



CATÓLICA
ESCOLA SUPERIOR DE BIOTECNOLOGIA

PORTO

DESENVOLVIMENTO DE MODELOS 3D
DE CANCRO DA MAMA PARA
AVALIAÇÃO DE AGENTES
ANTICANCERÍGENOS

por

Ana Rita Caldas Martins

Dezembro 2021



CATÓLICA
ESCOLA SUPERIOR DE BIOTECNOLOGIA

PORTO

DESENVOLVIMENTO DE MODELOS 3D
DE CANCRO DA MAMA PARA
AVALIAÇÃO DE AGENTES
ANTICANCERÍGENOS

Tese apresentada à Escola Superior de Biotecnologia da Universidade Católica
Portuguesa para obtenção do grau de Mestre em

Engenharia Biomédica

Por

Ana Rita Caldas Martins

Orientação: Professora Doutora Lúcia Raquel Marona Rodrigues

Dezembro de 2021

RESUMO

A cultura bidimensional (2D) de células cancerígenas *in vitro* não representa fidedignamente a arquitetura tridimensional (3D), a heterogeneidade e a complexidade dos tumores humanos. Nesse sentido, são necessários modelos mais representativos, ou seja, modelos que reflitam melhor os principais aspectos da biologia tumoral. Esses são estudos essenciais de biologia e imunologia do cancro, bem como para validação de alvos e descoberta de medicamentos. Os sistemas de cultura de células tridimensionais (3D) têm vindo a ganhar um interesse crescente para a descoberta de novas drogas e engenharia de tecidos tendo em conta as suas vantagens evidentes no fornecimento de informações fisiologicamente mais relevantes e dados mais preditivos para testes *in vivo*. Nesta dissertação discutem-se as características dos sistemas de cultura de células 3D em comparação com a cultura 2D. Abordam-se também as principais tecnologias de cultura de células 3D e o seu impacto na descoberta de drogas, incluindo a formação de esferóides usando diferentes técnicas. Os esferóides são o resultado do crescimento e agregação de um ou mais tipos de células em cultura 3D. Em geral, os esferóides retêm as características das células iniciais, mas assumem uma forma esférica. Este trabalho consiste num processo de implementação e otimização de um protocolo para a formação de esferóides de células MDA-MB-231, que é uma linha celular de cancro de mama triplo-negativo (CMTN), através da técnica de cultura de sobreposição líquida que inclui placas com fundo em U e o uso de agarose como substrato. A resposta das células MDA-MB-231 à Doxorubicina (DOX) foi avaliada no modelo 3D de cultura de células, e comparada com a resposta usando o modelo de cultura em monocamada (2D). Através de uma análise quantitativa baseada na área de crescimento dos esferóides, foi possível verificar que as culturas 3D mostraram maior suscetibilidade à DOX para a concentração de 4 µg/mL, na qual observou-se uma maior redução da área do esferóide. A exposição à DOX levou a uma maior diminuição do número de células viáveis no modelo de cultura 2D comparativamente com o modelo 3D, demonstrando que apresenta uma maior resistência a agentes quimioterapêuticos. Em suma, este trabalho estuda a formação, estrutura e crescimento de esferóides, bem como a sua resistência toxicológica a fármacos em comparação com a cultura de células em modelo 2D.

Palavras-chave: Cancro de mama triplo negativo, Cultura 2D, Cultura 3D, Esferóides, Doxorrubicina.

ABSTRACT

The *in vitro* two-dimensional (2D) culture of cancer cells does not represent the three-dimensional (3D) architecture, heterogeneity, and complexity of human tumors. In this sense, more representative models, i.e., that better reflect the main aspects of tumor biology. These are essential studies in cancer biology and immunology, as well as for target validation and drug discovery. Three-dimensional (3D) cell culture systems have gained increasing interest for new drug discovery and tissue engineering given their clear advantages in providing more relevant physiologically information and more predictive data for testing *in vivo*. This dissertation discusses the characteristics of 3D cell culture systems compared to 2D culture. The main 3D cell culture technologies and their impact on drug discovery are also discussed, including the formation of spheroids using different techniques. Spheroids are the result of the growth and aggregation of one or more cell types in 3D culture. In general, spheroids retain the characteristics of the initial cells but assume a spherical shape. This work consists of an optimization process for the formation of spheroids from MDA-MB-231 cells, which is a triple-negative breast cancer (CMTN) cell line, through the liquid overlay culture technique that includes U-bottom plates and the use of agarose as a substrate. The response of MDA-MB-231 cells to Doxorubicin (DOX) was evaluated in the 3D cell culture model and compared to a response using the monolayer (2D) culture model. Through a quantitative analysis based on the growing area of the spheroids, it was found that the 3D cultures increase the susceptibility to DOX at the concentration of 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$, in which a greater reduction in the spheroid area was observed. Exposure to DOX led to a greater decrease in the number of viable cells in the 2D culture model compared to the 3D culture model, demonstrating that is more resistant to chemotherapeutics. In summary, this work studies the formation, structure, and growth of spheroids, as well as their toxicological drug resistance compared to cell culture in a 2D model.

Keywords: Triple-negative breast cancer, 2D culture, 3D culture, spheroids, Doxorubicin.

AGRADECIMENTOS

O meu primeiro agradecimento é feito à minha orientadora, Professora Lígia Rodrigues, por me ter dado a oportunidade de participar num dos seus projetos, e por ter sido incansável no apoio, orientação e disponibilidade assim como, não poderia de deixar de agradecer, ao coordenador João Paulo Ferreira, por todo o auxílio e responsabilidade na minha entrada para este grupo de Engenharia Biológica da Universidade do Minho.

Aos meus colegas do LBBS agradeço pela partilha de conhecimento, por todo o tempo e disponibilidade dedicados ao meu estudo, em especial às meninas das células, Diana, Débora, Cátia, Mariana e Renata por toda a paciência e boa vontade em ajudar-me durante todo este desafio. À Marta do ICVS, agradeço pela disponibilidade e pelo auxílio.

Sem sombra de dúvida, um enorme agradecimento é feito à minha família, que me apoiou e continua a apoiar incondicionalmente em todas as minhas escolhas, em todo o percurso traçado até ao momento, de uma forma que nem eu consigo expressar por palavras.

Às minhas maravilhosas amigas, Sandra e Rita, por estarem sempre comigo, nos melhores e piores momentos, por me fazerem ver, que desistir nunca é uma opção. Assim como ao meu amigo de longa data, João Paulo por estar sempre presente na minha vida.

E não posso deixar de agradecer ao meu colega de curso da UCP, pela ajuda que me proporcionou ao longo destes 2 anos a nível académico e pessoal e por ter sido um bom amigo.

“Success is stumbling from failure to failure with no loss of enthusiasm.”

Winston S. Churchill

ÍNDICE

RESUMO.....	I
ABSTRACT	IV
AGRADECIMENTOS	VI
ÍNDICE DE FIGURAS	XII
ÍNDICE DE TABELAS	XV
ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	XVII
CAPÍTULO 1. INTRODUÇÃO	1
1.1 O CANCRO	2
1.2 CANCRO DE MAMA TRIPLO NEGATIVO.....	3
1.2.1 <i>Subtipos</i>	5
1.2.2 <i>Diagnóstico</i>	7
1.2.3 <i>Tratamentos</i>	9
1.3 MODELOS DE CULTURA CELULAR BIDIMENSIONAIS (2D) E TRIDIMENSIONAIS (3D).....	10
1.3.1 <i>Técnicas</i>	16
1.3.1.1 Cultura de sobreposição líquida	18
1.3.1.2 Técnica da gota suspensa.....	19
1.3.1.3 Biorreatores	19
1.3.1.4 Dispositivos microfluídicos.....	20
1.3.1.5 Levitação magnética.....	21
1.3.1.6 Bioimpressão 3D	22
1.3.1.7 <i>Scaffold-based</i> naturais e sintéticos.....	24
1.3.1.8 Placas micropadronizadas.....	25
1.3.1.9 Encapsulamento da matriz.....	27
1.3.1.10 Matriz embebida e matriz no topo.....	28
1.3.1.11 Esferas microtransportadoras	29
1.4 DROGAS QUIMIOTERAPÊUTICAS	29
1.4.1 <i>Doxorrubicina</i>	30
CAPÍTULO 2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	32
2.1 CULTURA CELULAR	33
2.2 CULTURA DE MODELOS MONOCAMADA 2D E ESFERÓIDES 3D	33
2.3 ANÁLISE DA DISTRIBUIÇÃO DE TAMANHOS DE ESFERÓIDES 3D.....	34
2.4 VIABILIDADE CELULAR.....	34
2.5 ANÁLISE IMUNOHISTOQUÍMICA	35
2.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA	36
CAPÍTULO 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
3.1 FORMAÇÃO DOS ESFERÓIDES E EFEITO DA DOXORRUBICINA.....	38
3.2 VIABILIDADE CELULAR.....	44
3.3 ANÁLISE IMUNOHISTOQUÍMICA	46
CAPÍTULO 4. CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES FUTURAS	48
4.1. CONCLUSÕES GERAIS	49
4.2. TRABALHO FUTURO	50
BIBLIOGRAFIA	51

ÍNDICE DE FIGURAS

CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO

Figura 1.1. Distribuição mundial do cancro como causa de morte em idades inferiores a 70 anos em 2019 (Adaptado de Sung et al., 2021).....	2
Figura 1.2. Distribuição de casos e mortes para os 10 cancros mais comuns em 2020 para ambos os sexos (Adaptado de Sung et al., 2021).	3
Figura 1.3. Classificação dos modelos de estudo de cancro mais comuns em sistemas 3D (Adaptado de Paradiso et al., 2021).....	16
Figura 1.4. Principais diferenças entre culturas 2D e 3D (Adaptado de Fontana et al., 2020).....	17
Figura 1.5. Cultura de sobreposição líquida (Adaptado de Kamatar et al., 2020).	18
Figura 1.6. Técnica de gota suspensa (Retirado de Pinto et al., 2020).....	19
Figura 1.7. Biorreatores com diferentes métodos de rotação usando frascos giratórios (a) e frascos rotatórios (b) (Retirado de Edmondson et al., 2014).....	20
Figura 1.8. Dispositivos microfluídicos- Exemplos de sistemas ou chips de cultura de células microfluídicas: canais lineares (a), canais bifurcados (b), redes microvasculares (c) e redes idealizadas (d) (Retirado de Yuste et al., 2021).....	21
Figura 1.9. Levitação magnética (Adaptado de Kamatar et al., 2020).....	22
Figura 1.10. Representação esquemática dos métodos mais comuns de bioimpressão. (A) Bioimpressão térmica a jato de tinta. (B) Bioimpressão piezoelétrica a jato de tinta. (C) Bioimpressão de extrusão pneumática. (D) Bioimpressão por extrusão mecânica. (E) Bioimpress.....	23
Figura 1.11. Estereolitografia de impressão 3D (Adaptado de Principle of 3D Printing- Stereolithography, 2018).	25
Figura 1.12. Placas micropadronizadas (Adaptado de Kim et al., 2019).	27
Figura 1.13. Encapsulamento da matriz (Adaptado de Nath & Devi, 2016).....	28
Figura 1.14. Matriz embebida e matriz no topo (Retirado de Pinto et al., 2020).....	28

Figura 1.15. Esferas microtransportadoras (Retirado de Pinto et al., 2020).	29
--	----

CAPÍTULO 2: MATERIAIS E MÉTODOS

Figura 2.1. Formação de esferóides usando agarose como camada de base. As células são plaqueadas em meio MEMD. Após 7 dias, as células agregam-se e formam esferóides.	34
--	----

CAPÍTULO 3: RESULTADOS E DISCUSSÃO

Figura 3.1. Efeito da doxorrubicina em esferóides de células de cancro da mama (MDA-MB-231) após 24 horas e 48 horas de tratamento. Os ensaios foram realizados em triplicado e representam a média \pm desvio padrão. * $p < 0,1$; *** $p < 0,001$; ns $> 0,05$	43
--	----

Figura 3.2. Viabilidade celular das culturas em monocamada (2D) e esferóides (3D), 24 h e 48 h após tratamento com doxorrubicina. Os ensaios foram realizados em triplicado e correspondem a media \pm desvio padrão.	45
---	----

ÍNDICE DE TABELAS

CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO

Tabela 1.1. Classificações moleculares de CMTN.....	6
Tabela 1.2. Diferenças entre cultura de células 2D e 3D.....	12

CAPÍTULO 3: RESULTADOS E DISCUSSÃO

Tabela 3.1. Morfologia das 1000, 1500 e 2000 células MDA-MB-231 cultivadas como esferóides tumorais 3D em placas de 96 poços (6º, 8º e 10º dias em cultura).	38
Tabela 3.2. Morfologia das 5000 células MDA-MB-231 cultivadas como esferóides, tumorais 3D em placas de 96 poços (7º e 10º dias em cultura).	39
Tabela 3.3. Morfologia das 8000 células MDA-MB-231 cultivadas como esferóides tumorais 3D em placas de 96 poços (7º e 10º dias em cultura).....	40
Tabela 3.4. Morfologia das 5000 células MDA-MB-231 cultivadas como esferóides tumorais 3D em placas de 96 poços (7º, 10º, 13º e 16º dias em cultura).	40
Tabela 3.5. Morfologia das 8000 células MDA-MB-231 cultivadas como esferóides tumorais 3D em placas de 96 poços (7º, 10º, 13º e 16º dias em cultura).	41
Tabela 3.6. Morfologia das 15,000 células MDA-MB-231 cultivadas como esferóides tumorais 3D em placas de 96 poços (7º, 8º e 9º dias em cultura).	42

ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

2D: Células bidimensionais

3D: Células Tridimensionais

ADN: Ácido Desoxirribonucleico

BL1: *basal-like* 1

BL2: *basal-like* 2

CM: Cancro da Mama

CMTN: Cancro da Mama Triplo Negativo

CSIR: Complexo de Silenciamento Induzido por RNA

DMSO: Dimetilsulfóxido

DOX: Doxorrubicina

ERO: Espécies Reativas de Oxigénio

H&E: Hematoxilina e Eosina

IHQ: Imuno-Histoquímica

LITs: Linfócitos Infiltrantes de Tumores

M: Mesenquimal

MEC: Matriz Extracelular

MEMD: Meio de *Eagle* Modificado *Dulbecco*

miRNA: microRNA

mRNA: RNA mensageiro

MSL: Mesenquimal *stem-like*

MTT: [3- (4,5-dimetiltiozol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio]

OMS: Organização Mundial da Saúde

PARP: Poli ADP-ribose Polimerase

PDMS: Polidimetilsiloxano

PLGA: Poli Ácido Lático-co-glicólico

PEG: Polietilenoglicol

PFA: Paraformaldeído

PI3K: Fosfoinosítido 3-quinase

PIK3CA: Fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato 3-quinase

RA: Recetor de Androgénio

RAL: Recetor de Andrógeno Luminal

RE: Recetor de Estrogénio

RFCEH2: Recetor de Fator de Crescimento Epidérmico Humano 2

RP: Recetor de Progesterona

RPC: Resposta Patológica Completa

SST: Solução Salina Tamponada

CAPÍTULO 1. INTRODUÇÃO

1.1 O Cancro

Atualmente, o cancro é considerado como a principal causa de morte e uma barreira importante para o aumento da esperança de vida em todos os países do mundo (Cao et al., 2021; Sung et al., 2021).

De acordo com estimativas da Organização Mundial da Saúde (OMS) em 2019, o cancro foi considerado como a primeira ou a segunda principal causa de morte antes dos 70 anos em 112 de 183 países, e ocupa o terceiro ou quarto lugar em 23 outros países, como pode ser observado na Figura 1.1. A crescente proeminência do cancro como principal causa de morte reflete, em parte, declínios acentuados nas taxas de mortalidade por acidente vascular cerebral e doença coronária, em relação ao cancro, em muitos países. De modo geral, a taxa de incidência e mortalidade por cancro está a desenvolver-se rapidamente em todo o mundo; isso reflete o envelhecimento e o crescimento da população, bem como as mudanças na prevalência e distribuição dos principais fatores de risco para o cancro, vários dos quais estão associados ao desenvolvimento socioeconómico (Sung et al., 2021).

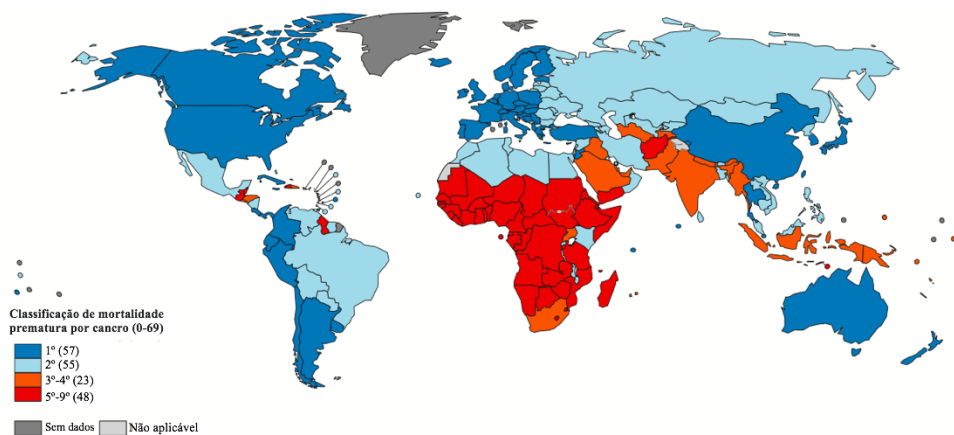


Figura 1.1. Distribuição mundial do cancro como causa de morte em idades inferiores a 70 anos em 2019 (Adaptado de Sung et al., 2021).

Segundo a GLOBOCAN, estima-se que o número de novos casos de cancro atingiu, em 2019, 19,3 milhões mundialmente e quase 10 milhões de pessoas morreram de cancro (Cao et al., 2021; Sung et al., 2021). O cancro de mama já ultrapassou o cancro de pulmão como a principal causa de incidência de cancro em todo o mundo, com uma estimativa de 2,3 milhões de novos casos (Zeng et al., 2021).

