



Universidade de São Paulo

Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto

Departamento de Química

Programa de Pós-Graduação em Química

“Síntese de modelos esferoidais de células melanômicas em diferentes graus de progressão associados a sistemas dermo-equivalentes para tratamento via Terapia Fotodinâmica”

Danielli Azevedo Mônico

Dissertação apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área: **Química**

RIBEIRÃO PRETO - SP

2021



Universidade de São Paulo

Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto

Departamento de Química

Programa de Pós-Graduação em Química

“Síntese de modelos esferoidais de células melanômicas em diferentes graus de progressão associados a sistemas dermo-equivalentes para tratamento via Terapia Fotodinâmica”

Danielli Azevedo Mônico

Dissertação apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área: **Química**

Orientador: Prof. Dr. Antônio Cláudio Tedesco

RIBEIRÃO PRETO - SP

2021

FICHA CATALOGRÁFICA

Mônico, Danielli Azevedo

Síntese de modelos esferoidais de células melanômicas em diferentes graus de progressão associados a sistemas dermo-equivalentes para tratamento via Terapia Fotodinâmica. Ribeirão Preto, 2021.

94 p. : il. ; 30cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Química

Orientadora: Tedesco, Antonio Claudio

1. Esferoide multicelular. 2. Equivalente dérmico. 3. Ftalocianina de alumínio-cloro. 4. Melanoma. 5. Terapia Fotodinâmica

Folha de Aprovação

Danielli Azevedo Mônico

Síntese de modelos esferoidais de células melanômicas em diferentes graus de progressão associados a sistemas dermo-equivalentes para tratamento via Terapia Fotodinâmica.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química para obtenção do título de Mestre

Área de concentração: Química

Orientador: Prof. Dr. Antonio Claudio Tedesco

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

A Deus por ter guiado os meus caminhos, me guardado e abençoado durante a
realização deste trabalho.

Aos meus pais por todo o apoio, incentivo e dedicação quanto à minha educação.

Aos meus incentivadores. Amigos e companheiros.

Agradecimentos

A Deus, pela infinita misericórdia para com a minha vida. Por ter guiado os meus caminhos e me revestido de força de vontade para concluir este trabalho. Por estar presente em todos os momentos da minha vida e nunca ter me desamparado.

Ao Professor Doutor Antonio Claudio Tedesco, pela orientação, oportunidade e confiança, assim como pelo apoio, paciência e grande aprendizado científico desde a minha iniciação científica até à finalização deste trabalho.

Aos meus pais, Eder e Miriam, por terem me apoiado em todo o tempo. Sou grata por sempre terem acreditado em mim e por terem apostado na minha educação. Sou grata por terem me proporcionado um lar tranquilo e amoroso toda a minha vida. Sem eles, não teria conseguido chegar a lugar algum.

À minha irmã, Carol, que sempre me incentivou e apoiou as minhas decisões e que é um motivo de orgulho para mim.

Aos meus avós, Antônio, Edna e Boaventura, que sempre me trataram com afeto e apoiaram a minha educação. Agradeço àqueles que sonhavam comigo sobre o primeiro diploma e que me apoiaram até aqui.

Aos meus familiares que sempre se colocaram disponíveis para me auxiliar, seja com um conselho, ou carona, ou ainda, em oração. Sou grata por todo o apoio e por compartilharem das minhas conquistas.

Aos meus amigos do grupo de orações que me apoiaram e suportaram desde o início do grupo. Todas as conversas, discussões e brincadeiras foram de extrema valia para me dar força de continuar.

Em especial, aos meus amigos Fernanda e Samuel por todo o suporte emocional e por serem verdadeiros presentes de Deus na minha vida. Sou extremamente grata à amizade de vocês.

