridade comprometida. Este procedimento tem como objetivo rotular eficientemente as células que não devem ser incluídas na contagem de núcleos e micronúcleos, além de fornecer medidas de citotoxicidade. Após este passo, as células receberão PBS com 2% de soro bovino fetal e serão centrifugadas para remoção de corante livre. Serão realizadas duas etapas de lise para liberar núcleos e micronúcleos e marcar o DNA. O primeiro passo consiste em lise das células utilizando uma solução com cloreto de sódio (0,854 mg/mL), citrato de sódio (1 mg/mL) e IGEPAL (0,3 µL/mL), bem como 0,4 µM de corante fluorescente verde SYTOX (ThermoFisher Scientific, S7020). Esta solução também contém RNase (Sigma, SLB5176V), o que elimina a chance dos corantes se associarem a moléculas de RNA residual. Após a lise por 60 min (37°C), as placas serão centrifugadas e o material biológico receberá a segunda solução de lise (sacarose 85,6 mg mL, ácido cítrico 15 mg/mL e SYTOX Green 0,4 µM). As segundas soluções de lise serão suplementadas com 5 µL/poço de esferas de látex. Após 30 minutos, o material ficará em temperatura ambiente para leitura no citômetro de fluxo (Accuri C6, BD Biosciences). Serão utilizadas as esferas de látex AccuCheck Counting Beads (Thermo-Fisher Scientific, PBC100), com cerca de 6 µm de diâmetro e que, na análise por citometria de fluxo, apresentem-se sob a forma de duas subpopulações bem discriminadas, com fluorescências no canal FL2. Serão adicionadas na concentração de 5 µL/poço, e a quantidade encontrada nos poços deve variar pouco. Assim, é possível calcular a relação entre a quantidade de núcleos e beads em cada amostra. Desvios desta razão em relação àquela encontrada nos controles, serão interpretados como mudanças na velocidade de divisão mitótica. Os eventos marcados com EMA serão excluídos da contagem total. Os eventos com SYTOX serão avaliados de acordo com seu tamanho (FSC) e fluorescência (FL1) para discriminação entre núcleos e micronúcleos. Pelo menos 20000 eventos são contados na região dos núcleos em cada amostra. Os dados finais desse experimento consistem em: porcentagem de micronúcleos (para EMA negativo e SYTOX positivo), em relação ao controle em comparação aos poços de controle (células não-irradiadas, não tratadas). A relação entre núcleos e esferas será usada para analisar se houve ou não proliferação celular. Serão utilizados como controle positivo tumoroides incubados com colchicina ou mitomicina C (Sigma-Aldrich) (8,8 e 4µg/mL, respectivamente) por 4 ou 20 horas. Controles negativos serão os tumoroides que receberão solução de NaCl em meio de cultura na concentração final de 0,9%.

h) Principais contribuições científicas ou tecnológicas da proposta Até o momento da redação deste projeto, os tumoroides prostáticos são produzidos a partir de explantes dos próprios pacientes, num escopo de medicina personalizada que, embora promissor, são inexecutáveis em larga escala considerando-se políticas de saúde pública (alto custo de execução), e não permitem a prospecção de novos compostos sem a doação de tecidos dos indivíduos afetados.

O projeto pretende produzir inovação tecnológica ao construir um modelo reprodutível e compartilhável para estudos de tumores *in vitro*, com o maior nível possível de similaridade com os tumores *in vivo*.

- Modelo *in vitro* inovador de tumor de próstata humano, possibilitando teste de fármacos antitumorais em larga escala e com alta representatividade em relação ao tecido *in vivo*;
- Teste de eficácia de fármacos incorporados a inovadora metodologia de carreamento por óxido de grafeno nanoestruturado.



PLANO DE TRABALHO

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES – CNEN/IPEN

EDITAL COPDE 6/2020

2020.06.IPEN.12.PD

Lista de Referências Bibliográficas

ANTONI, D.; BURCKEL, H.; JOSSET, E.; NOEL, G. Three-Dimensional Cell Culture: A Breakthrough in Vivo. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 16, n. 12, p. 5517–5527, 11 mar. 2015. Disponível em: <http://www.mdpi.com/1422-0067/16/3/5517>

