

FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E DESENVOLVIMENTO NA
REGIÃO CENTRO-OESTE

EVELYN DE ANDRADE SALOMÃO

**EFEITO DA *Campomanesia adamantium* (CAMBESS.) O. BERG EM
MODELO DE MELANOMA:**

APLICAÇÃO DO IR-780 *IN VITRO* E *IN VIVO*.

CAMPO GRANDE
2023

EVELYN DE ANDRADE SALOMÃO

**EFEITO DA *Campomanesia adamantium* (CAMBESS.) O. BERG EM
MODELO DE MELANOMA:**

APLICAÇÃO DO IR-780 *IN VITRO* E *IN VIVO*.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste, na Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul para obtenção do Título de Doutora em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste. Linha de pesquisa: A Biodiversidade do Pantanal e Cerrado e suas Relações e Aplicações na Saúde.

Orientadora Prof(a) Dra. Danielle Bogo

CAMPO GRANDE
2023



Ata de Defesa de Tese
Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste
Doutorado

Aos oito dias do mês de dezembro do ano de dois mil e vinte e três, às treze horas, na Videoconferência, da Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, reuniu-se a Banca Examinadora composta pelos membros: Danielle Bogo (UFMS), Ana Lucia Tasca Gois Ruiz (UNICAMP), Lilliam May Grespan Estodutto da Silva (UCDB), Rita de Cassia Avellaneda Guimaraes (UFMS) e Valter Aragao do Nascimento (UFMS), sob a presidência do primeiro, para julgar o trabalho da aluna: **EVELYN DE ANDRADE SALOMÃO**, CPF 02039531181, Área de concentração em Tecnologia e Saúde, do Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste, Curso de Doutorado, da Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, apresentado sob o título **"EFEITO DA CAMPOMANESIA ADAMANTIUM (CAMBESS.) O. BERG EM MODELO DE MELANOMA: APLICAÇÃO DO IR-780 IN VITRO E IN VIVO"** e orientação de Danielle Bogo. A presidente da Banca Examinadora declarou abertos os trabalhos e agradeceu a presença de todos os Membros. A seguir, concedeu a palavra à aluna que expôs sua Tese. Terminada a exposição, os senhores membros da Banca Examinadora iniciaram as arguições. Terminadas as arguições, a presidente da Banca Examinadora fez suas considerações. A seguir, a Banca Examinadora reuniu-se para avaliação, e após, emitiu parecer expresso conforme segue:

EXAMINADOR	ASSINATURA	AVALIAÇÃO
Dra. Danielle Bogo (Interno)		Aprovada
Dra. Ana Lucia Tasca Gois Ruiz (Externo)		Aprovada
Dra. Lilliam May Grespan Estodutto da Silva (Externo)		Aprovada
Dra. Magalli Costa Barbosa Lima e Silva (Externo) (Suplente)		
Dra. Rita de Cassia Avellaneda Guimaraes (Interno)		Aprovada
Dr. Valter Aragao do Nascimento (Interno)		Aprovada

RESULTADO FINAL:

Aprovação Aprovação com revisão Reprovação

OBSERVAÇÕES:

Nada mais havendo a ser tratado, a Presidente declarou a sessão encerrada e agradeceu a todos pela presença.

Assinaturas:

Presidente da Banca Examinadora

Aluna

Aos meus pais, por tudo que fazem por mim.

Ao meu esposo, por sempre estar ao meu lado.

À Nalah, pelo amor incondicional.

AGRADECIMENTOS

A todos que me dedicaram tempo e conhecimento para elaboração e desenvolvimento dessa pesquisa realizada em momentos de tensão, medos e incertezas em meio à pandemia de COVID-19.

À minha colega de profissão, professora e amiga Dra. Iandara Schettert Silva, toda minha admiração.

À professora Dra. Danielle Bogo, meu profundo agradecimento pela orientação e por acreditar em meu potencial e nunca me deixar abalar nos momentos difíceis.

Ao corpo técnico, docente e discente dos laboratórios de Biologia Molecular e Cultura Celular-FACFAN/UFMS, Purificação de Proteínas e suas Funções Biológicas-FAMED/UFMS, Unidade de Ciências de Alimentos-FACFAM/UFMS, Histologia-INBIO/UFMS e Laboratório de Análises Clínicas-FACFAN/UFMS, em especial à Magalli Costa Barbosa Lima e Silva pela amizade e compartilhamento do conhecimento sobre a pesquisa.

Aos Professores Dr. Auro Nomizo e Dra. Cristina Ribeiro de Barros e ao colega Murillo Duarte Silva do Laboratório de Imuno-endocrinologia e Regulação do Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-USP, pela parceria.

Aos professores Dr. Valter Aragão do Nascimento e Dr. Rondon Tosta Ramalho, por todo conhecimento compartilhado.

Agradeço também à Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, ao Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste e às agências de fomento CAPES e FINEP.

“O universo de cada um se resume ao tamanho do seu saber.”

Albert Einstein

RESUMO

Câncer é um conjunto de doenças de caráter maligno com desenvolvimento rápido e agressivo, sendo o melanoma considerado um dos tipos mais graves devido à alta possibilidade de metástase. O Brasil possui biodiversidade disponível para o estudo de bioativos no tratamento de várias doenças. O Cerrado é o bioma onde encontra-se o fruto da *Campomanesia adamantium* (guavira) popularmente utilizada como remédio e descrita com potencial antiproliferativo sobre células tumorais, sendo assim, avaliou-se o efeito desse fruto em modelo de metástase pulmonar de melanoma. Os extratos da casca e da polpa foram obtidos por maceração em solvente diclorometano e utilizados na pesquisa do potencial antiproliferativo em sete linhagem celulares, sendo duas não tumorais, pelos métodos SRB e MTT, obtendo dados da inibição de 50% do crescimento celular, inibição total do crescimento celular e índice de seletividade utilizando a linhagem NIH-3T3. Ainda, foram avaliados parâmetros para utilização do marcador tumoral IR-780 no equipamento In-Vivo Xtreme para avaliação de amostras frente a linhagem B16-F10. Ambos extratos foram ativos principalmente frente à linhagem U251 (glioblastoma), sendo o extrato da casca mais ativo (GI50 = 4,89 ug/ml, IS = 51,3) do que o extrato da polpa (GI50 = 32,1 ug/ml, IS = 8,7). O extrato da casca apresentou, na maior concentração, efeito citocida para a maioria das linhagens tumorais testadas. No teste de absorção do IR-780 pelas células B16-F10 (melanoma murino), a melhor visualização da viabilidade celular foi obtida com a utilização do marcador na concentração de 20 µM para a densidade celular de 2×10^5 . Ainda, a coloração simultânea com o corante nuclear Hoechst 33342 evidenciou o acúmulo de IR-780 no citosol celular. Nos testes *in vivo* foram realizados três modelos de tumor (n=3) pela inoculação de 5×10^5 células, em camundongos machos da linhagem BALB/c, sendo um nódulo subcutâneo dorsal e dois métodos de obtenção de metástase pulmonar, por inoculação intraperitoneal e por inoculação venosa pela veia lateral caudal. Foi utilizado 200µL do IR-780 a 0,45 mg/kg intraperitoneal, nas últimas 24h do experimento para obtenção das imagens de fluorescência, obtendo resultados satisfatórios no modelo de metástase, por inoculação venosa, e inviabilizado o uso do marcador nos outros dois modelos. Para determinar a atividade dos extratos *in vivo* os animais foram inoculados com células B16-F10 no primeiro dia de experimento pela veia lateral caudal. No 15º dia, foram distribuídos em cinco grupos (n=6), o grupo controle não recebeu tratamento, o grupo Azeite recebeu tratamento com 100µL de azeite de oliva extra virgem puro, o grupo Doxo foi tratado com 200µL de doxorrubicina 5 mg/kg, o grupo DEGPE foi tratado com extrato da polpa e o grupo DEGPU foi tratado com extrato da casca ambos diluído em azeite de oliva extra virgem a 92,5 mg/kg/100µL intraperitoneal, todos os grupos receberam uma única dose de tratamento. Nas últimas 24h do estudo, no 29º dia, os grupos também receberam IR-780. Os animais foram pesados em diferentes dias, sem apresentar diferença estatística significativa entre os grupos. O consumo de ração foi avaliado nos últimos três dias do

experimento, onde constatou diferença significativa somente entre o grupo controle e o grupo azeite. Com relação a metástase, a diferença estatística ($p < 0,05$) foi entre os grupos tratados com os extratos e o grupo controle, indicando grande redução da metástase pulmonar, principalmente no grupo DEGPU, confirmado pelas análises macroscópica e histológica dos pulmões. As imagens obtidas na análise *ex vivo* indicaram que a intensidade de fluorescência do IR-780 foi inversamente proporcional ao comprometimento pulmonar, sugerindo a viabilidade de uso desse marcador para este tipo de análise. Portanto, conclui-se que os extratos da *C. adamantium* limitaram o crescimento tumoral e a implantação da metástase e que o IR-780 pode ser utilizado para determinar viabilidade celular e comprometimento pulmonar tumoral.

Descritores: B16-F10, Marcador tumoral, Metástase pulmonar, In-Vivo Xtreme, Imaging system

ABSTRACT

Cancer is a group of malignant diseases with rapid and aggressive development, and melanoma is considered one of the most serious types due to high possibility of metastasis. Brazil has biodiversity available for study of bioactive for treatment of various diseases. Cerrado is a biome where fruit of *Campomanesia adamantium* (guavira) is found, popularly used as a medicine and described as having anti-proliferative potential on tumor cells, therefore, effect of this fruit on melanoma lung metastasis model was evaluated. Peel and pulp extracts were obtained by maceration in dichloromethane solvent and used to research antiproliferative potential in seven cell lines, two of which were non-tumorous, using SRB and MTT methods, obtaining data on 50% of growth inhibition, total growth inhibition and selectivity index using NIH-3T3 line. Furthermore, parameters were evaluated for using IR-780 tumor marker in In-Vivo Xtreme equipment to evaluate samples against B16-F10 lineage. Both extracts were active mainly against U251 lineage (glioblastoma), with peel extract being more active (GI50 = 4.89 ug/ml, IS = 51.3) than pulp extract (GI50 = 32.1 ug/ml ml, IS = 8.7). Peel extract showed, at the highest concentration, a cytotoxic effect for most of tumor lines tested. In IR-780 absorption test by B16-F10 cells (murine melanoma), best visualization of cell viability was obtained using marker at concentration of 20 μM for a cell density of 2×10^5 . Furthermore, simultaneous staining with nuclear dye Hoechst 33342 showed the accumulation of IR-780 in cell cytosol. In vivo tests, three tumor models (n=3) were performed by inoculating 5×10^5 cells in male mice of BALB/c lineage, one dorsal subcutaneous nodule and two methods of obtaining pulmonary metastasis, by intraperitoneal inoculation and by venous inoculation through caudal lateral vein. 200 μL of IR-780 at 0.45 mg kg^{-1} intraperitoneally was used in last 24 hours of experiment to obtain fluorescence images, satisfactory results were obtained in metastasis model, by venous inoculation, and the use of marker in two other models was unfeasible. To determine activity of extracts *in vivo*, animals were inoculated with B16-F10 cells, through lateral caudal vein, on first day of experiment. On 15th day, they were distributed into five groups (n=6), where control group received no treatment, Olive group received treatment with 100 μL of pure extra virgin olive oil, DOX group was treated with 200 μL of doxorubicin 5 mg/kg, DEGPE was treated with pulp extract and DEGPE group was treated with peel extract, both diluted in extra virgin olive oil at 92.5 mg/kg/100 μL intraperitoneally, all groups received a single dose of treatment. In last 24h of study, on 29th day, groups also received IR-780. Animals were weighed on different days, without showing a statistically significant difference between groups. Feed consumption was evaluated in last three days of experiment, where a significant difference was found only between Control group and Olive group. Regarding metastasis, statistical difference (p<0.05) was between groups treated with extracts and Control group, indicating a great reduction in lung metastasis, especially in DEGPE group, confirmed by macroscopic and histological

analyzes of lungs. Images obtained in ex vivo analysis indicated that fluorescence intensity of IR-780 was inversely proportional to lung involvement, suggesting the feasibility of using this marker for this type of analysis. Therefore, it is concluded that *C. adamantium* extracts limited tumor growth and metastasis implantation and that IR-780 can be used to determine cell viability and tumor lung involvement.

Descriptors: B16-F10, Tumoral marker, Lung metastasis, In-Vivo Xtreme, Imaging system

LISTA DE ILUSTRAÇÃO

Figura 01. Regra ABCDE para alerta de câncer de pele melanoma. _____	19
Figura 02. Foto dos frutos (A) e da inflorescência (B) da <i>C. adamantium</i> . _____	23
Figura 03. Fórmula molecular do IR-780. _____	24
Figura 04. Espectro de luz. _____	24
Figura 05. Imagem da Polpa (A) e da Casca (B) após processo de secagem em estufa de circulação. _____	26
Figura 06. Equipamento <i>In-Vivo Xtreme</i> , Bruker. _____	28
Figura 07. Esquema demonstrativo da distribuição das concentrações celulares (linhas) e das concentrações do IR-780 (colunas) para determinação da absorção do IR-780. ____	31
Figura 08. Representação da atividade antiproliferativa dos extratos DEGPU e DEGPE frente as linhagens K562 (leucemia), HT-29 (adenocarcinoma colorretal), NIH-3T3 (fibroblasto), B16-F10 (melanoma), J774 (macrofago), CACO-2 (adenocarcinoma colorretal) e U-251 (glioblastoma). _____	36
Figura 09. Representação da atividade antiproliferativa nas linhagens K562 (leucemia) e U-251 (glioblastoma) tratadas com doxorubicina (Doxo – quadrado preto), DEGPU (círculo vermelho) e DEGPE (triângulo verde). _____	37
Figura 10. Viabilidade celular (%) com desvio padrão da linhagem B16-F10 tratada com DEGPU e DEGPE (0,25; 2,5; 25 e 250 µg/mL). _____	37
Figura 11. Campo claro (1) e microscopia de fluorescência (2) das concentrações celulares de 2x10 ⁵ células/placa B16-F10 com 20µM IR-780 (a); 4x10 ⁵ células/placa B16-F10 com 40µM IR-780 (b); e 4x10 ⁵ células/placa B16-F10 com 80µM IR-780 (c). Setas vermelhas indicando excesso de cristais do corante nas maiores concentrações de IR-780. _____	38
Figura 12. Imagem demonstrando a fluorescência emitida pela adição do IR-780 nas concentrações de 20 (1); 40 (2); e 80µM (3) nas diferentes concentrações celulares 1x10 ⁵ (a); 2x10 ⁵ (b); e 4x10 ⁵ células/placa B16-F10 (c); Destaque em vermelho da maior concentração do IR-780 demonstrando menores áreas de fluorescência. _____	39
Figura 13. Célula da linhagem B16-F10 com seus núcleos corados com Hoechst 33342 (a); citosol corado com IR-780 (b) e as imagens sobrepostas demonstrando a diferença entre núcleo e citosol (c). _____	40

- Figura 14.** Animal controle negativo apresentando fluorescência na região abdominal caudal e sua escala de intensidade de fluorescência. _____ 40
- Figura 15.** Animais apresentando nódulo subcutâneo dorsal visível (a); imagens dos animais no equipamento *In-Vivo Xtreme* com suas respectivas escalas de intensidade de fluorescência (b). As imagens apresentam maior intensidade de fluorescência na região abdominal caudal e pouca ou nenhuma fluorescência na região do nódulo subcutâneo. _____ 41
- Figura 16.** Imagem de fluorescência dos órgãos dos três animais com suas respectivas escalas de intensidade. Fígado (1), pulmões (2), rins (3) testículos (4) e nódulo tumoral (T), na mesma sequência para as três imagens. _____ 42
- Figura 17.** Animais apresentando aumento de volume abdominal, compatível com ascite, após a inoculação intraperitoneal de células B16-F10. _____ 42
- Figura 18.** Todos exemplares do grupo apresentando aumento de volume abdominal, compatível com ascite. Animal apresentando diversas áreas de fluorescência (a) e animais apresentando maior volume abdominal com prejuízo às imagens de fluorescência (b) e (c). _____ 43
- Figura 19.** Exame necroscópico abdominal. Evidenciado pelas setas amarelas, vários nódulos tumorais disseminados pelo mesentério; a seta azul demonstra o líquido ascítico. _____ 43
- Figura 20.** Imagens de fluorescência dos órgãos dos três animais com suas respectivas escalas de intensidade; Rins (1), fígado (2), pulmões (3) e testículos (4), na mesma sequência para as três imagens. Animal com menor quantidade de líquido ascítico apresentando maior fluorescência (a); animal com maior presença de ascite sem marcação de fluorescência (b); e animal com ascite moderada apresentando pouca intensidade de fluorescência (c). _____ 44
- Figura 21.** Imagem dos animais com sua respectiva escala de intensidade de fluorescência. Demonstrando regiões de fluorescência na região abdominal caudal e alguns pontos na região cranial. _____ 44
- Figura 22.** Imagem de fluorescência dos órgãos dos três animais com suas respectivas escalas de intensidade. Pulmões (1), rins (2), fígado (3) e testículos (4), na mesma sequência para as três imagens. Pulmão mais comprometido sem fluorescência (a); pulmão com comprometimento acentuado com leve fluorescência (b); e pulmão menos comprometido com maior fluorescência (c). _____ 45

Figura 23. Gráfico apresentando a média dos pesos dos animais, com desvio padrão, de cada grupo, nos dias 1, 15 e 30 do experimento._____	46
Figura 24. Gráfico do consumo médio de ração por animal nos últimos três dias do experimento, com desvio padrão, de cada grupo. * $p < 0.05$._____	46
Figura 25. Imagem representativa de fluorescência dos pulmões e sua respectiva escala de intensidade. Apresentando os grupos: Controle (a), Azeite (b), Doxo (c), DEGPU (d) e DEGPE (e)._____	46
Figura 26. Imagens macroscópicas dos pulmões apresentando inúmeros nódulos metastáticos na superfície pleural. Apresentando os grupos: Controle (a), Azeite (b), Doxo (c), DEGPU (d) e DEGPE (e)._____	47
Figura 27. Média dos números de nódulos da superfície pleural dos pulmões com desvio padrão de todos grupos. * $p < 0.05$._____	47
Figura 28. Imagens histológicas do parênquima pulmonar. Áreas enegrecidas demonstrando presença de nódulos metastáticos malignos. Superfície pleural apresentando nódulos nos grupos Controle (a), Azeite (b) e Doxo (c). Grupos DEGPU (d) e DEGPE (e) com poucos nódulos no parênquima._____	48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Tipos tumorais e seus marcadores. _____ 20

Tabela 2. Atividade antiproliferativa dos extratos da polpa (DEGPU) e da casca (DEGPE) dos frutos da guavira frente a seis linhagens celulares. _____ 35

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATCC®	<i>American Type Culture Collection</i>
B16-F10	Linhagem celular de melanoma murino
CACO-2	Linhagem celular de adenocarcinoma de cólon humano
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
DEGPE	Do inglês <i>dichloromethane extract of guavira peel</i> (extrato da casca)
DEGPU	Do inglês <i>dichloromethane extract of guavira pulp</i> (extrato da polpa)
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
GI ₅₀	<i>Growth inhibition 50%</i> (inibição de 50% do crescimento celular)
HE	Hematoxilina e eosina
HT-29	Linhagem celular de adenocarcinoma colorretal humano
IP	Intraperitoneal
IS	Índice de seletividade
IV	Intravenoso
J774	Linhagem celular de macrófago murino
K562	Linhagem celular de leucemia mieloide crônica
MTT	[3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina]
NIH-3T3	Linhagem celular de fibroblasto murino
PBS	Tampão fosfato-salino
PC-3	Linhagem celular de adenocarcinoma de próstata
pH	Potencial hidrogeniônico
PROPP	Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
p/v	Peso/volume
ROS	<i>Reactive oxygen species</i> (espécies reativas de oxigênio)
RPMI-1640	<i>Roswell Park Memorial Institute Medium</i>
SC	Subcutâneo
SRB	Sulforrodamina B
TGI	<i>Total growth inhibition</i> (inibição total do crescimento celular)

UI Unidade Internacional
U-251 Linhagem celular de glioblastoma humano

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
2. REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1 Câncer	18
2.2 Melanoma	19
2.3 Diagnóstico	20
2.4 Tratamento	21
2.4.1 Quimioterápicos	21
2.5 <i>Campomanesia adamantium</i>	22
2.6 Biomarcadores tumorais de fluorescência – IR-780	24
3. OBJETIVOS	25
3.1 Objetivo geral	25
3.2 Objetivos específicos	25
4. METODOLOGIA	26
4.1 Aquisição dos frutos da <i>Campomanesia adamantium</i>	26
4.2 Preparo dos extratos do fruto da <i>Campomanesia adamantium</i>	26
4.3 Manutenção das linhagens celulares	26
4.4 IR-780 Iodide, Sigma-Aldrich	27
4.5 Análises de fluorescência	27
4.6 Testes <i>in vitro</i>	28
4.6.1 Determinação da atividade antiproliferativa dos extratos - <i>in vitro</i>	28
4.6.2 Determinação da GI ₅₀ e da TGI	30
4.6.3 Cálculo do IS	30
4.6.4 Teste de absorção celular do IR-780	30

4.6.5 Acúmulo do IR-780 na linhagem B16-F10	31
4.7 Testes <i>in vivo</i>	31
4.7.1 Manejo animal	31
4.7.2 Modelos de tumor	32
4.7.3 Determinação da atividade antiproliferativa dos extratos em metástase pulmonar	32
4.7.4 Análise macroscópica dos pulmões	33
4.7.5 Análise histológica	33
4.8 Análise estatística	34
5. RESULTADOS	35
5.1 Determinação da atividade antiproliferativa dos extratos <i>in vitro</i> – GI ₅₀ , TGI e índice de seletividade	35
5.2 Teste de absorção celular do IR-780	37
5.3 Acúmulo do IR-780 na linhagem B16-F10	39
5.4 Modelos de tumor <i>in vivo</i>	40
5.4.1 Melanoma subcutâneo	41
5.4.2 Metástase pulmonar – inoculação intraperitoneal	42
5.4.3 Metástase pulmonar – inoculação intravenosa	44
5.5 Atividade antiproliferativa dos extratos em modelo de metástase pulmonar	45
5.6 Análise macroscópica dos pulmões	47
5.7 Avaliação histológica	47
6. DISCUSSÃO	49
7. CONCLUSÃO	51
8. REFERÊNCIAS	52
APÊNDICE A – Artigo submetido na revista Journal of Medicinal Food	60
APÊNDICE B – Artigo publicado pela revista Molecules	61

1. INTRODUÇÃO

Câncer é o nome dado a um conjunto de doenças de caráter maligno, caracterizado por crescimento desordenado, rápido e agressivo das células, podendo invadir tecidos localizados ou órgãos distantes. Por esse motivo, é necessário um diagnóstico precoce, tratamento específico e individualizado, podendo ser combinado mais de uma modalidade de tratamento, como cirurgia, radioterapia, quimioterapia e imunoterapia (INCA, 2022a).

Segundo a Organização Pan-Americana de Saúde/Organização Mundial de Saúde (OPAS/OMS, 2020), em 2018 foram relatados 9,6 milhões de mortes pelo câncer em todo mundo, sendo que 70% das mortes ocorrem em países de média e baixa renda, sendo assim, é uma doença considerada geradora de impacto econômico em constante crescimento.

No Brasil, estima-se que entre 2023 e 2025 serão aproximadamente 704 mil novos casos de câncer, sendo que 70% desses casos estarão concentrados nas regiões Sul e Sudeste (INCA, 2022b). Só em 2023 o câncer de mama e de próstata somados gerarão mais de 145 mil novos casos entre mulheres e homens, respectivamente, e o câncer de pele melanoma terá quase 9 mil novos casos (INCA, 2022c). Em Mato Grosso do Sul, a incidência do melanoma varia de 2,96 a 11,31 casos para cada cem mil habitantes do gênero masculino e de 1,56 a 2,16 casos por cem mil habitantes do gênero feminino (INCA, 2022d).

O câncer de pele melanoma é considerado um dos tipos mais graves da doença devido à alta possibilidade de gerar metástase. Se detectado em sua fase inicial tem prognóstico favorável, porém quando em metástase, a sobrevivência do paciente em cinco anos é de apenas 31,9% (INCA, 2022e; NIH, 2022).