Aos amigos do Laboratório de Fotobiologia e Fotomedicina, Centro de Nanotecnologia e Engenharia Tecidual. O famoso CNET me proporcionou conhecer pessoas maravilhosas que me aconselharam, apoiaram e provocaram conforto e muitas risadas em momentos difíceis. Especialmente, agradeço ao Italo e Carla que me acompanharam durante o processo científico. Agradeço ao Henrique por todo o apoio científico e técnico que auxiliaram e muito durante todo o período no laboratório. À Olímpia, por ter disponibilizado toda a ajuda e apoio necessário. À Luandra, Gra e Mary

por terem me recebido tão bem e proporcionado tantas conversas e momentos felizes. Aos Léos Barcelos e Franchi, Dani e Jayme pelos conselhos da vida e acadêmicos. Aos companheiros de mestrado Alex e Jay pelas inúmeras conversas, cantorias e risadas. À Hellen, Samara, Flávia e Érika pelas incríveis conversas e por todo o suporte. Aos ICs Ana, Patrick e Milena por toda a parceria. Principalmente ao Hiago e à Luiza, por terem compartilhado comigo diversos momentos felizes e de tensão; especialmente por terem segurado a minha mão nos momentos de dificuldade. Ao Jefferson pelos conselhos e por ter aparecido de forma tão inesperada e ter se tornado um grande amigo.

Aos amigos de graduação Hiago, Jesimiel e Maycon por todas as seções de desabafo e partilha dos momentos difíceis da pós-graduação. Sou grata por todo o apoio e suporte. Também sou bastante orgulhosa dos meus queridos. Assim como aos meus calouros, especialmente ao Luiz Fernando que sempre me apoiou. Sou grata aos amigos que fiz durante meu período na USP, que me apoiaram e encheram minha vida de alegria, especialmente ao Anderson que sempre alegrou meus dias com arte.

Aos amigos do grupo USP CCB, por terem me acompanhado, auxiliado e participado de todos os momentos da minha pós-graduação, por terem me oferecido um lugar seguro e me apresentado em orações.

Aos irmãos em Cristo que sempre me trataram com todo o carinho e me ofereceram o companheirismo, suporte e amor.

À Universidade de São Paulo e aos docentes e funcionários da FFCLRP-USP

À CNPq pela concessão da bolsa de mestrado e pelo apoio financeiro para a realização deste trabalho.

À FAPESP e CAPES pelo apoio financeiro para a realização deste trabalho.

“A ciência nunca resolve um problema sem criar pelo menos outros dez”

George Bernard Shaw

Resumo

Mônico, D. A. **Síntese de modelos esferoidais de células melanômicas em diferentes graus de progressão associados a sistemas dermo-equivalentes para tratamento via Terapia Fotodinâmica.** 2021. 94f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2021.

Os Equivalentes de Pele Reconstituídas têm sido amplamente estudados para obtenção e padronização das técnicas, assim como a utilização em testes de corrosividade e irritação de reagentes e cosméticos, por exemplo, como forma de substituir o uso de animais para esses testes. Também estão sendo desenvolvidos os Modelos de Pele Melanoma, uma vez que a compreensão das células tumorais é mais bem estudada em um sistema que mimetiza a integração das células do melanoma com os demais componentes da pele humana. Esses modelos têm sido utilizados para estudos de progressão tumoral e de desenvolvimento de novas estratégias e tratamentos do tumor. O presente trabalho foi baseado no acoplamento de cultura celular tridimensional de células de melanoma (WM 1617) na forma de esferoides multicelulares e da estrutura tridimensional equivalente dérmico que foi constituído de matriz de colágeno Tipo I e fibroblastos saudáveis. Primeiramente, foi realizado o preparo e caracterização dos esferoides multicelulares utilizando as células WM 35, WM 1552, WM 278 e WM 1617 que representam os estágios de crescimento radial, vertical e metastático do melanoma. Foi observado o preparo com alta reprodutibilidade dos esferoides multicelulares utilizando as células WM 35, WM 278 e WM 1617, enquanto as células WM 1552 não foram possíveis de formar os agregados celulares utilizando o método da gota suspensa. As células WM 1617 foram escolhidas por representar o estágio de crescimento metastático do melanoma. Essas células foram caracterizadas quanto à internalização de NE-AICIPc, assim como a concentração ideal e dose de energia necessária tanto para crescimento em monocamada (2D), quanto para esferoide multicelular (3D). Os esferoides formados foram incluídos em equivalentes dérmicos e foi verificado o comportamento de invasão celular do esferoide dentro da matriz de colágeno. O esferoide multicelular foi tratado com $1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ de NE-AICIPc antes de ser incluído ao equivalente dérmico. Após o acoplamento entre os sistemas, o acoplado foi irradiado com luz vermelha na dose de energia de 25 J cm^{-2} (660 nm) o que ocasionou em morte celular do agregado tumoral e preservação do tecido saudável.