ARAN, D.; CAMARDA, R.; ODEGAARD, J.; PAIK, H.; OSKOTSKY, B.; KRINGS, G.; GOGA, A.; SIROTA, M.; BUTTE, A. J. Comprehensive analysis of normal adjacent to tumor transcriptomes. *Nature Communications*, v. 8, n. 1, p. 1–13, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/s41467-017-01027-z>

ARNETH, B. Tumor Microenvironment. *Medicina*, v. 56, n. 1, p. 15, 30 dez. 2019. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1010-660X/56/1/15>

AVLASEVICH, S.; BRYCE, S.; DE BOECK, M.; ELHAJOUJI, A.; VAN GOETHEM, F.; LYNCH, A.; NICOLETTE, J.; SHI, J.; DERTINGER, S. Flow cytometric analysis of micronuclei in mammalian cell cultures: Past, present and future. *Mutagenesis*, v. 26, n. 1, p. 147–152, 2011.

BAGHBAN, R.; ROSHANGAR, L.; JAHANBAN-ESFAHLAN, R.; SEIDI, K.; EBRAHIMI-KALAN, A.; JAYMAND, M.; KOLAHIAN, S.; JAVAHERI, T.; ZARE, P. Tumor microenvironment complexity and therapeutic implications at a glance. *Cell Communication and Signaling*, v. 18, n. 1, p. 1–19, 2020.

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

BALAKRISHNAN, B.; JAYAKRISHNAN, A. Self-cross-linking biopolymers as injectable in situ forming biodegradable scaffolds. *Biomaterials*, v. 26, n. 18, p. 3941–3951, jun. 2005. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0142961204009329>

BALKWILL, F. R.; CAPASSO, M.; HAGEMANN, T. The tumor microenvironment at a glance. *Journal of Cell Science*, v. 125, n. 23, p. 5591–5596, 2012.

BARTLETT, R.; EVERETT, W.; LIM, S.; NATASHA, G.; LOIZIDOU, M.; JELL, G.; TAN, A.; SEIFALIAN, A. M. Personalized in vitro cancer modeling — Fantasy or reality? *Translational Oncology*, v. 7, n. 6, p. 657–664, 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tranon.2014.10.006>

BLUMENTHAL, R. D.; GOLDENBERG, D. M. Methods and goals for the use of in vitro and in vivo chemosensitivity testing. *Molecular Biotechnology*, v. 35, n. 2, p. 185–197, 2007.

BONFIM, L.; PASSOS, P. Q. S.; GONÇALVES, K. O.; COURROL, L. C.; SILVA, F. R. O.; VIEIRA, D. P. Microwavemediated synthesis of iron-oxide nanoparticles for use in magnetic levitation cell cultures. *Applied Nanoscience (Switzerland)*, v. 9, n. 8, p. 1707–1717, 2019.

BROUTIER, L.; MASTROGIOVANNI, G.; VERSTEGEN, M. M. A.; FRANCIES, H. E.; GAVARRÓ, L. M.; BRADSHAW, C. R.; ALLEN, G. E.; ARNES-BENITO, R.; SIDOROVA, O.; GASPERSZ, M. P.; GEORGAKOPOULOS, N.; KOO, B. K.; DIETMANN, S.; DAVIES, S. E.; PRASEEDOM, R. K.; LIESHOUT, R.; IJZERMANS, J. N. M.; WIGMORE, S. J.; SAEBPARY, K.; GARNETT, M. J.; VAN DER LAAN, L. J. W.; HUCH, M. Human primary liver cancer-derived organoid cultures for disease modeling and drug screening. *Nature Medicine*, v. 23, n. 12, p. 1424–1435, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/nm.4438>

CAZZANIGA, W.; NEBULONI, M.; LONGHI, E.; LOCATELLI, I.; ALLEVI, R.; LUCIANÒ, R.; SENATORE, G.; VENTIMIGLIA, E.; CUCCHIARA, V.; GENOVESE, L.; MONTORSI, F.; ALFANO, M.; SALONIA, A.; CAVARRETTA, I. Human Prostate Tissue-derived Extracellular Matrix as a Model of Prostate Microenvironment. *European Urology Focus*, v. 2, n. 4, p. 400–408, 2016.