O Brasil possui vasta biodiversidade disponível para o estudo de substâncias bioativas para o tratamento de várias doenças, dentre elas, o câncer. O Cerrado é o segundo maior bioma da América do Sul com aproximadamente 2 milhões de km². (MMA, 2022; SIMÕES; SCHENKEL, 2002).

A *Campomanesia adamantium* (Cambess.) O. Berg, conhecida como guavira, é um fruto encontrado em abundância na região do Cerrado brasileiro e é amplamente utilizada, popularmente, como remédio e pela indústria alimentícia (CARNEVALI *et al.*, 2008). A guavira é considerada a fruta símbolo do Estado de Mato Grosso do Sul, pela Lei Estadual nº 5.082 de 08 de novembro de 2017 (MS, 2017), por estar presente na cultura da população sul-mato-grossense, como música, arte e alimento.

Lima e Silva *et al.* (2018) descrevem grande potencial antiproliferativo *in vitro* do extrato do fruto da guavira e de cinco isolados ativos com ação antiproliferativa sobre as células cancerígenas, podendo ser considerado um potencial agente anticâncer para o tratamento da doença.

Porém estudos *in vivo* são necessários para a comprovação da eficácia do produto, sendo de grande importância a análise completa do seu mecanismo de ação sobre a doença e seus possíveis efeitos no organismo.

Devido à guavira ser considerada uma fonte de substâncias biologicamente ativas e possuir enorme potencial no tratamento do câncer, esta pesquisa avaliou o efeito da *Campomanesia adamantium in vivo*, em metástase pulmonar de melanoma. Portanto, o presente trabalho surge como um mecanismo que relaciona o estudo da biodiversidade do Cerrado, com o potencial biológico e sua aplicação na saúde, dando sequência ao estudo para desenvolvimento da região em pesquisas sobre o câncer.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Câncer

As neoplasias são classificadas em benignas, quando uma massa tumoral se desenvolve mais lentamente de forma organizada, com bordas definidas e sem o comprometimento de tecidos adjacentes, e em malignas, conhecidas como câncer, que em seu primeiro estágio estão localizadas somente no tecido de origem da mutação (carcinoma *in situ*), porém possuem crescimento rápido, sem definição de bordas, com capacidade de gerar neovascularização e causar metástase, ou seja, migrar do seu tecido de origem até outros tecidos pelo corpo rapidamente se tornando um carcinoma invasivo (INCA, 2011).

Câncer é o nome dado a um conjunto de alterações celulares que determinam a malignidade da doença. Essas alterações (mutações) ocorrem por estímulos, fisiológicos ou patológicos em células normais, que provocam o desenvolvimento desordenado em ritmo acelerado, desencadeando a proliferação ativa de células modificadas, que por fim dão origem a um tecido tumoral (neoplasia), persistente mesmo quando cessado o estímulo (INCA, 2022a).

A nomenclatura das neoplasias trás referência a origem e a classificação entre benigno ou maligno. Os tumores benignos recebem o prefixo relacionado ao tecido de origem e o sufixo “oma”, como exemplo temos o lipoma, um tumor benigno do tecido gorduroso ou adiposo (lipo do grego *lípous* que quer dizer gordura). Já a nomenclatura de neoplasias malignas considera a origem embrionária do tecido podendo receber também a localização. Carcinomas possuem origem no epitélio de revestimento externo ou interno, como exemplo temos carcinoma de pele; adenocarcinomas são de origem glandular, como o adenocarcinoma mamário; quando a origem é no tecido conjuntivo recebem o prefixo do tecido de origem juntamente com o sufixo “sarcoma”, como por exemplo o osteossarcoma de fêmur, que é o câncer do osso no fêmur. Porém, nem todas nomenclaturas seguem esse padrão, como o exemplo do melanoma, um tipo agressivo de câncer de pele (INCA, 2011).

2.2 Melanoma

O melanoma corresponde a apenas 3% das neoplasias malignas da pele, porém é responsável pela maioria dos óbitos. Sua prevalência é predominante entre homens, adultos (+65) e brancos. A taxa de risco gira em torno de 2,6% em brancos, 0,6% em hispânicos e 0,1% em negros. Apesar dessa estatística, a prevalência de melanoma em jovens com menos de 30 anos é maior entre as mulheres (ONCOGUIA, 2020).

De acordo com a Sociedade Brasileira de Cirurgia Oncológica (2022), o câncer de pele é considerado o mais frequente no Brasil, totalizando 27% dos casos de câncer. Pode acometer pele e mucosas e, por se tratar de células produtoras de melanina, se apresentam em forma de pintas ou manchas. Por esse motivo o autoexame é uma forma de identificar os primeiros sinais dessa doença, utilizando a regra ABCDE (Figura 01), onde são sinais preocupantes nas pintas ou manchas: Assimetria (formato irregular); Borda (quando não for lisa), Cores (quando a pinta/mancha possuir mais de uma cor), Diâmetro (quando maior do que 0,6 cm) e Evolução (se houver crescimento progressivo do diâmetro ou elevação). As lesões também podem apresentar descamação ou coceira.



Figura 01. Regra ABCDE para alerta de câncer de pele melanoma. Fonte: INCA Rio Preto, disponível em <<<https://incariopreto.com.br/cancer-de-pele-melanoma/>>>

Possui um prognóstico favorável quando diagnosticado em sua fase inicial, porém é uma forma agressiva da doença, uma vez que pode facilmente se tornar invasivo, ou seja, originar metástase em outros tecidos (INCA, 2022e).

As células inicialmente acometidas são os melanócitos, responsáveis pela produção e armazenamento da melanina, uma proteína pigmentante que confere a cor da pele de cada indivíduo com função fotoprotetora da radiação solar ultravioleta. Os achados histológicos do tecido epitelial com melanoma podem apresentar melanócitos agrupados em “ninhos”, em cordão, em redemoinhos ou isolados na região basal da epiderme ou nas camadas mais

profundas, com presença de grande quantidade ou total ausência de melanina (melanóticos ou amelanóticos, respectivamente), indiferenciados (anaplásicos) com modificação do tamanho e formato (pleomorfismo) (VELASQUEZ *et al*, 2015).

2.3 Diagnóstico

Nem sempre os tumores estão visíveis ou são perceptíveis em exame de anamnese, sendo assim, exames complementares são necessários para se chegar ao diagnóstico correto e ao prognóstico e extensão da doença. Os exames de marcadores tumorais estão sendo utilizados complementarmente ao diagnóstico ou na prevenção do câncer, uma vez que esses marcadores (Tabela 1) podem determinar a hereditariedade genética ou a presença de proteínas específicas da doença e com isso fechar um diagnóstico precoce. Um exemplo desse tipo de marcador é o PSA (Proteína Específica Prostática), uma glicoproteína dosada no sangue para monitoração do câncer de próstata. Esses marcadores são encontrados no sangue, urina ou tecido (EISENBERG; KOIFMAN, 2001).

Tabela 1. Tipos tumorais e seus marcadores

Tipo tumoral	Marcadores
Mama	CAI5-3, CEA, TPA, MCA, CA27-29, CA125, CA549, SP2, CAT-D, EMCA, ELSA, MIB-1, HER-2/neu
Próstata	PSA, FAP, P53, bcl-2, c-erbB-2
Pulmão	Enolase neuro-específica, CA 15-3, CA 19-9, K-ras, cromogranina, Leu-7, CEA, creatinoquinase, CYFRA21-1
Colo uterino	SCC, CEA, HPV, CYFRA 21-1
Tireoide	Calcitonina, HTG
Fígado	aFP

Fonte: modificada de GADELHA, 1998.

Exames de imagem também são utilizados no diagnóstico de tumores. O ultrassom é um equipamento que utiliza ondas sonoras, não invasivo e que pode auxiliar na identificação de massas tumorais em tecidos moles, porém seu uso é limitado a algumas partes do corpo e não diferencia massas benignas de malignas. O eco Doppler colorido também pode auxiliar na detecção de neovascularização em massas tumorais ou se os vasos sanguíneos foram acometidos (BORGES *et al*, 2004). A ressonância magnética utiliza ondas eletromagnéticas para geração das imagens e pode ser utilizado com contraste para melhor delimitação do tumor, portanto é um exame complementar à cirurgia de remoção tumoral (ALVARES; MICHELL, 2003).

A radiografia é um exame que pode diagnosticar tumores malignos ósseos e que utiliza radiação X, assim como a tomografia computadorizada. A cintilografia é uma técnica que utiliza radiofármaco com afinidade pelo tecido ósseo acometido por tumores ou inflamação, geralmente é utilizado para detecção de metástase óssea ou determinar o grau de comprometimento ósseo no tumor primário (GUIMARÃES; COSTA; SILVA, 2023).

O exame conhecido por PET scan ou PET/CT é uma tomografia computadorizada que utiliza emissão de pósitrons, ou seja, um elemento radioativo instável que libera radiação quando estabilizado. Essa radiação é captada pelo equipamento que indica a região com maior atividade radioativa. Geralmente esse elemento radioativo se liga com glicose ou oxigênio presente nos tecidos, como os tumores possuem desenvolvimento rápido, utilizam mais glicose e oxigênio que os tecidos normais (AKIYOSHI, *et al*, 2008).

Diante dos inúmeros exames complementares ao diagnóstico do câncer, a biópsia é uma forma segura de diagnosticar e estadiar a evolução da doença, mesmo em sua fase inicial, porém pode ser considerado invasivo a depender da localização tumoral. O exame histopatológico pode ser realizado em tecidos, sólido ou líquido, onde será analisada a morfologia celular e alterações locais (INCA, 2021).

2.4 Tratamento

A partir das informações adquiridas com os exames complementares ao diagnóstico, o melhor tratamento pode, então, ser determinado. Dentre os tratamentos mais utilizados estão a excisão cirúrgica completa do tumor, o uso de radioterapia e a quimioterapia. Esses tratamentos podem ser utilizados isoladamente ou em conjunto, para melhores resultados (INCA, 2022f).

2.4.1 Quimioterápicos

A quimioterapia consiste no uso de fármacos que possuem atividade tóxica sobre células jovens que se desenvolvem rapidamente ou de forma desordenada. Esses fármacos podem ser administrados por via oral, intravenosa, intramuscular e até mesmo tópica, sendo assim seu efeito é sistêmico e não local (INCA, 2023).

Dessa forma, algumas drogas dessa classe farmacológica também atingem células normais que também apresentam desenvolvimento rápido, como é o caso das unhas, cabelos, células de defesa, células das mucosas e células gonadais. Por esse motivo, os efeitos colaterais apresentados com o uso de quimioterápicos são variados, podendo apresentar-se com perda de cabelo, queda na imunidade e assim predisposição a infecções, fadiga, anemia, náuseas, vômitos, infertilidade, entre outros (ONCOGUIA, 2021). Por esse motivo, a classe dos

antimicrobianos devem apresentar como característica desejável alta seletividade ao seu alvo, com o menor dano ao paciente.

A doxorubicina é um quimioterápico amplamente utilizado para o tratamento do câncer, aproximadamente 30% dos casos (MURILLO; SUTACHAN; ALBARRACÍN, 2023) desde meados de 1950 (ARCAMONE, 1981). Pode ser utilizada isoladamente ou em terapia associativa no tratamento de neoplasias malignas de tumores sólidos, leucemias e linfomas (MOURA *et al*, 2017), porém seu uso vem sendo associado à cardiotoxicidade desde o início dos anos 70, juntamente com outros efeitos colaterais como alopecia, náusea, vômito, estomatites, leucopenia, trombocitopenia e anemias, dentre outros (BLUM; CARTER, 1974).

A necessidade de aprofundar os estudos referentes a princípios ativos que exercem ação antineoplásica é de grande interesse para a saúde pública e para o desenvolvimento econômico de uma região. Sabe-se que o Brasil é visado pela vasta disponibilidade de recursos naturais e florestas com inúmeras plantas com potencial medicinal, distribuídos em aproximadamente nove biomas. O Cerrado brasileiro é o bioma predominante na região Centro-Oeste e possui mais de 12 mil variedades de espécies de plantas já catalogadas. Dentre essas espécies, a *Campomanesia adamantium* vem sendo amplamente estudada, devido ao conhecimento popular e ao descobrimento de inúmeras atividades biológicas (BRASIL, 2022; FERREIRA *et al.*, 1998).

2.5 *Campomanesia adamantium*

A *Campomanesia adamantium* (Cambess.) O. Berg., classificada dentro da família Myrtaceae, está amplamente difundida pela região do Cerrado brasileiro. Seus frutos popularmente conhecidos como guavira, gabiroba, guavirova-do-cerrado, dentre outros, são globosos, com odor cítrico e coloração variando do verde escuro ao amarelado quando maduros (Figura 02.A). A planta arbustiva, de flores brancas (Figura 02.B) e folhas aromáticas, floresce nos meses de setembro a outubro e a maturação dos frutos ocorre nos meses chuvosos de novembro a janeiro (KUHLMANN, 2018; POTT; POTT, 1994).



Figura 02. Foto dos frutos (A) e da inflorescência (B) da *C. adamantium*. Foto da flor – Fonte: Maurício Mercadante, disponível em <<<https://eol.org/pt-BR/pages/5455610>>>

Os frutos da *C. adamantium* são consumidos *in natura* ou como doces, sorvetes e refrescos, podendo ser utilizado também como flavorizantes em destilados alcoólicos e pela indústria alimentícia. Popularmente a guavira também é amplamente utilizada de forma medicinal e, devido a presença marcante na cultura da população de Mato Grosso do Sul, até mesmo na música, foi considerada como a fruta símbolo do estado por uma lei estadual desde 2017 (MS, 2017; CARNEVALI *et al.*, 2008; VALLILO *et al.*, 2006).

Devido a presença de compostos fenólicos, chalconas e flavonoides (LIMA E SILVA, 2018), inúmeros estudos atribuíram atividades biológicas às folhas e frutos dessa planta, como anti-inflamatória (SOUZA *et al.*, 2017; FERREIRA *et al.*, 2013), antimutagênica (MARTELLO *et al.*, 2016), antioxidante (FERNANDES *et al.*, 2015; PASCOAL *et al.*, 2011; COUTINHO *et al.*, 2008; RAMOS; CARDOSO; YAMAMOTO, 2007), antimicrobiana (CARDOSO *et al.*, 2010; PAVAN *et al.*, 2009), antiproliferativa (PASCOAL *et al.*, 2014) e antidiarreica (LESCANO *et al.*, 2016).

Lima e Silva (2018) demonstrou que dois extratos em diclorometano do fruto da *C. adamantium* apresentaram atividade antiproliferativa e seletividade a algumas linhagens neoplásicas em análises *in vitro* apresentadas promissora. Com isso, estudos *in vivo* são necessários para demonstrar a eficácia dos extratos e assim, continuar a pesquisa de uma possível droga antineoplásica a ser disponibilizada como agente quimioterápico no tratamento do câncer.

2.6 Biomarcadores tumorais de fluorescência – IR-780

Assim como dito anteriormente sobre os exames de imagem complementares ao diagnóstico, na pesquisa pré-clínica também são utilizadas várias formas de avaliação tumoral. O uso de biomarcadores tumorais de fluorescência, como o IR-780, vêm sendo utilizado nas pesquisas para o acompanhamento da evolução e como terapia combinada no tratamento do câncer (SHEN *et al*, 2022; WANG *et al*, 2021; YANG *et al*, 2021).

Esse marcador é um corante cianina iodeto (Figura 03) com pico de absorção em 780nm, com excitação em 760 e emissão em 830nm, próximo ao infravermelho (Figura 04). Suas características indicam grande fotoestabilidade, clearance de 24h, baixa solubilidade em água e afinidade por tecido tumoral, que pode ser associada aos polipeptídeos transportadores de ânions orgânicos, que estão super expressos em células cancerígenas. Além disso, esse marcador pode produzir espécies reativas de oxigênio (ROS) e possui propriedades fototérmicas quando estimulado, mostrando ser um marcador versátil para utilização no tratamento de tumores (YANG *et al*, 2021; ALVES *et al*, 2018).

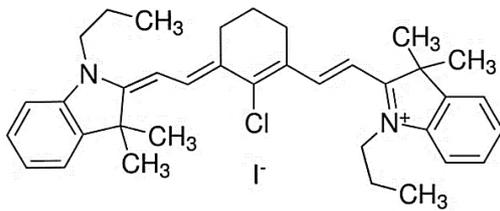


Figura 03. Fórmula molecular do IR-780.
Fonte: Sigma-Aldrich.

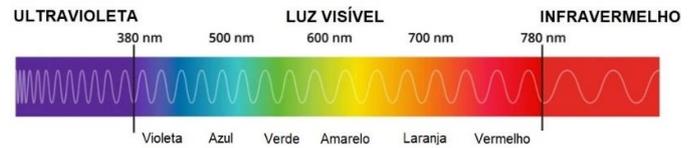


Figura 04. Espectro de luz.
Fonte: modificado de Elena Pimukova, Stock Adobe.

Dessa forma, o presente estudo teve a finalidade de investigar a atividade antitumoral dos extratos da *Campomanesia adamantium* juntamente com ferramentas tecnológicas para pesquisas pré-clínicas, com o intuito de aprofundar o conhecimento da relação desse marcador tumoral, IR-780, frente a linhagem celular de melanoma murino B16-F10 em modelo de metástase e, com isso, ajudar no desenvolvimento da saúde na região Centro-Oeste.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito da *Campomanesia adamantium* (Cambess.) O. Berg (guavira) em modelo de melanoma e a aplicação do marcador tumoral IR-780 em análises *in vitro* e *in vivo*.

3.2 Objetivos específicos

Obter os extratos, em solvente diclorometano, da polpa (sem semente) e da casca do fruto da guavira;

Determinar atividade antiproliferativa *in vitro* em diferentes linhagens celulares;

Determinar os índices GI₅₀ (inibição de 50% do crescimento celular), TGI (inibição total do crescimento celular) e IS (índice de seletividade);

Determinar a absorção e local de acúmulo do marcador de fluorescência IR-780 nas células B16-F10;

Padronizar o uso do marcador frente a linhagem B16-F10 *in vitro* e *in vivo*;

Desenvolver modelo de metástase pulmonar de melanoma em animais utilizando a linhagem B16-F10;

Determinar a ação antiproliferativa *in vivo* em modelo de metástase pulmonar por meio de imagem radiográfica de fluorescência e análise histológica dos órgãos.

4. METODOLOGIA

4.1 Aquisição dos frutos da *Campomanesia adamantium*

A atividade de acesso ao patrimônio genético/CTA foi cadastrada no SisGen nº A26D547. Os frutos da guavira foram adquiridos nos guavirais do Distrito de Taunay, Município de Aquidauana, Mato Grosso do Sul (20°15'12.4"S 56°04'04.3"O). A colheita dos frutos foi realizada no mês de novembro de 2020. Os frutos foram armazenados em temperatura de -8°C até o momento do processamento.

4.2 Preparo dos extratos do fruto da *Campomanesia adamantium*

Para obtenção das amostras-teste, os frutos foram previamente lavados e separados em casaca e polpa sem semente. Tanto a polpa quanto a casaca foram secas em estufa de circulação de ar a uma temperatura de 37°C até a desidratação, em torno de 6 dias (Figura 05). A polpa e as cascas foram maceradas à exaustão, separadamente, em solvente diclorometano durante 15 dias à temperatura ambiente ao abrigo de luz, sendo que o solvente foi trocado a cada 5 dias. Após esse período, os dois extratos foram filtrados separadamente e concentrados em rotaevaporador para eliminação do solvente. As amostras, denominadas DEGPA (*dichloromethane extract of guavira Pulp* – extrato da polpa) e DEGPE (*dichloromethane extract of guavira peel* – extrato da casca), foram acondicionadas em frasco âmbar em geladeira a uma temperatura média de 4°C, até o momento do uso.



Figura 05. Imagem da Polpa (A) e da Casca (B) após processo de secagem em estufa de circulação.

4.3 Manutenção das linhagens celulares

As linhagens escolhidas para a pesquisa foram: leucemia mieloide crônica (K562 ATCC® CCL-243™), adenocarcinoma colorretal humano (HT-29 ATCC® HTB-38™, CACO-2), fibroblasto murino (NIH-3T3 ATCC® CRL-1658™), macrófago murino (J774 ATCC® TIB-67™), glioblastoma humano (U-251) e melanoma murino (B16-F10). Esse experimento foi

realizado no Laboratório de Cultura Celular da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Alimentos e Nutrição, FACFAN-UFMS.

As células NIH-3T3, B16-F10 e J774 foram cultivadas em meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) Sigma-Aldrich (MO, USA) e as demais linhagens em RPMI-1640 (Roswell Park Memorial Institute Medium) Sigma-Aldrich (MO, USA) ambos contendo 10% de soro fetal bovino (Gibco Catálogo# 10082147) Thermo Fisher (MA, USA), 1% de estreptomicina/penicilina (100µg/mL e 100UI/mL, respectivamente) Sigma-Aldrich (MO, USA), mantida em incubadora a 37°C e atmosfera com 5% de CO₂, mantidas por três passagens antes da utilização nos experimentos.

4.4 IR-780 Iodide, Sigma-Aldrich

Para solução estoque do IR-780 iodide, diluiu-se 0,01g em 1mL de DMSO, armazenado em temperatura média de 4°C ao abrigo de luz direta.

4.5 Análises de fluorescência

O equipamento utilizado para análises de fluorescência *in vitro* das culturas celulares foi o microscópio de fluorescência Leica DM 2000 Led com o software LAS V4.12 e lente objetiva de 40x.

Para as análises de fluorescência das culturas celulares, marcação tumoral *in vivo* e *ex vivo* dos órgãos foi utilizado o *In-Vivo Xtreme BI 4MP* Bruker (MA, USA) (Figura 06), com primeiro plano (foreground) na modalidade fluorescência, fonte de iluminação múltiplos comprimentos de onda, com filtros de excitação em 760 e emissão em 830, controles da câmera com tipo de exposição padrão, modo de alta velocidade, tempo de exposição 2.0 segundos, Bin 2x2 pixels, FOV 19cm, fStop 1.1, focal plane 0mm e histograma no modelo *rainbow*. O segundo plano (background) foi na modalidade raio-x, com kVp 45, tempo de exposição de 0.1 segundo, Bin 1x1 pixel, fStop 2.8, focal plane 0mm e histograma em escala de cinza. Para obtenção das imagens, os animais devem ser submetidos a leve contenção por plano anestésico inalatório com isoflurano.



Figura 06. Equipamento *In-Vivo Xtreme*, Bruker.

4.6 Testes *in vitro*

4.6.1 Determinação da atividade antiproliferativa dos extratos - *in vitro*

As linhagens celulares foram tripsinizada, quando necessário (por três passagens), e centrifugadas a 1000 rpm durante 8 minutos. Os péletes formados foram ressuspensos em meio completo e a contagem celular foi realizada em hemocitômetro, utilizando o corante seletivo de células mortas, Trypan Blue 0,4 %, Gibco, Thermo Fisher (MA, USA). A contagem celular foi realizada nos quatro quadrantes da câmara e a média foi estabelecida para o cálculo:

$$X = \bar{X} \cdot 5 \times 10^4$$

Onde X é a quantidade de células/mL; \bar{X} é a média dos quadrantes; 5 é o fator de diluição do Trypan Blue; e 10^4 é a correção do volume para um mL. A diluição das células foi ajustada com meio completo até concentração final desejada.

Para o ensaio de atividade antiproliferativa, foi feita uma placa T0, juntamente com a placa amostra de 96 poços para cada linhagem e incubadas a 37 °C, com 5 % de CO₂ por 24 h, (100 µL/poço nas concentrações de 50.000 células/mL para K562, HT-29, J774 e CACO-2, 35.000 células/mL para NIH-3T3, 70.000 células/mL para B16-F10 e 75.000 células/mL para U-251). Após esse período, a T0 foi fixada e a placa amostra foi exposta a diferentes concentrações de cada amostra-teste, DEGPE e DEGPE (0,25; 2,5; 25 e 250 µg/mL), previamente diluídas em DMSO (0,1 %), e novamente incubadas, por 48 h (MONKS *et al.*, 1991). A doxorrubicina foi usada como controle positivo nas concentrações de 0,025; 0,25; 2,5; 25 µg/mL. Dois métodos foram utilizados para determinação da atividade antiproliferativa:

Método MTT

Somente para a linhagem K562 foi utilizado o ensaio de MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina], que é baseado na redução do MTT em formazan pelas enzimas desidrogenases mitocondriais, com isso, pode-se dizer que sua redução é diretamente proporcional à atividade mitocondrial e assim, à viabilidade celular (MAGALHÃES; THÁ.; LEME, 2018).