Palavras-chave: esferoide multicelular; equivalente dérmico; melanoma; engenharia de tecidos; ftalocianina de alumínio-cloro; terapia fotodinâmica;

Abstract

Mônico, D.A. **Synthesis of spheroidal models of melanomic cells at different degrees of progression associated with dermo-equivalent systems for treatment via Photodynamic Therapy**. 2021. 94f. Thesis (Master's degree). Faculty of Philosophy, Sciences and Letters of Ribeirão Preto - University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2021.

Reconstituted skin has been studied to obtain and standardize techniques and their use in corrosivity and irritation tests of reagents and cosmetics, for example, as a way to replace the use of animals for these tests. Skin Melanoma Models are also being developed since the understanding of tumor cells is better studied in a system that mimics the integration of melanoma cells with other components of human skin. These models have been used for studies of tumor progression and the development of new tumor strategies and treatments. The present work was based on the three-dimensional cell culture coupling of melanoma cells (WM 1617) in the form of multicellular spheroids and the three-dimensional structure consisting of Type I collagen matrix and healthy fibroblasts. First, the preparation and characterization of multicellular spheroids were carried out using WM 35, WM 1552, WM 278 and WM 1617 cells, representing the radial, vertical and metastatic growth stages of melanoma. The preparation with high reproducibility of multicellular spheroids using WM 35, WM 278 and WM 1617 cells was observed, while WM 1552 cells could not form cell aggregates using the hanging drop method. WM 1617 cells were chosen because they represent the metastatic growth stage of melanoma. These cells were characterized for NE-AICIPc uptake, as well as the ideal concentration and energy dose required for both monolayer (2D) and multicellular spheroid (3D) cell death. The spheroids formed were included in dermal equivalents, and the cell invasion behavior of the spheroid within the collagen matrix was verified. The multicellular spheroid was treated with $1.0 \mu\text{mol L}^{-1}$ NE-AICIPc before being added to the dermal equivalent. After coupling between the systems, the material was irradiated with a red light at a dose of 25 J cm^{-2} (660 nm), resulting in cell death of the tumor aggregate and preservation of healthy tissue.

Keywords: multicellular spheroid; dermal equivalent; melanoma; tissue engineering; chloroaluminum phthalocyanine; photodynamic therapy;