O cancro de mama feminino é o cancro mais frequentemente diagnosticado (Figura 1.2.) com 11,7% do total de casos, seguido pelo cancro de pulmão (11,4%), colorretal (10,0%), cancro de próstata (7,3%) e estômago (5,6%). O cancro de pulmão é a principal causa de morte por cancro com 18,0% do total de mortes por caso, seguido pelo cancro colorretal (9,4%), fígado (8,3%), estômago (7,7%) e cancro de mama feminino (6,9%). Nas mulheres, o cancro de mama (CM) é o cancro mais comumente diagnosticado e a principal causa de morte por cancro (Figura 1.2.) (Eiriz et al., 2021; Malik et al., 2020; Saraiva et al., 2020; Sung et al., 2021; van der Meer et al., 2021).

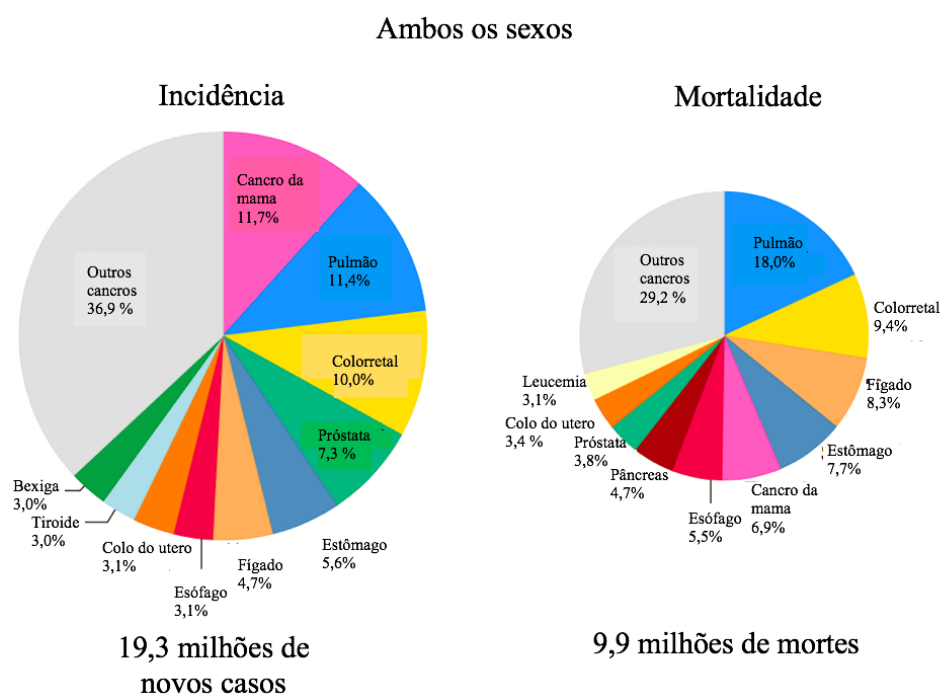


Figura 1.2. Distribuição de casos e mortes para os 10 cancros mais comuns em 2020 para ambos os sexos (Adaptado de Sung et al., 2021).

O cancro de mama é caracterizado pelo crescimento anormal e descontrolado de células indiferenciadas do tecido mamário. Este tecido pode desenvolver doenças benignas raras conhecidas como angiossarcomas ou tumores filodes. Na maioria dos casos, os tumores de mama são malignos e espalham-se para outros tecidos, como os ossos (Malik et al., 2020).

1.2 Cancro de Mama Triplo Negativo

Dentro do espectro do cancro de mama, o cancro de mama triplo negativo (CMTN) é conhecido como um tipo de CM que se caracteriza pela ausência de recetores hormonais, uma vez que não há expressão do recetor de estrogénio (RE), do recetor de progesterona (RP) e

não apresenta sobreexpressão do recetor de fator de crescimento epidérmico humano 2 (RFCEH2). O CMTN representa entre 10% a 20% de todos os casos de cancro de mama, mas tem um pior prognóstico devido a uma alta taxa de reincidência precoce e opções terapêuticas limitadas (da Silva et al., 2020; Gong et al., 2021; Hammerl et al., 2021).

O CMTN carece de uma abordagem de tratamento orientado pela biologia do tumor. No entanto, devido aos avanços tanto na classificação molecular do CMTN, como na sequenciação do genoma, têm vindo a ser identificados novos potenciais alvos moleculares de CMTN (Lyons, 2019).

Segundo (Ryu & Sohn, 2021), os potenciais alvos moleculares de TNBC são relativos às vias de reparação de ADN, de PI3K/AKT, de RAS/MAPK e do recetor de androgénio.

A via de reparação de ADN é regulada por BRCA1 e BRCA2, que são considerados genes supressores do tumor e que mantêm o controlo do erro de replicação de ADN, a divisão celular; a reparação do ADN e apoptose envolvendo a via de reparação da recombinação homóloga, também é regulada por outras proteínas, como ATM, PALB2, RAD51, BARD1, BRIP1, PARP1, TP53 e CHK2; a via de PI3K/AKT que é considerada a segunda maior desregulação génica, seguida pela mutação TP53, encontrada em pacientes com CMTN. A via RAS/MAPK que ao ser ativado perde o gene da fosfatase 4 de especificidade dupla (DUSP4), um regulador negativo da quinase 1/2 regulada por sinal extracelular (ERK1/2) e da quinase 1/2 do terminal N c-Jun, aumentando a manutenção das populações de células-tronco cancerígenas, que podem ser suprimidas quando tratadas com os inibidores da via RAS-ERK. Ao subtipo RAL que mostra a expressão de RNA mensageiro (mRNA) nove vezes maior do RA do que os outros subtipos de CMTN, predispondo os tumores RAL a serem suscetíveis aos antagonistas do RA, a sinalização de RA é ativada por meio de sinalização mediada por ERK com PI3K, Src e RAS e outras vias onde vários estudos estão a ser feitos para identificar mais potenciais alvos visando o CMTN metastático (Ryu & Sohn, 2021).

No momento, vários estudos estão a ser feitos com o intuito de identificar candidatos a alvos metastáticos de CMTN, sendo um desses alvos a metilação epigenética do ADN. A metilação em BRCA1 está correlacionada com a baixa sobrevida global e sobrevida livre de recorrência no CMTN. Estudos pré-clínicos e clínicos demonstraram que as vias Wnt/b-catenin, Notch, Hedgehog, JAK/STAT e RAS/MAPK podem aumentar as populações de células-tronco do cancro da mama, sendo um fator de importante relevância pois as células-tronco do CM são consideradas a principal causa de recorrência e metástase devido à

capacidade de repovoamento a partir de uma única célula. Essas células têm uma taxa de crescimento lento tornando-as menos responsivas à quimioterapia (Ryu & Sohn, 2021).

Ao longo da última década, muito esforço foi dedicado à classificação de CMTN em vários subtipos moleculares com perfis mutacionais distintos, alterações genómicas e processos biológicos que permitem orientar as decisões de tratamento (Gong et al., 2021).

1.2.1 Subtipos

Sendo reconhecida a heterogeneidade molecular do CMTN, a pesquisa subsequente concentrou-se na classificação dos seus subtipos com base no prognóstico da doença ou na resposta esperada à terapia sistémica (Borri & Granaglia, 2021; Sporikova et al., 2018).

Em 2011, Lehmann *et al.* identificaram seis subtipos de TNBC com base em perfis de expressão genética e análises de ontologia. Os novos subtipos incluíram (a) *basal-like 1* (BL1) e *basal-like 2* (BL2), que demonstram elevada expressão de genes do ciclo celular e sinalização de fator de crescimento, respetivamente; (b) imunomodulador (IM), com alta expressão de vias relacionadas ao sistema imunológico; (c) mesenquimal (M), que apresenta genes de diferenciação e proliferação mesenquimal; (d) mesenquimal *stem-like* (MSL), que tem características mesenquimais e baixa proliferação; e (e) recetor de andrógeno luminal (LAR), caracterizado pela ativação de vias relacionadas às hormonas (Ensenyat-Mendez et al., 2021; Lehmann et al., 2011).

Ambos os subtipos BL1 e BL2 são sensíveis a agentes que danificam o ácido desoxirribonucleico (ADN), como a cisplatina. Os perfis de expressão genética dos subtipos M e MSL sobrepõem-se aos do cancro de mama metaplásico quimiorresistente e exibem a regulação positiva dos genes envolvidos na transição epitelial-mesenquimal, motilidade celular, remodelação da matriz extracelular e diferenciação celular (Sporikova et al., 2018).

O subtipo M é caracterizado por expressão aumentada de genes de sinalização imunológica (sinalização de células imunológicas e citocinas, processamento e apresentação de antígenos e vias de sinalização imunológicas centrais). O perfil de expressão do subtipo M é gerado por linfócitos infiltrantes de tumor (LITs) em vez de células tumorais (Sporikova et al., 2018).

O subtipo final, RAL, é enriquecido em genes envolvidos na sinalização de hormonas, síntese de esteroides e metabolismo de androgénio/estrogénio, incluindo a sobreexpressão do

recetor de androgénio (RA) e os seus alvos e co-ativadores a jusante. As linhas celulares do subtipo RAL são sensíveis aos inibidores de Fosfoinosítido 3-quinase (PI3K) como resultado de uma mutação na subunidade catalítica de fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato 3-quinase a (PIK3CA) domínio da quinase (Sporikova et al., 2018).

Mais recentemente, Lehmann e colaboradores (Lehmann et al., 2011) sugeriram que o perfil de expressão do gene do cancro é obtido por uma composição variável de células tumorais e componentes celulares circundantes e aprimoraram a classificação de CMTN com base em subtipos moleculares previamente propostos, restringindo os subtipos triplo-negativos de seis para quatro: BL1, BL2, M e RAL (Borri & Granaglia, 2021; Lehmann et al., 2011).

As classificações moleculares de CMTN são ilustradas e comparadas na Tabela 1.1.

Tabela 1.1. Classificações moleculares de CMTN.

Subtipos	Caraterísticas	Referências
<i>Basal-like 1 (BL1)</i>	Alta atividade proliferativa demonstrada por elevada expressão de mRNA de Ki67.	(Borri & Granaglia, 2021).
Basal-like (BL)		
<i>Basal-like 2 (BL2)</i>	Exibe sinalização de fator de crescimento regulado, glicólise e gliconeogénese, juntamente com expressão aumentada de marcadores mioepiteliais.	(Borri & Granaglia, 2021; Sporikova et al., 2018).
Mesenquimal (M)	Exibe padrões genéticos responsáveis pela motilidade celular e processos de diferenciação celular; Mutação PIK3CA.	(Borri & Granaglia, 2021; Sporikova et al., 2018).
Recetor de Androgénio Luminal (RAL)	Expressam níveis elevados de hormonas do recetor de andrógeno (AR) e correlacionam-se também com tumores que mostram diferenciação apócrina no exame histológico.	(Borri & Granaglia, 2021).

1.2.2 Diagnóstico

Os CMTNs são geralmente diagnosticados na população feminina mais jovem, com menos de 50 anos. 10% dos CMTNs diagnosticados são caracterizados como grau I, embora alguns artigos científicos afirmem que esta doença não tem classificação de grau I. Como é um tipo molecular agressivo, os CMTNs apresentam uma alta tendência de metastização e os pacientes têm um maior risco de reincidência em comparação com outros tipos moleculares (Jitariu et al., 2017).

Os CMTNs são frequentemente diagnosticados ao atingir o grau III, são caracterizados por tumores de grande tamanho e geralmente estão associados a padrões metastáticos específicos. Vários estudos identificaram uma grande variedade de fatores de risco para os CMTNs além da origem afro-americana e da idade precoce do paciente. Além disso, pacientes com diagnóstico de cancro de ovário e/ou pacientes que já se submeteram a radioterapia e terapia endócrina têm um risco aumentado de desenvolver CMTNs (Jitariu et al., 2017).

Geralmente, os diagnósticos de CMTNs são baseados no grau histológico, envolvimento dos gânglios linfáticos e ausência dos marcadores RE, RP e RFCEH2. O CMTN também pode ser rastreado e diagnosticado por exames radiológicos, clínicos e patológicos, sendo estas as principais abordagens para o diagnóstico de CM (Malla et al., 2019; Thakur & Kutty, 2019).

A precisão da detecção de CMTN pelos exames radiológicos requer a perícia e experiência dos médicos radiologistas. Portanto, o papel da imunohistoquímica (IHQ) e do onco-patologista/clínico é crucial na identificação do TNBC. A identificação de CMTN usando imunohistoquímica depende da propriedade marcante de ausência/falta de recetores hormonais (RE, PR) e RFCEH2 em tecidos de biópsia do paciente e é atualmente considerada o melhor método de diagnóstico de CMTN (Thakur & Kutty, 2019).

Para melhorar a taxa de sobrevivência de pacientes com CMTN, é necessário um maior conhecimento das vias-alvo, desenvolvimento de novos medicamentos e a identificação de biomarcadores baseados no sangue, soro, urina e outras fontes que são acessíveis com invasividade mínima para facilitar assim, o desenvolvimento de modalidades de tratamento aprimoradas. Com base nesses requisitos, acredita-se que estratégias terapêuticas baseadas em microRNAs (miRNA)- RNAs endógenos, altamente conservados e pequenos não codificadores de aproximadamente 22 nucleótidos de comprimento que regulam a expressão

gênica a nível pós-transcricional- podem constituir uma abordagem promissora para o tratamento do CMTN (Kahraman et al., 2018; Malla et al., 2019; Naorem et al., 2019).

As funções de muitos miRNAs ainda são desconhecidas, embora mais de 2.588 sequências de miRNAs maduros sejam identificadas em humanos. Os miRNAs maduros formam o complexo de silenciamento induzido por RNA (CSIR) com a proteína *Argonaute* e outras proteínas, sendo que, o CSIR reconhece e reprime a expressão do gene alvo. Os miRNAs contribuem para a oncogénese ou supressão tumoral em muitos tipos de cancro. Os miRNAs que promovem o cancro são denominados miRNAs oncogénicos, enquanto os miRNAs que inibem a tumorigénese são chamados de miRNAs supressores de tumor. Geralmente, esses miRNAs supressores de tumor são expressos em níveis anormalmente baixos, enquanto os oncogénicos são expressos em níveis elevados em vários tipos de cancro (Kogure et al., 2019; Malla et al., 2019; Naorem et al., 2019).

Os padrões de expressão de miRNA são específicos do tecido e refletem processos fisiopatológicos, tais como tumorigénese, metástase e capacidade de resposta a medicamentos nas suas células de origem. Além disso, os miRNAs podem ser detetados não apenas em amostras de tecido, mas também em sangue, soro, urina e outras fontes que são acessíveis com uma mínima invasividade. Extensas pesquisas têm demonstrado que os miRNAs são desregulados em todas as fases do CM e podem ter um papel potencial como biomarcadores prognósticos e preditivos. Em particular, os perfis sorológicos têm sido explorados e estes perfis são candidatos promissores para a deteção de CM, também tendo um potencial substancial como marcadores prognósticos (Kahraman et al., 2018; Naorem et al., 2019).

Relativamente aos miRNAs oncogénicos no cancro da mama, muitos destes que visam genes supressores de tumor são sobreexpressos no CM. O miR-10b é altamente expresso em pacientes metastáticos precoces e em pacientes recorrentes com CM e também está associado ao aumento da proliferação, migração e invasão de células de CM através do direcionamento da caderina-E. O miR-21 promove a transformação e o desenvolvimento de CM por meio da supressão da expressão da proteína 4 de morte celular programada. miR-155 atua como um oncogénico miRNA no cancro da mama, cuja inibição por um oligonucleotídeo antisense previne a proliferação e induz a apoptose celular. O miR-200a suprime a apoptose de células de CM ao direcionar o regulador da transcrição à proteína associada sim 1 (YAP1). Finalmente, o miR-27b tem como alvo o gene ST14 (supressão de tumorigenicidade 14) e aumenta a invasão e migração de células de cancro de mama (Yang & Liu, 2020).

Os miRNAs supressores de tumor podem inibir a progressão do cancro por meio do silenciamento de oncogenes e genes promotores de tumor, tais como a família letal-7 (let-7), miR-26b, miR-124, miR-125a/125b, miR-205 e miR-206 (Yang & Liu, 2020).

Foi relatado anteriormente que também a expressão de miRNAs originados de células sanguíneas está geralmente ligada a doenças e a assinaturas de miRNA que representam novos biomarcadores potenciais para o diagnóstico precoce e minimamente invasivo (Kahraman et al., 2018).

Um teste de diagnóstico eficaz com base no sangue pode não apenas aumentar a especificidade e a sensibilidade da triagem de CM e atuar como um fator de regulação para procedimentos de diagnóstico por imagem adicionais, como ressonância magnética, mas também pode aumentar a adesão e aceitação do paciente de exames médicos preventivos (Kahraman et al., 2018).

1.2.3 Tratamentos

CMTN ainda é uma doença órfã em termos de opções terapêuticas e a quimioterapia continua a ser a base do tratamento. Infelizmente, apenas cerca de um terço dos pacientes responde à quimioterapia, portanto, a identificação de biomarcadores moleculares acionáveis é crucial para o desenvolvimento de novos tratamentos direcionados. Recentemente, diversos ensaios clínicos mostraram resultados promissores com o uso de inibidores da poli ADP-ribose polimerase (PARP) e com a incorporação de imunoterapia com quimioterapia, enriquecendo as estratégias de tratamento além dos agentes citotóxicos convencionais (Diana et al., 2020).

O processo de tomada de decisão terapêutica representa um ponto crucial para o CMTN precoce devido à sua maior propensão de reincidir, geralmente dentro de 2–3 anos a partir do diagnóstico, com opções de tratamento limitadas disponíveis no cenário metastático além dos medicamentos citotóxicos convencionais (Diana et al., 2020).

A quimioterapia ainda é a base da terapia entre a administração pré ou pós-cirúrgica, e os regimes baseados em antraciclinas e/ou taxanos permanecem o padrão de tratamento. A abordagem neoadjuvante é a escolha preferida para pacientes no tratamento do cancro da mama na fase inicial, com o objetivo de cirurgia conservadora da mama, ou para pacientes

com contraindicação temporária da cirurgia. O uso de quimioterapia no cenário neoadjuvante permite uma avaliação direta da resposta *in vivo* por exame clínico ou avaliação por imagem (Diana et al., 2020; Lebert et al., 2018).

A quimioterapia neoadjuvante resulta em taxas mais altas de resposta patológica completa (RPC) em CMTN do que em doença RFCEH2-negativa com recetor hormonal positivo. A taxa de RPC varia de acordo com o subtipo de CMTN, com o subtipo *basal-like 1* tem a maior frequência de RPC (52%) e os subtipos *basal-like 2* e recetor de androgénio luminal tem a menor frequência (Lebert et al., 2018).