DE CARVALHO, L. R.; VIEIRA, D. P. Evaluation of genotoxic potential of peptides used in nuclear medicine (PSMA - 617 and -11, and ubiquitidine 29-41) using a flow-cytometric, semi-automated analysis of micronuclei frequency in cell cultures. *Toxicology Reports*, v. 7, n. February, p. 304–316, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2020.02.003>

DENT, M. P.; MADNICK, S. J.; HALL, S.; VANTANGOLI POLICELLI, M.; BARS, C.; LI, H.; AMIN, A.; CARMICHAEL, P. L.; MARTIN, F. L.; BOEKELHEIDE, K. A human-derived prostate co-culture microtissue model using epithelial (RWPE1) and stromal (WPMY-1) cell lines. *Toxicology in Vitro*, v. 60, n. May, p. 203–211, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2019.05.023> DOYLE, A. D.; YAMADA, K. M. Mechanosensing via cell-matrix adhesions in 3D



PLANO DE TRABALHO

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES – CNEN/IPEN

EDITAL COPDE 6/2020

2020.06.IPEN.12.PD

microenvironments. *Experimental Cell Research*, v. 343, n. 1, p. 60–66, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.yexcr.2015.10.033>

DROST, J.; KARTHAUS, W. R.; GAO, D.; DRIEHUIS, E.; SAWYERS, C. L.; CHEN, Y.; CLEVERS, H. Organoid culture systems for prostate epithelial and cancer tissue. *Nature Protocols*, v. 11, n. 2, p. 347–358, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/nprot.2016.006>

EAGLE, H.; FOLEY, G. E. Cytotoxicity in human cell cultures as a primary screen for the detection of anti-tumor agents. *Cancer research*, v. 18, n. 9, p. 1017–25, out. 1958. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13596943>

EGEBLAD, M.; NAKASONE, E. S.; WERB, Z. Tumors as Organs: Complex Tissues that Interface with the Entire Organism. *Developmental Cell*, v. 18, n. 6, p. 884–901, jun. 2010. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1534580710002480>

ELBADAWY, M.; ABUGOMAA, A.; YAMAWAKI, H.; USUI, T.; SASAKI, K. Development of prostate cancer organoid culture models in basic medicine and translational research. *Cancers*, v. 12, n. 4, p. 1–18, 2020.

FAN, H.; DEMIRCI, U.; CHEN, P. Emerging organoid models: Leaping forward in cancer research. *Journal of Hematology and Oncology*, v. 12, n. 1, p. 1–10, 2019.

FINNBERG, N. K.; GOKARE, P.; LEV, A.; GRIVENNIKOV, S. I.; MACFARLANE, A. W.; CAMPBELL, K. S.; WINTERS, R. M.; KAPUTA, K.; FARMA, J. M.; ABBAS, A. E.-S.; GRASSO, L.; NICOLAIDES, N. C.; EL-DEIRY, W. S. Application of 3D tumoroid systems to define immune and cytotoxic therapeutic responses based on tumoroid and tissue slice culture molecular signatures. *Oncotarget*, v. 8, n. 40, p. 66747–66757, 2017.

FISCHER, B.; MEIER, A.; DEHNE, A.; SALHOTRA, A.; TRAN, T. A.; NEUMANN, S.; SCHMIDT, K.; MEISER, I.; NEUBAUER, J. C.; ZIMMERMANN, H.; GENTILE, L. A complete workflow for the differentiation and the dissociation of hiPSC-derived cardiospheres. *Stem Cell Research*, v. 32, n. March, p. 65–72, 2018.

FOGLIETTA, F.; CANAPARO, R.; MUCCIOLI, G.; TERRENO, E.; SERPE, L. Methodological aspects and pharmacological applications of three-dimensional cancer cell cultures and organoids. *Life Sciences*, v. 254, n. May, p. 117784, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.117784>

GAO, D.; VELA, I.; SBONER, A.; IAQUINTA, P. J.; KARTHAUS, W. R.; GOPALAN, A.; DOWLING, C.; WANJALA, J. N.; UNDVALL, E. A.; ARORA, V. K.; WONGVIPAT, J.; KOSSAI, M.; RAMAZANOGLU, S.; BARBOZA, L. P.; DI, W.; CAO, Z.; ZHANG, Q. F.; SIROTA, I.; RAN, L.; MACDONALD, T. Y.; BELTRAN, H.; MOSQUERA, J.-M.; TOUIJER, K. A.; SCARDINO, P. T.; LAUDONE, V. P.; CURTIS, K. R.; RATHKOPF, D. E.; MORRIS, M. J.; DANILA, D. C.; SLOVIN, S. F.; SOLOMON, S. B.; EASTHAM, J. A.; CHI, P.; CARVER, B.; RUBIN, M. A.; SCHER, H. I.; CLEVERS, H.; SAWYERS, C. L.; CHEN, Y. Organoid Cultures Derived from Patients with Advanced Prostate Cancer. *Cell*, v. 159, n. 1, p. 176–187, set. 2014. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867414010472>

GLEAVE, A. M.; CI, X.; LIN, D.; WANG, Y. A synopsis of prostate organoid methodologies, applications, and limitations. *Prostate*, v. 80, n. 6, p. 518–526, 2020.