Lista de Figuras

Figura 1: Representação das diferentes camadas celulares da derme e epiderme.	2
Figura 2: Progressão do melanoma cutâneo a partir de um único melanócito segundo o Modelo de Clarke.	9
Figura 3: Exemplos de Melanomas observados..	10
Figura 4: Gradientes formados em esferoides tumorais multicelulares similares aos tumores sólidos in vivo. A, B e C representam os diversos tipos de irrigação do tecido tumoral, apresentando as regiões viáveis circundando próximas dos vasos tumorais de forma a receber melhor nutrição de oxigênio e outros gases e nutrientes necessários para o crescimento tumoral, enquanto as regiões necróticas se encontram afastadas dos vasos de alimentação. O esferoide multicelular já apresenta o contato das células viáveis com o meio de cultura saturado com oxigênio e nutrientes, enquanto as células necróticas se encontram alocadas no interior do esferoide.	12
Figura 5: Representação fotográfica do método da gota suspensa para cultivo celular 3D	14
Figura 6: Diagrama de Jablonski apresentando os mecanismos de ação da TFD.....	22
Figura 7: Estrutura química do Grupo Heme presente nas Hemoglobinas e as estruturas dos principais fotossensibilizadores: Porfirina, Clorina e Ftalocianina.....	24
Figura 8: Estrutura química da ftalocianina de alumínio-cloro	26
Figura 9: Representação esquemática de nanoemulsão óleo-em-água	27
Figura 10: Representação esquemática do protocolo de formação de esferoides multicelulares pelo método da gota suspensa	31
Figura 11: Esferoides multicelulares formados a partir das células WM 35 ao decorrer de 14 dias. Barra equivale a 100 µm.	40
Figura 12: Esferoides multicelulares formados a partir de células WM 35 pelo método de plaqueamento sobre matriz solidificada.	41
Figura 13: Esferoides multicelulares formados a partir das células WM 278 ao decorrer de 14 dias. Barra equivale a 100 µm.	42
Figura 14: Esferoides multicelulares formados a partir das células WM 1617 ao decorrer de 14 dias. Barra equivale a 100 µm.	43
Figura 15: Comparação gráfica dos dados obtidos para diâmetro médio, “Circularity”, “Aspect Ratio” e “Roundness” dos esferoides formados a partir das células WM 1617, WM 278, WM 1552 e WM 35. (*) p<0,05; (**) p<0,01; (***) p<0,001; (****) p<0,0001.	45
Figura 16: Acompanhamento do crescimento de esferoides multicelulares WM 1617 utilizando A: o Kit de Viabilidade <i>LIVE/DEAD</i> para estimar a viabilidade celular em cada dia do crescimento B: o reagente de viabilidade celular <i>AlamarBlue</i> . Barra equivale a 200 µm.	48
Figura 17: Comparação entre a internalização apresentada pela ftalocianina de alumínio-cloro livre solubilizada em DMSO e formulada em nanoemulsão após administração em células WM 1617 cultivadas em monocamada. A coloração cinza representa a AICIPc livre na concentração de 5,0 µmol L ⁻¹ . As formulações NE-AICIPc representam respectivamente: vermelho representa 0,5 µmol L ⁻¹ , azul representa 1,5 µmol L ⁻¹ , verde representa 3,0 µmol L ⁻¹ e lilás representa 5,0 µmol L ⁻¹	50
Figura 18: Tempo de internalização de AICIPc através da aplicação de nanoemulsão carregada de ftalocianina de alumínio-cloro em células WM 1617 cultivadas em monocamada. A internalização de NE-AICIPc representa respectivamente: cinza representa 1 h, vermelho representa 2 h, azul representa 3 h, verde representa 4 h, lilás representa 5 h e amarelo representa 6 h.....	50
Figura 19: A: Internalização de AICIPc em esferoides multicelulares. B: Ensaios quantitativo e qualitativo para determinar melhor tempo de internalização de AICIPc através da aplicação de NE-AICIPc em esferoides multicelulares preparados a partir de células WM 1617. Barra equivale 200 µm.	53