Vários estudos examinaram o benefício potencial do tratamento adjuvante após a quimioterapia neoadjuvante. Estes incluem um estudo de fase III que examina o uso de *avelumab*, um inibidor de anticorpo monoclonal de PD-L1, no contexto adjuvante ou pós-neoadjuvante em pacientes de alto risco e outra fase de ensaio clínico avaliando *pembrolizumabe*, um inibidor PD-1 eficaz no tratamento de vários tipos de cancro, em pacientes com CMTN que apresentam doença residual após quimioterapia neoadjuvante (Lebert et al., 2018).

Para pacientes que não recebem quimioterapia neoadjuvante (com a possível exceção daqueles com subtipos histológicos raros), as diretrizes da *European Society for Medical Oncology* sugerem o tratamento com quimioterapia adjuvante. Existe alguma controvérsia na escolha da quimioterapia sistémica para pequenos tumores ($\leq 0,5$ cm) que são nódulos negativos, e essa decisão deve, portanto, ser individualizada. O regime adjuvante ideal para CMTN não foi ainda estabelecido, mas as diretrizes atuais apoiam o uso de regimes que contêm uma antraciclina e um taxano, se viável (Lebert et al., 2018).

1.3 Modelos de Cultura Celular Bidimensionais (2D) e Tridimensionais (3D)

Diferentes abordagens estratégicas para prevenir e tratar o cancro estão ainda, nos dias de hoje, a ser desenvolvidas. Entre elas, a descoberta de medicamentos é uma abordagem importante tendo como objetivo, identificar novas entidades de compostos anticancerígenos. Existem quatro fases no desenvolvimento do medicamento, a de descoberta do medicamento, a do ensaio pré-clínico, a do ensaio clínico e, por fim, a aprovação pela autoridade reguladora. As principais causas de falha dos medicamentos nos estudos de fase II e III são a mínima eficácia e os efeitos colaterais adversos que possuem. A redução nas taxas de descoberta de

medicamentos, revela que a principal razão para a falha de medicamentos é o uso de modelos *in vitro* inadequados que não fornecem informações suficientes sobre o perfil de segurança e a eficácia do medicamento (Chaicharoenaudomrung et al., 2019).

As técnicas de cultura de células auxiliam no fornecimento de informações pertinentes à fisiologia e bioquímica das células, aos efeitos de drogas, aos compostos tóxicos nas células, à mutagênese e à carcinogênese (Chaicharoenaudomrung et al., 2019). Ao longo dos anos, a cultura de células bidimensionais (2D) tem sido usada na descoberta e no desenvolvimento de drogas. Neste método, as células são normalmente cultivadas em frascos rígidos, que as obriga a aderir à superfície de materiais artificiais e que influenciam o metabolismo celular e o crescimento normal. Os resultados experimentais obtidos em cultura monocamada 2D são geralmente inconsistentes com a situação real *in vivo* (Guo et al., 2019).

Nos últimos anos, a cultura de células tridimensionais (3D) despertou grande interesse. A cultura de células 3D permite respostas celulares com maior relevância biológica, formação do tumor, desenvolvimento de drogas, e testes que mimetizam a matriz extracelular (MEC). Materiais com boas propriedades mecânicas e biocompatibilidade são selecionados como substrato adequado para cultura de células (Guo et al., 2019).

Os requisitos de células são diferentes entre os modelos e, de facto, não existe um modelo 3D universal disponível facilmente implementado e várias limitações são inerentes ao tipo de modelo. Portanto, os modelos 2D e 3D são complementares, pois cada um pode fornecer informações importantes. Além disso, dependendo do ensaio ou do tipo de célula selecionado, o modelo de cultura mais adequado pode variar, juntamente com suas características e requisitos específicos (Yuste et al., 2021).

A análise do efeito dos sinais biofísicos nas células cancerígenas durante o desenvolvimento tornou-se o foco de muitos estudos *in vitro*. A simplicidade, o baixo custo e a reprodutibilidade dos modelos 2D tornaram-nos o suporte da pesquisa biológica, mas a complexidade do tecido *in vivo* pode ser facilmente abordada usando sistemas 3D. Em sistemas tridimensionais, as propriedades mecânicas podem ser ajustadas para que os modelos imitem uma ampla gama de rigidez do tecido. Além disso, a adesão, propagação e migração celular não são restritas a uma única camada e a MEC pode ser personalizada para reproduzir a experiência da célula *in vivo* por meio de diferentes conjuntos de sinais químicos e mecânicos (Paradiso et al., 2021). Na Tabela 1.2 pode ser observado os diferentes aspetos da cultura de células 2D e 3D explicando as vantagens e desvantagens de ambos os métodos.

Tabela 1.2. Diferenças entre cultura de células 2D e 3D.

Características	Cultura celular 2D	Cultura Celular 3D	Referências
Forma da célula	<ul style="list-style-type: none"> • Plana e alongada uma vez que as células só podem crescer e se expandir bidimensionalmente; • As células crescem numa monocamada na placa. 	<ul style="list-style-type: none"> • A forma natural da célula e o crescimento celular são preservados; • As células crescem em agregados/esferóides 3D; • Os esferóides contêm várias camadas. 	(Chaicharoenodomrung et al., 2019; Jensen & Teng, 2020).
Caraterísticas das células	<ul style="list-style-type: none"> • Morfologia e forma de divisões alteradas; perdas de fenótipo e polaridades diversas. 	<ul style="list-style-type: none"> • Morfologia preservada e forma de divisões, fenótipo e polaridades diversas. 	(Kapałczyńska et al., 2018).
Rigidez	<ul style="list-style-type: none"> • Alta rigidez (aproximadamente 3×10^9 Pa). 	<ul style="list-style-type: none"> • Baixa rigidez (> 4000 Pa). 	(Chaicharoenodomrung et al., 2019).
Tempo de Formação de cultura	<ul style="list-style-type: none"> • De minutos a poucas horas. 	<ul style="list-style-type: none"> • De horas a alguns dias. 	(Kapałczyńska et al., 2018).
Qualidade da cultura	<ul style="list-style-type: none"> • Alto desempenho, reprodutibilidade, cultura de longo prazo, fácil de interpretar, simplicidade de cultura. 	<ul style="list-style-type: none"> • Pior desempenho e reprodutibilidade, difícil de interpretar, culturas mais difíceis de realizar. 	(Kapałczyńska et al., 2018).
Imitação <i>in vivo</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Não imite a estrutura natural do tecido ou da massa tumoral. 	<ul style="list-style-type: none"> • Tecidos e órgãos <i>in vivo</i> estão na forma 3D. 	(Chaicharoenodomrung et al., 2019; Kapałczyńska et al., 2018).
Junção celular	<ul style="list-style-type: none"> • As junções celulares são menos comuns. 	<ul style="list-style-type: none"> • As junções celulares são comuns e permitem a comunicação célula a célula; • As células comunicam-se por meio de troca de iões, pequenas moléculas e correntes elétricas. 	(Jensen & Teng, 2020).
Polarização	<ul style="list-style-type: none"> • Polarização Parcial. 	<ul style="list-style-type: none"> • Representação mais precisa da polarização celular. 	(Chaicharoenodomrung et al., 2019).

Tabela 1.2. Diferenças entre cultura de células 2D e 3D (continuação).

Características	Cultura celular 2D	Cultura Celular 3D	Referências
Exposição celular ao meio	<ul style="list-style-type: none"> • Todas as células da cultura recebem a mesma quantidade de nutrientes e fatores de crescimento do meio no frasco, fazendo com que mais células fiquem na mesma fase do ciclo celular. 	<ul style="list-style-type: none"> • Os nutrientes não precisam ser divididos igualmente entre todas as células, mas podem ser, se necessário; • As células centrais frequentemente permanecem inativas, uma vez que recebem menos oxigênio e fatores de crescimento do meio; • Este processo assemelha-se às células centrais nas células tumorais, tornando possível imitar o comportamento e a estrutura de uma célula tumoral <i>in vivo</i>. 	(Jensen & Teng, 2020).
Interações celulares	<ul style="list-style-type: none"> • Privado de interações célula-célula e célula-ambiente extracelular; • Nenhum microambiente semelhante ao <i>in vivo</i> e nenhum "nicho". 	<ul style="list-style-type: none"> • Interações adequadas do ambiente célula-célula e célula-ambiente extracelular; • "nichos" ambientais são criados. 	(Chaicharoenaudomrung et al., 2019; Jensen & Teng, 2020).
Diferenciação celular	<ul style="list-style-type: none"> • A diferenciação celular é pobre. 	<ul style="list-style-type: none"> • As células são bem diferenciadas. 	(Jensen & Teng, 2020).
Acesso a componentes essenciais	<ul style="list-style-type: none"> • Acesso ilimitado a oxigênio, nutrientes, metabolitos e moléculas de sinalização (em contraste com <i>in vivo</i>). 	<ul style="list-style-type: none"> • Acesso variável a oxigênio, nutrientes, metabolitos e moléculas de sinalização (o mesmo que <i>in vivo</i>). 	(Kapałczyńska et al., 2018).
Sensibilidade a drogas	<ul style="list-style-type: none"> • As células costumam ter pouca resistência a drogas; • As drogas não são bem metabolizadas; • Falta de correlação entre culturas de células em monocamada 2D e tumores humanos em testes de drogas. 	<ul style="list-style-type: none"> • As células costumam ter mais resistência ao tratamento com drogas; • O metabolismo da droga é muito melhor; • Dá uma representação mais precisa do efeito da droga. 	(Chaicharoenaudomrung et al., 2019; Jensen & Teng, 2020).
Proliferação celular	<ul style="list-style-type: none"> • As células proliferam num ritmo anormalmente rápido do que se observa em esferóides 3D. 	<ul style="list-style-type: none"> • As taxas de proliferação são realistas e podem ser altas ou baixas dependendo da técnica e dos tipos de células. 	(Chaicharoenaudomrung et al., 2019; Jensen & Teng, 2020).

Tabela 1.2. Diferenças entre cultura de células 2D e 3D (continuação).

Características	Cultura celular 2D	Cultura Celular 3D	Referências
Níveis de expressão	<ul style="list-style-type: none"> • Os níveis de expressão de genes e proteínas são frequentemente muito diferentes em comparação com modelos <i>in vivo</i>. 	<ul style="list-style-type: none"> • Os níveis de expressão de genes e proteínas assemelham-se a níveis encontrados nas células <i>in vivo</i>. 	(Jensen & Teng, 2020).
Custo	<ul style="list-style-type: none"> • Para estudos em grande escala, é muito mais barato do que usar cultura 3D; • Testes baratos disponíveis comercialmente. 	<ul style="list-style-type: none"> • São normalmente mais caros do que as técnicas em cultura de células 2D e requerem mais tempo; • A cultura de células 3D reduz as diferenças entre a seleção de drogas <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>, diminuindo a probabilidade de usar modelos animais; • Mais caro, mais demorado e menos testes disponíveis comercialmente. 	(Chaicharoenaudomrung et al., 2019; Kapałczyńska et al., 2018).
Apoptose	<ul style="list-style-type: none"> • Os medicamentos podem induzir facilmente a apoptose nas células. 	<ul style="list-style-type: none"> • Taxas mais altas de resistência para drogas induzindo a apoptose. 	(Jensen & Teng, 2020).
Resposta a estímulos	<ul style="list-style-type: none"> • Representação imprecisa da resposta a estímulos mecânicos das células; • As células não podem experimentar a gravidade, uma vez que estão incapazes de expandir para a terceira dimensão. 	<ul style="list-style-type: none"> • Representação precisa da resposta a estímulos mecânicos das células; • As células podem experimentar a gravidade dando uma maior representação precisa de uma célula <i>in vivo</i>. 	(Jensen & Teng, 2020).
Uso e análise	<ul style="list-style-type: none"> • Altamente replicável e facilmente interpretável; • Melhor para culturas a longo prazo. 	<ul style="list-style-type: none"> • Pode ser difícil duplicar os experimentos; • Pode ser difícil interpretar os dados. 	(Jensen & Teng, 2020).
Mecanismos moleculares	<ul style="list-style-type: none"> • Mudanças na expressão gênica, <i>splicing</i> de mRNA, topologia e bioquímica das células muitas vezes exibem níveis diferenciais de gene/proteína em comparação com modelos <i>in vivo</i>. 	<ul style="list-style-type: none"> • Expressão de genes, <i>splicing</i>, topologia e bioquímica de células como <i>in vivo</i> é apresentada de forma relevante em modelos 3D. 	(Chaicharoenaudomrung et al., 2019; Kapałczyńska et al., 2018).

Muitos processos estão intrinsicamente ligados às interações célula-célula e interações célula-matriz, alcançando uma representação mais próxima das condições *in vivo* do que os modelos 2D. No entanto, ainda estão longe do ideal devido à incapacidade de analisar a confluência, à distribuição irregular do oxigênio (com menor concentração no núcleo) e à baixa reprodutibilidade (Yuste et al., 2021).

A inclusão de restrições mecânicas na concepção de um modelo *in vitro* requer o uso de plataformas de cultura 3D (*scaffold free* ou em *scaffold based*) para imitar totalmente a biologia do tecido tumoral nativo, bem como as propriedades mecânicas e bioquímicas (Paradiso et al., 2021).

Os desafios de reproduzir características do microambiente num modelo 3D alimentaram a comunidade científica a desenvolver uma ampla variedade de plataformas para lidar com diferentes níveis de complexidade, por exemplo, as células podem ser cultivadas em suportes porosos/materiais fibrosos ou encapsulados em biomateriais feitos de polímeros solúveis em água chamados hidrogéis (Paradiso et al., 2021).

Outra tendência promissora é o uso de MEC negativa obtida por descelularização de tecidos, usado como estrutura para cultivo celular ou como componente aditivo de géis 3D para simular *in vitro* a arquitetura e propriedades químicas ou biológicas do MEC. Além disso, a fisiologia do tecido pode ser reproduzida com o uso de organóides derivados de células-tronco adultas ou pluripotentes, que são culturas de tecidos 3D auto-organizadas criadas a partir de células-tronco para replicar parte ou grande parte da complexidade de um órgão; alternativamente, as células podem ser cultivadas num chip de cultura de células microfluídicas 3D multicanal que simula mecanicamente atividades e resposta fisiológica de órgãos ou sistemas específicos. Todas essas plataformas possuem diferentes níveis de complexidade e podem reproduzir certas características mecânicas do tecido nativo (Paradiso et al., 2021).

A Figura 1.3. ilustra a classificação dos modelos de estudo de cancro mais comuns, tal com as suas vantagens e respetivas limitações. As características biológicas e técnicas do modelo de cancro são destacadas. Na parte inferior, destaca-se a complexidade celular dos sistemas 3D *in vitro* e a acessibilidade de imagens e análises.

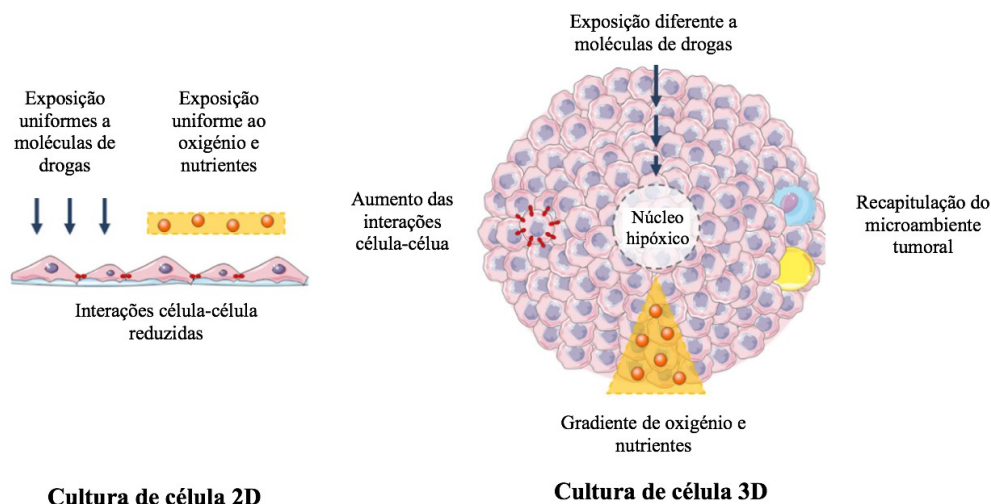


Figura 1.4. Principais diferenças entre culturas 2D e 3D (Adaptado de Fontana et al., 2020).

Tendo em conta as vantagens claras dos sistemas de cultura 3D, muitos estudos tem-se focado no desenvolvimento e na otimização de tecnologias de cultura de células 3D que possam ser usados para analisar diferentes doenças e respetivos tratamentos. Normalmente, os esferóides são construídos a partir de células tumorais, usando técnicas de *scaffold-free* e *scaffold-based*. Embora cada técnica tenha diferenças tanto no princípio quanto no protocolo, elas partilham o mesmo objetivo, nomeadamente o de fornecer as características semelhantes de células *in vivo* em aspetos morfológicos, funcionais e microambientais (Chaicharoenaudomrung et al., 2019; Hoarau-Véchet et al., 2018; Jain et al., 2020; Pinto et al., 2020).

Na técnica de *scaffold-free*, diferentes fatores (por exemplo, substratos de baixa adesão, força de gravidade e ação magnética) contribuem para a formação de agregados celulares e geração de esferóides. Durante este processo, a MEC é originada pelo depósito contínuo de proteínas produzidas pelos esferóides (Chaicharoenaudomrung et al., 2019; Pinto et al., 2020). As principais técnicas de *scaffold-free* usadas para induzir a formação de esferóides tumorais *in vitro* são as técnicas de sobreposição líquida, técnicas de gota suspensa, os biorreatores, os reatores microfluídicos, levitação magnética e impressão 3D. Essas culturas permitem a reprodução de características importantes da heterogeneidade do microambiente do tumor, como gradientes de oxigênio e são relativamente rápidas e fáceis de estabelecer, representando uma ferramenta útil para sistemas de alto rendimento. No entanto, podem ser limitados em tamanho pela falta de difusão de nutrição para as células dentro das

culturas, dependendo do tamanho e do processo de automontagem das células (Hoarau-Véchet et al., 2018; Paradiso et al., 2021).