GOLDHIRSCH, A.; WINER, E. P.; COATES, A. S.; GELBER, R. D.; PICCART-GEBHART, M.; THÜRLIMANN, B.; SENN, H.-J.; ALBAIN, K. S.; ANDRÉ, F.; BERGH, J.; BONNEFOI, H.; BRETTEL-MORALES, D.; BURSTEIN, H.; CARDOSO, F.; CASTIGLIONE-GERTSCH, M.; COATES, A. S.; COLLEONI, M.; COSTA, A.; CURIGLIANO, G.; DAVIDSON, N. E.; DI LEO, A.; EJLERTSEN, B.; FORBES, J. F.; GELBER, R. D.; GNANT, M.; GOLDHIRSCH, A.; GOODWIN, P.; GOSS, P. E.; HARRIS, J. R.; HAYES, D. F.; HUDIS, C. A.; INGLE, J. N.; JASSEM, J.; JIANG, Z.; KARLSSON, P.; LOIBL, S.; MORROW, M.; NAMER, M.; KENT OSBORNE, C.; PARTRIDGE, A. H.; PENAUILLORCA, F.; PEROU, C. M.; PICCART-GEBHART, M. J.; PRITCHARD, K. I.; RUTGERS, E. J. T.; SEDLMAYER, F.; SEMIGLAZOV, V.; SHAO, Z.-M.; SMITH, I.; THÜRLIMANN, B.; TOI, M.; TUTT, A.; UNTCH, M.; VIALE, G.; WATANABE, T.; WILCKEN, N.; WINER, E. P.; WOOD, W. C. Personalizing the treatment of women with early breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2013. *Annals of Oncology*, v. 24, n. 9, p. 2206–2223, set. 2013. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0923753419369649>

GOTOH, YOYKO; NIIMI, SHINGO; HAYAKAWA, TAKAO; 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, mar. 2004. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0142961203006331> GRIFFITH, L. G.; SWARTZ, M. A.



PLANO DE TRABALHO

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES – CNEN/IPEN

EDITAL COPDE 6/2020

2020.06.IPEN.12.PD

Capturing complex 3D tissue physiology in vitro. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, v. 7, n. 3, p. 211–224, 2006.

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.

HARUNAGA, J. S.; YAMADA, K. M. Cell-matrix adhesions in 3D. *Matrix Biology*, v. 30, n. 7–8, p. 363–368, set. 2011. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3624763/pdf/nihms412728.pdf> HENKE, E.; NANDIGAMA, R.; ERGÜN, S. Extracellular Matrix in the Tumor Microenvironment and Its Impact on Cancer Therapy. *Frontiers in Molecular Biosciences*, v. 6, n. January, p. 1–24, 2020.

HIDA, K.; MAISHI, N.; ANNAN, D. A.; HIDA, Y. Contribution of tumor endothelial cells in cancer progression. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 19, n. 5, p. 1–12, 2018. HIRSCHBERG, E. Tissue culture in cancer chemotherapy screening. *Cancer research*, v. 18, n. 8 Part 1, p. 869–78, set. 1958. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13573357> HSU, J. W.; YASMIN-KARIM, S.; KING, M. R.; WOJCIECHOWSKI, J. C.; MICKELSEN, D.; BLAIR, M. L.; TING, H. J.; WEN-LUNG, M.; LEE, Y. F. Suppression of prostate cancer cell rolling and adhesion to endothelium by $1\alpha,25$ - dihydroxyvitamin D₃. *American Journal of Pathology*, v. 178, n. 2, p. 872–880, 2011.