Após às 48 h de incubação com as amostras-teste, foi adicionado 20 µL/poço de MTT na concentração de 2,5 mg/mL solubilizado em PBS pH 7,4 e a placa foi novamente incubada durante 4 horas a 37 °C, 5 % de CO₂ e 100 % de umidade relativa. Após, centrifugou-se a placa a 1500 rpm durante 10 minutos e, cuidadosamente, o sobrenadante foi descartado por aspiração. Os cristais de formazan foram solubilizados pela adição de 100 µL/poço de DMSO.

Método SRB

As demais linhagens foram submetidas ao método SRB (sulforrodamina B), que é um corante aniônico de coloração rosa brilhante com capacidade de ligar-se às terminações básicas de aminoácidos de células, sendo assim, a proliferação celular pode ser determinada por colorimetria.

Após a incubação com as amostras-teste, o sobrenadante das células foi descartado e utilizou-se 100 µL/poço da solução de ácido tricloroacético (20 %) incubada durante 30 minutos em temperatura média de 4 °C para fixação das células. Após, as células foram lavadas com água corrente e secas em temperatura ambiente. Após total secagem da placa, foi adicionado 50 µL/poço da SRB (Sigma, USA), diluída a 0,1 % (p/v) em ácido acético a 1 %, durante um período de 30 minutos a temperatura ambiente. As placas foram lavadas cinco vezes com ácido acético a 1 % e secas novamente em temperatura ambiente. O corante fixado foi solubilizado com solução de Tris base (10 mM, pH 10,5) sob agitação constante durante 20 minutos (SKEHAN *et al.*, 1990).

Os experimentos foram realizados em triplicata e posteriormente quantificado por meio de leitora de microplaca Thermo Plate em 540 nm. Calculou-se a porcentagem de crescimento por meio das fórmulas a seguir:

Se $T \geq T_0 < C$ a amostra-teste foi citostática e a fórmula utilizada foi:

$$100 [(T - T_0)/(C - T_0)]$$

Se $T < T_0$ a amostra-teste foi citocida e a fórmula utilizada foi:

$$100 [(T - T_0)/(T_0)]$$

Se $T > C$ a amostra-teste estimulou o crescimento e não apresentou GI.

Onde: T é a média da absorbância da célula tratada depois de 48hs; T₀ é o controle das células no dia da adição das amostras-teste; e C é o controle de célula sem adição das amostras-teste depois das 48 h.

Para os resultados com a B16-F10 também foi plotado um gráfico de viabilidade celular para melhor visualização dos resultados. Os dados foram gerados a partir das porcentagens de crescimento do controle, considerados 100% e da linhagem em questão nas quatro concentrações utilizadas para ambas amostras dos extratos.

4.6.2 Determinação da GI₅₀ e da TGI

Foi utilizada a curva concentração-resposta, para cada linhagem celular, determinada por meio da análise de regressão não linear (sigmoidal fit) usando o software de Origin 6.0 (OriginLab Corporation, MA, USA). A partir dos gráficos, dois níveis de efeito são calculados através da regressão sigmoidal: 1) concentração da amostra teste que causa 50% de inibição do crescimento celular (GI₅₀); 2) concentração que causa inibição total do crescimento (TGI) (MONKS *et al.*, 1991).

4.6.3 Cálculo do IS

O índice de seletividade (IS) foi calculado com base nos resultados de GI₅₀ da linhagem não tumoral NIH-3T3 dividido pelo GI₅₀ obtido para as outras linhagens tumorais (INDRAYANTO; PUTRA; SUHUD, 2021).

4.6.4 Teste de absorção celular do IR-780

A linhagem celular B16-F10 foi cultivada em placas de Petri para cultivo celular (32,8 mm com grid), nas concentrações de 1×10^5 , 2×10^5 e 4×10^5 de células/placa incubadas a 37 °C com 5 % de CO₂ durante 24 h. Cada concentração celular recebeu IR-780 nas concentrações de 20, 40 e 80 µM diluído em DMEM sem soro fetal a partir da solução estoque, totalizando nove placas, como demonstrado na Figura 07.

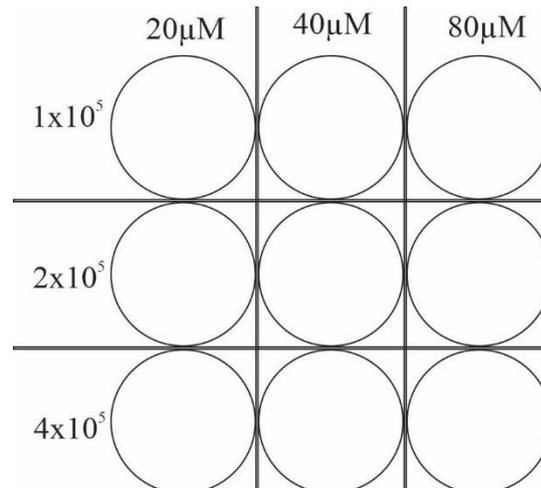


Figura 07. Esquema demonstrativo da distribuição das concentrações celulares (linhas) e das concentrações do IR-780 (colunas) para determinação da absorção celular do IR-780.

As placas foram novamente incubadas por 4 horas a 37 °C e 5 % de CO₂. Após esse período, as placas foram cuidadosamente aspiradas e lavadas três vezes com PBS. Por fim as células foram observadas em microscópio de fluorescência Leica DM 2000 Led e no equipamento *In-Vivo Xtreme*, Bruker, utilizando os softwares LAS V4.12 e Bruker Molecular Imaging, respectivamente.

4.6.5 Acúmulo do IR-780 na linhagem B16-F10

Para determinar a localização do acúmulo do marcador, foi utilizada uma placa de Petri (32,8mm) com 2x10⁵ células, 20 µM de IR-780 e uma gota do corante nuclear Hoechst 33342 (NucBlue™) Thermo Fisher (MA, USA). As células foram observadas em microscópio de fluorescência.

4.7 Testes *in vivo*

4.7.1 Manejo animal

Os experimentos foram realizados após aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (CEUA), protocolo n° 1140/2020, conforme a determinação do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). 40 exemplares de *Mus musculus* da linhagem BALB/c, machos, 25-35g, 4-6 semanas, foram adquiridos no Biotério Central vinculado à Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação (PROPP-UFMS). Os animais foram mantidos em mini-isoladores do Rack Ventilado Basic (Alesco®), ambientados até a idade adulta de 8 semanas, respeitando o número máximo de 5 exemplares por gaiola, com enriquecimento ambiental e cama de maravalha, à

temperatura e umidade relativa do ar aproximada de 21°C e 60%, ciclo claro/escuro de 12 horas, recebendo ração padrão (NUVILAB® CR) e água *ad libitum*.

4.7.2 Modelos de tumor

Para realização de três modelos tumorais, as células de B16-F10 foram ajustadas com PBS até concentração final de 5×10^5 células/200µL para inoculação subcutânea (SC) e intraperitoneal (IP), e 5×10^5 células/50µL para inoculação intravenosa (IV), cada grupo foi formado por n=3. Para comparar os resultados, um animal foi utilizado como controle negativo do IR-780. Esse animal foi mantido nas mesmas condições dos outros grupos, com diferencial de não receber células tumorais.

a. Melanoma subcutâneo: Para obtenção do nódulo subcutâneo, as células foram administradas pela via SC em inoculação única na região dorsal do pescoço. Os animais foram mantidos por 25 dias.

b. Metástase pulmonar – inoculação intraperitoneal: O primeiro modelo de metástase pulmonar foi obtido pela inoculação única IP de células, no quadrante abdominal inferior direito. Os animais foram mantidos por 30 dias.

c. Metástase pulmonar – inoculação intravenosa: Para o Segundo modelo de metástase pulmonar, as células foram inoculadas IV pela veia caudal lateral, uma única vez. Foi utilizado anestésico inalatório Isoflurano para contenção dos animais. Esses animais também foram mantidos por 30 dias.

No penúltimo dia de cada experimento, todos animais receberam 200µL de IR-780 0,45 mg/kg por via intraperitoneal, determinado por experimento piloto prévio em nosso laboratório, preparado a partir da solução estoque com solução fisiológica estéril 0,9%. As imagens de fluorescência foram obtidas após 24h, utilizando anestésico inalatório Isoflurano para contenção dos animais. Imagens *ex vivo* dos nódulos subcutâneos e dos órgãos pulmão, rins, fígado e testículos também foram obtidas.

4.7.3 Determinação da atividade antiproliferativa dos extratos em metástase pulmonar

No primeiro dia do experimento, 30 animais foram pesados e o modelo de metástase pulmonar foi obtido por administração única de 5×10^5 /50µL das células B16-F10 pela via IV pela veia caudal lateral, utilizando isoflurano para leve contenção dos animais.

No 15º dia, todos os animais foram novamente pesados e os grupos foram distribuídos aleatoriamente em n=6, totalizando cinco grupos nomeados como: Controle; Azeite; Doxo; DEGPE; e DEGPE. Os animais do grupo Controle não receberam nenhum tipo de tratamento.

O grupo Azeite, recebeu 100 µL de azeite de oliva extra virgem puro IP. Os animais do grupo Doxo receberam o fármaco quimioterápico doxorrubicina, solubilizado em PBS, na concentração final de 5 mg/kg, administrado 200 µL IP. Para utilização no tratamento, os dois extratos foram solubilizados em azeite de oliva extra virgem, na concentração final de 92,5 mg/kg/100µL pela via IP, dose com melhor atividade definida por Lima e Silva (2018) em experimentos anteriores em nosso laboratório utilizando modelo *in vivo* de nódulo subcutâneo com a linhagem B16-F10. Os animais foram tratados uma única vez.

Nos últimos três dias de experimentos os animais tiveram o consumo de ração quantificados, para avaliação da média de consumo por dia/animal de cada grupo.

No 29º dia, todos os grupos receberam 200 µL IP do marcador de fluorescência IR-780, preparado, a partir da solução estoque, diluindo-se em solução fisiológica 0,9 % estéril, até a concentração final de 0,45 mg/kg.

No 30º dia os animais foram pesados e a eutanásia foi realizada com o aprofundamento do plano anestésico utilizando isoflurano, confirmada com a exsanguinação por punção da veia hepática. As imagens de fluorescência *in vivo* e *ex vivo* dos órgãos rins, testículos, fígado e pulmões foram imediatamente adquiridas no equipamento *In-Vivo Xtreme* e os órgãos foram posteriormente fixados com formol 10%.

4.7.4 Análise macroscópica dos pulmões

Os nódulos metastáticos da superfície pleural dos pulmões foram contados com auxílio do estereomicroscópio óptico Olympus. Os resultados foram apresentados com média e desvio padrão.

4.7.5 Análise histológica

Os rins, testículos, fígados e os lobos pulmonares esquerdos fixados em formol 10% utilizados para fabricação das lâminas histológicas coradas com hematoxilina e eosina (HE) foram utilizadas para análise qualitativa dos tecidos.

Também foi realizada análise quantitativa dos nódulos metastáticos pulmonares, utilizando o microscópio Leica DM 2000 Led com o software LAS V4.12. Foram analisados o comprometimento do parênquima, a localização dos nódulos e possíveis lesões nos tecidos. O cálculo da porcentagem de implantação foi observado a partir da razão da área total de metástase pela área total do lóbulo x 100 (CONESA *et al.*, 2009).

4.8 Análise estatística

Os dados obtidos na contagem superficial dos nódulos pulmonares, os pesos dos animais e o consumo de ração foram analisados utilizando ANOVA um critério, seguido de pós- teste de Tukey ($p < 0,05$) por meio do software Bioestat 5.0.

5. RESULTADOS

5.1 Determinação da atividade antiproliferativa dos extratos *in vitro* – GI₅₀, TGI e índice de seletividade

A Tabela 2 apresenta os dados obtidos no estudo da atividade antiproliferativa dos extratos em sete linhagens celulares tumorais e não tumorais. O resultado de GI₅₀ menor ou igual a 30 µg/mL é considerado indicativo de amostras promissoras, pois demonstram maior atividade do extrato sobre as linhagens celulares (ITHARAT et al., 2004).

Tabela 2. Atividade antiproliferativa dos extratos da polpa (DEGPU) e da casca (DEGPE) dos frutos da guavira frente a seis linhagens celulares.

Linhagens celulares	DEGPU			DEGPE		
	GI ₅₀	TGI	IS	GI ₅₀	TGI	IS
K562	32,99	47,93	8,45	27,42	40,20	9,14
HT-29	>250,00	>250,00	0,88	50,27	157,62	4,99
B16-F10	>250,00	>250,00	1,08	180,76	>250,00	1,39
CACO-2	>250,00	>250,00	1,07	56,87	237,95	4,41
U-251	32,10	249,92	8,68	4,89	12,77	51,26
*NIH-3T3	278,70	>250,00		250,68	>250,00	
*J774	>250,00	>250,00		64,55	>250,00	

GI₅₀: µg/mL concentração que inibe 50% do crescimento celular; TGI: µg/mL concentração que inibe completamente o crescimento celular; SI: índice de seletividade calculado pela razão da GI₅₀ da linhagem NIH-3T3 GI₅₀ pela GI₅₀ de cada linhagem tumoral; * linhagem celular não tumoral; dados em negrito demonstrando os resultados mais promissores.

Portanto, o extrato da polpa (DEGPU) mostrou-se mais eficaz nas linhagens celulares tumorais K562 (leucemia) e U-251 (glioblastoma) com GI₅₀ de 32,99 e 32,10 µg/mL e TGI de 47,93 e 249,92 µg/mL, respectivamente. O extrato da casca (DEGPE) também apresentou melhores resultados nas mesmas linhagens K562 e U-251 com GI₅₀ de 27,42 e 4,89 µg/mL e TGI de 40,20 e 12,77 µg/mL, respectivamente.

Os resultados demonstram que o extrato da casca tem maiores efeitos sobre as linhagens HT-29, B16-F10 e CACO-2 quando comparado ao extrato da polpa, devido aos menores resultados de GI₅₀ obtidos. Nenhum dos extratos apresentou efeito citotóxico na linhagem celular não tumoral NIH-3T3. O extrato da polpa também não inibiu o crescimento da linhagem celular não tumoral J774 (macrófago), portanto, nas concentrações testadas, DEGPU

apresentou-se seguro com relação a citotoxicidade e para as demais linhagens celulares este extrato não apresentou efeito citostático.

O IS foi determinado com base nos resultados de GI_{50} obtidos anteriormente, com cálculo da razão entre o resultado da linhagem celular não tumoral NIH-3T3 (fibroblasto) pelos resultados da GI_{50} das outras linhagens celulares tumorais. O valor de $IS \geq 10$ indica maior seletividade da amostra frente a linhagem testada (INDRAYANTO; PUTRA; SUHUD, 2021), portanto assumimos que tanto o extrato da polpa quanto o extrato da casca foram seletivas contra as cepas K562 e U-251. O melhor resultado obtido foi do extrato da casca para a cepa U-251, com IS de 51,26.

Os resultados da atividade antiproliferativa de ambos extratos frente todas as linhagens celulares testadas estão demonstrados abaixo (Figura 08). Pode-se observar que o extrato da casca (DEGPE) foi mais efetivo que o extrato da polpa (DEGPU)

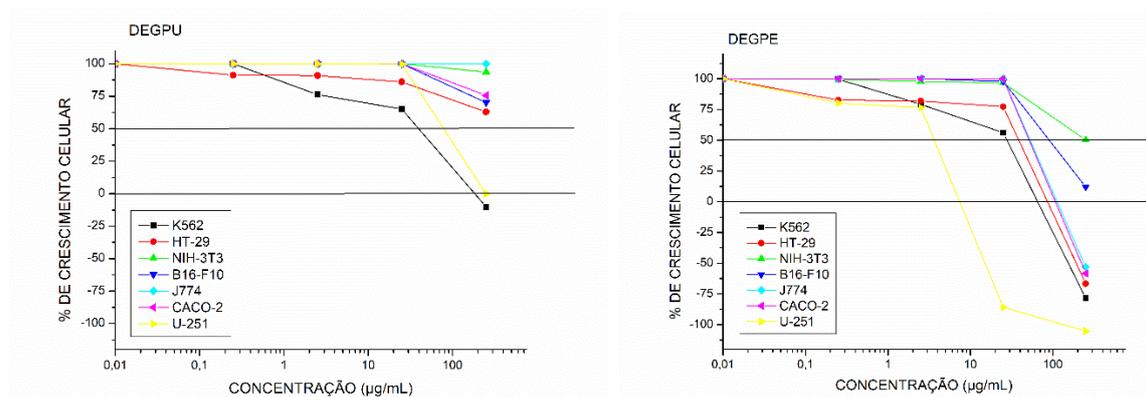


Figura 08. Representação da atividade antiproliferativa dos extratos DEGPU e DEGPE frente as linhagens K562 (leucemia), HT-29 (adenocarcinoma colorretal), NIH-3T3 (fibroblasto), B16-F10 (melanoma), J774 (macrofago), CACO-2 (adenocarcinoma colorretal) e U-251 (glioblastoma). Os resultados foram expressos em porcentagem de crescimento celular pela concentração dos extratos (0,25; 2,5; 25; 250 µg/mL) (escala em \log_{10}). Origin 6.0 Software.

A Figura 09 demonstra a atividade antiproliferativa das duas linhagens que obtiveram melhores resultados, K562 e U-251, juntamente com o resultado da doxorrubicina (amostra padrão) após 48h de tratamento. Em ambas apresentações, o extrato da casca (DEGPE) demonstrou maior atividade citocida do que a doxorrubicina na maior dosagem testada.

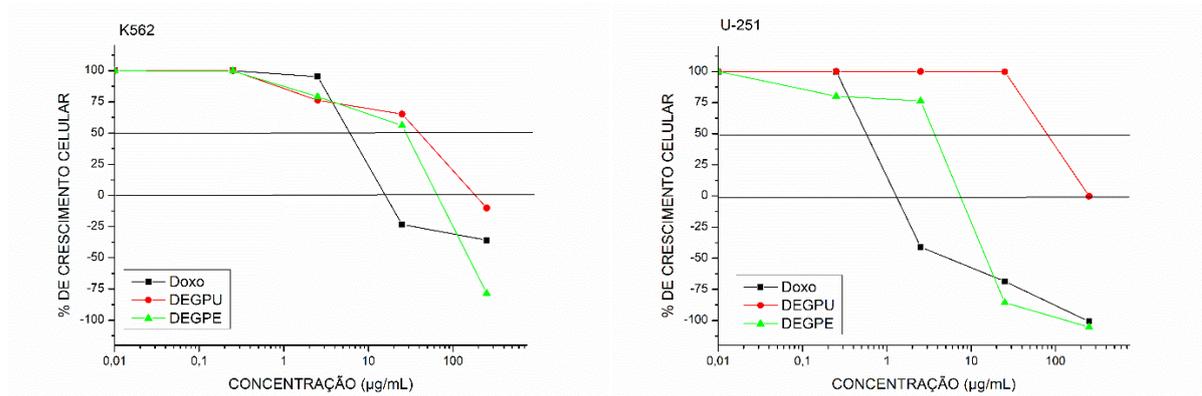


Figura 09. Representação da atividade antiproliferativa nas linhagens K562 (leucemia) e U-251 (glioblastoma) tratadas com doxorubicina (Doxo – quadrado preto), DEGPE (círculo vermelho) e DEGPE (triângulo verde). Os resultados foram expressos em porcentagem de crescimento celular pela concentração dos tratamentos (0,25; 2,5; 25; 250 µg/mL) (escala em \log_{10}). Origin 6.0 Software.

Com relação à linhagem celular B16-F10, levando em consideração a porcentagem de crescimento descontado o controle, o percentual de viabilidade celular também foi baixo em ambos os tratamentos quando comparado ao controle (células não tratadas). Portanto, na maior concentração testada, as células apresentaram inibição total do crescimento e morte celular, demonstrando que ambos os tratamentos foram citocidas para essa célula (Figura 10).

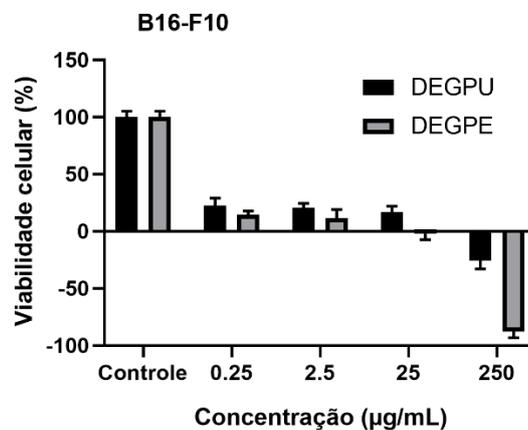


Figura 10. Viabilidade celular (%) com desvio padrão da linhagem B16-F10 tratada com DEGPE e DEGPE (0,25; 2,5; 25 e 250 µg/mL). GraphPad Prism 8.0.1 Software.

5.2 Teste de absorção celular do IR-780

Na análise celular, a concentração de 2×10^5 células/placa permitiu melhor visualização por apresentar monocamada definida, sem sobreposição das células (Figura 11). As concentrações de 40 e 80 µM de IR-780 apresentaram pequenos cristais de corante, ou seja, sua solubilidade ficou comprometida, havendo saturação do meio (Figura 11.b1/c1), sendo que na maior concentração (80 µM), observou-se que em aproximadamente 10 minutos as células se

romperam e com isso houve a perda gradativa da fluorescência. Sendo assim, a concentração de $20\mu\text{M}$ de IR-780 foi suficiente para obter a marcação, sem causar dano celular (Figura 11.a2).

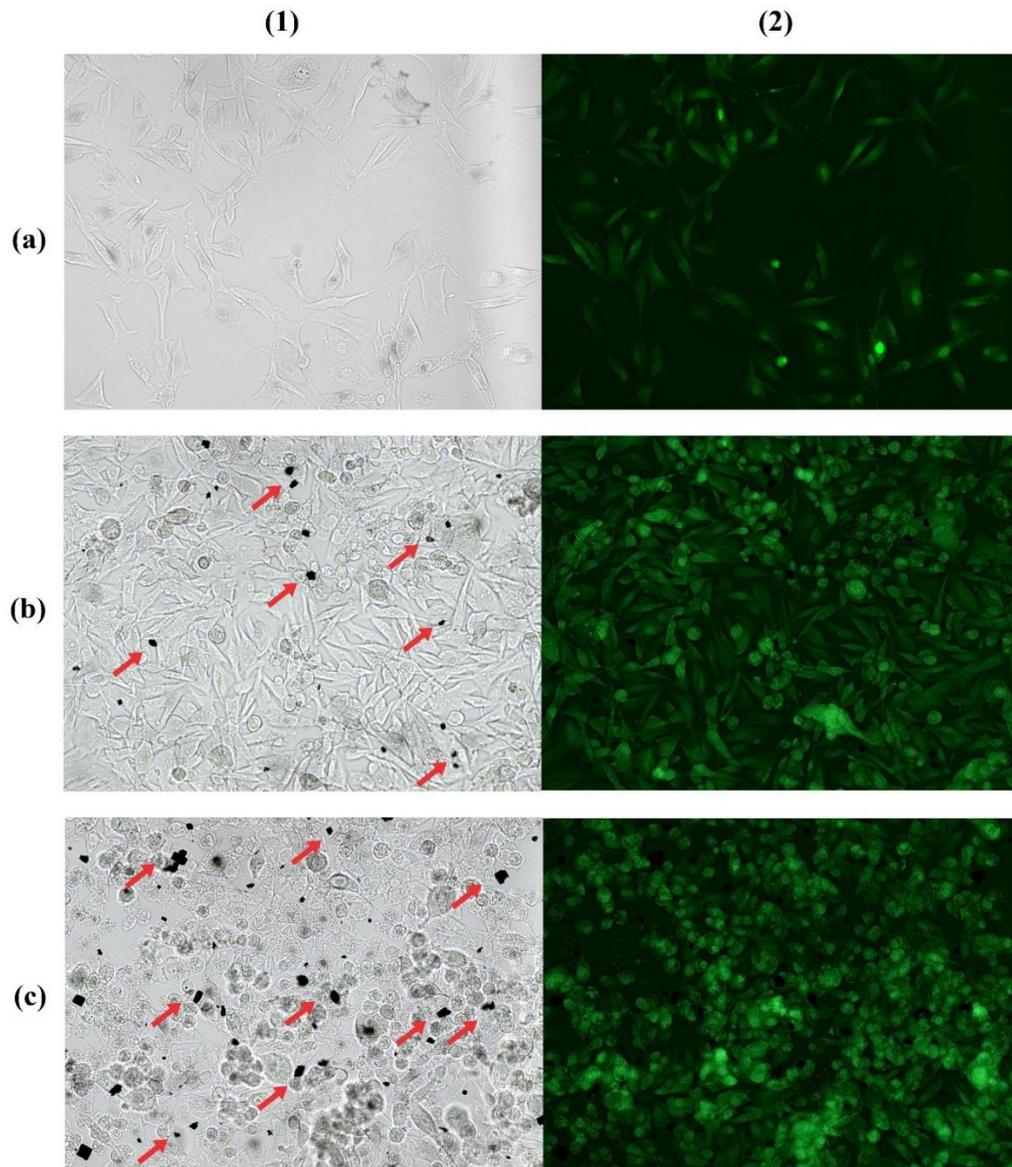


Figura 11. Campo claro (1) e microscopia de fluorescência (2) das concentrações celulares de 2×10^5 células/placa B16-F10 com $20\mu\text{M}$ IR-780 (a); 4×10^5 células/placa B16-F10 com $40\mu\text{M}$ IR-780 (b); e 4×10^5 células/placa B16-F10 com $80\mu\text{M}$ IR-780 (c). Setas vermelhas indicando excesso de cristais do corante nas maiores concentrações de IR-780. Obtido com microscópio de fluorescência Leica DM 2000 Led.