Relativamente à técnica de *scaffold-based* refere-se a sistemas de ancoragem de células que são usados para imitar a estrutura de MEC, permitindo uma maior interação célula-célula e célula-matriz. Estes sistemas podem consistir em microtransportadores porosos de hidrogéis naturais, sintéticos e semissintéticos feitos de polímeros reticulados (Pinto et al., 2020).

1.3.1.1 Cultura de sobreposição líquida

A cultura de sobreposição líquida pode ser considerada a mais simples de todas as técnicas de cultura 3D. Para criar modelos 3D, a superfície é coberta com uma película fina de agar, agarose, matrigel ou outro substrato inerte. Esta matriz artificial promove facilmente a agregação de células para se tornarem esferóides evitando a adesão celular com o substrato (Figura 1.5.) (Chaicharoenaudomrung et al., 2019; Jain et al., 2020).

Esta técnica é económica e altamente reprodutível sem a necessidade de qualquer equipamento específico. O modelo de cultura inclui placas de ultra-baixa fixação, que por sua vez incluem poços individuais com um polímero hidrofílico que ajuda a manter as células destacadas, estas placas apresentam a capacidade de produzir um esferóide por poço, sendo suficientemente favoráveis para aplicações de médio rendimento (Chaicharoenaudomrung et al., 2019; Jain et al., 2020).

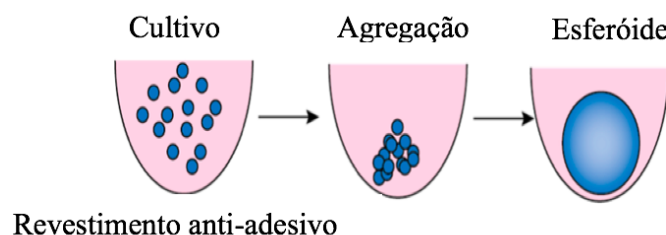


Figura 1.5. Cultura de sobreposição líquida (Adaptado de Kamatar et al., 2020).

1.3.1.2 Técnica da gota suspensa

A técnica da gota suspensa é atrativa para o desenvolvimento de esferóides multicelulares. Estes esferóides têm um tamanho consistente e podem ser controlados pela densidade das células usadas para o seu cultivo (Figura 1.6). Podem ser usadas entre 50 a 15,000 células para se obter o tamanho desejável dos esferóides. A técnica da gota suspensa é relativamente simples e aplicável para inúmeras linhas celulares, com uma reprodutibilidade de quase 100%. Estes esferóides tendem a ser compactos em vez de agregados livremente e possuem uma baixa variabilidade nos tamanhos (Chaicharoenaudomrung et al., 2019; Jain et al., 2020).

Sendo esta técnica baseada na tendência das células agregarem espontaneamente, não dependendo de matrizes ou *scaffolds*, as preocupações relativamente à formação das estruturas 3D são reduzidas. A desvantagem desta técnica é o volume limitado da suspensão celular. A tensão superficial não é suficiente para manter os líquidos aderidos à superfície, pois apenas 50 μL de suspensão celular podem ser acomodados na superfície de forma invertida, a menos que ocorra gotejamento (Chaicharoenaudomrung et al., 2019; Jain et al., 2020).

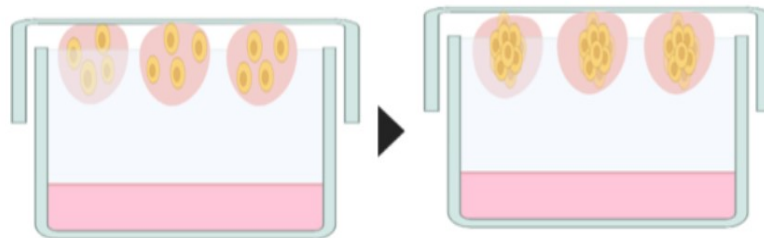


Figura 1.6. Técnica de gota suspensa (Retirado de Pinto et al., 2020).

1.3.1.3 Biorreatores

Os esferóides podem ser formados num biorreator sob condições de cultura dinâmica com fluxo constante. Ao usar biorreatores giratórios ou biorreatores de microgravidade, é possível produzir um esferóide em grande escala (Edmondson et al., 2014).

A agitação rotativa contínua inibe a adesão das células à superfície, levando à formação de esferóides (Figura 1.7.). Os principais meios de rotação utilizados são os biorreatores giratórios e os biorreatores rotatórios. Nos biorreatores giratórios, um agitador

magnético é posicionado dentro do frasco, permitindo a distribuição homogênea de oxigênio e nutrientes. No entanto, as células são submetidas à força de cisalhamento direta, o que aumenta o risco de danos. Nos biorreatores rotativos, o próprio frasco é girado, permitindo a dispersão de oxigênio e nutrientes, e a redução das forças de cisalhamento sobre as células. Como vantagem, este método permite a geração de esferóides em grande escala. Porém, a rotação contínua impede a visualização dos agregados, pode danificar as células e é difícil de monitorizar. Ainda assim, este método é considerado um dos sistemas mais eficientes para a obtenção de grandes quantidades de esferóides em condições nutricionais controladas (Pinto et al., 2020).

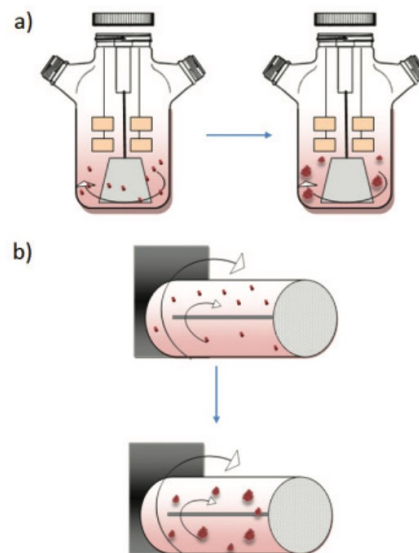


Figura 1.7. Biorreatores com diferentes métodos de rotação usando frascos giratórios (a) e frascos rotatórios (b) (Retirado de Edmondson et al., 2014).

1.3.1.4 Dispositivos microfluídicos

O desenvolvimento da fabricação em microescala e nanoescala permitiu a criação de um novo tipo de sistema de cultura de células, próximo aos bioreatores, mas em menor escala, conhecido como microfluídica. Os *chips* microfluídicos permitem projetar estruturas complexas em microescala com parâmetros bem controlados e definidos, como microambientes dinâmicos, que imitam de perto condições *in vivo* (Yuste et al., 2021).

Os dispositivos microfluídicos também são conhecidos como *lab-on-a-chip* ou *organ-on-chip*, pois consistem num pequeno dispositivo com estruturas e câmaras intrincadas que replica as condições e funções *in vivo* de um órgão ou tecido específico. Existem 4 exemplos de sistemas de cultura de células microfluídicas: os canais lineares (Figura 1.8. a), os canais bifurcados (Figura 1.8. b), redes microvasculares (Figura 1.8. c) e redes idealizadas (Figura 1.8. d) (Yuste et al., 2021).

Neste método, as células são colocadas em microcanais com sistema de perfusão livre, permitindo a distribuição de oxigénio e nutrientes e a eliminação de resíduos metabólicos. Como uma vantagem, este sistema pode imitar a microvasculatura tumoral *in vivo*. No entanto, este método requer laboratórios e equipamentos especializados. Devido à sua capacidade de garantir a permeabilidade aos gases, o polidimetilsiloxano (PDMS) é o material mais utilizado para a fabricação de dispositivos microfluídicos. Além disso, o PDMS é biocompatível, fácil de preparar e de baixo custo. No entanto, sob alta pressão, os microcanais PDMS podem deformar-se, causando mudanças nas velocidades do fluido. Dependendo do tipo de vedação, reversível ou irreversível, os dispositivos microfluídicos PDMS podem suportar pressões de até 0.3 ou 2 bar, respetivamente. Além disso, quando exposto a alguns fluidos, o PDMS pode inchar, o que afeta a função do dispositivo (Pinto et al., 2020).

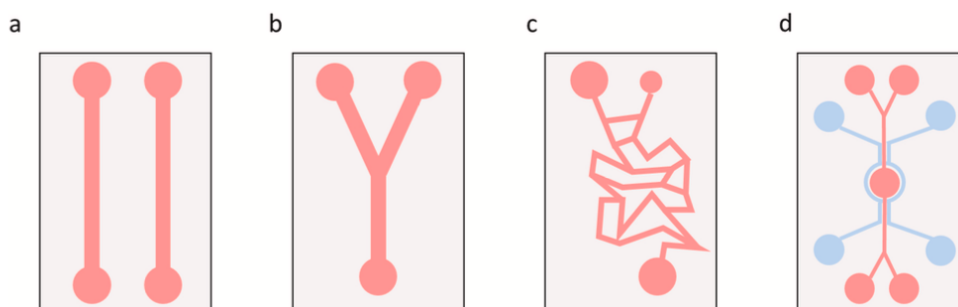


Figura 1.8. Dispositivos microfluídicos- Exemplos de sistemas ou chips de cultura de células microfluídicas: canais lineares (a), canais bifurcados (b), redes microvasculares (c) e redes idealizadas (d) (Retirado de Yuste et al., 2021).

1.3.1.5 Levitação magnética

A levitação magnética foi desenvolvida pela primeira vez em 2010. Foram usados hidrogéis contendo ouro, nanopartículas de óxido de ferro magnético e bacteriófago filamentosos. Neste método, as células são cultivadas até 80% de confluência e tratadas com hidrogéis, sendo incubadas durante a noite para permitir o processo de captação. As células

tratadas são tripsinizadas e colocadas numa placa de ultra-baixa fixação. Uma tampa com um íman de neodímio é imediatamente colocada no topo da placa. Os esferóides começam a formar-se em poucas horas na interface ar-líquido devido à levitação em direção ao íman. Quando as células se agregam, elas começam a sintetizar proteínas da ECM como colagénio, fibronectina e laminina. Os esferóides podem ser incubados por alguns dias até atingirem o tamanho ideal para estudo (Figura 1.9) (Hoarau-Véchet et al., 2018).

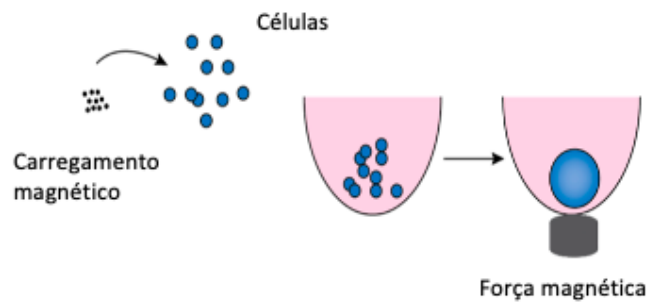


Figura 1.9. Levitação magnética (Adaptado de Kamatar et al., 2020).

1.3.1.6 Bioimpressão 3D

A técnica de impressão 3D é uma tecnologia desenvolvida recentemente que, em geral é referida como a estrutura 3D personalizada sob controlo computacional em que os materiais são impressos, solidificados e conectados entre si (Figura 1.10). A impressão 3D é utilizada como uma ferramenta inovadora na fabricação de tecidos funcionais vivos a partir de células e biomateriais de suporte com *bioinks* em sistemas de impressão computadorizada. Esta tecnologia permite uma ampla gama de aplicações em engenharia de tecidos ou medicina regenerativa. Além disso, a impressão 3D, incluindo a tecnologia de bioimpressão, que consiste na impressão sequencial com *bioink* precursor (polímero ou composto) numa trajetória predefinida e dentro das células (Chaicharoenaudomrung et al., 2019; Łabowska et al., 2021).

Bioink é uma tinta especialmente concebida para aplicações biológicas e médicas que não é tóxica, permitindo a viabilidade de células e tecidos. É composta principalmente de hidrogel devido à sua biodegradabilidade e capacidade de imitar a anatomia e as características mecânicas do corpo, porém, adicionalmente, contém células vivas, agregados

celulares ou moléculas bioativas, criando produtos inteiramente biologicamente funcionais. A aplicação potencial e o tipo de célula determinam a escolha do *bioink* e *bioprinter* a ser adotado. Várias estratégias convencionais de impressão 3D foram relatadas, como a impressão a jato de tinta, a microextrusão e impressão a laser que, também foram desenvolvidas para gerar estruturas biológicas 3D diretamente circundantes de células e agentes bioativos, incluindo vários tecidos biomiméticos, por exemplo, tecido ósseo, cartilagem e tecido osteocondral, tecido cardíaco, vasos sanguíneos, tecido hepático e tumores (Łabowska et al., 2021).

Além da capacidade de gerar construções geométricas contendo células viáveis, a técnica de bioimpressão 3D também facilitou aplicações de alto rendimento com reprodutibilidade precisa. No entanto, as principais preocupações são a exigência da dispendiosa máquina de bioimpressão 3D e os efeitos negativos nas células sensíveis durante o processo de impressão. As células podem ser danificadas devido a tensões osmóticas, térmicas e mecânicas (Chaicharoenaudomrung et al., 2019).

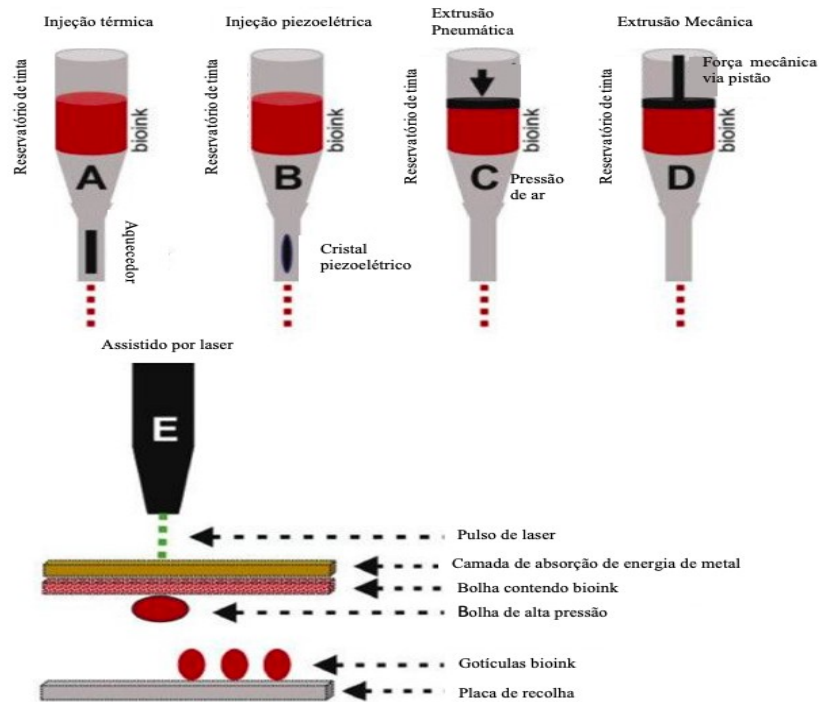


Figura 1.10. Representação esquemática dos métodos mais comuns de bioimpressão. (A) Bioimpressão térmica a jato de tinta. (B) Bioimpressão piezoelétrica a jato de tinta. (C) Bioimpressão de extrusão pneumática. (D) Bioimpressão por extrusão mecânica. (E) *Bioimpress.*

1.3.1.7 *Scaffold-based* naturais e sintéticos

Uma variedade de *scaffolds* derivados naturalmente, como a seda, o colagénio, a agarose, a quitosana e/ou a MEC descelularizada humano, foram empregues para estudar a eficácia de drogas no cancro de mama. Os *scaffolds* de polímeros naturalmente derivados e biodegradáveis oferecem várias vantagens porque, ao contrário dos polímeros sintéticos, eles são biologicamente ativos enquanto ainda fornecem a oportunidade de controlar as propriedades mecânicas e a distribuição espacial das células dentro do *scaffold*. Os *scaffolds* mais complexos usados para estudar a resistência aos medicamentos são aqueles produzidos por células vivas como MEC, que podem ser modificados para criar matrizes acelulares. A MEC secretada pelas células inclui proteínas, glicoproteínas, glicosaminoglicanos e proteoglicanos. Fornece suporte e permite o transporte extracelular, sinalização célula-matriz, bem como sinalização célula-célula (Fisher & Rao, 2020).

Além dos polímeros naturais, *scaffolds* feitos de materiais sintéticos também têm sido utilizados, pois fornecem propriedades químicas e físicas consistentes, tornando o modelo mais fácil de reproduzir em estudos futuros, mantendo a citocompatibilidade. Estes *scaffolds* são frequentemente fabricados usando tecnologia de impressão 3D ou estereolitografia (Figura 1.11) para estudar os efeitos da geometria e da mecânica do *scaffold* na resposta aos medicamentos (Fisher & Rao, 2020).

Estruturas sintéticas também têm sido usadas para investigar o impacto da rigidez da matriz na resposta ao medicamento. Isso é de grande importância ao modelar o comportamento celular em ambientes de tumor primário e metastático, pois a rigidez da matriz é conhecida por impactar significativamente os fenótipos celulares. Para este fim, *scaffolds* de PDMS foram projetados com rigidez equivalente à cartilagem articular, osso colagénio e tumores mamários primários (Fisher & Rao, 2020).

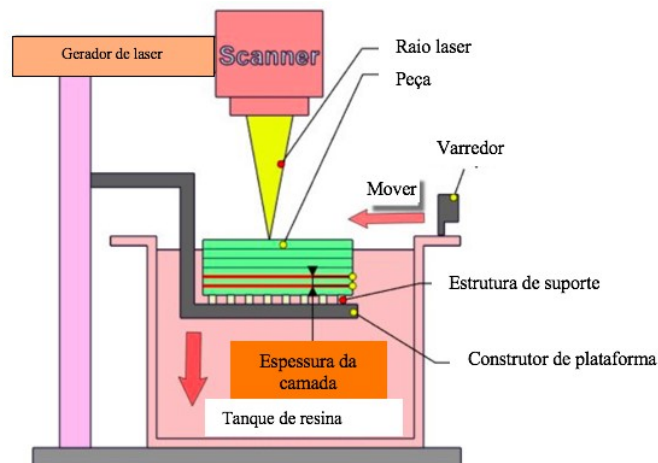


Figura 1.11. Estereolitografia de impressão 3D (Adaptado de Principle of 3D Printing-Stereolithography, 2018).