HUMMERS, W. S.; OFFEMAN, R. E. Preparation of Graphitic Oxide. *Journal of the American Chemical Society*, v. 80, n. 6, p. 1339, 1958. HUMPHREY, P. A. Diagnosis of adenocarcinoma in prostate needle biopsy tissue. *Journal of Clinical Pathology*, v. 60, n. 1, p. 35–42, 2007

. HUMPHREY, Peter A. Histopathology of prostate cancer. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, v. 7, n. 10, p. 1–21, 2017. ITTMANN, M. Anatomy and histology of the human and murine prostate. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, v. 8, n. 5, p. 1–6, 2018. JANORKAR, A. V. Review: Polymeric scaffold materials for two-dimensional and three-dimensional in vitro culture of hepatocytes. In: ACS SYMPOSIUM SERIES, 2010, v. 1054, p. 1–32.

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, 26 dez. 2016. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s10616-016-0026-7>

JONOUSH, Z. A.; FARAHANI, M.; BOHLOULI, M.; NIKNAM, Z.; GOLCHIN, A.; HATAMIE, S.; REZAEI –TAVIRANI, M.; OMIDI, M.; ZALI, H. Surface modification of graphene and its derivatives for drug delivery systems. *Mini-Reviews in Organic Chemistry*, v. 17, p. 1–15, 2020.

KARTHAUS, W. R.; IAQUINTA, P. J.; DROST, J.; GRACANIN, A.; VAN BOXTEL, R.; WONGVIPAT, J.; DOWLING, C. M.; GAO, D.; BEGTHEL, H.; SACHS, N.; VRIES, R. G. J.; CUPPEN, E.; CHEN, Y.; SAWYERS, C. L.; CLEVERS, H. C. Identification of Multipotent Luminal Progenitor Cells in Human Prostate Organoid Cultures. *Cell*, v. 159, n. 1, p. 163–175, set. 2014. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867414010484>

KATT, M. E.; PLACONE, A. L.; WONG, A. D.; XU, Z. S.; SEARSON, P. C. In vitro tumor models: Advantages, disadvantages, variables, and selecting the right platform. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, v. 4, n



PLANO DE TRABALHO

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES – CNEN/IPEN

EDITAL COPDE 6/2020

2020.06.IPEN.12.PD

CRONOGRAMA FÍSICO

META FÍSICA: 1 – Desenvolvimento de modelo reprodutível para estudos de tumores *in vitro*

ATIVIDADES:	INDICADOR FÍSICO DE EXECUÇÃO	Duração Prevista	
		Início	Fim
Produção de tumoroides por agregação	- Tumuroides produzidos	1º T	4º T
Produção de tumoroides por levitação magnética	- Tumuroides produzidos	1º T	5º T
OBS: Atividades distribuídas por trimestre.			

META FÍSICA: 2 – Desenvolvimento de um modelo *in vitro* inovador de tumor de próstata humano

ATIVIDADES:	INDICADOR FÍSICO DE EXECUÇÃO	Duração Prevista	
		Início	Fim
Experimentos de prevalência de populações de linhagens de células LN CAP	Experimentos de cultivo celular <i>in vitro</i> em 2D e 3D	2º T	4º

META FÍSICA: 3 – Desenvolvimento de Teste de eficácia de fármacos por carreação por óxido de grafeno nanoestruturado.

ATIVIDADES:	INDICADOR FÍSICO DE EXECUÇÃO	Duração Prevista	
		Início	Fim
Síntese e funcionalização do OG Incorporação de fármacos ao OG	- Ensaios de síntese e funcionalização do OG.	2º T	4º T

META FÍSICA: 4 - Utilização da estrutura para testes de fármacos antitumorais diversos

ATIVIDADES:	INDICADOR FÍSICO DE EXECUÇÃO	Duração Prevista	
		Início	Fim
Viabilidade – Irradiações Viabilidade – Fármacos Citotoxicidade – Irradiações Citotoxicidade - fármacos Genotoxicidade	- Protocolo de viabilidade por MTS em formazan. - Ensaios de lise e marcação com SYTOX® Green e EMA para citotoxicidade.	3º T	6º T

META FÍSICA: 5 - Formação de recursos humanos para o desenvolvimento de novas tecnologias no IPEN

ATIVIDADES:	INDICADOR FÍSICO DE EXECUÇÃO	Duração Prevista	
		Início	Fim
Viabilidade – Irradiações Viabilidade – Fármacos Citotoxicidade – Irradiações Citotoxicidade - fármacos Genotoxicidade	- desenvolvimento de novas tecnologias para o IPEN.	1º T	6º