Figura 20: Ensaio de Citotoxicidade em células WM 1617 cultivadas em monocamada variando a concentração da nanoemulsão AICIPc.	54
Figura 21: Ensaio de Citotoxicidade em esferoides multicelulares formados pelas células WM 1617 variando a concentração da nanoemulsão vazia e contendo AICIPc.....	55
Figura 22: Acompanhamento do esferoide multicelular antes e depois do tratamento proposto com NE-AICIPc em concentração de 1,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Barra equivale a 100 μm	56
Figura 23: Ensaio de fototoxicidade em células WM 1617 cultivadas em monocamada variando a densidade de energia aplicada. (****) $p < 0,0001$	57
Figura 24: Ensaio quantitativo e qualitativo de fototoxicidade em esferoide multicelular formado a partir de células WM 1617. A coloração verde indica a marcação de células vivas com calceína AM, enquanto a coloração vermelha indica a marcação de células mortas com etídio-homodímero-1 e a coloração azul indica a marcação das células a partir da internalização de AICIPc. A primeira sobreposição refere-se à sobreposição das imagens obtidas com marcação de Calceína AM e Etídio-Homodímero-1 e a segunda sobreposição refere-se à sobreposição das imagens das células vivas, mortas e tratadas com nanoemulsão de AICIPc. (**) $p < 0,01$. Barra equivale a 200 μm	59
Figura 25 : Contração do Equivalente Dérmico observada no decorrer de 14 dias.....	62
Figura 26: Microfotografias apresentando o acompanhamento de esferoide multicelular WM 1617 não marcado em equivalente dérmico no decorrer de 12 dias.	63
Figura 27: Microfotografias obtidas com microscópio confocal de varredura a laser Leica Platform TCS SP8. A coloração verde indica marcação com Alexa Fluor $\text{\textcircled{R}}$ 488 phalloidin, faloídina, que cora os filamentos de actina presentes no citoesqueleto. A coloração azul indica marcação com DAPI, que cora regiões de DNA ricas em adenina-timina. A coloração vermelha indica a presença de AICIPc, presente no meio intracelular.....	65
Figura 28: Microfotografias apresentando o acompanhamento do Equivalente Dérmico incluído de Esferoide Multicelular marcado com AICIPc (Sistema acoplado) por 7 dias com microscópio confocal de varredura a laser Leica Platform TCS SP8. Utilizando os marcadores Alexa Fluor $\text{\textcircled{R}}$ 488 phalloidin, faloídina (verde), DAPI (azul) e AICIPc (vermelho). Barra equivale a 200 μm .	66
Figura 29: Fotomicrografias da microestrutura dos equivalentes dérmicos pós irradiação. Barra equivale a 100 μm	67
Figura 30: Microfotografias obtidas com microscópio confocal de varredura a laser Leica Platform TCS SP8. A coloração verde indica marcação das células vivas com Calceína – AM, enquanto a coloração vermelha indica marcação das células mortas com Etídio-Homodímero e a coloração azul indica a presença de células que internalizaram a NE-AICIPc.....	69

Lista de abreviações e siglas

% - *porcento*

% v/v – porcentagem volume por volume

± - mais ou menos

µg mL⁻¹ – micrograma por mililitro

µL – microlitro

µm – micrometro

µmol L⁻¹ – micromol por mililitro

2D – bidimensional

3D – tridimensional

a. C. – antes de Cristo

AlClPc – ftalocianina de alumínio-cloro

Anvisa - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ATP – *adenosine triphosphate* (trifosfato de adenosina)

CaCl₂ – cloreto de cálcio

cm – centímetros

CO₂ – dióxido de carbono ou gás carbônico

DMEM - *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

DMSO - dimetilsulfóxido

DNA - *deoxyribonucleic acid* (ácido desoxirribonucleico)

ERO - Espécies Reativas de Oxigênio

FCTC - Fluorescência Celular Total Correlacionada

FDA – *Food and Drug Administration* (agência federal do Departamento de Saúde e Serviços Humanos dos Estados Unidos)

FS – Fotossensibilizador

g – gramas

h – horas

INCA – Instituto Nacional do Câncer

J cm⁻² – joule por centímetro quadrado

mg mL⁻¹ – miligrama por mililitro

mL – mililitro

mm – milímetro

mmol L⁻¹ – milimol por litro

mRNA – RNA mensageiro

MTT - brometo de 3-4,5-dimetil-tiazol-2-il-2,5-difeniltetrazólio

nm – nanômetro

O₂ – gás oxigênio

°C – graus Celsius

PBS - *Phosphate-buffered saline* (tampão fosfato salino)