1.3.1.8 Placas micropadronizadas

O método de micropadrão pode ser uma técnica prospectiva capaz de criar esferóides com tamanhos definidos. Absorção física/ligação covalente ou impressão por micro-contato de matriz extracelular ou porções adesivas de células têm sido usadas para micropadrões. As células podem ser produzidas em esferóides no micropadrão, resultando em esferóides com uma distribuição de tamanho estreita (Kim et al., 2019).

As placas são modificadas para criar compartimentos de tamanho do micrómetro com uma superfície de baixa adesão dentro de cada microespaço, fornecendo um micropadrão ou micropoços que induzem as células a crescer como aglomerados (Figura 1.13). Primeiro, uma camada de polimetacrilato de 3-trimetoxissilila é adicionada à placa de vidro, para garantir a fixação dos micropoços de hidrogel à placa, seguida por uma camada uniforme de hidrogel. Os hidrogéis são redes de material polimérico reticulado, que geralmente são compostos de polímeros hidrofílicos com alto teor de água. Possuem uma alta similaridade com a MEC, pois exibem uma rigidez semelhante à do tecido mole e são feitos de misturas de polímeros naturais, tais como o colagénio e a matrigel. Para células 3D na cultura, os hidrogéis devem possuir resistência mecânica adequada para promover a imobilização celular, fixação e formação de tecidos. Além disso, os hidrogéis devem ter uma alta porosidade para o transporte eficiente de nutrientes e oxigénio (Figura 1.12.). Portanto, estes precisam de ser cuidadosamente selecionados e otimizados dependendo dos tipos de células (Chaicharoenaudomrung et al., 2019; Lee et al., 2017; Worthington et al., 2019).

Os hidrogéis podem ser classificados em hidrogéis de polímeros naturais ou sintéticos, dependendo da sua origem. Polímeros naturais típicos incluem o alginato, o colagénio, a gelatina e a agarose. O alginato é um polissacarídeo biocompatível extraído de algas marinhas. Por ter carga negativa, pode ser reticulado ionicamente com catiões divalentes. A agarose geralmente não é biodegradável no corpo ou em estruturas de tecido, embora possa ser degradada por certas bactérias. O colagénio é o componente de MEC mais comum no corpo. Existem pelo menos 16 tipos de colagénio. O colagénio fornece grupos funcionais e ligantes para a adesão celular e pode ser facilmente reticulado pelo controle do pH e da temperatura. A gelatina tem uma composição semelhante ao colagénio sendo que os fragmentos decompostos de fibras de colagénio são os principais constituintes da gelatina. Esta é frequentemente usada por ser economicamente acessível e ser facilmente reticulada controlando a temperatura (Lee et al., 2017).

Polímeros sintéticos tipicamente usados em hidrogéis biocompatíveis incluem polietilenoglicol (PEG) e poli ácido láctico-co-glicólico (PLGA). O PEG é frequentemente usado em dispositivos *organ-on-a-chip* porque a sua viscosidade, hidrofobicidade-hidrofobicidade e porosidade podem ser facilmente controladas alterando o seu peso molecular médio. Grupos funcionais como o acrilato podem ser anexados a polímeros PEG para torná-los foto-reticuláveis. Os fatores bioquímicos podem também estar ligados a cadeias de polímero de PEG. Essas características permitem o uso do PEG numa ampla gama de aplicações. O PLGA é um polímero que consiste em co-polímeros de monómeros de ácido glicólico e ácido láctico. O PLGA é biocompatível e biodegradável, e a sua taxa de biodegradação pode ser controlada alterando a proporção de ácido polilático (PLA) e ácido poliglicólico (PGA) (Lee et al., 2017).

Em seguida, por meio de técnicas de fotolitografia, o polidimetilsiloxano é adicionado ao hidrogel para a formação dos micropoços. A suspensão de células é então cultivada em micropoços de hidrogel, que podem variar em tamanho de 150-600 μm . Este método permite a produção em grande escala de esferóides. No entanto, muitas vezes se formam bolhas durante a cultura, e a pipetagem pode danificar as superfícies com micropadrões devido à pipetagem (Pinto et al., 2020).

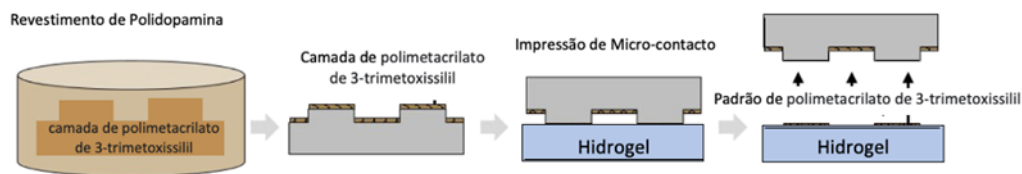


Figura 1.12. Placas micropadronizadas (Adaptado de Kim et al., 2019).

1.3.1.9 Encapsulamento da matriz

Esferóides tumorais encapsulados em matriz são criados usando dispositivos microfluídicos e hidrogéis. Embora os dispositivos microfluídicos com vários designs estejam disponíveis, o básico principal permanece o mesmo, que envolve o encerramento de gotículas de suspensão de células numa camada de hidrogel formando microcápsulas. Um desses dispositivos microfluídicos é composto por três tubos capilares de vidro, que são preenchidos com a suspensão de células no tubo capilar mais interno, solução livre de cálcio no tubo capilar médio e uma solução de hidrogel no tubo capilar mais externo (Figura 1.14). Quando as gotículas de suspensão de células misturadas com hidrogel caem no banho de cálcio, o hidrogel sofre gelificação formando microcápsulas celulares (Nath & Devi, 2016).

As células tumorais dentro da microcápsula reúnem-se para formar esferóides encapsulados em matriz. A solução livre de cálcio serve como barreira, evitando a difusão do cálcio intracelular para o hidrogel contido no tubo mais externo, que após a gelificação prematura pode obstruir o dispositivo. Para encapsular as células, a solução de peptídeo (pó liofilizado de peptídeos sintetizados *in vitro* dissolvidos em bicarbonato de sódio) é misturada com a suspensão de células seguida por gelificação. Normalmente, as cápsulas têm 200-300 μm de diâmetro e a espessura do invólucro varia de 5-35 μm (Nath & Devi, 2016).

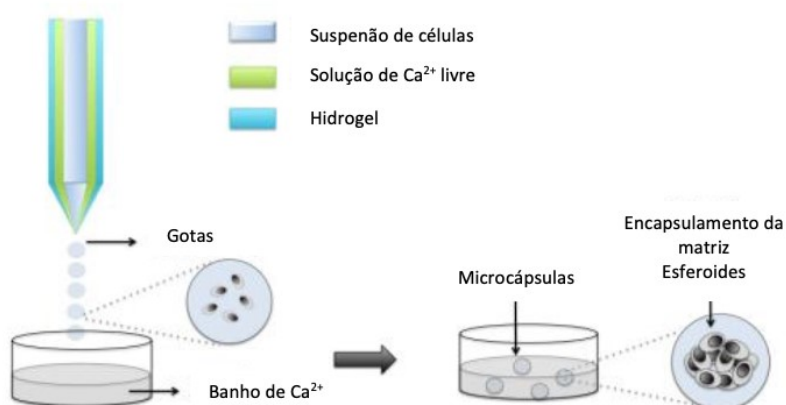


Figura 1.13. Encapsulamento da matriz (Adaptado de Nath & Devi, 2016).

1.3.1.10 Matriz embebida e matriz no topo

A matriz no topo e os métodos embutidos na matriz são bastante semelhantes. No método da matriz no topo, as células são cultivadas e aprisionadas no topo da matriz sólida e os esferóides são formados por meio da agregação celular. No método incorporado à matriz, as células suspensas na matriz liquefeita são incorporadas à matriz apenas após o processo de gelificação (Figura 1.14). Vários compostos têm sido usados como matriz, incluindo agarose, matrigel, colagénio e polímeros sintéticos. O método matriz no topo facilita o processamento pós-cultura e a imagem dos esferóides gerados (Pinto et al., 2020).

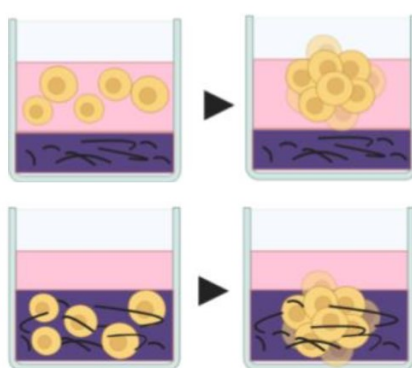


Figura 1.14. Matriz embebida e matriz no topo (Retirado de Pinto et al., 2020).

1.3.1.11 Esferas microtransportadoras

Neste método, as células aderem a grânulos revestidos com matriz natural (colagêneo, celulose) ou sintéticos (dextrano, poli (d, l-lactídeo-co-glicolídeo)), formando estruturas esferoidais, como pode ser observado na Figura 1.15. Os grânulos de microtransportadores fornecem uma superfície de fixação de células, permitindo a agregação, especialmente de células incapazes de se agregar espontaneamente. Este método é considerado um sistema de geração de esferóides rápido, fácil e reproduzível, e permite a adesão de diferentes tipos de células para formar esferóides heterogêneos. No entanto, a presença de grânulos de microtransportadores em esferóides não imita as condições fisiológicas do tumor *in vivo* (Pinto et al., 2020).

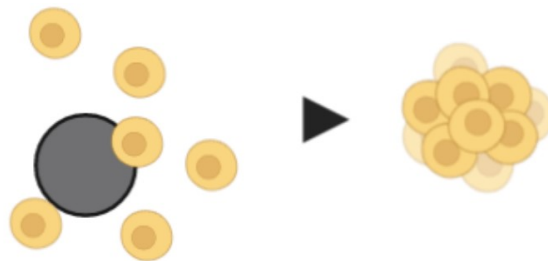


Figura 1.15. Esferas microtransportadoras (Retirado de Pinto et al., 2020).

1.4 Drogas Quimioterapêuticas

Atualmente, várias estratégias de desenvolvimento no tratamento do cancro têm sido descritas. O diagnóstico primário e as alternativas avançadas de tratamento aumentaram as taxas de sobrevivência. As opções de tratamento nesse sentido incluem procedimento cirúrgico, radioterapia e quimioterapia. A quimioterapia é a principal abordagem para o tratamento de pacientes com cancro, principalmente em condições metastáticas (khaki-khatibi et al., 2019).

Existem muitos tipos de drogas quimioterapêuticas e os seus mecanismos de ação não são exatamente os mesmos. De acordo com o mecanismo de ação ao nível molecular, os agentes quimioterapêuticos podem ser divididos em várias categorias, incluindo agentes alquilantes, inibidores da redutase de nucleotídeos e anti-metabolitos. Existem dezenas ou mesmo centenas de medicamentos em cada categoria que atuam em diferentes partes das células tumorais para inibir ou matar os tumores. Os mais comuns incluem a destruição da estrutura celular ou a prevenção da replicação do ADN, inibição da síntese de enzimas ou

proteínas, destruição de componentes estruturais celulares e inibição da angiogénese tumoral (Sun et al., 2021).

Algumas drogas, como agentes alquilantes, inibidores da topoisomerase e inibidores da replicação, podem destruir a estrutura do ADN ou interferir na replicação do ADN. Inibidores de topoisomerase, que são divididos em inibidores de topoisomerase I e inibidores de topoisomerase II, podem inibir a atividade de topoisomerase envolvida na replicação e transcrição do ADN, causando quebras de cadeia simples ou dupla. Além disso, muitos medicamentos comuns, como a doxorubicina (DOX), mitoxantrona, cumarona, gencitabina, mercaptopurina, CPT, PTX, vinorelbina, CDDP, carbacol e quinona, podem gerar espécies reativas de oxigénio e induzir danos ao ADN para atingir efeitos da anticarcinogénese (Sun et al., 2021).

1.4.1 Doxorubicina

Quando se pretende selecionar/validar uma droga para uma determinada patologia, qualquer droga solúvel (por exemplo, compostos de quimioterapia), inibidor de *checkpoint* imunológico (como o eixo PD-1/PD-L1), anticorpo agonista ou molécula pequena, pode ser adicionado a uma cultura 3D para aferir o seu efeito nas células cancerígenas ou para promover a morte mediada pelas células do sistema imunológico (Saraiva et al., 2020).

O antibiótico antraciclínico adriamicina® (Doxorubicina), isolado do *Streptomyces peucetius*, é um agente quimioterapêutico comumente utilizado para vários tipos de cancros, incluindo, linfomas, leucemias, cancro da mama, dos ovários, bexiga e pulmão. No entanto, o desenvolvimento de resistência à DOX é uma das principais razões para a baixa eficiência quimioterapêutica nesses pacientes (Prasanna et al., 2020; C. Wen et al., 2019; Zhao et al., 2018).

Os mecanismos de ação da DOX propostos incluem intercalação na expressão do gene de interrupção do ADN, geração de espécies reativas de oxigénio e inibição da topoisomerase II, uma girase importante para a síntese e replicação do ADN (Zhao et al., 2018).

O mecanismo de ação da DOX nas células cancerígenas começa com a sua difusão passiva através da membrana de bicamada fosfolipídica de células malignas no citoplasma, onde a DOX é convertida numa semiquinona e gera espécies reativas de oxigénio (ERO),

causando a formação de radicais livres e *stress* oxidativo. No citosol, a DOX entra na mitocôndria causando danos ao ADN e *stress* energético. Como resultado, as mitocôndrias libertam a proteína do citocromo C, desencadeando a cascata da caspase que leva à morte celular. Do citosol, a DOX transloca-se para o núcleo, onde se intercala entre as hélices de ADN de cadeia dupla e inibe as enzimas topoisomerases I e II. O dano resultante ao ADN leva à geração de radicais livres, alquilação e ativação da via do p53, inibindo assim a proliferação celular e induzindo a apoptose. A DOX também pode hiperativar a enzima nuclear K-1, esgotando assim a energia da célula, resultando em autofagia (Franco et al., 2018).

No entanto, os benefícios terapêuticos potenciais da DOX são limitados devido aos seus efeitos adversos em vários órgãos que levam a cardiotoxicidade, hepatotoxicidade, nefrotoxicidade, problemas de fertilidade e indução de diabetes tipo 2 (Prasanna et al., 2020).

CAPÍTULO 2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Cultura Celular

A linha celular de cancro de mama triplo negativo, MDA-MB-231 (ATCC HTB-26), foi cultivada em meio Meio de *Eagle* Modificado *Dulbecco* (MEMD), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e 1% de penicilina/estreptomicina. As células foram incubadas a 37°C numa incubadora humidificada a 5% de CO₂.

2.2 Cultura de Modelos Monocamada 2D e Esferóides 3D

Para estudos em modelo monocamada 2D, as células MDA-MB-231 foram plaqueadas com uma densidade celular de 1000 células/poço em placas de 96 poços de fundo plano (TC Plate 96 Well Standard d.F). Para a formação de esferóides, os ensaios foram realizados em placas de 96 poços de fundo redondo em U (TPP *Techno Plastic Products*). Cada placa foi revestida por uma solução de MEMD (sem vermelho de fenol) contendo 1,5% de agarose, uma vez que as propriedades não-adesivas da agarose promovem a formação dos esferóides. Após a solidificação da agarose, as placas foram sujeitas a radiação ultravioleta durante 60 min, e posteriormente, foram seladas e refrigeradas durante 24 h.

Para a otimização da formação de esferóides, diferentes concentrações celulares entre 10000 e 15000 células/poço foram testadas num volume final de 150 µL de meio suplementado (Badea et al., 2019; de Hoogt et al., 2017; Freischel et al., 2021; Jain et al., 2020; J. E. Lee et al., 2019; Nowacka et al., 2021; Saraiva et al., 2020; Xie et al., 2020). As células foram plaqueadas com volume final de 150 µL de meio suplementado. As placas foram centrifugadas a 170 x g por 60 s, e posteriormente incubadas a 37°C, 5% CO₂ por 72 h, para permitir a formação de esferóides. Após este período, o meio foi trocado com um intervalo de 3 dias, onde 75 µL foram removidos e 75 µL de meio suplementado fresco foi adicionado. Este processo foi realizado durante 13 dias, uma vez que, ao sétimo dia o esferóide encontra-se completamente formado como ilustrado na Figura 2.1.

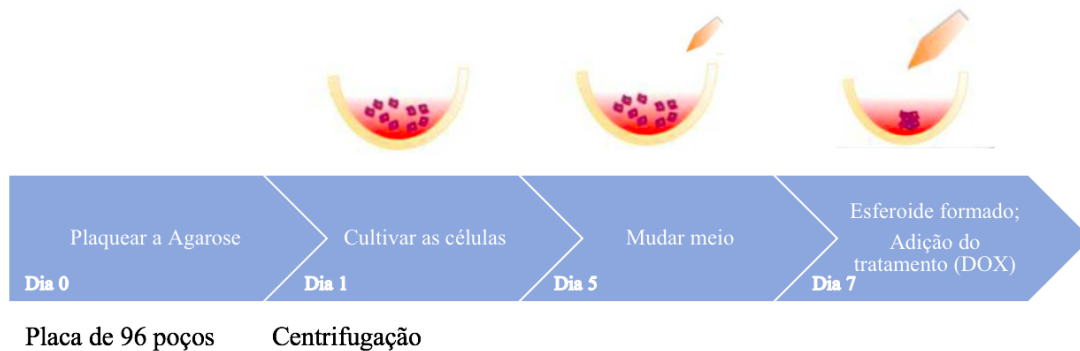


Figura 2.1. Formação de esferóides usando agarose como camada de base. As células são plaqueadas em meio MEMD. Após 7 dias, as células agregam-se e formam esferóides.

2.3 Análise da Distribuição de Tamanhos de Esferóides 3D

Após o esferóide estar formado (7º dia), diferentes concentrações de Doxorrubicina (DOX) (Sigma) (0,5 µg/mL; 1,0 µg/mL; 2,0 µg/mL; 3,0 µg/mL; 4,0 µg/mL; 5,0 µg/mL e 10,0 µg/mL) foram testadas. As células foram submetidas a este tratamento por períodos de 24 h e 48 h numa placa de agitação a uma velocidade de 90 rotações por min. As soluções de DOX foram preparadas a partir da diluição de uma solução de DOX a 200 µg/mL em meio completo. Após esse período, a solução de DOX foi removida e substituída por meio suplementado fresco. A avaliação do efeito da DOX foi realizada através de um método simples de análise quantitativa baseada na área de crescimento dos esferóides em resposta ao tratamento. Deste modo, foram tiradas imagens dos esferóides ao longo do tempo, utilizando o microscópio *Leica Microsystems Wetzlar GmbH*, que tem acoplado uma máquina fotográfica *LEICA D-LUX 3*. A medição das áreas dos esferóides, foi realizada com recurso ao software *Image J* (Figura 3.1).