As imagens obtidas através do *In-Vivo Xtreme* demonstraram resultados similares aos da microscopia de fluorescência. Para a concentração de $80\mu\text{M}$ de IR-780 (Figura 12.3), observa-se que as imagens apresentam fluorescência, porém em áreas menores, quando comparada às concentrações de $20\mu\text{M}$ e $40\mu\text{M}$ (Figura 12.1-2), corroborando a informação de

que a morte celular causada atrapalha a emissão de fluorescência. Com as análises microscópicas e radiográficas, pode-se concluir que o IR-780 foi absorvido pelas células B16-F10 na concentração de $20\mu\text{M}$ sem causar dano celular e a concentração de 2×10^5 (Figura 12.b1) apresentou melhor confluência para análise celular microscópica. Com isso podemos utilizar o marcador para avaliar a viabilidade celular.

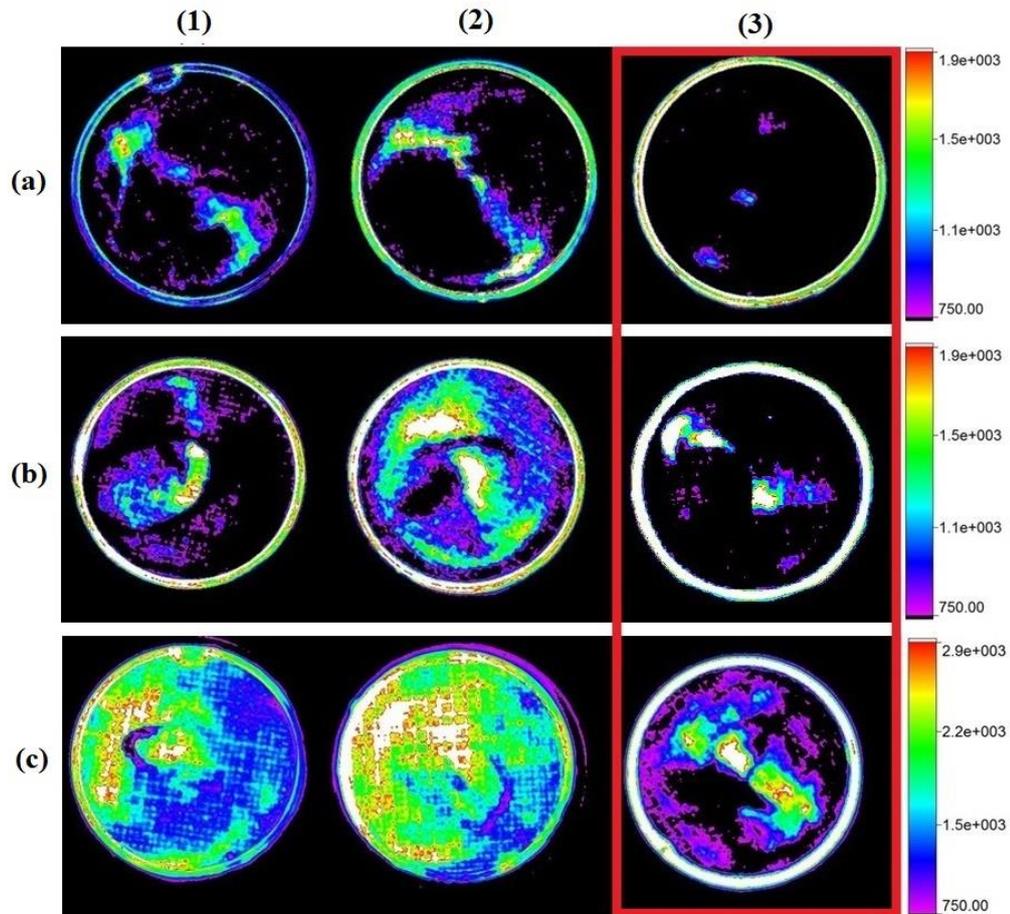


Figura 12. Imagem demonstrando a fluorescência emitida pela adição do IR-780 nas concentrações de 20 (1); 40 (2); e $80\mu\text{M}$ (3) nas diferentes concentrações celulares 1×10^5 (a); 2×10^5 (b); e 4×10^5 células/placa B16-F10 (c); Destaque em vermelho da maior concentração do IR-780 demonstrando menores áreas de fluorescência. Obtida com o In-Vivo Xtreme, Bruker.

5.3 Acúmulo do IR-780 na linhagem B16-F10

Para a confirmação da localização do acúmulo do IR-780 nas células B16-F10, também foi utilizado o corante de núcleo Hoechst 33342 para efeito comparativo. De fato, a localização do acúmulo de IR-780 foi confirmada através da fluorescência deste marcador no qual delimita o citosol celular (Figura 13.b), corroborando com outros estudo que demonstraram sua afinidade pelas mitocôndrias (CHEN *et al*, 2018; WANG *et al*, 2014; ZHANG *et al*, 2014).

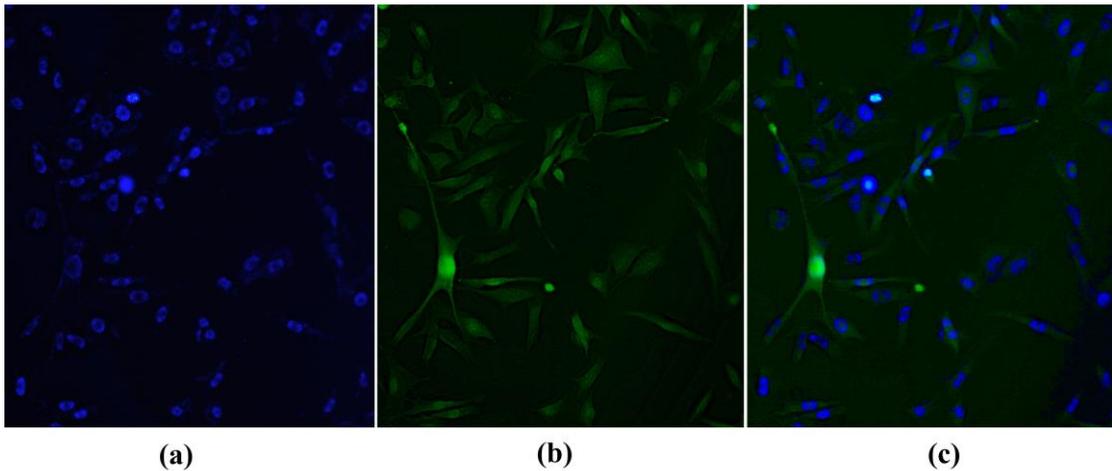


Figura 13. Célula da linhagem B16-F10 com seus núcleos corados com Hoechst 33342 (a); citosol corado com IR-780 (b) e as imagens sobrepostas demonstrando a diferença entre núcleo e citosol (c). Obtida com microscópio de fluorescência Leica DM 2000 Led.

5.4 Modelos de tumor *in vivo*

Para efeito comparativo dos modelos experimentais de tumores realizados nesse estudo, foi utilizado um animal controle negativo nas mesmas condições de estudo dos grupos experimentais, porém sem a inoculação celular, ou seja, sem apresentar tumor, apenas com marcador IR-780. Entretanto, o animal sem tumor apresentou fluorescência na região abdominal caudal (Figura 14). Isso pode ser explicado pelo fato de que o IR-780, apesar de ser marcador com maior seletividade para células tumorais, também pode fazer ligação com outros compostos orgânicos, como por exemplo a albumina, com quem faz uma fraca ligação não covalente (POTÉZ *et al*, 2018).

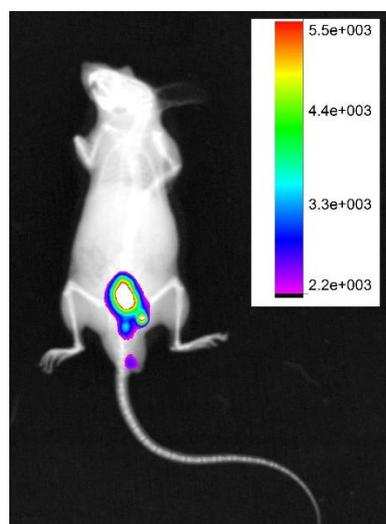


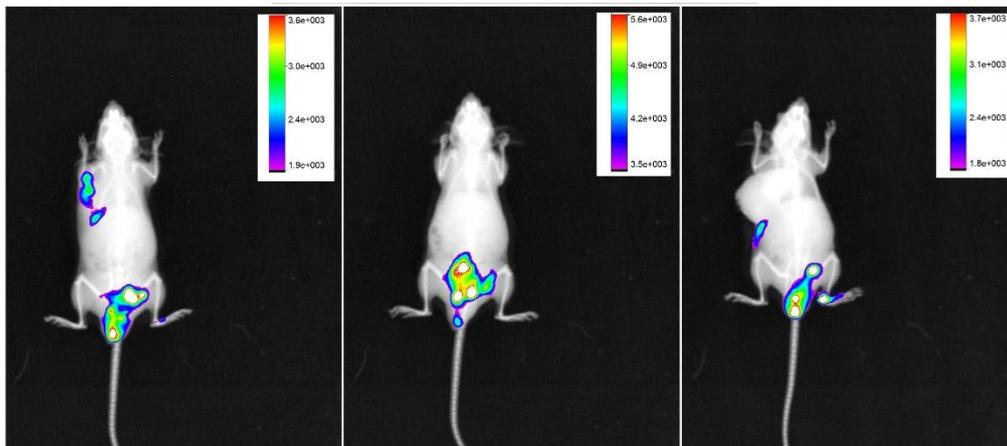
Figura 14. Animal controle negativo apresentando fluorescência na região abdominal caudal e sua escala de intensidade de fluorescência. Obtido com o *In-Vivo Xtreme*, Bruker

5.4.1 Melanoma subcutâneo

Os animais submetidos à injeção subcutânea de células B16-F10 na região dorsal, desenvolveram nódulo dentro de 25 dias (Figura 15.a). Após a administração intraperitoneal do IR-780 nos animais, imagens de fluorescência foram adquiridas utilizando o equipamento *In-Vivo Xtreme*, no qual constatou-se através dos resultados de fluorescência obtidos que a região abdominal caudal apresentou maior pico de fluorescência, por outro lado, a região próxima aos nódulos apresentou pouca ou nenhuma fluorescência, quando avaliado a imagem geral do animal (Figura 15.b).



(a)



(b)

Figura 15. Animais apresentando nódulo subcutâneo dorsal visível (a); imagens dos animais no equipamento *In-Vivo Xtreme* com suas respectivas escalas de intensidade de fluorescência (b). As imagens apresentam maior intensidade de fluorescência na região abdominal caudal e pouca ou nenhuma fluorescência na região do nódulo subcutâneo.

Os órgãos desses animais também foram analisados por fluorescência, juntamente com os tumores já seccionados. Foram analisados os fígados e os rins por serem órgão de metabolização e excreção, os testículos por estarem próximos as áreas de maior intensidade de fluorescência e os pulmões por serem considerados órgão alvo de metástase, quando se tratando

da linhagem B16-F10. Como esperado, o fígado, por ser o órgão metabolizador, apresentou maior intensidade de fluorescência, porém, nenhum tumor foi capaz de emitir fluorescência significativa (Figura 16).

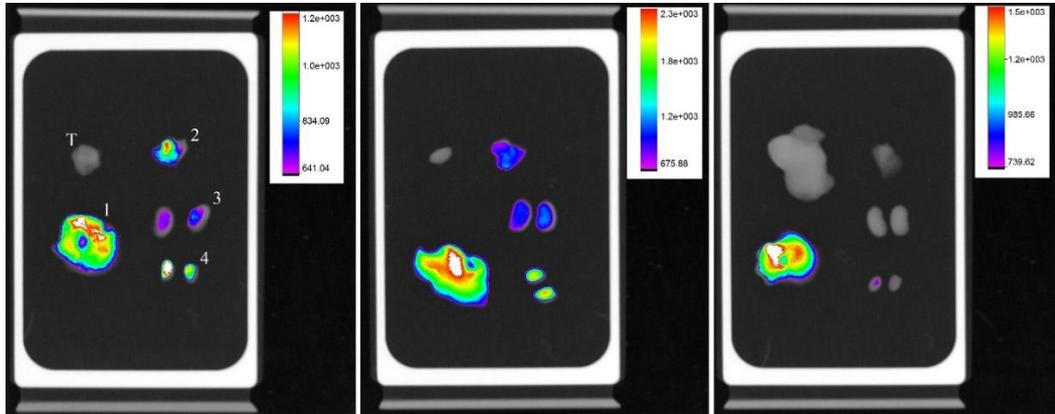


Figura 16. Imagem de fluorescência dos órgãos dos três animais com suas respectivas escalas de intensidade. Fígado (1), pulmões (2), rins (3) testículos (4) e nódulo tumoral (T), na mesma sequência para as três imagens. Obtido com o In-Vivo Xtreme, Bruker

5.4.2 Metástase pulmonar – inoculação intraperitoneal

O modelo animal utilizado para o desenvolvimento de metástase pulmonar com a injeção intraperitoneal de células tumorais não foi favorável ao estudo. No trigésimo dia os três exemplares apresentaram inchaço abdominal, conforme Figura 17 compatível com ascite. Porém esse período não foi suficiente para o desenvolvimento da metástase.



Figura 17. Animais apresentando aumento de volume abdominal, compatível com ascite, após a inoculação intraperitoneal de células B16-F10.

As imagens adquiridas no *In-Vivo Xtreme* mostram uma pequena área com maior intensidade de fluorescência na região abdominal caudal. Em apenas um animal foi observada

diversas áreas de fluorescência com menor intensidade (Figura 18.a), já os animais com ascite mais pronunciada não apresentaram fluorescência disseminada (Figura 18.b-c). No exame necroscópico observou-se que nenhum animal apresentou metástase pulmonar macroscopicamente visível, porém, todos apresentaram inúmeros nódulos tumorais amplamente disseminados pelo mesentério abdominal (Figura 19).

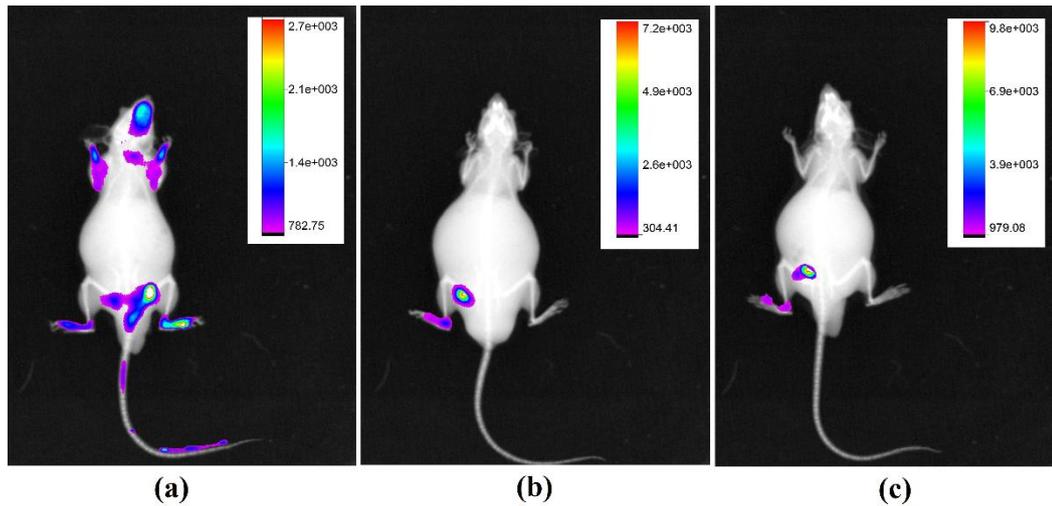


Figura 18. Todos exemplares do grupo apresentando aumento de volume abdominal, compatível com ascite. Animal apresentando diversas áreas de fluorescência (a) e animais apresentando maior volume abdominal com prejuízo às imagens de fluorescência (b) e (c).

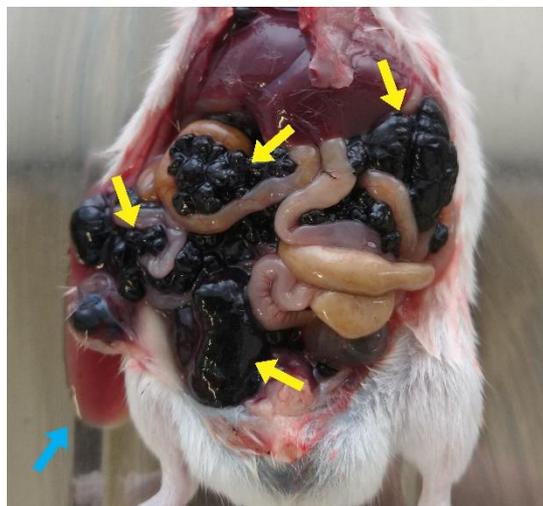


Figura 19. Exame necroscópico abdominal. Evidenciado pelas setas amarelas, vários nódulos tumorais disseminados pelo mesentério; a seta azul demonstra o líquido ascítico.

Pelo mesmo motivo descrito anteriormente no modelo subcutâneo, os órgãos de escolha para análise foram o fígado, os rins, pulmões e testículos. O animal que apresentou maior quantidade de líquido ascítico não apresentou fluorescência nos órgãos, podendo indicar dificuldade de absorção do IR-780 (Figura 20.b). Os outros dois animais apresentaram

fluorescência em todos os órgãos, porém o animal que apresentou menos ascite obteve maior intensidade de fluorescência (Figura 20.a).

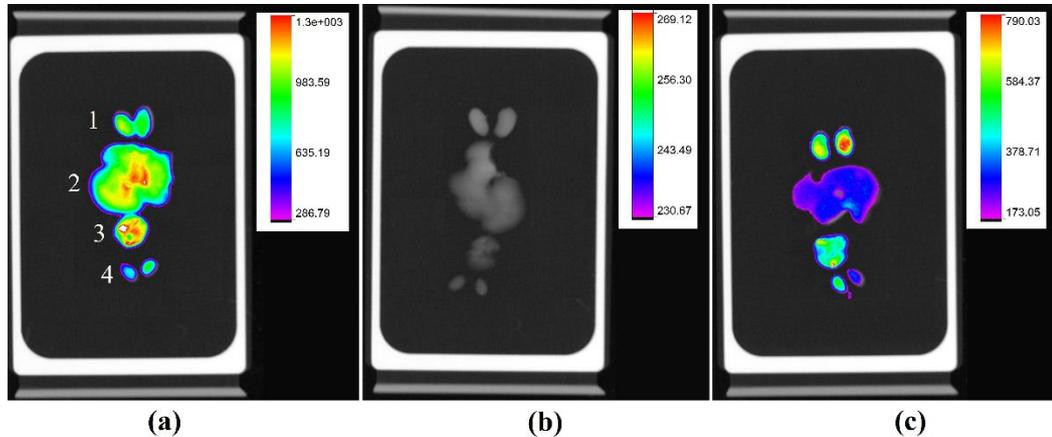


Figura 20. Imagens de fluorescência dos órgãos dos três animais com suas respectivas escalas de intensidade; Rins (1), fígado (2), pulmões (3) e testículos (4), na mesma sequência para as três imagens. Animal com menor quantidade de líquido ascítico apresentando maior fluorescência (a); animal com maior presença de ascite sem marcação de fluorescência (b); e animal com ascite moderada apresentando pouca intensidade de fluorescência (c). Obtido com o In-Vivo Xtreme, Bruker.

5.4.3 Metástase pulmonar – inoculação intravenosa

Os animais utilizados como modelo de metástase pulmonar pela inoculação intravenosa de células tumorais da linhagem B16-F10 foram acompanhados por 30 dias, quando começaram a apresentar alterações comportamentais, como letargia e redução da alimentação. Como nos outros grupos, o IR-780 foi administrado previamente às imagens, que apresentaram o mesmo padrão de fluorescência localizada na região abdominal caudal, mais alguns pontos de fluorescência na região cranial e nenhum ponto na região pulmonar, de interesse (Figura 21).

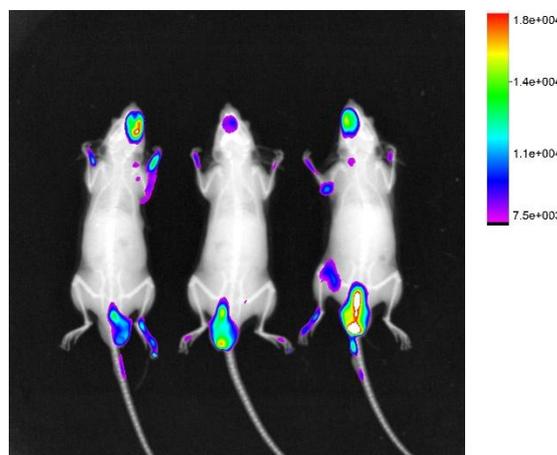


Figura 21. Imagem dos animais com sua respectiva escala de intensidade de fluorescência. Demonstrando regiões de fluorescência na região abdominal caudal e alguns pontos na região cranial. Obtido com o In-Vivo Xtreme, Bruker.

Mantendo o mesmo critério avaliativo dos outros grupos, os órgãos analisados para o segundo modelo de metástase pulmonar também foram os pulmões, rins, testículos e fígado. As imagens obtidas pelo *In-Vivo Xtreme* demonstraram que o pulmão que tinha sua superfície mais comprometidas pelos nódulos, não apresentou fluorescência (Figura 22.a). A imagem de fluorescência dos outros pulmões foi inversamente proporcional à quantidade de nódulos superficiais, ou seja, o pulmão menos comprometido apresentou maior fluorescência (Figura 22.c). Entretanto isso não era esperado, uma vez que o IR-780 vem sendo descrito como mais seletivo para células tumorais, esperava-se que as imagens seriam mais intensas onde houvesse tumores. O mesmo ocorreu nas imagens dos nódulos SC, os quais não apresentaram emissão de fluorescência. Porém sabe-se que o melanoma produz muita melanina, um fotoprotetor que lhe caracteriza a coloração acastanhada escura e que absorve luz ultravioleta e luz visível (OU-YANG; STAMATAS; KOLLIAS, 2004). Dessa forma, a melanina absorve a luz em um amplo alcance de comprimentos de onda, o que prejudica a absorção de luz pelo equipamento.

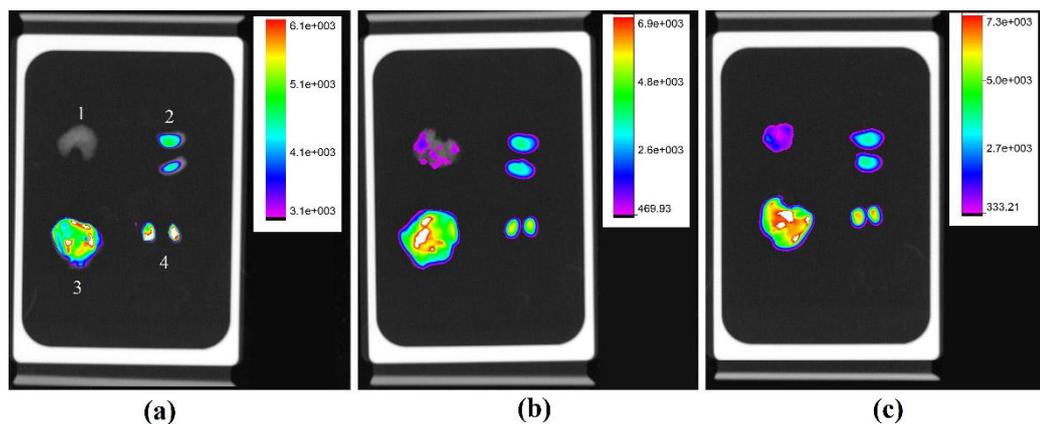


Figura 22. Imagem de fluorescência dos órgãos dos três animais com suas respectivas escalas de intensidade. Pulmões (1), rins (2), fígado (3) e testículos (4), na mesma sequência para as três imagens. Pulmão mais comprometido sem fluorescência (a); pulmão com comprometimento acentuado com leve fluorescência (b); e pulmão menos comprometido com maior fluorescência (c). Obtido com o In-Vivo Xtreme, Bruker.