RNA – *ribonucleic acid* (ácido ribonucleico)

rpm – rotações por minuto

SFB – Soro Fetal Bovino

TFD – Terapia Fotodinâmica

ULA - *Ultra-Low Attachment*

URF - Unidades Relativas de Fluorescência

Sumário

1. Introdução	1
1.1 Pele	1
1.2 Modelos de pele	3
1.3 Câncer	4
1.4 Câncer de pele	5
1.5 Melanoma	6
1.6 Esferoides multicelulares (Cultura celular 3D)	10
1.7 Equivalente de pele melanoma	15
1.8 Espécies Reativas de Oxigênio	17
1.9 Tratamentos de câncer	18
1.10 Terapia-Alvo	19
1.11 Terapia Fotodinâmica	20
1.12 Fármacos Fotosensibilizadores	23
1.13 Veiculadores de Fármaco	26
2. Objetivo Geral	29
2.1 Objetivos Específicos	29
3. Materiais e Métodos	30
3.1 Cultura celular	30
3.2 Formação de esferoides multicelulares	30
3.3 Caracterização morfológica dos esferoides multicelulares	31
3.4 Preparo de nanoemulsão contendo ftalocianina de alumínio-cloro como fotoativo 32	
3.5 Estimativa da Viabilidade Celular dos esferoides multicelulares	32
3.6 Ensaio de internalização celular de ftalocianina de alumínio-cloro	33
3.7 Ensaio de citotoxicidade	34
3.8 Ensaio de Fotocitotoxicidade	35
3.9 Preparo de equivalentes dérmicos	36
3.10 Estudos da Cinética de Contração dos Equivalentes Dérmicos	36
3.11 Marcação de esferoides multicelulares e inclusão em equivalentes dérmicos	36
3.12 Estudos de microscopia confocal	37
3.13 Ensaio de fotocitotoxicidade do Equivalente Dérmico	37
3.14 Análise Estatística	38
4. Resultados e Discussão	39
4.1 Caracterização dos esferoides multicelulares	39
4.2 Estimativa da Viabilidade Celular dos esferoides multicelulares da WM 1617 ..	47
4.3 Ensaio de internalização de AICIPc como fotoativo potencial no tratamento via Terapia Fotodinâmica	48
4.4 Ensaio de Citotoxicidade das AICIPc nas linhagens WM 1617, na ausência de Luz 53	

4.5	Ensaio de fototoxicidade	56
4.6	Estudos Cinéticos de Contração do Equivalente Dérmico.....	60
4.7	Inclusão de esferoides multicelulares em equivalentes dérmicos mimetizando sistemas 3D de progressão tumoral metastática.....	63
4.8	Ação da irradiação visível em modelos dérmicos contendo os esferoides de WM 1617, mimetizando os sistemas 3D de propagação melanocítica.....	67
5.	Conclusões	70
6.	Referências	72