2.4 Viabilidade Celular

Para determinar o efeito da DOX na viabilidade celular, realizou-se o ensaio colorimétrico de [3- (4,5-dimetiltiozol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio] (MTT) (Sigma). A viabilidade celular foi estudada nos modelos monocamada 2D e esferóides 3D. Para tal, a cultura dos modelos foi realizada como descrito na secção 2.2, sendo a concentração selecionada para a cultura de esferóides 3D de 15000 células/poço. As células foram tratadas

com DOX a uma concentração final de 2, 3 e 4 µg/mL por períodos de 24 h e 48 h a 37°C, numa incubadora humidificada com 5% de CO₂. As soluções de DOX foram preparadas a partir da diluição de uma solução de DOX a 200 µg/mL em meio completo.

Para o modelo de monocamada 2D, as células foram expostas à DOX 24 h após serem plaqueadas, enquanto para o modelo de esferóides 3D, as células foram sujeitas a tratamento após os esferóides estarem totalmente formados (7º dia) Sendo que, após ser colocado o tratamento, os esferóides permaneciam em agitação durante 24 e 48 h. Após este período de incubação, os esferóides foram transferidos para *eppendorfs* (3 esferóides por cada condição) e despeitados com a pipeta com movimentos *up and down*. De seguida centrifugou-se a 1300 rotações por min durante 3 min. Descartou-se o sobrenadante, removendo assim o tratamento anteriormente adicionado, e ressuspendeu-se em 200 µL de MEMD sem vermelho de fenol. Contou-se as células, e estas foram colocadas numa placa de fundo plano (*TC Plate 96 Well.Standard d.F*) por 24 h a 37°C.

Após os períodos de incubação, a solução de DOX foi descartada e foram adicionados 100 µL da solução de MTT (0,5 mg/mL) e as células foram incubadas por 2 h a 37°C e 5% de CO₂, protegidas da luz. Em seguida, a solução de MTT foi removida e substituída por 100 µL de DMSO (Sigma) para dissolver os cristais de *formazan azul* formados em resposta à reação da solução de MTT com células viáveis. Após os cristais de *formazan azul* estarem dissolvidos, a absorvância foi medida usando um leitor de microplaca (Cytation 3, BioTek) a um comprimento de onda de 570 nm. Células não sujeitas a tratamento foram usadas como controlo positivo e normalizadas para 100% da viabilidade celular.

2.5 Análise Imunohistoquímica

MDA-MB-231 esferóides foram tratados com 4 µg/mL durante 24 h e 48 h. Após o período de incubação, os esferóides sujeitos a tratamento foram lavados com solução salina tamponada (SST) (PBS [1x]: 137 mM cloreto de sódio, 2.7 mM cloreto de potássio, 10 mM fosfato disódico e 1.8 mM fosfato monopotássico) e fixados em paraformaldeído (PFA) a 4%, de modo que a cobrir o esferóide por completo, durante 30 min ou 12 h à temperatura ambiente. Em seguida, retirou-se o PFA e lavou-se o esferóide 3 vezes com SST. Após o processo de lavagem, transferiu-se cada esferóide para uma cassette com duas esponjas adequadas para incorporar tecidos, em cada extremo da cassette. As cassetes foram submersas em PFA, para posterior processamento no serviço de histologia do Instituto de Investigação

em Ciências da Vida e Saúde (ICVS). OS esferóides foram cortados em secções de 4 μm e corados com hematoxilina e eosina (H&E).

2.6 Análise Estatística

Os dados estão apresentados como média \pm desvio padrão (D.P). Análise *Two-way ANOVA* com testes de comparações múltiplas de Dunnet foi realizada usando GraphPad Prism 8.3.0 para identificar diferenças entre vários grupos, considerando um nível de significância de 95%.





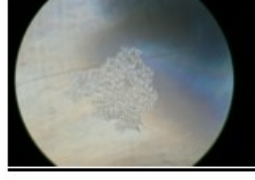



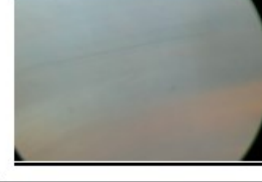
CAPÍTULO 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Formação dos Esferóides e Efeito da Doxorrubicina

As células MDA-MB-231 foram cultivadas em placas de 96 poços com fundo em formato em U e posteriormente foram tratadas com DOX em diferentes concentrações escolhidas com base nas referências de (’Oncul & ’Ercan, 2017; Wen et al., 2018; Sadeghloo et al., 2020; Chen et al., 2021. As imagens dos esferóides foram adquiridas antes e após a adição da DOX.

Inicialmente, para a otimização da formação de esferóides usou-se as concentrações de 1000, 1500 e 2000 células/poço, pois de acordo com (Lovitt et al., 2018; Saraiva et al., 2020), estas concentrações seriam suficientes para a formação de esferóides de MDA-MB-231. Contudo, verificou-se que as células não formaram estruturas esféricas, e com as mudanças de meio feitas ao 8º e 9º dias, visualizou-se perda de células em cada poço. Contudo, observou-se que, com o aumento do número de células, estas formaram estruturas maiores e mais coesas (Tabela 3.1).

Tabela 3.1. Morfologia das 1000, 1500 e 2000 células MDA-MB-231 cultivadas como esferóides tumorais 3D em placas de 96 poços (6º, 8º e 10º dias em cultura).

MDA-MB-231			
Células por poço \ Dia	1000	1500	2000
6º Dia			
8º Dia			
10º Dia			

Tendo em conta que não se conseguiu reter as células, não foi adicionado qualquer tratamento nesta fase.

Após uma análise mais aprofundada na literatura (Badea et al., 2019; Xie et al., 2020), optou-se por aumentar a concentração de células para 5000 e 8000 células /poço.

Para estas concentrações, verificou-se um aumento no tamanho dos esferóides, formando-se estruturas esféricas mais regulares em comparação com as estruturas formadas nas concentrações de células testadas anteriormente. É de salientar as diferenças entre as estruturas formadas com 5000 células/poço em relação às 8000 células/poço, uma vez que a concentração superior produziu esferóides de maiores dimensões, como se pode verificar na Tabela 3.2 e 3.3.

Segundo Saraiva e seus colaboradores (Saraiva et al., 2020), o tratamento deve ser adicionado quando o esferóide está completamente formado, sendo esse o sétimo dia. O fármaco adicionado à cultura 3D foi a DOX, a fim de reduzir a viabilidade das células cancerígenas, de forma a diminuir assim, o tamanho do esferóide. As concentrações usadas estão referidas nas Tabela 3.2 e 3.3. Verificou-se que para concentrações superiores a 5 µg/mL o meio se tornava avermelhado devido à elevada concentração utilizada, dificultando a visualização da estrutura do esferóide.

As células do cancro da mama MDA-MB-231 foram expostas ao tratamento por 72 h (’Oncul & ’Ercan, 2017; Sadeghloo et al., 2020).

Tabela 3.2. Morfologia das 5000 células MDA-MB-231 cultivadas como esferóides, tumorais 3D em placas de 96 poços (7º e 10º dias em cultura).

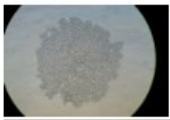
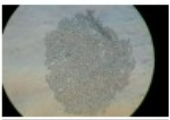
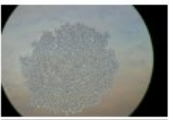
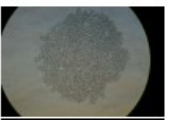





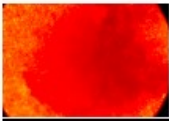
MDA-MB-231 – 5000 CÉLULAS POR POÇO						
Sem tratamento	7º Dia					
		Sem tratamento (controlo)	0,5 µg/mL	1,0 µg/mL	5,0 µg/mL	10,0 µg/mL
Com tratamento	10º Dia					

Tabela 3.3. Morfologia das 8000 células MDA-MB-231 cultivadas como esferóides tumorais 3D em placas de 96 poços (7º e 10º dias em cultura)


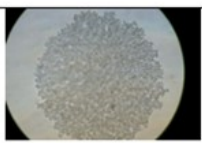
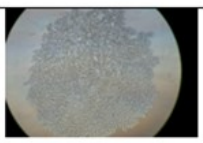
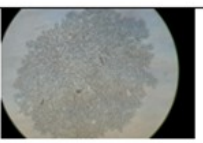

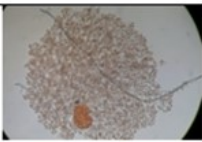
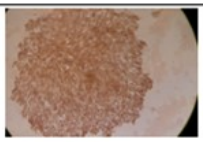
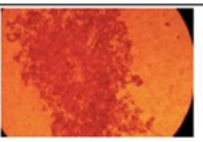
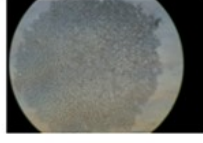
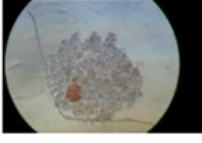
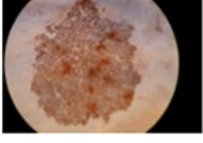
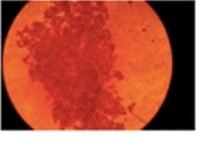
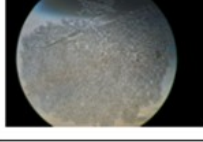
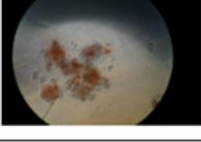
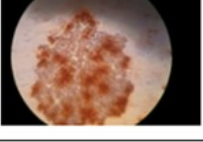
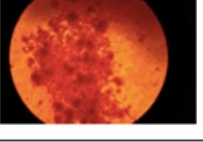
MDA-MB-231 – 8000 CÉLULAS POR POÇO						
Sem tratamento	7º Dia					
		Sem tratamento (controlo)	0,5 µg/mL	1,0 µg/mL	5,0 µg/mL	10,0 µg/mL
Com tratamento	10º Dia					
		Sem tratamento (controlo)	0,5 µg/mL	1,0 µg/mL	5,0 µg/mL	10,0 µg/mL

Tendo em conta estes resultados, decidiu-se usar concentrações de DOX inferiores a 5 µg/mL, passando então a usar-se a gama entre 0,5 e 5 µg/mL, tal como resumido nas Tabelas 3.4 e 3.5. Verificou-se que as células diminuíam de tamanho em todas as concentrações de DOX, mas com 5 µg/mL, continuava a ser difícil a observação dos esferóides.

Tabela 3.4. Morfologia das 5000 células MDA-MB-231 cultivadas como esferóides tumorais 3D em placas de 96 poços (7º, 10º, 13º e 16º dias em cultura).

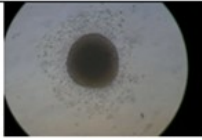
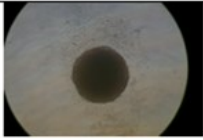
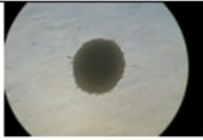
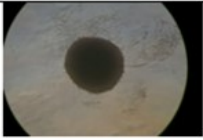
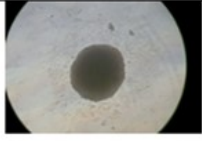
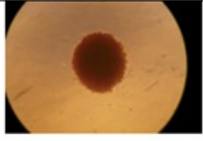
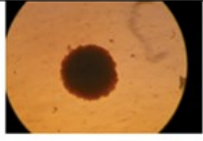
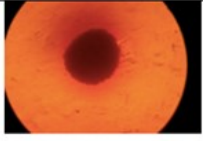


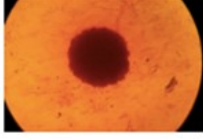
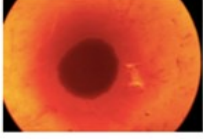
MDA-MB-231 – 5000 CÉLULAS POR POÇO					
Sem tratamento	7º Dia				
		Sem tratamento (controlo)	0,5 µg/mL	1,0 µg/mL	5,0 µg/mL
Com Tratamento	10º Dia (24 horas)				
	13º Dia (48 horas)				
	16º Dia (96 horas)				

Tabela 3.5. Morfologia das 8000 células MDA-MB-231 cultivadas como esferóides tumorais 3D em placas de 96 poços (7º, 10º, 13º e 16º dias em cultura).

MDA-MB-231 – 8000 CÉLULAS POR POÇO					
Sem tratamento	7º Dia				
		Sem tratamento (controlo)	0,5 µg/mL	1,0 µg/mL	5,0 µg/mL
Com Tratamento	10º Dia (24 horas)				
	13º Dia (48 horas)				
	16º Dia (96 horas)				

Após algumas tentativas de otimização de formação de esferóides, optou-se por aumentar a concentração de células por poço. Diferentes autores reportaram o uso de diferentes concentrações iniciais de células, por exemplo, Lee (2020), Nowacka et al. (2021) e Rustamov et al. (2019) utilizaram 10000 células/poço para formar um único esferóide; enquanto Nigjeh et al (2018) e Messan et al (2021) utilizaram 20000. Decidiu-se testar então a concentração de 15000 células/poço e de facto, conseguiu-se perceber que até então ainda não se tinha observado um esferóide tão coeso, tão regular, tão compacto e tão esférico como este formado nestas condições (Tabela 3.6).

Tabela 3.6. Morfologia das 15,000 células MDA-MB-231 cultivadas como esferóides tumorais 3D em placas de 96 poços (7º, 8º e 9º dias em cultura).

MDA-MB-231 – 15000 CÉLULAS POR POÇO					
Sem tratamento	7º Dia				
		Sem tratamento (controlo)	2,0 µg/mL	3,0 µg/mL	4,0 µg/mL
Com Tratamento	8º Dia (24 horas)				
	9º Dia (48 horas)				

As concentrações de DOX utilizadas foram de 2 µg/mL, 3 µg/mL e 4 µg/mL tal como reportado em outros trabalhos (Chen et al., 2021; Wen et al., 2018). Foi possível verificar que houve uma diminuição na área dos esferóides, embora essa diminuição não tenha sido significativa (Figura 3.1).

A análise da área dos esferóides foi realizada ao 7º dia de cultura (sem tratamento de DOX), ao 8º dia e ao 9º dia de cultivo (24 h e 48 h após adição de DOX). A Figura 3.1. representa a área dos esferóides determinada através da análise das imagens capturadas e com recurso ao programa *ImageJ*.

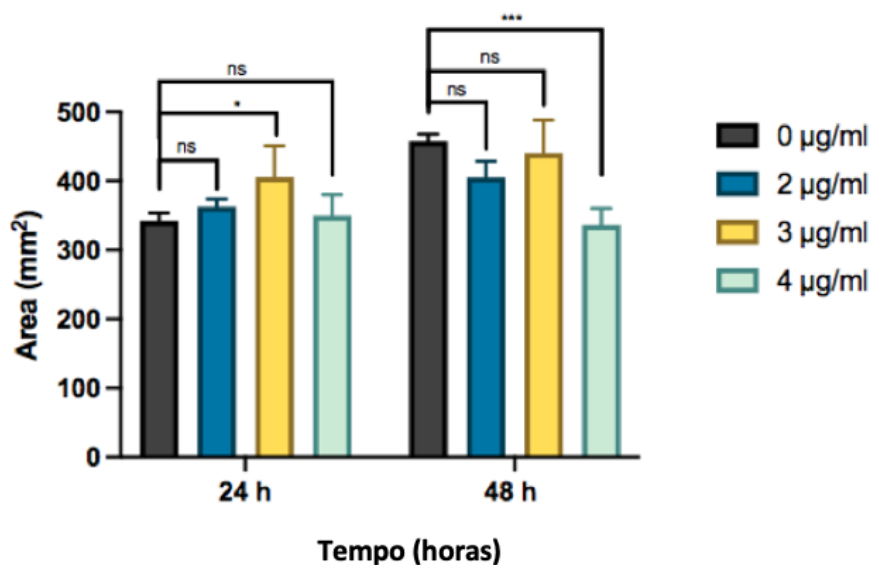


Figura 3.1. Efeito da doxorubicina em esferóides de células de cancro da mama (MDA-MB-231) após 24 horas e 48 horas de tratamento. Os ensaios foram realizados em triplicado e representam a média \pm desvio padrão. * $p < 0,1$; *** $p < 0,001$; ns $> 0,05$.

A taxa de crescimento das células cancerígenas em culturas de esferóides tem impacto na atividade inibitória da DOX, uma vez que a citotoxicidade pode ser menos eficaz em células com um tempo de duplicação mais lento (Lovitt et al., 2018).

Para investigar se os modelos de esferóides de células MDA-MB-231 podem ser usados na descoberta e/ou validação de drogas e tratamentos, a toxicidade da DOX foi avaliada até 48 h de tratamento. Os esferóides de células MDA-MB-231 revelaram suscetibilidade à DOX para a concentração de 3 $\mu\text{g/mL}$ após 24 h de tratamento, tal como para a concentração de 4 $\mu\text{g/mL}$ após 48 h de tratamento (Figura 3.1).

Esta avaliação mostrou que após 24 h de tratamento o crescimento dos esferóides não foi afetado quando sujeito a concentrações de 2 e 4 $\mu\text{g/mL}$. No entanto, após 48 horas de tratamento, a concentração de 4 $\mu\text{g/mL}$ foi a que mostrou uma redução significativa na área do esferóide. Segundo os estudos de Holub et al (2020), a DOX, às 48 h, afetou o crescimento celular e as interações celulares periféricas em concentrações mais elevadas de 30 $\mu\text{g/mL}$ e 60 $\mu\text{g/mL}$, enquanto nas concentrações mais baixas (0,3 $\mu\text{g/mL}$, 0,6 $\mu\text{g/mL}$, 3 $\mu\text{g/mL}$ e 6 $\mu\text{g/mL}$) produziram inibição de crescimento menos aparente em relação ao grupo controlo. Pode-se afirmar assim, que há a necessidade de aumentar concentração de DOX para obter um efeito mais pronunciado deste fármaco em modelos de esferóides de MDA-MB-231.