5.5 Atividade antiproliferativa dos extratos em modelo de metástase pulmonar

Os animais divididos nos grupos Controle, Azeite, Doxo, DEGPE e DEGPE foram avaliados quanto ao consumo de ração e peso. Todos os animais foram pesados no 1º, 15º e 30º dia do experimento, mas não houve diferenças estatisticamente significativas entre os grupos, inferindo que os tratamentos não afetaram o ganho de peso e não induziram sinais e sintomas que fossem indicativos de toxicidade (Figura 23).

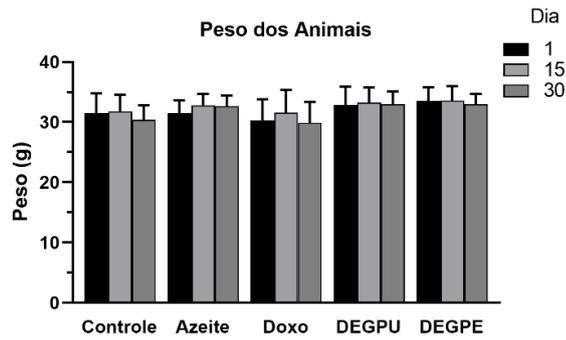


Figura 23. Gráfico apresentando a média dos pesos dos animais, com desvio padrão, de cada grupo, nos dias 1, 15 e 30 do experimento. GraphPad Prism 8.0.1 Software.

Com relação ao consumo de ração, os animais do grupo controle apresentaram redução no consumo de ração nos últimos 3 dias de experimento, com diferença estatisticamente significativa apenas entre os grupos Controle e Azeite ($p < 0,02$) (Figura 24).

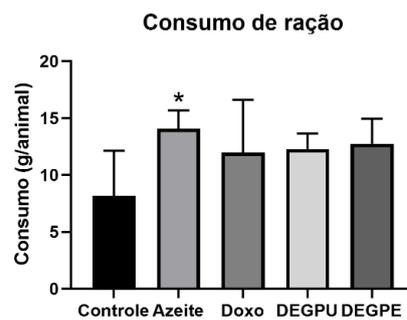


Figura 24. Gráfico do consumo médio de ração por animal nos últimos três dias do experimento, com desvio padrão, de cada grupo. * $p < 0.05$ com relação ao grupo controle. GraphPad Prism 8.0.1 Software.

As imagens obtidas pelo In-Vivo Xtreme mostraram que os pulmões que tiveram sua superfície mais comprometida por nódulos, apresentaram fluorescência reduzida (Figura 25.a-c).

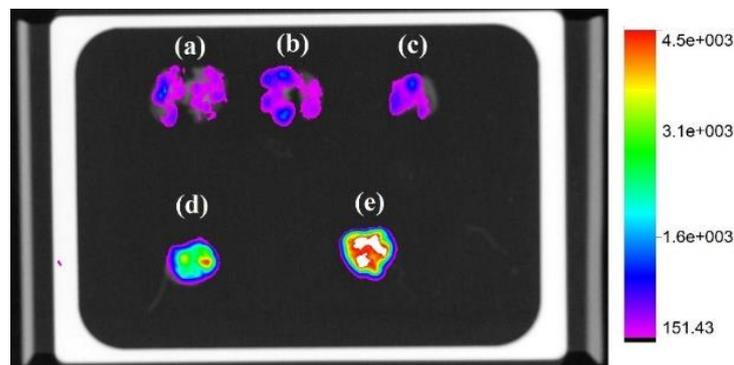


Figura 25. Imagem representativa de fluorescência dos pulmões e sua respectiva escala de intensidade. Apresentando os grupos: Controle (a), Azeite (b), Doxo (c), DEGPU (d) e DEGPE (e). Obtido com o *In-Vivo Xtreme*, Bruker.

5.6 Análise macroscópica dos pulmões

O modelo de metástase pulmonar foi confirmado pela observação macroscópica, onde ficou evidente a presença de nódulos presentes na superfície pleural dos pulmões (Figura 26).

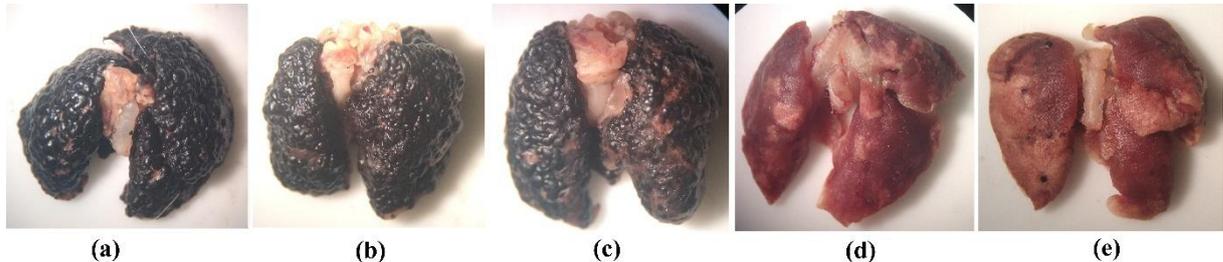


Figura 26. Imagens macroscópicas dos pulmões apresentando inúmeros nódulos metastáticos na superfície pleural. Apresentando os grupos: Controle (a), Azeite (b), Doxo (c), DEGPU (d) e DEGPE (e). Obtido com estereomicroscópio óptico Olympus.

Na contagem superficial dos nódulos, os grupos Controle, Azeite e DOX não apresentaram diferença estatística entre si (Figura 27). Os grupos DEGPU e DEGPE apresentaram redução de 97,5% e 94,38%, respectivamente, em relação ao grupo Controle ($p < 0,001$). Ambos os grupos também mostraram uma diferença significativa entre os grupos Azeite ($p < 0,01$) e DOX ($p < 0,05$).

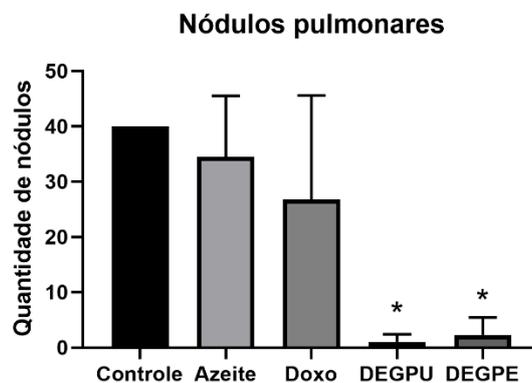


Figura 27. Média dos números de nódulos da superfície pleural dos pulmões com desvio padrão de todos grupos. * $p < 0,05$. GraphPad Prism 8.0.1 Software.

5.7 Avaliação histológica

Foram feitas análises histológicas dos órgãos rins, testículos e fígado que apresentaram maior intensidade de fluorescência, para determinar se houve implantação celular. As imagens histopatológicas mostraram tecido íntegro, sem sinais de crescimento celular anormal ou processos inflamatórios e necróticos. Podendo, assim, afirmar que não houve implantação das células B16F10 nesses órgãos (imagens não apresentadas).

Já nas análises pulmonares, o grupo controle apresentou alta porcentagem de implantação (>95%) em seu parênquima (Figura 28.a). O grupo Azeite teve 90% (Figura 28.b), seguido do grupo DOX com 70% de implantação (Figura 28.c). Os grupos tratados com DEGPE e DEGPE tiveram as porcentagens mais baixas, com 5% e <5%, respectivamente (Figura 28.d-e). A análise histológica não indicou processos inflamatórios ou necróticos no parênquima pulmonar.

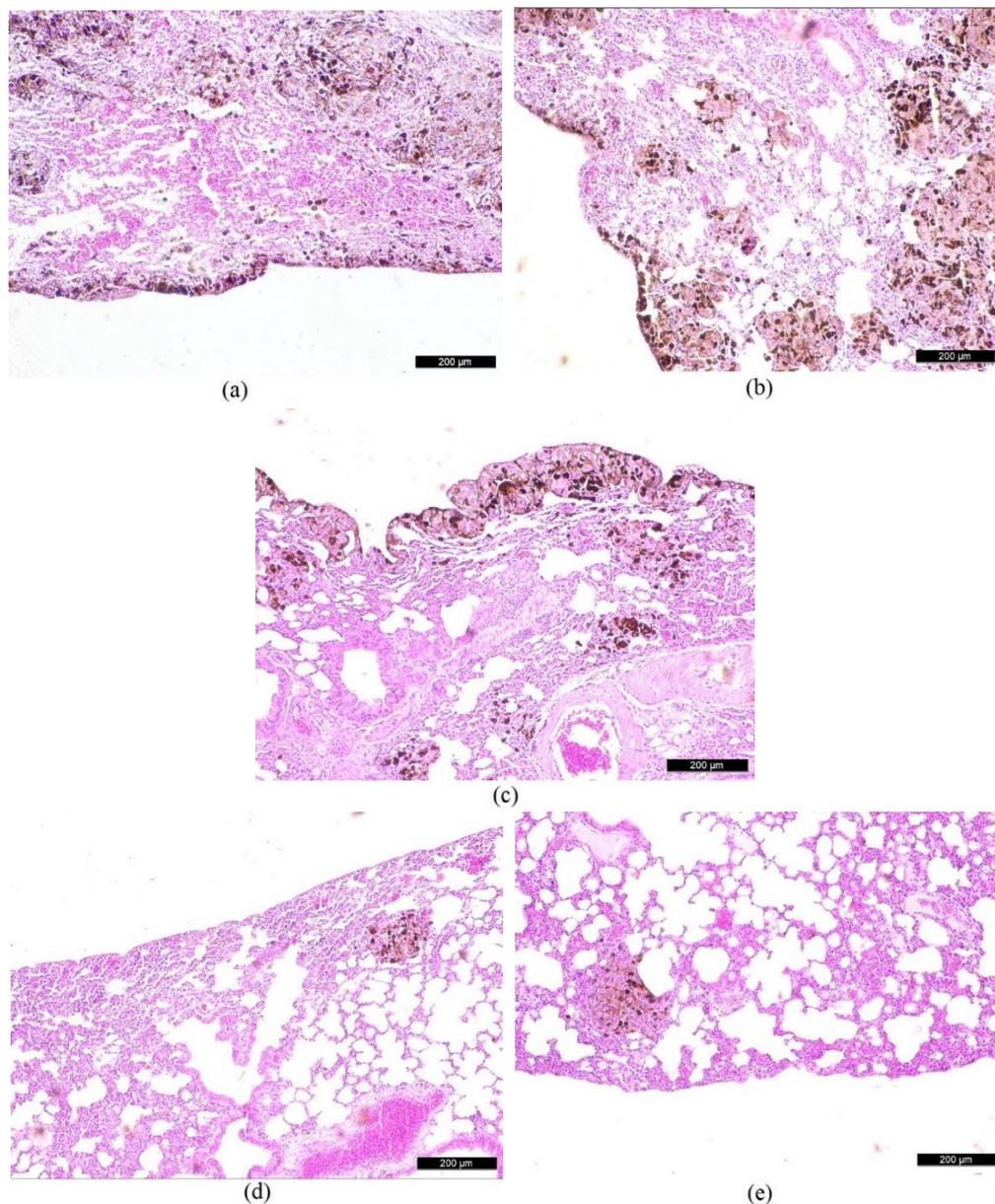


Figura 28. Imagens histológicas do parênquima pulmonar. Áreas enegrecidas demonstrando presença de nódulos metastáticos malignos. Superfície pleural apresentando nódulos nos grupos Controle (a), Azeite (b) e Doxo (c). Grupos DEGPE (d) e DEGPE (e) com poucos nódulos no parênquima.

6. DISCUSSÃO

O câncer de pele melanoma é considerado um dos tipos mais graves da doença devido à grande possibilidade de gerar metástases. Se detectado na fase inicial, tem prognóstico favorável, mas quando em metástase, a sobrevida dos pacientes é baixa. Por esse motivo, o estudo de drogas que possam atuar delimitando ou mesmo inibindo a progressão dessa doença é de grande interesse (INCA, 2022e; NIH, 2022).

As análises evidenciam que tanto o extrato da polpa quanto o extrato da casca possuem atividade antitumoral. Ambos os extratos mostraram atividade antiproliferativa contra linhagens neoplásicas de leucemia e glioblastoma, e na maior concentração testada, o extrato da casca mostrou atividade citotóxica para a maioria das linhagens. Além disso, na linhagem não tumoral J774 o extrato da polpa apresentou-se seguro com relação a citotoxicidade, ou seja, a proliferação celular foi maior que a apresentada no controle, demonstrando sua seletividade contra células neoplásicas. O teste *in vivo* também demonstrou que ambos os extratos apresentaram atividade contra o melanoma, delimitando a implantação de células metastáticas e reduzindo seu crescimento.

Em pesquisa com frutos inteiros de *C. adamantium* (VALLILO *et al.*, 2006) os óleos essenciais apresentaram diversos compostos entre eles o limoneno e outros dois tipos de monoterpenos, substâncias essas que possuem atividade antitumoral descrita na literatura (BRAZ *et al.*, 2021; BRAZ *et al.*, 2020).

De acordo com Lima e Silva *et al* (2018), o perfil químico de duas amostras de extrato em diclorometano, polpa com semente e casca do fruto da *C. adamantium*, foram identificadas as mesmas substâncias: três chalconas, duas flavonas e duas champanonas. O teste de atividade antiproliferativa demonstrou que a substância 4',6'dihidroxi-3',5'-dimetil-2'-metoxi-chalcona (dimetilchalcona) obteve GI₅₀ de 7,11µg/mL ($\pm 1,75$) quando testada isoladamente na linhagem B16-F10. Sendo assim, faz necessário o aprofundamento dos estudos sobre o perfil químico dos extratos em análise para melhor comparação e determinação do isolado mais ativo presente nas partes dos frutos em questão.

Com relação ao marcador, além de ser utilizado como marcador de fluorescência para detecção tumoral *in vivo*, o IR-780 também é utilizado em terapias fototérmicas, devido a sua capacidade de gerar calor e espécies reativas de oxigênio (ROS) (PAIS-SILVA; DE MELO-DIOGO; CORREIA, 2017). Vários estudos apresentam a interação do marcador com outras moléculas com a finalidade de formar nano complexos ou micelas estáveis ao organismo com a capacidade de amplificar a atividade citotóxica seletiva para células tumorais. São exemplos de interação o uso da albumina (BAI *et al*, 2022; LONG *et al*, 2022; CAO *et al*, 2017; JIANG

et al, 2015), polímeros de etilenoglicol (YANG *et al*, 2021; PAIS-SILVA; DE MELO-DIOGO; CORREIA, 2017; YAN *et al*, 2016; YUAN *et al*, 2015; PENG *et al*, 2011), crizotinib (WANG *et al*, 2021), lipídio nanoestruturado (YANG *et al*, 2019; KUANG *et al*, 2017; LI *et al*, 2017), nanodroplets de perfluorocarbono (CHENG *et al*, 2015), heparina e ácido fólico (YUE *et al*, 2013), cetuximab (SHIH *et al*, 2017), e lonidamina (YUE *et al*, 2017).

Em estudo com análises *in vitro* as concentrações utilizadas de IR-780 variaram de 2,5 μM até 3M (SHEN *et al*, 2022; LU *et al*, 2021), 20 μM da associação Caba-IR (ZHENG *et al*, 2019) e 250 $\mu\text{g/mL}$ da associação ABA-Mi(IR-780) (WOLF *et al*, 2019). Porém nosso estudo demonstrou que a concentração de 80 μM de IR-780 apresentou morte celular em cerca de 10 minutos, corroborando com as informações apresentado por Lu *et al* (2021) de que o IR-780 apresenta atividade apoptótica sobre as células.

Jiang *et al* (2015) demonstraram a toxicidade do IR-780 ao administrar 2,5 mg/kg intravenoso em camundongos da linhagem BALB/c obtendo 100% de letalidade, já na administração intraperitoneal de 3 mg/kg não foi relatado mortes (SHEN *et al*, 2022). O presente estudo utilizou 0,45 mg/kg intraperitoneal na mesma linhagem de camundongo sem apresentar nenhuma alteração toxicológica para o animal, assim como Zhang *et al* (2010) utilizaram 0,2 mg/kg intravenoso em camundongos atímicos Nude e também não apresentou alterações tóxicas.

A baixa absorção do IR-780 nos animais que apresentaram ascite pode ser explicada devido ao aumento da pressão intraperitoneal. Essa distensão abdominal causada pelo líquido inflamatório repercute sistemicamente causando várias alterações, mas principalmente, reduz o fluxo sanguíneo e bloqueia o sistema linfático da região, portanto a absorção do marcador fica reduzida (MILANESI; CAREGNATO, 2016; PAPA VRAMIDIS *et al*, 2011).

O uso do marcador de fluorescência IR-780 em células B16-F10 é pouco relatado na literatura. Seu uso para a avaliação da evolução do crescimento tumoral *in vivo* não foi eficiente, uma vez que as imagens obtidas não focaram no tumor, assim como também foi demonstrado por He *et al* (2017). Como apresentado nesse estudo, o tumor melanoma possui uma coloração escura devido a presença de melanina em grande quantidade e por esse motivo a captação da intensidade de fluorescência pelo equipamento fica prejudicada, uma vez que a melanina absorve um amplo espectro de luz (RILEY, 1997). Por outro lado, os resultados da avaliação do comprometimento pulmonar com as imagens de fluorescência *ex vivo* foram definidos e comprovados pelas análises histológicas e macroscópicas, devendo ser interpretado de maneira que, quanto maior a intensidade de fluorescência, menor o comprometimento tecidual e quanto

menor sua intensidade, maior é o comprometimento tecidual pelo tumor. Ou seja, a fluorescência será inversamente proporcional ao comprometimento tumoral.

7. CONCLUSÃO

Os resultados desta pesquisa indicaram que os extratos em diclorometano da casca e polpa do fruto da *Campomanesia adamantium* são eficazes contra linhagens de células tumorais, pois apresentaram GI_{50} próximo ou abaixo de 30 e efeito citocida sobre algumas linhagens tumorais, assim como também apresentaram um alto índice de seletividade, principalmente para células de glioblastoma (U-251) e leucemia (K562), sem o comprometimento das células não tumorais.

Corroborando com análises *in vitro*, as atividades dos extratos demonstrada em modelos de metástase pulmonar confirmam a capacidade em limitar o crescimento e prevenir a implantação metastática tumoral nos pulmões, sem apresentar toxicidade aos animais, gerando assim, a necessidade de aprofundar a pesquisa de seus ativos isolados para elaboração de um novo fármaco com efeito antitumoral.

O uso do marcador tumoral IR-780 também demonstrou eficácia nos testes *in vitro* frente a linhagem celular de melanoma (B16-F10), podendo ser utilizados com um teste de fácil execução e baixo custo para determinação de viabilidade celular. Esse marcador também demonstrou utilidade nos testes *ex vivo* para definir o comprometimento pulmonar devido a metástase do melanoma em animais da linhagem BALB/c. Portanto, estudo futuros fazem necessários para a elaboração de novos fármacos e técnicas investigativas do câncer.

8. REFERÊNCIAS

- AKIYOSHI, T. *et al.* Comparison of preoperative whole-body positron emission tomography with MDCT in patients with primary colorectal cancer. **Colorectal Disease**, v. 11, n. 5, p. 441-544, 2008. DOI: 10.1111/j.1463-1318.2008.01643.x
- ALVARES, B.R.; MICHELL, M. O uso da ressonância magnética na investigação do câncer mamário. **Radiologia Brasileira**, v. 36, n. 6, p. 373-378, 2003. DOI: 10.1590/S0100-39842003000600009
- ALVES, C.G. *et al.* IR780 based nanomaterials for cancer imaging and photothermal, photodynamic and combinatorial therapies. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 524, p. 164-175, 2018. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2018.03.020
- ARCAMONE, F. **Doxorubicin: anticancer antibiotics**. V. 17. New York: Academic Press INC., 1981.
- BAI, L. *et al.* Super-stable cyanine@albumin fluorophore for enhanced NIR-II bioimaging. **Theranostics**, v. 12, n. 10, p. 4536–4547, 2022. DOI: 10.7150/thno.71443
- BLUM, R.H.; CARTER, S.K. A new anticancer drug with significant clinical activity. **Annals of Internal Medicine**, v. 80, p. 249-259, 1974. DOI: 10.7326/0003-4819-80-2-249
- BORGES, J.B.R. *et al.* Avaliação por Doppler colorido do carcinoma da mama: correlação com dados clínicos e histopatológicos. **Radiologia Brasileira**, v. 37, n. 5, p. 323-328, 2004. DOI: 10.1590/S0100-39842004000500004
- BRASIL. **Ministério do Meio Ambiente e Mudança do Clima**. Cerrado. Governo Federal. Brasília, DF. 2022. Disponível em <<<https://www.gov.br/mma/pt-br/assuntos/ecossistemas-1/biomas/cerrado>>> Acesso em: 06 ago. 2023.
- BRAZ, J. DE V. C. *et al.* Mechanism of Action of Limonene in Tumor Cells: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Current Pharmaceutical Design**, v. 27, n. 26, p. 2956–2965, 2021. DOI: 10.2174/1381612826666201026152902
- BRAZ, J. DE V. C.; JÚNIOR, J. A. C. N.; SERAFINI, M. R. Terpenes with Antitumor Activity: A Patent Review. **Recent Patents on Anti-Cancer Drug Discovery**, v. 15, n. 4, p. 321–328, 2020. DOI: 10.2174/1574892815666201002162315
- CAO, H. *et al.* Albumin Biomimetic Nanocorona Improves Tumor Targeting and Penetration for Synergistic Therapy of Metastatic Breast Cancer. **Advanced Functional Materials**, v. 27, n. 11, p. 1605679, 2017. DOI: 10.1002/adfm.201605679
- CARDOSO, C.A.L. *et al.* Antimicrobial Activity of the Extracts and Fractions of Hexanic Fruits of *Campomanesia* Species (Myrtaceae). **Journal of Medicinal Food**, v.13, n. 5, p. 1273-1276, 2010. DOI: 10.1089/jmf.2009.0047
- CARNEVALI, T. DE O. *et al.* Estudo Anatômico Comparativo da Guavira (*Campomanesia adamantium* CAMB.). **Horticultura Brasileira**, v. 26, n. 2, 2008. Disponível em <<http://www.abhorticultura.com.br/eventos/trabalhos/ev_2/a1059_t2260_comp.pdf>> Acesso em: 08 dez. 2022.