Contudo, como a redução da área dos esferóides é mais pronunciada às 48 h de tratamento para a concentração de DOX a 4 µg/mL, esta foi a concentração selecionada para os ensaios posteriores.

3.2 Viabilidade Celular

A análise dos ensaios de MTT realizados à cultura 3D e à cultura 2D permitiu avaliar o efeito da DOX na viabilidade celular. Para estudar a viabilidade induzida por este fármaco em cultura 3D, foi usada a concentração de células de 15000 células/poço. As células foram tratadas com diferentes concentrações de DOX (2 µg/mL; 3 µg/mL e 4 µg/mL) após a formação completa do esferóide (7º dia), e foram sujeitas ao tratamento durante 24 h e 48 h. Os resultados foram normalizados pelo ensaio controlo, o que corresponde a 100% de viabilidade celular. Na cultura 2D, a DOX foi adicionada 24 h após as células serem plaqueadas a uma concentração de 10000 células/poço, e foram expostas ao tratamento igualmente por 24 h e 48 h. Como pode ser observado na Figura 3.2., a cultura 3D mostrou-se mais resistente ao tratamento com DOX em comparação com à cultura 2D.

Na cultura 2D (Figura 3.2) a percentagem da viabilidade celular é maior para todas as concentrações no intervalo de tempo de 24 h, em que é de aproximadamente 40%, do que para as 48 h de DOX, em que a percentagem fica abaixo dos 40%. Neste tipo de cultura não há diferenças na viabilidade com diferentes concentrações, uma vez que a média da viabilidade foi muito semelhante para as concentrações testadas em ambos os tempos de incubação testados.

Na cultura 3D observa-se o contrário em que, para o intervalo de 24 h com a DOX, a viabilidade celular é menor (abaixo dos 40%) do que para as 48 h (acima dos 40%). Relativamente às concentrações testadas, a viabilidade celular média mostrou-se muito semelhante, tal como para a cultura 2D.

Contudo, é de notar que, nestes resultados as diferenças não são significativas, uma vez que os desvios padrão são muito elevados. Deste modo, mais repetições ou outro tipo de avaliação de viabilidade celular deveria ser realizada de modo a obter resultados mais consistentes. Segundo a *Creative Bioarray* existem vários ensaios de citotoxicidade possíveis para estudos toxicológicos e farmacológicos, tais como ensaios de exclusão de corante (ensaio de azul triptano, eosina, vermelho neutro...), ensaios colorimétricos (ensaio de XTT,

MTS, WST-1...), ensaios fluorométricos (ensaios de azul Alamar...) e ensaios luminométricos (ensaio luminescente baseado em ATP e ensaio de viabilidade em tempo real).

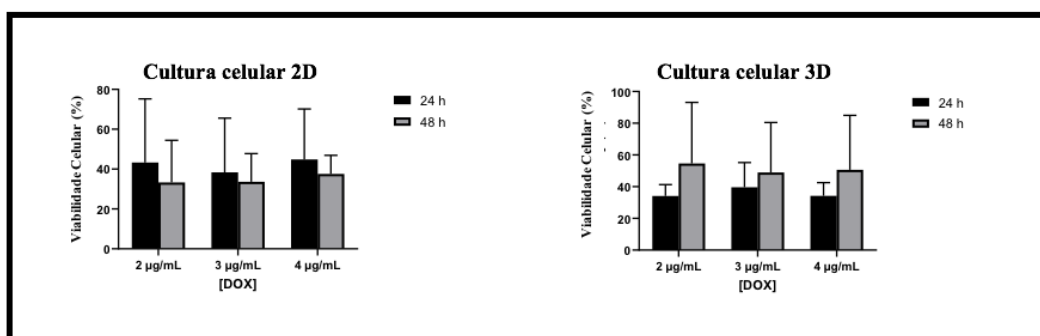


Figura 3.2. Viabilidade celular das culturas em monocamada (2D) e esferóides (3D), 24 h e 48 h após tratamento com doxorrubicina. Os ensaios foram realizados em triplicado e correspondem a média \pm desvio padrão.

Segundo estudos de Huang et al (2020) e Lovitt et al (2018), era expectável que os esferóides MDA-MB-231 possuíssem uma maior resistência à DOX comparativamente à cultura 2D, contrariamente ao que se verificou no presente trabalho, onde a média da viabilidade celular em culturas 2D se revelou inferior.

Outros tempos de exposição ao tratamento poderiam também ser testados. Poder-se-ia estendido o tempo de tratamento para 72 h para verificar se um maior tempo de incubação reproduzia uma menor viabilidade celular, tal como verificou Ghafari e seus colaboradores (Ghafari et al., 2017).

Alguns investigadores sugerem uma abordagem diferente para aumentar a eficácia da DOX em modelos esferóides 3D de MDA-MB-231, nomeadamente através da combinação de DOX com outra droga, obtendo desta forma uma eficácia anticancerígena mais elevada (Lee et al., 2020; Sabzichi et al., 2019; Wen et al., 2018).

Segundo Boix-Montesinos e colaboradores (2021), a escolha da matriz também pode modular a interação das células cancerígenas com a MEC e alterar as respostas ao tratamento. As células MDA-MB-231 cultivadas num sistema 3D baseado em Matrigel ganharam resistência à DOX comparando com a cultura 2D. No entanto, a resistência à DOX poderia ser parcialmente revertida pela substituição de Matrigel por PuraMatrix, um hidrogel peptídico sintético sem proteínas MEC (laminina, colágeno IV, entactina), ou pela inibição da

β 1-integrina, um recetor envolvido nas interações célula-matriz, demonstrando a relevância de interações célula-MEC em resposta ao tratamento.

3.3 Análise Imunohistoquímica

Um esferóide pode ser dividido em três zonas, nomeadamente, a zona necrótica no interior, a zona quiescente no meio e a zona proliferativa no exterior. Células mortas (zonas quiescentes e necróticas) podem ser resultantes da falta de nutrição e oxigénio no interior, enquanto a proliferação celular externa é realizada na superfície do esferóide. Com base na coloração de H&E, pode-se observar as cavidades necróticas devido à hipoxia.

A coloração com hematoxilina e eosina foi usada para visualizar os núcleos das células em amostras de esferóides. A matriz foi seccionada e, em seguida, corada com H&E para revelar a morfologia e os padrões de expressão de proteínas.

A fixação de esferóides (controlo e tratamento com 4 μ g/mL DOX) foi feita após 24 h e 48 h de exposição à DOX. Infelizmente, apenas se conseguiu obter esferóides com integridade para o controlo das 24 h. Isto deveu-se à dificuldade em transferir os esferóides que se encontravam depositados na matriz de agarose para a cassete. Além disso, os esferóides tratados com DOX apresentavam uma estrutura muito menos coesa em comparação aos esferóides não sujeitos ao tratamento, o que levou à sua desintegração aquando do processo de transferência para as cassetes. Estas cassetes são vulgarmente usadas para a fixação de tecidos, mas podem não ser a melhor opção para a fixação de esferóides.

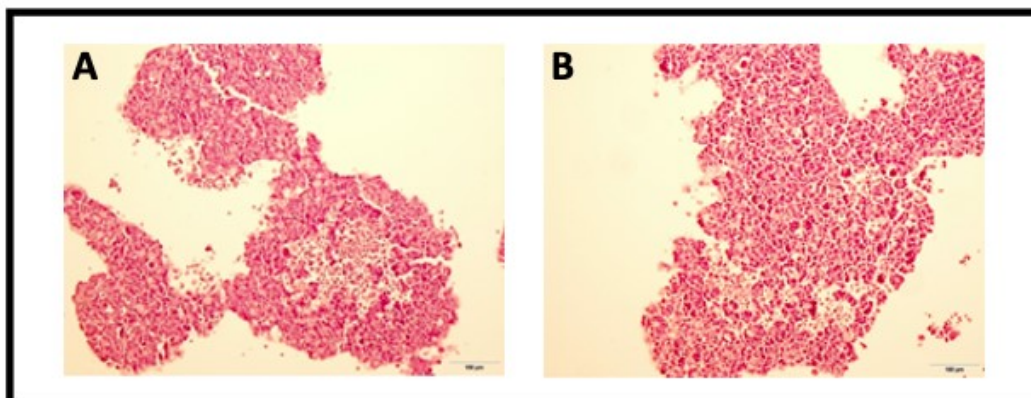


Figura 3.3 Estrutura interna do esferóide. Os esferóides foram criados em matriz de agarose em placas com fundo em forma de U a partir de 15000 células/poço e fixados no 8º dia de cultura. As amostras foram posteriormente fixadas com paraformaldeído, embebidas em parafina, seccionadas e coradas com H&E. As imagens representam seções de 4 μ m intermediárias através dos esferóides. Barra de escala = 100 μ m.

Após este ensaio identificou-se que alguns esferóides não se encontravam na cassette, tinham-se perdido após a sua colocação no recipiente com PFA, e, portanto, alterou-se o protocolo para se obter melhores resultados.

Com o ajuste protocolar, aspirou-se o meio sem remover os esferóides e logo de seguida, lavou-se com PFA. Removeu-se o PFA e voltou-se a adicionar, de modo que cobrisse na totalidade cada poço que continha esferóides. Selou-se com parafilme e deixou-se à temperatura ambiente durante 12 h. Após estarem concluídas as 12 h, removeu-se o PFA, e os esferóides foram retirados cuidadosamente da placa diretamente para as cassetes compostas por quatro esponjas sintéticas (2 em cada extremo), para evitar a perda do esferóide que se observou no primeiro ensaio. As cassetes foram colocadas num recipiente que continha PFA. Concluiu-se que esta otimização não melhorou o protocolo.

Mais otimizações no processo de preparação do esferóides para estudo de imunohistoquímica deverão ser realizados de forma a ser possível recolher as amostras mantendo a sua integridade.

De acordo com Froehlich et al. (2016) e Huang et al. (2020), as células mais internas do esferóide podem perder viabilidade devido às dificuldades de acesso ao suprimento de oxigénio e ao meio de crescimento fresco, podendo ser observado também na Figura 3.3 A, onde o centro do esferóide apresenta uma menor densidade de células marcadas. O esgotamento crescente de oxigénio e substâncias nutritivas em esferóides em crescimento pode causar um défice de energia e ATP e uma acumulação de ácidos gordos nas células. O processo pode ser seguido por desintegração e destruição do tecido na região interna que leva à composição estratificada dos esferóides e depende do tamanho, tempo de cultura e tipo de célula. Esferóides maiores que 500 μm exibem a estrutura em camadas concentricamente com um núcleo necrótico rodeado por uma camada viável de células quiescentes e uma borda externa de células em proliferação dentro de 3-5 dias, enquanto esferóides menores de cerca de 200 μm precisam de mais tempo, 8 dias, para desenvolver regiões centrais hipóxicas com áreas necróticas.

CAPÍTULO 4. CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES FUTURAS

4.1. Conclusões Gerais

O projeto foi realizado com o objetivo de implementar e otimizar o protocolo de formação de esferóides com células MDA-MB-231, com vista a avaliar o efeito de agentes anticancerígenos. Este modelo é particularmente importante, uma vez que se trata de uma linha celular de CMTN, um dos tipos de cancro com menos opções de tratamento atualmente.

Utilizou-se a técnica de cultura 3D, em que as células foram cultivadas em placas de 96 poços com o fundo em formato em U e, posteriormente foram tratadas com DOX em diferentes concentrações. Esta técnica é considerada uma técnica simples e barata em relação a outras técnicas disponíveis.

Uma vez otimizado o processo para a formação de esferóides, adicionou-se o tratamento de DOX, que é um dos agentes quimioterapêuticos mais ativos e mais amplamente usados no tratamento do cancro da mama. Os efeitos da DOX foram observados nos ensaios de cultura de células 3D através de análise de imagem, estudos de viabilidade celular e imunohistoquímica. A maior redução da taxa de crescimento das células do cancro de mama em culturas de esferóides foi verificada através de estudos de análise de imagem para a concentração de 4 µg/mL após 48 h de tratamento. Os estudos de viabilidade celular realizados através do ensaio colorimétrico MTT demonstraram uma redução de quase 40% na taxa de crescimento celular para o modelo 3D. Contudo, observou-se em comparação com as culturas de modelo 2D, que as células em modelo 3D apresentam uma resistência ao efeito da DOX. A análise imunohistoquímica feita com recurso à adição da coloração com H&E, permitiu a observação da morfologia do interior do esferóide, contudo, não foi possível comparar com os esferóides tratados com DOX, devido às dificuldades na execução deste protocolo que se encontra definido para tecidos e não otimizado para esferóides.

Tendo em conta todos os processos de otimização necessários para a formação e posterior análise, os modelos de esferóide MDA-MB-231 podem servir como modelos pré-clínicos promissores para explorar os mecanismos de progressão do cancro da mama e para a seleção de drogas antitumorais.

4.2. Trabalho Futuro

Concluindo, é consensual que os modelos de tumor 3D permitem a avaliação de medicamentos anticancerígenos em condições mais próximas do tumor real, devido às suas principais características, como organização espacial, interações célula-célula e célula-ECM, gradientes difusivos, sinalização celular complexa, resistência a medicamentos e adaptação metabólica. Estes recursos estão ausentes em sistemas de cultura 2D e, portanto, modelos de cultura 3D na avaliação pré-clínica fornecem resultados mais precisos do potencial terapêutico de candidatos a drogas anticancerígenas, aumentando assim a previsibilidade da eficácia *in vivo*. Por último, identificar e eliminar métodos terapêuticos que em nada mostraram eficácia em culturas 3D irá reduzir o uso de animais.

BIBLIOGRAFIA

- Badea, M. A., Balas, M., Hermenean, A., Ciceu, A., Herman, H., Ionita, D., & Dinischiotu, A. (2019). Influence of Matrigel on Single- and Multiple-Spheroid Cultures in Breast Cancer Research. *SLAS Discovery*, 24(5), 563–578. <https://doi.org/10.1177/2472555219834698>
- Bahcecioglu, G., Basara, G., Ellis, B. W., Ren, X., & Zorlutuna, P. (2020). Breast cancer models: Engineering the tumor microenvironment. In *Acta Biomaterialia* (Vol. 106, pp. 1–21). Acta Materialia Inc. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2020.02.006>
- Borri, F., & Granaglia, A. (2021). Pathology of triple negative breast cancer. In *Seminars in Cancer Biology* (Vol. 72, pp. 136–145). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2020.06.005>
- Cao, W., Chen, H. da, Yu, Y. W., Li, N., & Chen, W. Q. (2021). Changing profiles of cancer burden worldwide and in China: a secondary analysis of the global cancer statistics 2020. *Chinese Medical Journal*, 134(7), 783–791. <https://doi.org/10.1097/CM9.0000000000001474>
- Chaicharoenaudomrung, N., Kunhorm, P., & Noisa, P. (2019). Three-dimensional cell culture systems as an in vitro platform for cancer and stem cell modeling. In *World Journal of Stem Cells* (Vol. 11, Issue 12, pp. 1065–1083). Baishideng Publishing Group Co. <https://doi.org/10.4252/wjsc.v11.i12.1065>
- Chen, Z., Ma, N., Sun, X., Li, Q., Zeng, Y., Chen, F., Sun, S., Xu, J., Zhang, J., Ye, H., Ge, J., Zhang, Z., Cui, X., Leong, K., Chen, Y., & Gu, Z. (2021). Automated evaluation of tumor spheroid behavior in 3D culture using deep learning-based recognition. *Biomaterials*, 272. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2021.120770>
- Citotoxicity Testing Services. (2021). *Creative Bioarray: DDA Platform- Drug Discovery Accelerator*. https://dda.creative-bioarray.com/cytotoxicity.html?gclid=CjwKCAiA78aNBhAlEiwA7B76p-CwDwEtkCYVAc4bInRxfWBYgZkUdD9PvnAJs22W7h0FNaZXUhX6ghoCJqsQAvD_BwE
- da Silva, J. L., Cardoso Nunes, N. C., Izetti, P., de Mesquita, G. G., & de Melo, A. C. (2020). Triple negative breast cancer: A thorough review of biomarkers. In *Critical Reviews in Oncology/Hematology* (Vol. 145). Elsevier Ireland Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2019.102855>
- de Hoogt, R., Estrada, M. F., Vidic, S., Davies, E. J., Osswald, A., Barbier, M., Santo, V. E., Gjerde, K., van Zoggel, H. J. A. A., Blom, S., Dong, M., Närhi, K., Boghaert, E., Brito, C., Chong, Y., Sommergruber, W., van der Kuip, H., van Weerden, W. M., Verschuren, E. W., ... Graeser, R. (2017). Data descriptor: Protocols and characterization data for 2d,

3d, and slice-based tumor models from the predelect project. *Scientific Data*, 4. <https://doi.org/10.1038/sdata.2017.170>

Diana, A., Carlino, F., Franzese, E., Oikonomidou, O., Criscitiello, C., de Vita, F., Ciardiello, F., & Orditura, M. (2020). Early triple negative breast cancer: Conventional treatment and emerging therapeutic landscapes. In *Cancers* (Vol. 12, Issue 4). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/cancers12040819>

Edmondson, R., Broglie, J. J., Adcock, A. F., & Yang, L. (2014). Three-dimensional cell culture systems and their applications in drug discovery and cell-based biosensors. In *Assay and Drug Development Technologies* (Vol. 12, Issue 4, pp. 207–218). Mary Ann Liebert Inc. <https://doi.org/10.1089/adt.2014.573>

Eiriz, I. F., Vaz Batista, M., Cruz Tomás, T., Neves, M. T., Guerra-Pereira, N., & Braga, S. (2021). Breast cancer in very young women—a multicenter 10-year experience. *ESMO Open*, 6(1). <https://doi.org/10.1016/j.esmoop.2020.100029>

Ensenyat-Mendez, M., Llinàs-Arias, P., Orozco, J. I. J., Íñiguez-Muñoz, S., Salomon, M. P., Sesé, B., DiNome, M. L., & Marzese, D. M. (2021). Current Triple-Negative Breast Cancer Subtypes: Dissecting the Most Aggressive Form of Breast Cancer. *Frontiers in Oncology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.681476>

Fisher, M. F., & Rao, S. S. (2020). Three-dimensional culture models to study drug resistance in breast cancer. In *Biotechnology and Bioengineering* (Vol. 117, Issue 7, pp. 2262–2278). John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1002/bit.27356>