- CHEN, M. *et al.* Mitochondria targeting IR780-based nanoGUMBOS for enhanced selective toxicity towards cancer cells. **The Royal Society of Chemistry Advances**, v. 8, p. 31700-31709, 2018. DOI: 10.1039/C8RA05484C
- CHENG, Y. *et al.* Perfluorocarbon nanoparticles enhance reactive oxygen levels and tumour growth inhibition in photodynamic therapy. **Nature Communications**, v. 6, n. 1, p. 8785, 2015. DOI: 10.1038/ncomms9785
- CONESA, C. M. *et al.* *In vitro* and *in vivo* effect of IFN α on B16F10 melanoma in two models: Subcutaneous (C57BL6J mice) and lung metastasis (Swiss mice). **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 63, n. 4, p. 305–312, 2009. DOI: 10.1016/j.biopha.2008.07.092
- COUTINHO, I.D. *et al.* Determination of phenolic compounds and evaluation of antioxidant capacity of *Campomanesia adamantium* leaves. **Eclética Química**, v.33, n. 4, p. 53–60, 2008. DOI: 10.1590/S0100-46702008000400007
- EISENBERG, A.L.A.; KOIFMAN, S. Câncer de mama: marcadores tumorais (Revisão de Literatura). **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 47, n. 4, p. 377-88, 2001. DOI: 10.32635/2176-9745.RBC.2001v47n4.2300
- FERNANDES, T.O. *et al.* *Campomanesia adamantium* (Myrtaceae) fruits protect HEPG2 cells against carbon tetrachloride-induced toxicity. **Toxicology Reports**, v. 2, p. 184-193, 2015. DOI: 10.1016/j.toxrep.2014.11.018
- FERREIRA, L.C. *et al.* Anti-inflammatory and antinociceptive activities of *Campomanesia adamantium*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 145, p. 100–108, 2013. DOI: 10.1016/j.jep.2012.10.037
- FERREIRA, S.H. *et al.* **Medicamentos a partir de plantas medicinais no Brasil**. Ministério da Ciência e Tecnologia. Brasília, DF. 134 p. 1998.
- GADELHA, M.I.P. Validade dos marcadores tumorais. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 44, n. 3, p. 211-224, 1998.
- GUIMARÃES, G.M.; COSTA, D.H.; SILVA, T.S. A importância da cintilografia óssea na descoberta de metástase em câncer de mama. **E-Acadêmica**, v. 4, n. 2, p. e1842471, 2023. DOI: 10.52076/eacad-v4i2.471
- HE, W. *et al.* Rational Design of a New Self-Codelivery System from Redox-Sensitive Camptothecin-Cytarabine Conjugate Assembly for Effectively Synergistic Anticancer Therapy. **Advanced Healthcare Materials**, v. 6, n. 24, p. 1700829, 2017. DOI: 10.1002/adhm.201700829
- INCA, 2023. **Quimioterapia**. Instituto Nacional do Câncer, Ministério da Saúde. Brasil, 2022. Disponível em <<<https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/cancer/tratamento/quimioterapia>>> Acesso em: 30 mai. 2023.

INCA, 2022a. **O que é câncer?** Instituto Nacional do Câncer, Ministério da Saúde. Brasil, 2022. Disponível em <<<https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/cancer/o-que-e-cancer>>> Acesso em: 08 dez. 2022.

INCA, 2022b. **INCA estima 704 mil casos de câncer por ano no Brasil até 2025.** Instituto Nacional do Câncer, Ministério da Saúde. Brasil, 2022. Disponível em <<<https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/noticias/2022/inca-estima-704-mil-casos-de-cancer-por-ano-no-brasil-ate-2025>>> Acesso em: 08 dez. 2022.

INCA, 2022c. **Brasil - estimativa dos casos novos.** Instituto Nacional do Câncer, Ministério da Saúde. Brasil, 2022. Disponível em <<<https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/cancer/numeros/estimativa/estado-capital/brasil>>> Acesso em: 08 dez. 2022.

INCA, 2022d. **Melanoma maligno da pele (taxas ajustadas).** Instituto Nacional do Câncer, Ministério da Saúde. Brasil, 2022. Disponível em <<<https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/cancer/numeros/estimativa/por-neoplasia-taxas-ajustadas/pele-melanoma>>> Acesso em: 08 dez. 2022.

INCA, 2022e. **Câncer de pele melanoma.** Instituto Nacional do Câncer, Ministério da Saúde. Brasil, 2022. Disponível em <<<https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/cancer/tipos/pele-melanoma#:~:text=O%20c%C3%A2ncer%20de%20pele%20melanoma,de%20manchas%2C%20pintas%20ou%20sinais.>>> Acesso em: 08 dez. 2022.

INCA, 2022f. **Tratamento do Câncer.** Instituto Nacional do Câncer, Ministério da Saúde. Brasil, 2022. Disponível em <<<https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/cancer/tratamento#:~:text=O%20tratamento%20do%20c%C3%A2ncer%20pode,c%20ombinar%20mais%20de%20uma%20modalidade.&text=Veja%20tamb%C3%A9m%3A%20Cuidados%20paliativos.,Tabagismo%20para%20pacientes%20do%20INCA.>>> Acesso em: 08 ago. 2023.

INCA, 2021. **Detecção precoce do câncer.** Rio de Janeiro: Ministério da Saúde, 2021.

INCA, 2011. **ABC do Câncer: abordagens básicas para o controle do câncer.** Instituto Nacional do Câncer, Ministério da Saúde. Brasil, 2011. Disponível em <<https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/abc_do_cancer.pdf>> Acesso em: 24 abr. 2022.

INDRAYANTO, G.; PUTRA, G.S.; SUHUD, F. Validation of *in-vitro* bioassay methods: application in herbal drug research. **Profiles of Drug, Substances, Excipients, and Related Methodology**, v. 46, p. 273-307, 2021. DOI: 10.1016/bs.podrm.2020.07.005

ITHARAT, A. *et al.* In vitro cytotoxic activity of Thai medicinal plants used traditionally to treat cancer. **J. Ethnopharmacol**, v. 90, p. 33-38, 2004. DOI: 10.1016/j.jep.2003.09.014

JIANG, C. *et al.* Hydrophobic IR780 encapsulated in biodegradable human serum albumin nanoparticles for photothermal and photodynamic therapy. **Acta Biomaterialia**, v. 14, p. 61–69, 2015. DOI: 10.1016/j.actbio.2014.11.041

- KUANG, Y. *et al.* Hydrophobic IR-780 Dye Encapsulated in cRGD-Conjugated Solid Lipid Nanoparticles for NIR Imaging-Guided Photothermal Therapy. **ACS Applied Materials & Interfaces**, v. 9, n. 14, p. 12217–12226, 2017. DOI: 10.1021/acsami.6b16705
- KUHLMANN, M. **Frutos e sementes do Cerrado: espécies atrativas para a fauna**. V. 1, 2 ed. Brasília: M. K. Peres, 238 p. 2018.
- LESCANO, C.H. *et al.* *Campomanesia adamantium* Peel Extract in Antidiarrheal Activity: The Ability of Inhibition of Heat-Stable Enterotoxin by Polyphenols. **PLoS ONE**, v.11, n. 10, p. e0165208, 2016. DOI: 10.1371/journal.pone.0165208
- LI, H. *et al.* Dual-function nanostructured lipid carriers to deliver IR780 for breast cancer treatment: Anti-metastatic and photothermal anti-tumor therapy. **Acta Biomaterialia**, v. 53, p. 399–413, 2017. DOI: 10.1016/j.actbio.2017.01.070
- LIMA E SILVA, M. C. B. **Bioprospecção de extratos de frutos do cerrado com potencial antiproliferativo e estudo químico e efeitos tóxico, genotóxico e antitumoral do extrato mais ativo em células neoplásicas de melanoma murino-B16-F10**. 2018. 138f. Tese (Doutorado em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste), Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 2018.
- LIMA E SILVA, M. C. B. *et al.* Antiproliferative Activity of Extracts of *Campomanesia adamantium* (Cambess.) O. Berg and Isolated Compound Dimethylchalcone Against B16-F10 Murine Melanoma. **Journal of Medicinal Food**, v. 21, n. 10, p. 1024–1034, 2018. DOI: 10.1089/jmf.2018.0001
- LONG, L. *et al.* Effects of Human Serum Albumin on the Fluorescence Intensity and Tumor Imaging Properties of IR-780 Dye. **Photochemistry and Photobiology**, v. 98, n. 4, p. 935–944, 2022. 1. DOI: 10.1111/php.13547
- LU, Y.-J. *et al.* Liposomal IR-780 as a Highly Stable Nanotheranostic Agent for Improved Photothermal/Photodynamic Therapy of Brain Tumors by Convection-Enhanced Delivery. **Cancers**, v. 13, n. 15, p. 3690, 2021. DOI: 10.3390/cancers13153690
- MAGALHÃES, W. L. E.; THÁ, E. L.; LEME, D. M. Método de determinação de concentrações não citotóxicas para avaliação da capacidade protetora da lignina contra danos ao DNA. **Comunicado Técnico EMBRAPA**, Colombo-PR, nº 427, p. 3, dez. 2018. Disponível em <<<https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/1104215/1/CT4271572final2.pdf>>> Acesso em: 13 set. 2022.
- MARTELLO, M.D. *et al.* *Campomanesia adamantium* extract induces DNA damage, apoptosis, and affects cyclophosphamide metabolism. **Genetics and Molecular Research**, v. 15, n. 2, 2016. DOI: 10.4238/gmr.15027678.
- MILANESI, R.; CAREGNATO, R. C. A. Intra-abdominal pressure: an integrative review. **Einstein (São Paulo)**, v. 14, n. 3, p. 423–430, 2016. DOI: 10.1590/S1679-45082016RW3088

MMA, 2022. **Cerrado**. Ministério do Meio Ambiente. Brasil, 2022. Disponível em <<<https://www.gov.br/mma/pt-br/assuntos/ecossistemas-1/biomas/cerrado>>> Acesso em: 08 dez. 2022.

MONKS, A. *et al.* Feasibility of a High-Flux Anticancer Drug Screen Using a Diverse Panel of Cultured Human Tumor Cell Lines. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 83, n. 11, p. 757–766, 1991. DOI: 10.1093/jnci/83.11.757

MOURA, L.R. *et al.* Ação do extrato etanólico da casca de pequi (*Caryocar brasiliense*) na cardiotoxicidade crônica induzida por doxorubicina em ratos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 37, n. 7, p. 713-724, 2017. DOI: 10.1590/S0100-736X2017000700011

MS, 2017. Lei Estadual nº 5.082, de 08 de novembro de 2017. Declara a guavira (*Campomanesia spp.*) como fruto símbolo do Estado de Mato Grosso do Sul e dá outras providências. Diário Oficial do Estado de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS. p. 01. 2017. Disponível em <<[MURILLO, L.C; SUTACHAN, J.J.; ALBARRACÍN, S.L. An update on neurobiological mechanisms involved in the development of chemotherapy-induced cognitive impairment \(CICI\). **Toxicology Reports**, v. 10, p. 544-553, 2023. DOI: 10.1016/j.toxrep.2023.04.015](https://www.spdo.ms.gov.br/diariodoe/Index/PaginaDocumento/44948/?Pagina=1#:~:text=LEI%20N%C2%BA%205.082%2C%20DE%207,DE%20MATO%20GROSSO%20DO%20SUL.>> Acesso em: 08 jan. 2023.</p>
</div>
<div data-bbox=)

NIH, 2022. **Cancer Stat Facts: Melanoma of the Skin**. National Institutes of Health, U.S. Department of Health and Human Services. United States of America, 2018. Disponível em <<<https://seer.cancer.gov/statfacts/html/melan.html>>> Acesso em: 08 dez. 2022.

ONCOGUIA, 2021. **Uso da quimioterapia no tratamento do câncer**. ONG Oncoguia. Brasil, 2021. Disponível em <<<http://www.oncoguia.org.br/conteudo/quimioterapia/3701/50/>>> Acesso em: 30 mai. 2023.

ONCOGUIA, 2020. **Estatística para câncer de pele melanoma**. ONG Oncoguia. Brasil, 2020. Disponível em <<<http://www.oncoguia.org.br/conteudo/estatistia-para-cancer-de-pele-melanoma/7066/186/>>> Acesso em: 08 jan. 2023.

OPAS/OMS, 2020. **Câncer**. Organização Pan-Americana de Saúde, Escritório Regional para as Américas da Organização Mundial da Saúde, 2020. Disponível em <<[OU-YANG, H.; STAMATAS, G.; KOLLIAS, N. Spectral Responses of Melanin to Ultraviolet A Irradiation. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 122, n. 2, p. 492–496, 2004. DOI: 10.1046/j.0022-202X.2004.22247.x](https://www.paho.org/pt/topicos/cancer#:~:text=O%20c%C3%A2ncer%20C3%A9%20uma%20das%20principais%20causas%20de%20morte%20no,2%2C09%20milh%C3%B5es%20de%20casos)>> Acesso em: 08 dez. 2022.</p>
</div>
<div data-bbox=)

PAIS-SILVA, C.; DE MELO-DIOGO, D.; CORREIA, I. J. IR780-loaded TPGS-TOS micelles for breast cancer photodynamic therapy. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 113, p. 108–117, 2017. 1. DOI: 10.1016/j.ejpb.2017.01.002

- PAPAVRAMIDIS, T. *et al.* Abdominal compartment syndrome - Intra-abdominal hypertension: Defining, diagnosing, and managing. **Journal of Emergencies, Trauma, and Shock**, v. 4, n. 2, p. 279, 2011. DOI: 10.4103/0974-2700.82224
- PASCOAL, A.C. *et al.* Antiproliferative activity and induction of apoptosis in PC-3 cells by the chalcone cardamonin from *Campomanesia adamantium* (Myrtaceae) in a bioactivity-guided study. **Molecules**, v. 19, n. 2, p. 1843-1855, 2014. DOI: 10.3390/molecules19021843
- PASCOAL, A.C. *et al.* Free radical scavenging activity, determination of phenolic compounds and HPLC-DAD/ESI-MS profile of *Campomanesia adamantium* leaves. **Natural Product Communications**, v. 6, n. 7, p. 969-972, 2011. DOI: 10.1177/1934578X1100600711
- PAVAN, F.R. *et al.* Evaluation of anti-mycobacterium tuberculosis activity of *Campomanesia adamantium* (Myrtaceae). **Química Nova**, v. 32, n. 5, p. 1222–1226, 2009. DOI: 10.1590/S0100-40422009000500026
- PENG, C.-L. *et al.* Multimodal Image-Guided Photothermal Therapy Mediated by ¹⁸⁸ Re-Labeled Micelles Containing a Cyanine-Type Photosensitizer. **ACS Nano**, v. 5, n. 7, p. 5594–5607, 2011. DOI: 10.1021/nn201100m
- POTÉZ, M. *et al.* Characterization of a B16-F10 melanoma model locally implanted into the ear pinnae of C57BL/6 mice. **PLoS ONE**, v. 13, p. e0206693, 2018. DOI: 10.1371/journal.pone.0206693.
- POTT, A.; POTT, V.J. **Plantas do Pantanal**. Embrapa: Centro de Pesquisa Agropecuária do Pantanal, Corumbá: Embrapa-SPI, 320 p., 1994.
- RAMOS, D.D.; CARDOSO, C.A.L.; YAMAMOTO, N.T. Avaliação do potencial citotóxico e atividade antioxidante em *Campomanesia adamantium* (Cambess.) O. Berg (Myrtaceae). **Revista Brasileira de Biociências**, v.5, n. 2, p. 774-776, 2007.
- RILEY, P. Melanin. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 29, n. 11, p. 1235–1239, 1997. DOI: 10.1016/S1357-2725(97)00013-7
- SHEN, C. *et al.* Hyperbaric oxygen enhanced the chemotherapy of mitochondrial targeting molecule IR-780 in bladder cancer. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, v. 149, n. 2, p. 683-699, 2022. DOI: 10.1007/s00432-022-04385-4
- SHIH, Y.-H. *et al.* EGFR-targeted micelles containing near-infrared dye for enhanced photothermal therapy in colorectal cancer. **Journal of Controlled Release**, v. 258, p. 196–207, 2017. DOI: 10.1016/j.jconrel.2017.04.031
- SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P. A pesquisa e a produção brasileira de medicamentos a partir de plantas medicinais: a necessária interação da indústria com a academia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 12, n. 1, p. 35-40, 2002. DOI: 10.1590/S0102-695X2002000100005

SKEHAN, P. *et al.* New Colorimetric Cytotoxicity Assay For Anticancer-Drug Screening. **Journal of The National Cancer Institute**, v. 82, n° 13, p. 1107-1112, 1990. DOI: 10.1093/jnci/82.13.1107

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CIRURGIA ONCOLÓGICA, 2022. **Quando é necessário cirurgia para o tratamento de câncer de pele (melanoma maligno)?** SBCO Associação Médica Brasileira. Brasil, 2022. Disponível em <<[SOUZA, J.C. *et al.* Toxicological analysis and antihyperalgesic, antidepressant, and anti-inflammatory effects of *Campomanesia adamantium* fruit barks. **Nutritional Neuroscience**, v.20, n. 1, p. 23-31, 2017. DOI: 10.1179/1476830514Y.0000000145](https://sbco.org.br/cancer-pele-melanoma-maligno/#:~:text=O%20c%C3%A2ncer%20de%20pele%20chamado,de%20manchas%2C%20pintas%20ou%20sinais.>> Acesso em: 30 mai. 2023.</p>
</div>
<div data-bbox=)

VALLILO, M. I. *et al.* Composição química dos frutos de *Campomanesia adamantium* (Cambessédes) O.Berg. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 4, p. 805–810, 2006. DOI: 10.1590/S0101-20612006000400015

VELASQUEZ, C. A. C. *et al.* Tumor maligno derivado de melanocitos en piel de un bovino de presentación inusual: estudio de caso. **Revista de Medicina Veterinaria**, v. 29, p. 63-72, 2015.

WANG, J. *et al.* Design, synthesis and application of near-infrared fluorescence probe IR-780-Crizotinib in detection of ALK positive tumors. **Protein Expression and Purification**, v. 187, p. 105952, 2021. DOI: 10.1016/j.pep.2021.105952

WANG, Y. *et al.* Preferential accumulation of the near infrared heptamethine dye IR-780 in the mitochondria of drug-resistant lung cancer cells. **Biomaterials**, v. 35, p. 4116-4124, 2014. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2014.01.061

WOLF, M. P. *et al.* FRET in a Polymeric Nanocarrier: IR-780 and IR-780-PDMS. **Biomacromolecules**, v. 20, n. 11, p. 4065–4074, 2019. DOI: 10.1021/acs.biomac.9b00823

YAN, F. *et al.* NIR-Laser-Controlled Drug Release from DOX/IR-780-Loaded Temperature-Sensitive-Liposomes for Chemo-Photothermal Synergistic Tumor Therapy. **Theranostics**, v. 6, n. 13, p. 2337–2351, 2016. DOI: 10.7150/thno.14937

YANG, H. *et al.* Preparation of multifunctional nanobubbles and their application in bimodal imaging and targeted combination therapy of early pancreatic cancer. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 6254, 2021. DOI: 10.1038/s41598-021-82602-9

YANG, H. *et al.* A new strategy for accurate targeted diagnosis and treatment of cutaneous malignant melanoma: dual-mode phase-change lipid nanodroplets as ultrasound contrast agents. **International Journal of Nanomedicine**, v. 14, p. 7079–7093, 2019. DOI: 10.2147/IJN.S207419

YUAN, A. *et al.* Self-assembled PEG-IR-780-C13 micelle as a targeting, safe and highly-effective photothermal agent for in vivo imaging and cancer therapy. **Biomaterials**, v. 51, p. 184–193, 2015. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2015.01.069

YUE, C. *et al.* Mitochondria-targeting Near-infrared Light-triggered Thermosensitive Liposomes for Localized Photothermal and Photodynamic Ablation of Tumors Combined with Chemotherapy. **Nanoscale**, v. 9, p. 11103-11118, 2017. DOI: 10.1039/C7NR02193C.

YUE, C. *et al.* IR-780 dye loaded tumor targeting theranostic nanoparticles for NIR imaging and photothermal therapy. **Biomaterials**, v. 34, n. 28, p. 6853–6861, 2013. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2013.05.071

ZHANG, C. *et al.* A near-infrared fluorescent heptamethine indocyanine dye with preferential tumor accumulation for in vivo imaging. **Biomaterials**, v. 31, n. 25, p. 6612–6617, 2010. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2010.05.007

ZHANG, E. *et al.* Mechanistic study of IR-780 dye as a potential tumor targeting and drug delivery agent. **Biomaterials**, v. 35, n. 2, p. 771–778, 2014. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2013.10.033

ZHENG, Y. *et al.* Coupling the near-infrared fluorescent dye IR-780 with cabazitaxel makes renal cell carcinoma chemotherapy possible. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 116, p. 109001, 2019. DOI: 10.1016/j.biopha.2019.109001

APÊNDICE A – Artigo submetido na revista Journal of Medicinal Food
Journal of Medicinal Food

Journal of
MEDICINAL FOOD

Journal of Medicinal Food: <http://mc.manuscriptcentral.com/medicinalfood>

**New evidences of antiproliferative activity of
Campomanesia adamantium (Cambess.) O. Berg extracts in
melanoma lung metastasis.**

Journal:	<i>Journal of Medicinal Food</i>
Manuscript ID	JMF-2023-0028.R1
Manuscript Type:	Original Article
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Salomão, Evelyn; Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Medical School (FAMED), Nascimento, Valter; Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Medical School (FAMED), Silva, Iandara ; Universidade Federal de Mato Grosso do Sul Aiko Hiane, Priscila ; Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, FACFAN Gielow, Karine; Federal University of Mato Grosso do Sul Guimaraes, Rita de Cassia; Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, School of Pharmaceutical Sciences, Foods and Nutrition (FACFAN), Palhares, Murillo; Universidade Federal de Mato Grosso do Sul Bogo, Danielle; Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, School of Pharmaceutical Sciences, Foods and Nutrition (FACFAN),
Keyword:	Anticancer Activity, Cancer Cells, mice, fruitextract
Manuscript Keywords (Search Terms):	B16-F10, IR-780, Guavira, Cerrado

SCHOLARONE™
Manuscripts

Article

Investigating Effects of IR-780 in Animal Models of B16-F10 Melanoma: New Approach in Lung Metastasis

Evelyn de Andrade Salomão ^{1,*}, Valter Aragão do Nascimento ¹ , Caio Fernando Ramalho de Oliveira ², Iandara Schettert Silva ³, Rita de Cássia Avellaneda Guimarães ¹ and Danielle Bogo ¹

¹ Graduate Program in Health and Development in Central-West Region, Federal University of Mato Grosso do Sul (UFMS), Campo Grande 79070-900, Brazil; aragao60@hotmail.com (V.A.d.N.); rita.guimaraes@ufms.br (R.d.C.A.G.); danielle.bogo@ufms.br (D.B.)

² Federal Institute of Mato Grosso, Guarantã do Norte 78520-000, Brazil; caio.oliveira@ifmt.edu.br

³ Federal University of Mato Grosso do Sul (UFMS), Campo Grande 79070-900, Brazil; ian.da.ra@hotmail.com

* Correspondence: evelyn.salomao@ufms.br

Abstract: IR-780 is a fluorescent marker, photostable and non-toxic, and is widely used in tumor targeting; however, studies on the impact of IR-780 in animal models of B16-F10 melanoma are scarce in the literature. Therefore, this study aims to analyze behavior of this marker in melanoma cells using in vitro and in vivo analyses with fluorescence microscopy to conduct an analysis of cell culture, and an in vivo imaging system for an analysis of cell culture, tumor targeting on animals, and organ examination. In vitro analysis showed that B16-F10 cells at a concentration of 2×10^5 cells.plate⁻¹ allowed a better visualization using 20 μ M of IR-780. Furthermore, the location of IR-780 accumulation was confirmed by its fluorescence microscopy. Through in vivo studies, fluorescence was not observed in subcutaneous nodules, and it was found that animals that received intraperitoneal injection of B16-F10 cells presented ascites and did not absorb IR-780. Additionally, animals exhibiting lung metastasis showed fluorescence in ex vivo lung images. Therefore, use of the IR-780 marker for evaluating the progression of tumor growth did not demonstrate efficiency; however, it was effective in diagnosing pulmonary metastatic tumors. Although this marker presented limitations, results of evaluating pulmonary involvement through ex vivo fluorescence imaging were determined based on intensity of fluorescence.

Keywords: biomarker; fluorescence; in vivo imaging



Citation: Salomão, E.d.A.; Nascimento, V.A.d.; de Oliveira, C.F.R.; Silva, I.S.; Guimarães, R.d.C.A.; Bogo, D. Investigating Effects of IR-780 in Animal Models of B16-F10 Melanoma: New Approach in Lung Metastasis. *Molecules* **2023**, *28*, 6942. <https://doi.org/10.3390/molecules28196942>

Academic Editor: Takuya Terai

Received: 17 May 2023

Revised: 19 June 2023

Accepted: 27 June 2023

Published: 5 October 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Melanoma skin cancer is considered a serious disease due to its high possibility of metastasis. If detected in its early stages, melanoma has a favorable prognosis. However, when metastasis is diagnosed, the patient's five-year survival rate is 31.9% [1,2]. To understand the development or treatment of various types of cancer in humans, in recent years animal models are the most used to produce reliable data with clinical translation [3]. In this case, in both human and animal models, detection of tumor biomarkers in body fluids is the most non-invasive way to identify the developmental stage of a tumor [4]. In this way, fluorescence markers are widely used in medicine for cancer diagnoses [5–7]. A good marker should have certain characteristics such as low toxicity, short half-life, and fluorescence in a sufficient period for reliable diagnosis [8].

In vitro studies with the B16-F10 melanoma cell lineage generally use markers such as DAPI, CD31 (immunofluorescent monoclonal antibody) [9], Methylene blue [10], Phalloidin-Fluor 488, and Deep Red Plasma Membrane Stain [11], among others. They also perform cellular modifications by adding plasmids containing the GFP (green fluorescence protein) gene [12] or luciferase [13]. However, there are few studies that present in vivo or ex vivo tumor monitoring of B16-F10 using an in vivo imaging system, especially using the IR-780 marker.

This marker is a lipophilic cation with a molecular weight of 667 Da, which is photostable and non-toxic [14–16]. Its selective mitochondrial uptake is energy-dependent, membrane potential-dependent, and facilitated by organic anion-transporting peptides (OATPs) [17]. Plasma proteins also play an important role in the marker's uptake by tumor cells. IR-780 has the ability to form non-covalent complexes with plasma albumin, which enhances its fluorescence capacity [18].

IR-780 has been used in a wide variety of tumor cells and in vivo studies, such as in cancer cell lineages of human renal adenocarcinoma (786-O; ACHN) in nude mice [19]; human breast adenocarcinoma (MCF-7), human cervix adenocarcinoma (HeLa) and human osteosarcoma (MG-63) cells in athymic nude mice [20]; mouse mammary carcinoma (4T1) in BALB/c mice [21,22] and nude mice [23]; human glioblastoma (U-87 MG) in athymic nude mice [24]; human colon carcinoma (HCT 116) and adenocarcinoma (SW 620) in nude mice [25]; human melanoma (SK-Mel-28) in nude BALB/c mice [26]; mouse lung carcinoma (LL/2) in BALB/c athymic nude mice [27]; human pancreatic carcinoma (MIA-Pa-Ca2) in BALB/c nude mice [28]; and human lung adenocarcinoma (NCI-H3122) and MCF-7 in immune-deficient nude mice [29]. In addition to being used as a fluorescence marker for in vivo tumor detection, IR-780 is also used in photothermal therapies due to its ability to generate heat and reactive oxygen species (ROS) [30].

The aim of the study was using a new approach to evaluate the development of a murine melanoma tumor of B16-F10 cell line in BALB/c mice and investigate the effects of using the tumor marker IR-780 in vitro and in vivo tests in three animal models using the In-Vivo Xtreme imaging system.

2. Results

2.1. In Vitro IR-780 Uptake in B16-F10

From cellular analysis, the concentration of 2×10^5 allowed for better visualization by presenting a defined monolayer, without cell overlap (Figure 1(a1)). The concentrations of 40 μ M and 80 μ M of IR-780 presented small dye crystals, meaning that their solubility was compromised, resulting in saturation of medium (Figure 1(b1,c1)). At the highest concentration (80 μ M), it was observed that cells entered in apoptosis in approximately 10 min, resulting in a gradual loss of fluorescence. Therefore, a cell concentration of 2×10^5 with 20 μ M of IR-780 was considered more effective for the analyses.

Images obtained through In-Vivo Xtreme demonstrated results similar to those observed in fluorescence microscopy. In this case, for the concentration of 80 μ M of IR-780 (Figure 2(a3,b3,c3)) it was observed that the image presented fluorescence, but in smaller areas when compared to concentrations of 20 μ M and 40 μ M (Figure 2(a1,a2,b1,b2,c1,c2)), corroborating the information that apoptosis interferes with the emission of fluorescence.

2.2. In Vitro IR-780 Accumulation in B16-F10

Hoechst 33342 nuclear dye was used as a contrast effect. In this case, the location of IR-780 accumulation was confirmed through its delimited fluorescence in the cellular cytosol (Figure 3b).

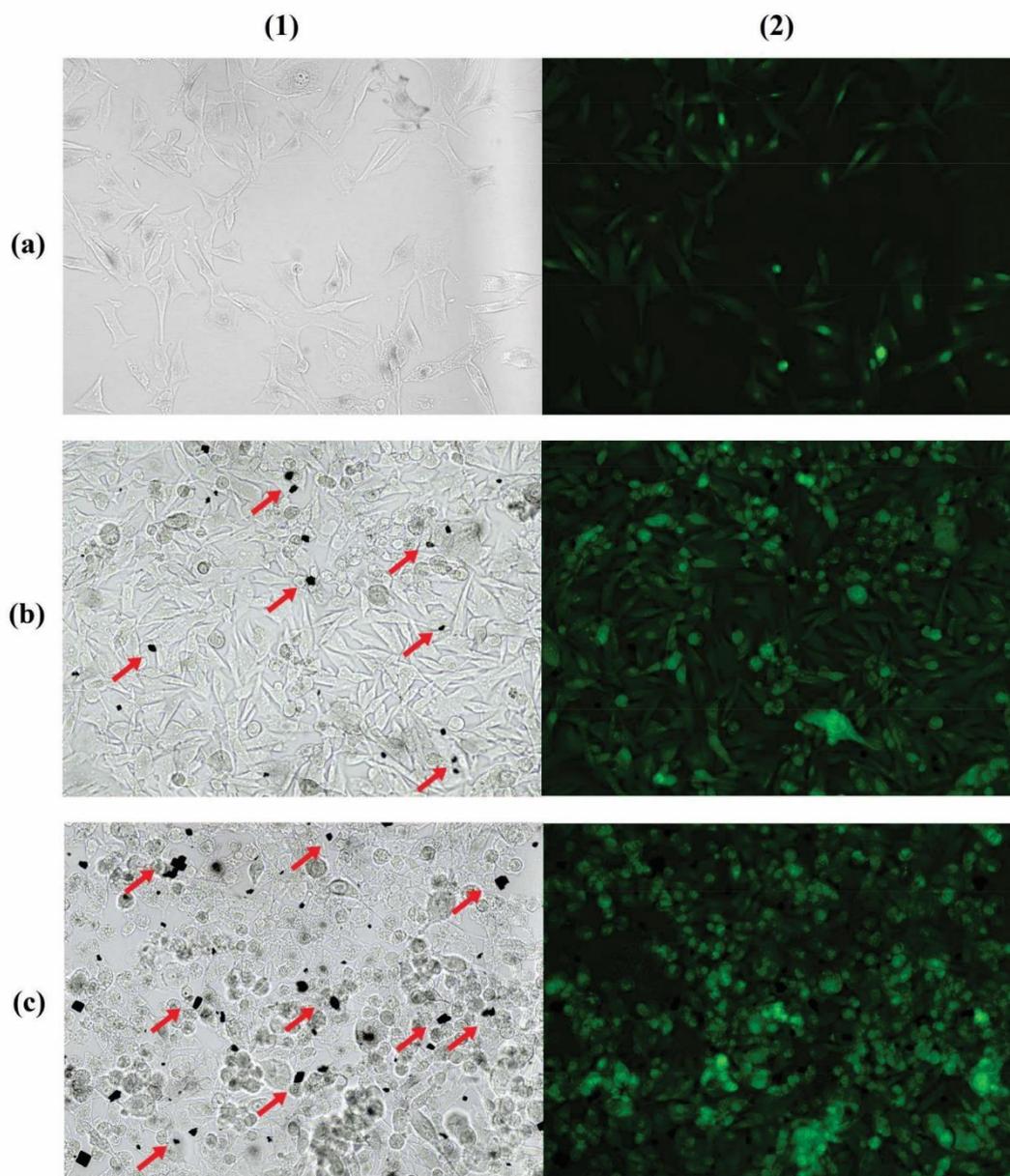


Figure 1. Bright field (1) and fluorescence microscopy (2) of cell concentration 2×10^5 cells with 20 μM IR-780 (a); 4×10^5 cells with 40 μM IR-780 (b); and 4×10^5 cells with 80 μM IR-780 (c). Red arrows indicate excess dye crystals at highest concentrations of IR-780. Obtained with Leica DM 2000 Led fluorescence microscope (200 \times).

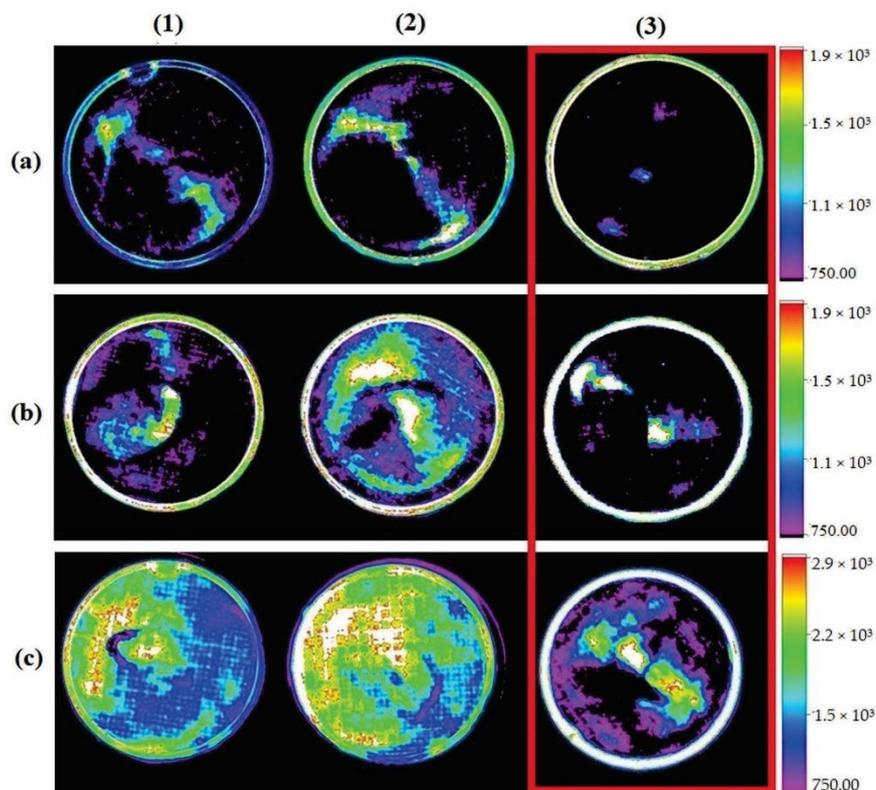


Figure 2. Image showing fluorescence emitted by the addition of IR-780 at concentrations of 20 μM (1), 40 μM (2), and 80 μM (3) in different cell concentrations: 1×10^5 (a), 2×10^5 (b), and 4×10^5 (c). Red highlight on highest concentration of IR-780 showing smaller areas of fluorescence. Obtained with In-Vivo Xtreme, Bruker.

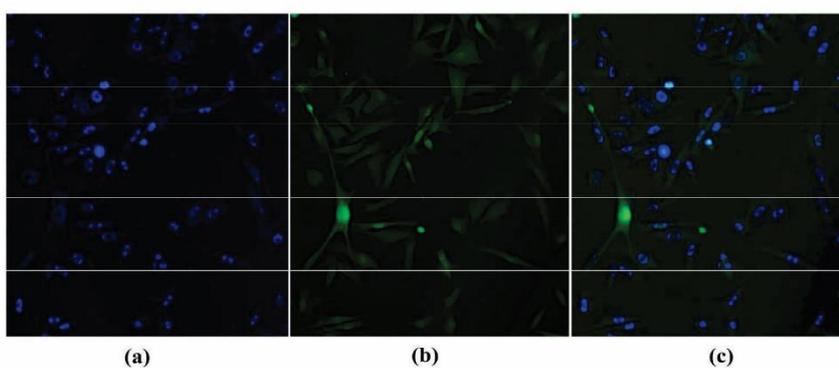


Figure 3. B16-F10 cell with its nuclei stained with Hoechst 33342 (a); cytosol stained with IR-780 (b); and overlaid images showing the difference between nucleus and cytosol (c). Obtained with Leica DM 2000 Led fluorescence microscope (200 \times).

2.3. In Vivo Models

For comparative purposes of tumor experimental models, a control animal was used under the same study conditions as the experimental groups, without receiving tumor cells,

only with IR-780 marker. However, the tumor-free animal presented fluorescence in caudal abdominal region (Figure 4).

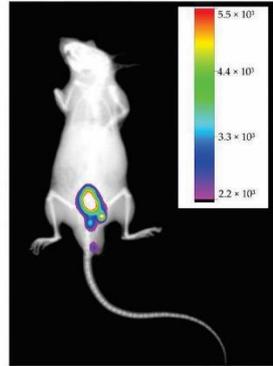


Figure 4. Negative control animal showing fluorescence in the caudal abdominal region and its fluorescence intensity scale. Obtained with In-Vivo Xtreme, Bruker.

2.3.1. Subcutaneous Melanoma

The animals subjected to subcutaneous injection of B16-F10 cells in the dorsal region developed nodules within 25 days (Figure 5a). After intraperitoneal administration of IR-780 in animals, fluorescence images were acquired using the In-Vivo Xtreme image system, which it was found through obtained fluorescence results that the caudal abdominal region presented the highest peak of fluorescence; on the other hand, the region near the nodules showed little or no fluorescence when evaluating the overall image of animal (Figure 5b).

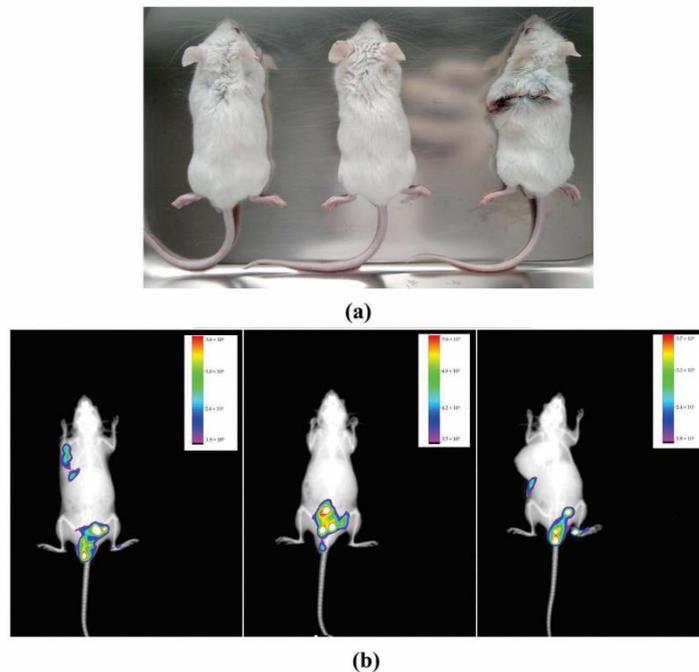


Figure 5. Animals showing visible dorsal subcutaneous nodules (a); images of animals in In-Vivo Xtreme image system with their respective fluorescence intensity scales (b). The images show higher fluorescence intensity in the caudal abdominal region and little or no fluorescence in the subcutaneous nodule region.

The organs of these animals were also analyzed by fluorescence, along with already-sectioned tumors. Livers and kidneys were analyzed because they are organs of metabolism and excretion, testicles because they are close to the areas of highest fluorescence intensity, and lungs because they are considered a target organ for metastasis when it comes to B16-F10 lineage. As expected, livers presented higher fluorescence intensity, but no tumor was able to emit significant fluorescence (Figure 6).

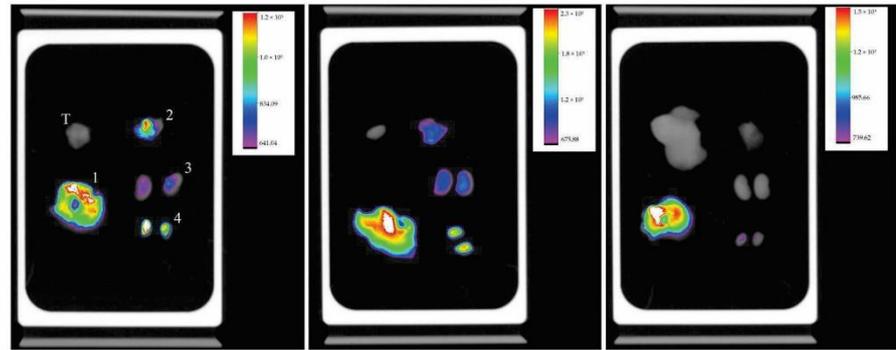


Figure 6. Organ's fluorescence image of three animals with their respective scales of fluorescence intensity acquired by the equipment In-Vivo Xtreme image system; liver (1), lungs (2), kidneys (3) testicles (4), and tumor (T), at the same sequence.

2.3.2. Pulmonary Metastasis: Intraperitoneal Inoculation

The animal model used for development of lung metastasis with intraperitoneal injection of tumor cells was not favorable for the study. On the thirtieth day, all three specimens showed abdominal swelling, as shown in Figure 7, compatible with ascites. However, this period was not sufficient for metastasis development.



Figure 7. All specimens in the group presented abdominal distension, compatible with ascites.

Images obtained from the In-Vivo Xtreme image system show a small area with higher fluorescence intensity in caudal abdominal region. Only in one animal were several areas of lower fluorescence intensity observed (Figure 8a), while animals with more pronounced ascites did not present disseminated fluorescence (Figure 8b,c). During necropsy, it was observed that none of animals had macroscopically visible lung metastases, but all had numerous tumor nodules widely disseminated throughout the abdominal mesentery (Figure 9).

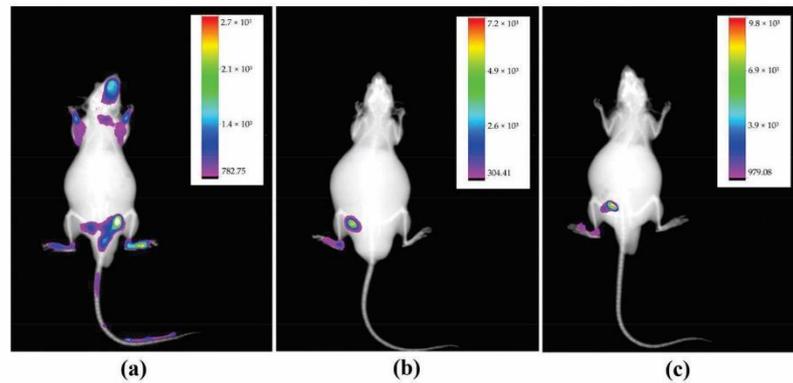


Figure 8. All animals in the group presented abdominal distension, compatible with ascites. One animal presented multiple areas of fluorescence (a), while animals with more pronounced ascites presented limited fluorescence images (b,c). Obtained with In-Vivo Xtreme, Bruker.

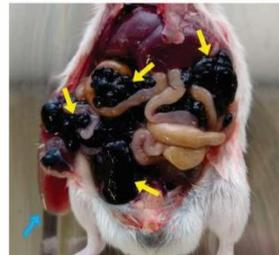


Figure 9. Abdominal necropsy. Several tumor nodules disseminated throughout mesentery are evidenced by yellow arrows; blue arrow demonstrates the ascitic fluid.

For the same reason as described earlier in the subcutaneous model, the chosen organs for analysis were liver, kidneys, lungs, and testicles. Animals with the highest amount of ascitic fluid did not show fluorescence in organs, indicating the possible difficulty in absorbing IR-780 (Figure 10b). The other two animals showed fluorescence in all organs, but the animal with less ascites showed a higher intensity of fluorescence (Figure 10a).

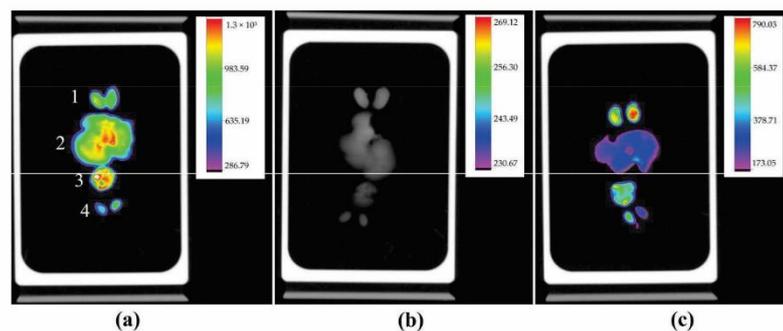


Figure 10. Organ fluorescence image of three animals with their respective scales of fluorescence intensity acquired by the In-Vivo Xtreme image system: kidneys (1), liver (2), lungs (3), and testicles (4), at the same sequence. Animal with a lower amount of ascitic fluid presenting higher fluorescence (a), animal with higher presence of ascites without fluorescence labeling (b), and animal with moderate ascites presenting low fluorescence intensity (c).

2.3.3. Pulmonary Metastasis: Intravenous Inoculation

The animals used as a model of lung metastasis by intravenous inoculation of B16-F10 cells were followed for 30 days, when they began to show behavioral changes such as lethargy and reduced food intake. As in other groups, IR-780 was administered prior to imaging, which showed the same pattern of fluorescence localized in the caudal abdominal region, with some points of fluorescence in the cranial region and no points in the lungs, a region of interest (Figure 11).

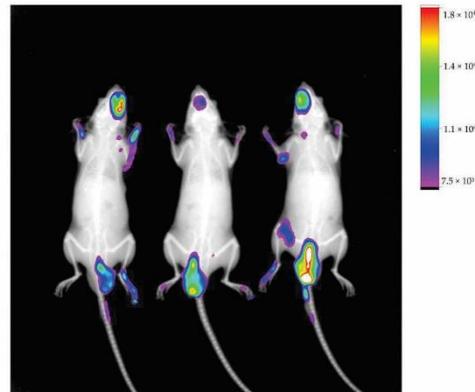


Figure 11. Image of animals with their respective fluorescence intensity scale, acquired with In-Vivo Xtreme image system. Showing regions of fluorescence in caudal abdominal region and some points in cranial region.

Maintaining the same evaluation criteria as the other groups, organs analyzed for the second model of lung metastasis were also the lungs, kidneys, testicles and liver. Images obtained by In-Vivo Xtreme showed that the lung with the most compromised surface by nodules did not show fluorescence (Figure 12a). The fluorescence image of other lungs was inversely proportional to number of superficial nodules, meaning that least compromised lung showed highest fluorescence (Figure 12c).

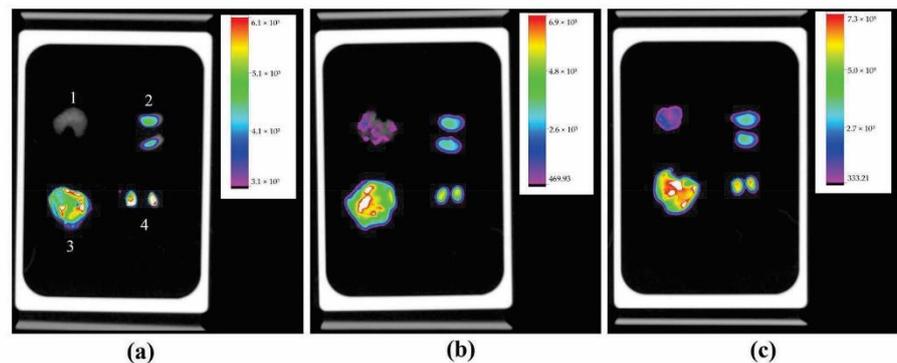


Figure 12. Fluorescence image of organs of three animals with their respective scales of fluorescence intensity acquired by equipment In-Vivo Xtreme image system; lungs (1), kidneys (2), liver (3), and testicles (4), at the same sequence. Lung with more nodules showing no fluorescence (a), lung with significant nodules with mild fluorescence (b), and less affected lung with higher fluorescence (c).

2.4. Metastatic Lung Macroscopic Evaluation

In a group with metastasis induced by intravenous injection of tumor cells, the model of pulmonary metastasis was confirmed by macroscopic evaluation of lungs, where the

presence of tumor nodules on the entire pleural surface of lungs was evident, as well as the difference in involvement between each lung. It was clear that Figure 13a was more involved compared to Figure 13b, which in turn was more involved than Figure 13c, corroborating with results obtained in fluorescence analysis.

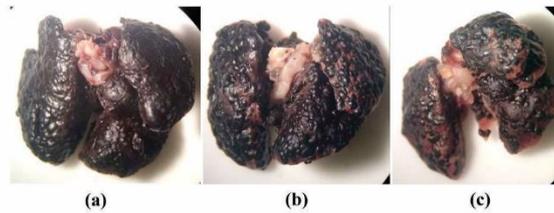


Figure 13. Macroscopic image of lung most affected by numerous malignant tumor nodules on pleural surface (a); lung with high involvement (b); lung with lower involvement (c).

2.5. Microscopic Evaluation

Metastatic lungs were used for histological analysis, which did not indicate any structural, inflammatory, or necrotic compromise. However, the tumor implantation percentage was high, with involvement of more than 90% of parenchyma lung (Figure 14a) and 99% of pleural surface (Figure 14b).