Fontana, F., Raimondi, M., Marzagalli, M., Sommariva, M., Gagliano, N., & Limonta, P. (2020). Three-dimensional cell cultures as an in vitro tool for prostate cancer modeling and drug discovery. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(18), 1–18. <https://doi.org/10.3390/ijms21186806>

Franco, Y. L., Vaidya, T. R., & Ait-Oudhia, S. (2018). Anticancer and cardio-protective effects of liposomal doxorubicin in the treatment of breast cancer. In *Breast Cancer: Targets and Therapy* (Vol. 10, pp. 131–141). Dove Medical Press Ltd. <https://doi.org/10.2147/BCTT.S170239>

Freischel, A. R., Damaghi, M., Cunningham, J. J., Ibrahim-Hashim, A., Gillies, R. J., Gatenby, R. A., & Brown, J. S. (2021). Frequency-dependent interactions determine outcome of competition between two breast cancer cell lines. *Scientific Reports*, 11(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-021-84406-3>

- Froehlich, K., Haeger, J. D., Heger, J., Pastuschek, J., Photini, S. M., Yan, Y., Lupp, A., Pfarrer, C., Mrowka, R., SchleuBner, E., Markert, U. R., & Schmidt, A. (2016). Generation of multicellular breast cancer tumor spheroids: comparison of different protocols. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 21(3), 89-98. <https://doi.org/10.1007/s10911-016-9359-2>
- Ghafari, F., Rajabi, M. R., Mazoochi, T., Taghizadeh, M., Nikzad, H., Atlasi, M. A., & Taherian, A. (2017). Comparing apoptosis and necrosis effects of *Arctium lappa* root extract and doxorubicin on MCF7 and MDA-MB-231 cell lines. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 18(3), 795–802. <https://doi.org/10.22034/APJCP.2017.18.3.795>
- Gong, Y., Ji, P., Yang, Y. S., Xie, S., Yu, T. J., Xiao, Y., Jin, M. L., Ma, D., Guo, L. W., Pei, Y. C., Chai, W. J., Li, D. Q., Bai, F., Bertucci, F., Hu, X., Jiang, Y. Z., & Shao, Z. M. (2021). Metabolic-Pathway-Based Subtyping of Triple-Negative Breast Cancer Reveals Potential Therapeutic Targets. *Cell Metabolism*, 33(1), 51-64.e9. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2020.10.012>
- Guo, J., Xing, C., Yuan, H., Chai, R., & Zhan, Y. (2019). Oligo (p-Phenylene Vinylene)/Polyisocyanopeptide Biomimetic Composite Hydrogel-Based Three-Dimensional Cell Culture System for Anticancer and Antibacterial Therapeutics. *ACS Applied Bio Materials*, 2(6), 2520–2527. <https://doi.org/10.1021/acsabm.9b00217>
- Hammerl, D., Martens, J. W. M., Timmermans, M., Smid, M., Trapman-Jansen, A. M., Foekens, R., Isaeva, O. I., Voorwerk, L., Balcioglu, H. E., Wijers, R., Nederlof, I., Salgado, R., Horlings, H., Kok, M., & Debets, R. (2021). Spatial immunophenotypes predict response to anti-PD1 treatment and capture distinct paths of T cell evasion in triple negative breast cancer. *Nature Communications*, 12(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-021-25962-0>
- Hoarau-Véchet, J., Rafii, A., Touboul, C., & Pasquier, J. (2018). Halfway between 2D and animal models: Are 3D cultures the ideal tool to study cancer-microenvironment interactions? In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 19, Issue 1). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms19010181>
- Holub, A. R., Huo, A., Patel, K., Thakore, V., Chhibber, P., & Erogbogbo, F. (2020). Assessing Advantages and Drawbacks of Rapidly Generated Ultra-Large 3D Breast Cancer Spheroids: Studies with Chemotherapeutics and Nanoparticles. *International journal of molecular sciences*, 21(12), 4413. <https://doi.org/10.3390/ijms21124413>
- Jain, N. K., Dimri, S., Prasad, R., Ravichandran, G., Naidu, V., De, A., & Srivastava, R. (2020). Characteristics of Molecularly Engineered Anticancer Drug Conjugated Organic Nanomicelles for Site-Selective Cancer Cell Rupture and Growth Inhibition of Tumor

Spheroids. *ACS Applied Bio Materials*, 3(10), 7067–7079.
<https://doi.org/10.1021/acsabm.0c00913>

Jensen, C., & Teng, Y. (2020). Is It Time to Start Transitioning From 2D to 3D Cell Culture? In *Frontiers in Molecular Biosciences* (Vol. 7). Frontiers Media S.A.
<https://doi.org/10.3389/fmolb.2020.00033>

Jitariu, A.-A., Cîmpean, A. M., Ribatti, D., & Raica, M. (2017). *Triple negative breast cancer: the kiss of death THE EMERGING CONCEPT OF TRIPLE NEGATIVE BREAST CANCER* (Vol. 8, Issue 28). www.impactjournals.com/oncotarget

Kahraman, M., Röske, A., Laufer, T., Fehlmann, T., Backes, C., Kern, F., Kohlhaas, J., Schrörs, H., Saiz, A., Zabler, C., Ludwig, N., Fasching, P. A., Strick, R., Rübner, M., Beckmann, M. W., Meese, E., Keller, A., & Schrauder, M. G. (2018). MicroRNA in diagnosis and therapy monitoring of early-stage triple-negative breast cancer. *Scientific Reports*, 8(1).
<https://doi.org/10.1038/s41598-018-29917-2>

Kamatar, A., Gunay, G., & Acar, H. (2020). Natural and synthetic biomaterials for engineering multicellular tumor spheroids. In *Polymers* (Vol. 12, Issue 11, pp. 1–23). MDPI AG.
<https://doi.org/10.3390/polym12112506>

Kapałczyńska, M., Kolenda, T., Przybyła, W., Zajączkowska, M., Teresiak, A., Filas, V., Ibbs, M., Bliźniak, R., Łuczewski, Ł., & Lamperska, K. (2018). 2D and 3D cell cultures – a comparison of different types of cancer cell cultures. *Archives of Medical Science*, 14(4), 910–919. <https://doi.org/10.5114/aoms.2016.63743>

khaki-khatibi, F., Ghorbani, M., Sabzichi, M., Ramezani, F., & Mohammadian, J. (2019). Adjuvant therapy with statin enriches the anti-proliferative effect of doxorubicin in human ZR-75-1 breast cancer cells via arresting cell cycle and inducing apoptosis. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 109, 1240–1248.
<https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.10.183>

Kim, E. M., Lee, Y. bin, Byun, H., Chang, H. K., Park, J., & Shin, H. (2019). Fabrication of Spheroids with Uniform Size by Self-Assembly of a Micro-Scaled Cell Sheet (μ CS): The Effect of Cell Contraction on Spheroid Formation. *ACS Applied Materials and Interfaces*, 11(3), 2802–2813. <https://doi.org/10.1021/acsami.8b18048>

Kogure, A., Kosaka, N., & Ochiya, T. (2019). Cross-talk between cancer cells and their neighbors via miRNA in extracellular vesicles: An emerging player in cancer metastasis. In *Journal of Biomedical Science* (Vol. 26, Issue 1). BioMed Central Ltd.
<https://doi.org/10.1186/s12929-019-0500-6>

- Łabowska, M. B., Cierluk, K., Jankowska, A. M., Kulbacka, J., Detyna, J., & Michalak, I. (2021). A review on the adaption of alginate-gelatin hydrogels for 3D cultures and bioprinting. In *Materials* (Vol. 14, Issue 4, pp. 1–28). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ma14040858>
- Lebert, J. M., Lester, R., Powell, E., Seal, M., & McCarthy, J. (2018). Advances in the systemic treatment of triple-negative breast cancer. In *Current Oncology* (Vol. 25, pp. S142–S150). Multimed Inc. <https://doi.org/10.3747/co.25.3954>
- Lee, J. E., Lee, J., Kim, J. H., Cho, N., Lee, S. H., Park, S. B., Koh, B., Kang, D., Kim, S., & Yoo, H. M. (2019). Characterization of the anti-cancer activity of the probiotic bacterium *Lactobacillus fermentum* using 2D vs. 3D culture in colorectal cancer cells. *Biomolecules*, 9(10). <https://doi.org/10.3390/biom9100557>
- Lee, K. S., Lee, M. G., Kwon, Y. S., & Nam, K. S. (2020). Arctigenin enhances the cytotoxic effect of doxorubicin in MDA-MB-231 breast cancer cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(8). <https://doi.org/10.3390/ijms21082997>
- Lee, S. H., Shim, K. Y., Kim, B., & Sung, J. H. (2017). Hydrogel-based three-dimensional cell culture for organ-on-a-chip applications. In *Biotechnology Progress* (Vol. 33, Issue 3, pp. 580–589). John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1002/btpr.2457>
- Lehmann, B. D., Bauer, J. A., Chen, X., Sanders, M. E., Chakravarthy, A. B., Shyr, Y., & Pietenpol, J. A. (2011). Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. *Journal of Clinical Investigation*, 121(7), 2750–2767. <https://doi.org/10.1172/JCI45014>
- Lovitt, C. J., Shelper, T. B., & Avery, V. M. (2018). Doxorubicin resistance in breast cancer cells is mediated by extracellular matrix proteins. *BMC Cancer*, 18(1). <https://doi.org/10.1186/s12885-017-3953-6>
- Lyons, T. G. (2019). Targeted Therapies for Triple-Negative Breast Cancer. *Current Treatment Options in Oncology*, 20(11). <https://doi.org/10.1007/s11864-019-0682-x>
- Malik, A., Hafeez, K., Nazar, W., Naeem, M., Ali, I., Ali, Q., Ahmed, Mujraba, Z., Rana, M. A., & Hafeez, M. M. (2020). Assessment of controversial risk factors in development of breast cancer: A study from local population. *Biological and Clinical Sciences Research Journal Biol. Clin. Sci. Res. J*, 49. <https://doi.org/10.54112/bcsrj.v2021i1.49>
- Malla, R. R., Kumari, S., Gavara, M. M., Badana, A. K., Guglavath, S., Kumar, D. K. G., & Rokkam, P. (2019). A perspective on the diagnostics, prognostics, and therapeutics of

- microRNAs of triple-negative breast cancer. In *Biophysical Reviews* (Vol. 11, Issue 2, pp. 227–234). Springer Verlag. <https://doi.org/10.1007/s12551-019-00503-8>
- Messan, M. R., Damaghi, M., Freischel, A., Miao, Y., Brown, J., Gillies, R., & Wallace, D. (2021). Predicting the results of competition between two breast cancer lines grown in 3-D spheroid culture. *Mathematical Biosciences*, 336, 108575. <https://doi.org/10.1016/j.mbs.2021.108575>
- Naorem, L. D., Muthaiyan, M., & Venkatesan, A. (2019). Identification of dysregulated miRNAs in triple negative breast cancer: A meta-analysis approach. *Journal of Cellular Physiology*, 234(7), 11768–11779. <https://doi.org/10.1002/jcp.27839>
- Nath, S., & Devi, G. R. (2016). Three-dimensional culture systems in cancer research: Focus on tumor spheroid model. In *Pharmacology and Therapeutics* (Vol. 163, pp. 94–108). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2016.03.013>
- Nigjeh, S. E., Yeap, S. K., Nordin, N., Kamalideghan, B., Ky, H., & Rosli, R. (2018). Citral induced apoptosis in MDA-MB-231 spheroid cells. *BMC complementary and alternative medicine*, 18(1), 1-10. <https://doi.org/10.1186/s12906-018-2115-y>
- Nowacka, M., Sterzynska, K., Andrzejewska, M., Nowicki, M., & Januchowski, R. (2021). Drug resistance evaluation in novel 3D in vitro model. *Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie*, 138, 111536. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.111536>
- 'Oncul, S. ', & 'Ercan, A. '. (2017). Discrimination of the Effects of Doxorubicin on Two Different Breast Cancer Cell Lines on Account of Multidrug Resistance and Apoptosis. "Ercan, A.," 79(4), 599–607. <https://www.ijpsonline.com/articles/discrimination-of-the-effects-of-doxorubicin-on-two-different-breast-cancer-cell-lines-on-account-of-multidrug-resistance-and-apop-3366.html>
- Paradiso, F., Serpelloni, S., Francis, L. W., & Taraballi, F. (2021). Mechanical studies of the third dimension in cancer: From 2D to 3D model. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 22, Issue 18). MDPI. <https://doi.org/10.3390/ijms221810098>
- Pinto, B., Henriques, A. C., Silva, P. M. A., & Bousbaa, H. (2020). Three-dimensional spheroids as in vitro preclinical models for cancer research. In *Pharmaceutics* (Vol. 12, Issue 12, pp. 1–38). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12121186>
- Prasanna, P. L., Renu, K., & Valsala Gopalakrishnan, A. (2020). New molecular and biochemical insights of doxorubicin-induced hepatotoxicity. In *Life Sciences* (Vol. 250). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.117599>

- Principle of 3D printing- Stereolithography.* (2018, December 10). <https://www.tanerxun.com/principle-of-3d-printing-stereolithography/.html>
- Rustamov, V., Keller, F., Klicks, J., Hafner, M., & Rudolf, R. (2019). Bone sialoprotein shows enhanced expression in early, high-proliferation stages of three-dimensional spheroid cell cultures of breast cancer cell line MDA-MB-231. *Frontiers in oncology*, *9*, 36. <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.00036>
- Ryu, W. J., & Sohn, J. H. (2021). Molecular targets and promising therapeutics of triple-negative breast cancer. In *Pharmaceuticals* (Vol. 14, Issue 10). MDPI. <https://doi.org/10.3390/ph14101008>
- Sabzichi, M., Ramezani, M., Mohammadian, J., Ghorbani, M., Mardomi, A., Najafipour, F., & Mehdizadeh, A. (2019). The synergistic impact of quinacrine on cell cycle and anti-invasiveness behaviors of doxorubicin in MDA-MB-231 breast cancer cells. *Process Biochemistry*, *81*, 175–181. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2019.03.007>
- Saraiva, D. P., Matias, A. T., Braga, S., Jacinto, A., & Cabral, M. G. (2020). Establishment of a 3D Co-culture With MDA-MB-231 Breast Cancer Cell Line and Patient-Derived Immune Cells for Application in the Development of Immunotherapies. *Frontiers in Oncology*, *10*. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.01543>
- Sporikova, Z., Koudelakova, V., Trojanec, R., & Hajduch, M. (2018). Genetic Markers in Triple-Negative Breast Cancer. In *Clinical Breast Cancer* (Vol. 18, Issue 5, pp. e841–e850). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.clbc.2018.07.023>
- Sun, Y., Hu, H., Jing, X., Meng, Q., Yu, B., Cong, H., & Shen, Y. (2021). Co-delivery of chemotherapeutic drugs and cell cycle regulatory agents using nanocarriers for cancer therapy. In *Science China Materials* (Vol. 64, Issue 8, pp. 1827–1848). Science in China Press. <https://doi.org/10.1007/s40843-020-1627-4>
- Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. (2021). Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, *71*(3), 209–249. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>
- Thakur, V., & Kutty, R. V. (2019). Recent advances in nanotheranostics for triple negative breast cancer treatment. In *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research* (Vol. 38, Issue 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s13046-019-1443-1>

- van der Meer, D. J., Kramer, I., van Maaren, M. C., van Diest, P. J., C. Linn, S., Maduro, J. H., J.A. Strobbe, L., Siesling, S., Schmidt, M. K., & Voogd, A. C. (2021). Comprehensive trends in incidence, treatment, survival and mortality of first primary invasive breast cancer stratified by age, stage and receptor subtype in the Netherlands between 1989 and 2017. *International Journal of Cancer*, *148*(9), 2289–2303. <https://doi.org/10.1002/ijc.33417>
- Wen, C., Fu, L., Huang, J., Dai, Y., Wang, B., Xu, G., Wu, L., & Zhou, H. (2019). Curcumin reverses doxorubicin resistance via inhibition the efflux function of ABCB4 in doxorubicin-resistant breast cancer cells. *Molecular Medicine Reports*, *19*(6), 5162–5168. <https://doi.org/10.3892/mmr.2019.10180>
- Wen, S. hsuan, Su, S. chiang, Liou, B. huang, Lin, C. hao, & Lee, K. rong. (2018). Sulbactam-enhanced cytotoxicity of doxorubicin in breast cancer cells. *Cancer Cell International*, *18*(1). <https://doi.org/10.1186/s12935-018-0625-9>
- Worthington, P., Drake, K. M., Li, Z., Napper, A. D., Pochan, D. J., & Langhans, S. A. (2019). Implementation of a High-Throughput Pilot Screen in Peptide Hydrogel-Based Three-Dimensional Cell Cultures. *SLAS Discovery*, *24*(7), 714–723. <https://doi.org/10.1177/2472555219844570>
- Xie, P., Liang, X., Song, Y., & Cai, Z. (2020). Mass spectrometry imaging combined with metabolomics revealing the proliferative effect of environmental pollutants on multicellular tumor spheroids. *Analytical Chemistry*, *92*(16), 11341–11348. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.0c02025>
- Yang, Z., & Liu, Z. (2020). The Emerging Role of MicroRNAs in Breast Cancer. In *Journal of Oncology* (Vol. 2020). Hindawi Limited. <https://doi.org/10.1155/2020/9160905>
- Sadeghloo, A. Y., Khorsandi, K., & Kianmehr, Z. (2020). Synergistic effect of photodynamic treatment and doxorubicin on triple negative breast cancer cells. *Photochemical and Photobiological Sciences*, *19*(11), 1580–1589. <https://doi.org/10.1039/d0pp00132e>
- Yuste, I., Luciano, F. C., González-Burgos, E., Lalatsa, A., & Serrano, D. R. (2021). Mimicking bone microenvironment: 2D and 3D in vitro models of human osteoblasts. In *Pharmacological Research* (Vol. 169). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2021.105626>
- Zeng, X., Shi, G., He, Q., & Zhu, P. (2021). Screening and predicted value of potential biomarkers for breast cancer using bioinformatics analysis. *Scientific Reports*, *11*(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-021-00268-9>

Zhao, N., C Woodle, M., & Mixson, A. J. (2018). Advances in Delivery Systems for Doxorubicin. *Journal of Nanomedicine & Nanotechnology*, 09(05). <https://doi.org/10.4172/2157-7439.1000519>