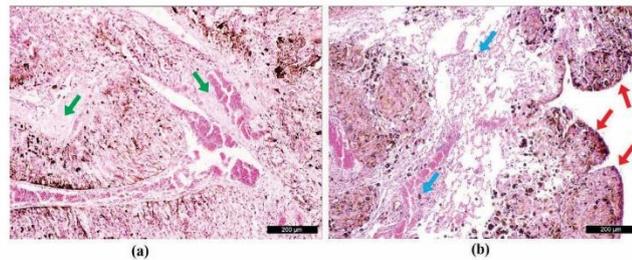


Figure 14. Histological image of the lung parenchyma with green arrows highlighting a few areas of intact tissue surrounded by metastatic tumor nodules (a), histological image of the lung pleura with red arrows showing nodules throughout the pleural surface and blue arrows demonstrating isolated foci of metastasis in lung parenchyma (b).

Histological analyses were also performed on organs that showed higher fluorescence to determine if there was any cellular implantation. However, intact tissue without signs of abnormal cell growth or inflammatory and necrotic processes was observed. Thus, it can be stated that there was no metastasis to other organs (images not presented).

3. Discussion

Our research demonstrates that a dose of 80 μM of IR-780 induces cellular apoptosis in approximately 10 min, corroborating with findings presented by Lu et al. [31] that IR-780 has apoptotic activity in glioblastoma cells observed through flow cytometry. Other studies using IR-780 at 15 μM in human bladder adenocarcinoma cells [32] and 10 μM in two lines of renal adenocarcinoma cells [19] also present an apoptotic effect. Therefore, with microscopic and radiographic analyses presented in our study, the concentration of 20 μM of IR-780 was sufficient to obtain labeling without causing cellular damage, and the concentration of 2×10^5 cells showed better confluence for microscopic cellular analysis. The accumulation of IR-780 in cellular cytosol corroborates with information from other studies that have demonstrated its affinity for mitochondria [17,33,34].

Studies also have shown the interaction of the IR-780 marker with other molecules in order to form stable nano-complexes or micelles with ability to selectively amplify cytotoxic

activity in tumor cells. Some of these interactions can occur with organic compounds, such as albumin, with which it forms weak non-covalent binding [18,23,35,36]. This kind of bind explains fluorescence images in animals with no tumor cells (Figure 4), where non-fluorescence images were expected.

In *in vivo* analysis, the present study used $0.45 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ of IR-780 intraperitoneally in BALB/c mouse strain without presenting any toxicological alterations to the animal. Zhang et al. [16] used $0.2 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ intravenously in athymic nude mice and Shen et al. [32] administered $3 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ intraperitoneally in mice; in both studies no toxicological alterations were reported. However, Jiang et al. [36] demonstrated IR-780 toxicity by administering $2.5 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ intravenously in BALB/c mice, resulting in 100% lethality. Therefore, the route of administration is a crucial factor in determining toxicity, as the concentration near $2.5 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ administered intravenously was lethal, while higher concentration of $3 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ administered intraperitoneally did not present any alterations in animals.

Use of fluorescence marker IR-780 in B16-F10 cells is rarely reported in literature. According to results obtained in our study, use of this marker for evaluation of subcutaneous tumor growth progression did not demonstrate efficiency, as obtained images were not focused on the tumor, as also shown by He et al. [37] who did not observe fluorescence in subcutaneous melanoma nodules using the same marker.

As observed, melanoma tumors have a dark coloration due to presence of melanin in large quantities and for this reason, the capture of fluorescence intensity by equipment is compromised, as melanin absorbs a broad spectrum of light [38]. For this reason, fluorescence images of subcutaneous nodules did not present results.

Low absorption of IR-780 in animals presenting ascites can be explained due to increased intraperitoneal pressure. This abdominal distension caused by inflammatory fluid has systemic repercussions causing several alterations, but mainly reduces blood flow and blocks lymphatic system of region; therefore, the marker absorption is reduced or does not occur [39,40].

Results of evaluation of lung involvement through *ex vivo* fluorescence images were defined and corroborated by histological and macroscopic analyses. As mentioned previously, the presence of melanin competes for absorption of light; therefore, this result should be interpreted as the higher fluorescence the intensity, the lower the tissue involvement. On the other hand, the lower the fluorescence intensity, the greater the tissue involvement by the tumor [41].

4. Materials and Methods

4.1. Cell Lines and Culture

Murine melanoma (B16-F10) was maintained in DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) Sigma-Aldrich (São Paulo, Brazil) with 10% of fetal bovine serum (Gibco™ Thermo Fisher (São Paulo, Brazil) and 1% streptomycin/penicillin ($100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ and $100 \text{ UI}\cdot\text{mL}^{-1}$, respectively) Sigma-Aldrich, kept at 37°C and atmosphere with 5% CO_2 .

4.2. IR-780 Iodide, Sigma-Aldrich

To stock solution of IR-780 iodide, $0.01 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$, diluted in DMSO Sigma-Aldrich, stored at 4°C away from direct light.

4.3. Fluorescence Analysis

The equipment used for fluorescence analyses of cell culture was a Leica DM 2000 Led fluorescence microscope with LAS V4.12 software. For analysis of cell culture and tumor targeting on animals and organs an In-Vivo Xtreme BI 4MP Bruker (Billerica, MA, USA) was used, with the foreground in fluorescence mode, a multi-wavelength light source, with the excitation filter at 760 and emission at 830, camera controls with standard exposure type, high speed mode, exposure time 2.0 s, Bin 2×2 pixels, FOV 19 cm, fStop 1.1, focal plane 0 mm and histogram in rainbow model. The background was in X-ray mode, with

kVp 45, exposure time of 0.1 s, Bin 1×1 pixel, fStop 2.8, focal plane 0 mm and grayscale histogram, using a Bruker Molecular Imaging software.

4.4. *In Vitro* IR-780 Uptake in B16-F10

The B16-F10 cell line was grown in Petri dishes for cell culture (32.8 mm with grid) at concentrations of 1×10^5 , 2×10^5 and 4×10^5 cells-plate⁻¹, incubated for 24 h. Each cell concentration received IR-780 at concentrations of 20 μ M, 40 μ M, and 80 μ M diluted in DMEM without fetal serum, from the stock solution, totaling nine plates. The plates were incubated for a further 4 h and after were carefully aspirated and washed with PBS. This process was three times repeated. Finally, cells were observed in a fluorescence microscope and in the In-Vivo Xtreme imaging system.

4.5. *In Vitro* IR-780 Accumulation in B16-F10

To determine the location of dye accumulation, a Petri dish (32.8 mm) with 2×10^5 cell-plate⁻¹, 20 μ M of IR-780, and a drop of Hoechst 33342 (NucBlue™) Thermo Fisher, was used. Cells were observed in a fluorescence microscope.

4.6. *Experimental Animals*

Mus musculus BALB/c, males, 25–35 g, 4–6 weeks old, were purchased from the Central Animal Facility linked to Dean of Research and Graduate Studies of UFMS. Animals were kept in mini isolators of the Basic Alesco® Ventilated Rack (São Paulo, Brazil), at temperature and relative humidity of 21 °C and 60%, 12 h light/dark cycle, receiving standard chow (NUVILAB® CR) and water ad libitum.

In Vivo Models

To perform three tumor models, B16-F10 cells (5×10^5) were diluted in different final volumes according to the used technique: 200 μ L for subcutaneous (SC) and intraperitoneal (IP) injections, and 50 μ L to intravenous (IV) injection. Each group was composed of 3 mice ($n = 3$).

To approach results, one animal was used as a negative control for IR-780. This animal was maintained under the same conditions but did not receive injection of tumor cells. On the last day of the experiment, this animal was intraperitoneal inoculated with 200 μ L IR-780 0.45 mg·kg⁻¹, prepared from stock solution in 0.9% saline. Images were obtained within 24 h, using inhalational anesthetic isoflurane for animal containment.

Ex vivo images of the subcutaneous nodules and the organs lung, kidney, liver, and testicle were also obtained.

a. Subcutaneous melanoma: To obtain subcutaneous nodule, cells were administered SC in a single dose at dorsal region of neck. After 24 days of cell application, animals received 200 μ L IR-780 as control animal and the other groups.

b. Pulmonary metastasis (intraperitoneal): The first metastatic model was performed by single administration of cells by IP in lower abdominal quadrant. After 29 days, animals received IR-780.

c. Pulmonary metastasis (intravenous): For the second metastatic model, cells were administered by IV into lateral tail vein, using isoflurane to contain animal. These animals also received IR-780 after 29 days.

4.7. *Metastatic Lung Macroscopic Evaluation*

Metastatic nodules on the pleural surface of the lungs were evaluated using an Olympus optical stereomicroscope.

4.8. *Microscopic Evaluation*

Two sections from complete left lung lobe, liver, kidney, and testicles stained with HE was used for quantitative analysis using the Leica DM 2000 Led microscope and LAS V4.12

software. Total area of irregular cell growth and total area of analyzed organs were used to calculate the implantation percentage of metastasis.

5. Conclusions

In this study, we tested in vitro and in vivo the effect of IR-780 marker on B16-F10 melanoma cells. The microscopic and radiographic analyses presented in our study using IR-780 revealed that a concentration of 20 μ M did not cause any cellular damage, and a cell concentration of 2×10^5 showed better confluence for microscopic analysis. Fluorescence images of an animal without tumor cells were observed, possibly due to binding of marker with other organic molecules. Additionally, use of IR-780 for evaluating subcutaneous tumor growth evolution did not demonstrate efficiency. However, for pulmonary metastatic tumors, it was effective in diagnosis. Although IR-780 presented limitations in this study, results of evaluating pulmonary involvement through ex vivo fluorescence images were defined and corroborated by histological and macroscopic analyses, and should be interpreted considering fluorescence intensity.

Although some in vivo analyses showed limitations, further studies should be carried out involving this marker with melanoma cells. Since IR-780 has apoptotic properties and is described in the literature as an adjuvant in cancer chemo-phototherapy due to its optical properties and capacity to generate ROS, its use as an active drug against melanoma cells should be deepened.

Author Contributions: Conceptualization, E.d.A.S. and D.B.; methodology, C.F.R.d.O. and E.d.A.S.; software, E.d.A.S.; validation, R.d.C.A.G. and E.d.A.S.; formal analysis, E.d.A.S.; investigation, E.d.A.S.; resources, E.d.A.S.; data curation, E.d.A.S.; writing—original draft preparation, E.d.A.S. and V.A.d.N.; writing—review and editing, E.d.A.S. and D.B.; visualization, E.d.A.S. and I.S.S.; supervision, D.B.; project administration, D.B.; funding acquisition, D.B. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was supported by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior—Brasil (CAPES), Finance Code 001, and Financiadora de Estudos e Projetos—Brasil (FINEP).

Institutional Review Board Statement: Experiments were carried out after approval by the Committee on Ethics in Use of Animals (CEUA) from Federal University of Mato Grosso do Sul as determined by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), protocol N^o 1140/2020.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The data used to support the findings of this study are available from the corresponding author upon request.

Acknowledgments: We thank the Graduate Program PPGSD and Federal University of Mato Grosso do Sul-UFMS for the support, and the CAPES and FINEP for funding.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

Sample Availability: Not applicable.

References

1. Instituto Nacional do Câncer. Câncer De Pele Melanoma. Available online: <https://www.gov.br/inca/ptbr/assuntos/cancer/tipos/pelemelanoma#:~:text=O%20c%C3%A2ncer%20de%20pele%20melanoma,de%20manchas%2C%20pintas%20ou%20sinais> (accessed on 8 December 2022).
2. National Institutes of Health. Cancer Stat Facts: Melanoma of the Skin. Available online: <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/melan.html> (accessed on 8 December 2022).
3. Onaciu, A.; Munteanu, R.; Munteanu, V.C.; Gulei, D.; Raduly, L.; Feder, R.I.; Pirlog, R.; Atanasov, A.G.; Korban, S.S.; Irimie, A.; et al. Spontaneous and Induced Animal Models for Cancer Research. *Diagnostics* **2020**, *10*, 660. [CrossRef] [PubMed]
4. Lin, J.; Ma, L.; Zhang, D.; Gao, J.; Jin, Y.; Han, Z.; Lin, D. Tumour biomarkers—Tracing the molecular function and clinical implication. *Cell Prolif.* **2019**, *52*, e12589. [CrossRef]
5. Yang, Z.; Wang, L.; Zhang, J.; Liu, J.; Yu, X. Application of bismuth sulfide based nanomaterials in cancer diagnosis and treatment. *Nano Today* **2023**, *49*, 101799. [CrossRef]

6. Zhou, Q.; Berg, N.S.V.D.; Rosenthal, E.L.; Iv, M.; Zhang, M.; Leonel, J.C.M.V.; Walters, S.; Nishio, N.; Granucci, M.; Raymundo, R.; et al. EGFR-targeted intraoperative fluorescence imaging detects high-grade glioma with panitumumab-IRDye800 in a phase 1 clinical trial. *Theranostics* **2021**, *11*, 7130–7143. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Zhou, Q.; van den Berg, N.S.; Rosenthal, E.L.; Iv, M.; Zhang, M.; Leonel, J.C.; Walters, S.; Nishio, N.; Granucci, M.; Raymundo, R.; et al. Fluorescence Imaging of Breast Tumors and Gastrointestinal Cancer. *Recent Results Cancer Res.* **2020**, *216*, 591–624. [[CrossRef](#)]
8. Sharma, S. Tumor markers in clinical practice: General principles and guidelines. *Indian J. Med. Paediatr. Oncol.* **2009**, *30*, 1–8. [[CrossRef](#)]
9. Potez, M.; Trappetti, V.; Bouchet, A.; Fernandez-Palomo, C.; Güç, E.; Kilarski, W.W.; Hlushchuk, R.; Laissue, J.; Djonov, V. Characterization of a B16-F10 melanoma model locally implanted into the ear pinnae of C57BL/6 mice. *PLoS ONE* **2018**, *13*, e0206693. [[CrossRef](#)]
10. Del Grande, M.P.; Miyake, A.M.; Nagamine, M.K.; Leite, J.V.; da Fonseca, I.I.; de Oliveira Massoco, C.; Dagli, M.L. Methylene blue and photodynamic therapy for melanomas: Inducing different rates of cell death (necrosis and apoptosis) in B16-F10 melanoma cells according to methylene blue concentration and energy dose. *Photodiagn. Photodyn. Ther.* **2022**, *37*, 102635. [[CrossRef](#)]
11. Seif, E.J.; de França, L.P.; de Oliveira, F.F.; de Oliveira, R.A.; Chaves, A.L.; Silva, L.A.; Gaiba, S. Antioxidant and cytotoxic activity of *Diplotropis inexcis rizzini* & a. Mattos seed oil in b16-f10 murine melanoma. *Braz. J. Dev.* **2021**, *7*, 106838–106856. [[CrossRef](#)]
12. Wysocka, A. Green fluorescent protein as a marker for monitoring activity of stressinducible hsp70 rat gene promoter. *Mol. Cell. Biochem.* **2000**, *215*, 153–156. [[CrossRef](#)]
13. Xian, H.; Li, J.; Zhang, Y.; Li, D.; Zhu, Y.; Li, S.; Tan, Z.; Lin, Z.; Li, X.; Pan, Y. Antimetastatic Effects of Ganoderma lucidum Polysaccharide Peptide on B16-F10-luc-G5 Melanoma Mice With Sleep Fragmentation. *Front. Pharm.* **2021**, *12*, 650216. [[CrossRef](#)]
14. Huang, B.; Wang, L.; Tang, K.; Chen, S.; Xu, Y.; Liao, H.; Niu, C. IR780 Based Sonotherapeutic Nanoparticles to Combat Multidrug-Resistant Bacterial Infections. *Front. Chem.* **2022**, *10*, 840598. [[CrossRef](#)]
15. Ram Prasad, R.P.; Rishikesh Pandey, R.P.; Ajit Varma, A.V.; Ishan Barman, I.B. Multimodal Image-Guided Photothermal Therapy Mediated by ¹⁸⁸Re-Labeled Micelles Containing a Cyanine-Type Photosensitizer. *ACS Nano* **2011**, *5*, 5594–5607. [[CrossRef](#)]
16. Zhang, C.; Wang, S.; Xiao, J.; Tan, X.; Zhu, Y.; Su, Y.; Cheng, T.; Shi, C. Sentinel lymph node mapping by a near-infrared fluorescent heptamethine dye. *Biomaterials* **2010**, *31*, 1911–1917. [[CrossRef](#)]
17. Zhang, E.; Luo, S.; Tan, X.; Shi, C. Mechanistic study of IR-780 dye as a potential tumor targeting and drug delivery agent. *Biomaterials* **2014**, *35*, 771–778. [[CrossRef](#)]
18. Long, L.; Tan, X.; Liu, Z.; Liu, Y.; Cao, X.; Shi, C. Effects of Human Serum Albumin on the Fluorescence Intensity and Tumor Imaging Properties of IR-780 Dye. *Photochem. Photobiol.* **2022**, *98*, 935–944. [[CrossRef](#)]
19. Zheng, Y.; Lan, T.; Wei, D.; Zhang, G.; Hou, G.; Yuan, J.; Yan, F.; Wang, F.; Meng, P.; Yang, X.; et al. Coupling the near-infrared fluorescent dye IR-780 with cabazitaxel makes renal cell carcinoma chemotherapy possible. *Biomed. Pharm.* **2019**, *116*, 109001. [[CrossRef](#)]
20. Zhang, C.; Liu, T.; Su, Y.; Luo, S.; Zhu, Y.; Tan, X.; Fan, S.; Zhang, L.; Zhou, Y.; Cheng, T.; et al. A near-infrared fluorescent heptamethine indocyanine dye with preferential tumor accumulation for in vivo imaging. *Biomaterials* **2010**, *31*, 6612–6617. [[CrossRef](#)]
21. Li, H.; Wang, K.; Yang, X.; Zhou, Y.; Ping, Q.; Oupicky, D.; Sun, M. Dual-function nanostructured lipid carriers to deliver IR780 for breast cancer treatment: Anti-metastatic and photothermal anti-tumor therapy. *Acta Biomater.* **2017**, *53*, 399–413. [[CrossRef](#)]
22. Yan, F.; Duan, W.; Li, Y.; Wu, H.; Zhou, Y.; Pan, M.; Liu, H.; Liu, X.; Zheng, H. NIR-Laser-Controlled Drug Release from DOX/IR-780-Loaded Temperature-Sensitive-Liposomes for Chemo-Photothermal Synergistic Tumor Therapy. *Theranostics* **2016**, *6*, 2337–2351. [[CrossRef](#)]
23. Cao, H.; Zou, L.; He, B.; Zeng, L.; Huang, Y.; Yu, H.; Zhang, P.; Yin, Q.; Zhang, Z.; Li, Y. Albumin Biomimetic Nanocorona Improves Tumor Targeting and Penetration for Synergistic Therapy of Metastatic Breast Cancer. *Adv. Funct. Mater.* **2017**, *27*, 1605679. [[CrossRef](#)]
24. Kuang, Y.; Zhang, K.; Cao, Y.; Chen, X.; Wang, K.; Liu, M.; Pei, R. Hydrophobic IR-780 Dye Encapsulated in cRGDConjugated Solid Lipid Nanoparticles for NIR Imaging-Guided Photothermal Therapy. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2017**, *9*, 12217–12226. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Shih, Y.-H.; Luo, T.-Y.; Chiang, P.-F.; Yao, C.-J.; Lin, W.-J.; Peng, C.-L.; Shieh, M.-J. EGFR-targeted micelles containing near-infrared dye for enhanced photothermal therapy in colorectal cancer. *J. Control. Release* **2017**, *258*, 196–207. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Yang, H.; Cai, W.; Lv, W.; Zhao, P.; Shen, Y.; Zhang, L.; Ma, B.; Yuan, L.; Duan, Y.; Yao, K. A new strategy for accurate targeted diagnosis and treatment of cutaneous malignant melanoma: Dual-mode phase-change lipid nanodroplets as ultrasound contrast agents. *Int. J. Nanomed.* **2019**, *14*, 7079–7093. [[CrossRef](#)]
27. Yue, C.; Yang, Y.; Song, J.; Alfranca, G.; Zhang, C.; Zhang, Q.; Yin, T.; Pan, F.; de la Fuente, J.M.; Cui, D. Mitochondria-targeting Near-infrared Light-triggered Thermosensitive Liposomes for Localized Photothermal and Photodynamic Ablation of Tumors Combined with Chemotherapy. *Nanoscale* **2017**, *9*, 11103–11118. [[CrossRef](#)]
28. Yang, H.; Zhao, P.; Zhou, Y.; Li, Q.; Cai, W.; Zhao, Z.; Shen, J.; Yao, K.; Duan, Y. Preparation of multifunctional nanobubbles and their application in bimodal imaging and targeted combination therapy of early pancreatic cancer. *Sci. Rep.* **2021**, *11*, 6254. [[CrossRef](#)]

29. Wang, J.; Sun, C.; Ji, M.; Wang, B.; Wang, P.; Zhou, G.; Dong, B.; Du, W.; Huang, L.; Wang, H.; et al. Design, synthesis and application of near-infrared fluorescence probe IR-780-Crizotinib in detection of ALK positive tumors. *Protein Expr. Purif.* **2021**, *187*, 105952. [[CrossRef](#)]
30. Pais-Silva, C.; de Melo-Diogo, D.; Correia, I.J. IR780-loaded TPGS-TOS micelles for breast cancer photodynamic therapy. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2017**, *113*, 108–117. [[CrossRef](#)]
31. Lu, Y.-J.; Anilkumar, T.S.; Chuang, C.-C.; Chen, J.-P. Liposomal IR-780 as a Highly Stable Nanotheranostic Agent for Improved Photothermal/Photodynamic Therapy of Brain Tumors by Convection-Enhanced Delivery. *Cancers* **2021**, *13*, 3690. [[CrossRef](#)]
32. Shen, C.; Yue, X.; Dai, L.; Wang, J.; Li, J.; Fang, Q.; Zhi, Y.; Shi, C.; Li, W. Hyperbaric oxygen enhanced the chemotherapy of mitochondrial targeting molecule IR-780 in bladder cancer. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **2022**, *149*, 683–699. [[CrossRef](#)]
33. Chen, M.; Bhattarai, N.; Cong, M.; Pérez, R.L.; McDonough, K.C.; Warner, I.M. Mitochondria targeting IR780-based nanoGUMBOS for enhanced selective toxicity towards cancer cells. *RSC Adv.* **2018**, *8*, 31700–31709. [[CrossRef](#)]
34. Wang, Y.; Liu, T.; Zhang, E.; Luo, S.; Tan, X.; Shi, C. Preferential accumulation of the near infrared heptamethine dye IR-780 in the mitochondria of drug-resistant lung cancer cells. *Biomaterial* **2014**, *35*, 4116–4124. [[CrossRef](#)]
35. Bai, L.; Hu, Z.; Han, T.; Wang, Y.; Xu, J.; Jiang, G.; Feng, X.; Sun, B.; Liu, X.; Tian, R.; et al. Super-stable cyanine@albumin fluorophore for enhanced NIR-II bioimaging. *Theranostics* **2022**, *12*, 4536–4547. [[CrossRef](#)]
36. Jiang, C.; Cheng, H.; Yuan, A.; Tang, X.; Wu, J.; Hu, Y. Hydrophobic IR780 encapsulated in biodegradable human serum albumin nanoparticles for photothermal and photodynamic therapy. *Acta Biomater.* **2015**, *14*, 61–69. [[CrossRef](#)]
37. He, W.; Hu, X.; Jiang, W.; Liu, R.; Zhang, D.; Zhang, J.; Li, Z.; Luan, Y. Rational Design of a New Self-Codelivery System from Redox-Sensitive Camptothecin-Cytarabine Conjugate Assembly for Effectively Synergistic Anticancer Therapy. *Adv. Healthc. Mater.* **2017**, *6*, 1700829. [[CrossRef](#)]
38. Ou-Yang, H.; Stamatias, G.; Kollias, N. Spectral Responses of Melanin to Ultraviolet A Irradiation. *J. Investig. Dermatol.* **2004**, *122*, 492–496. [[CrossRef](#)]
39. Milanese, R.; Caregnato, R.C.A. Intra-abdominal pressure: An integrative review. *Einstein* **2016**, *14*, 423–430. [[CrossRef](#)]
40. Papavramidis, T.; Marinis, A.; Pliakos, I.; Kesisoglou, I.; Papavramidou, N. Abdominal compartment syndrome—Intraabdominal hypertension: Defining, diagnosing, and managing. *J. Emerg. Trauma Shock* **2011**, *4*, 279. [[CrossRef](#)]
41. Riley, P. Melanin. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **1997**, *29*, 1235–1239. [[CrossRef](#)]

Disclaimer/Publisher’s Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.