1. Introdução

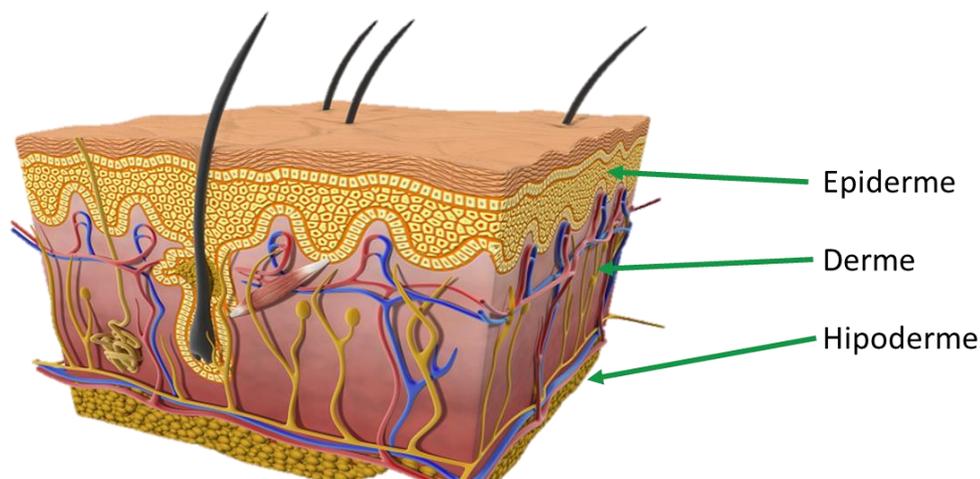
1.1 Pele

A pele é o maior órgão do corpo humano (1,5 m² em adultos), e tem a função de proteger contra as agressões externas e prevenir contra a desidratação. É formada por três camadas: epiderme, derme e hipoderme, conforme ilustrado na Figura 1, porém as duas principais camadas são a epiderme e derme (Catarino, 2015; Danso *et al.*, 2015; Pennacchi, 2016).

A derme está localizada logo abaixo da epiderme e acima da hipoderme e é usualmente referenciada como tecido suporte, uma vez que oferece resistência e elasticidade à pele. É um tecido conjuntivo fibroelástico composto por fibras de colágeno e elastina fracamente conectadas sintetizadas por fibroblastos que serve como barreira mecânica. A derme é constituída por uma matriz extracelular rica em colágeno tipo I, onde estão imersos os fibroblastos e demais constituintes da derme, como os folículos pilosos, glândulas sudoríparas e sebáceas, vasos sanguíneos e linfáticos, além de corpúsculos e terminações nervosas. Os fibroblastos sintetizam os componentes da matriz extracelular como as fibras de colágeno e fatores de crescimento (Catarino, 2015; Danso *et al.*, 2015; Hill *et al.*, 2015; Pennacchi, 2016; Müller e Kulms, 2018; Bataillon *et al.*, 2019).

A derme é separada da epiderme pela camada basal, que compreende uma rede complexa de proteínas e proteoglicanos que conectam as duas camadas e garantem as funções regulatórias importantes, como determinar a polaridade dos queratinócitos basais e contribuir para a reepitelização durante a cicatrização de uma ferida. A camada basal ainda permite a comunicação constante entre as duas camadas da pele (Müller e Kulms, 2018; Bataillon *et al.*, 2019).

Figura 1: Representação das diferentes camadas celulares da derme e epiderme.



Fonte: Imagem reproduzida de Rejuline.

Disponível em: <<https://www.rejuline.com.tr/tr/cildin-yapisi-ve-islevi/>>

A epiderme é a camada mais superficial, avascular e composta principalmente por queratinócitos, células de Langherans e melanócitos. É um tecido epitelial estratificado escamoso queratinizado e é caracterizado pela contínua regeneração celular, o que garante a manutenção da barreira funcional da pele. A epiderme é ainda dividida em quatro estratos que se formam pela diferenciação dos queratinócitos: o estrato basal, espinhoso, granuloso e córneo, formados ao longo de uma proliferação e maturação destas células. Os queratinócitos são gerados e proliferados no estrato basal e, então, movem-se para as camadas superiores e mais externas enquanto se diferenciam. A proliferação, migração, diferenciação e, posterior, morte celular, permitem a compartimentalização dos estratos e representam os diferentes estágios de maturação dessas células que compõem cerca de 80% da epiderme (Brohem *et al.*, 2011; Pennacchi, 2016; Bataillon *et al.*, 2019).

Os melanócitos se localizam no estrato basal da epiderme, onde estão alinhados e cada melanócito está rodeado por cerca de 36 queratinócitos e se comunica por meio de extensões dendríticas. Produzem o pigmento melanina, cuja função primária é absorver a luz ultravioleta (UV), agindo como um protetor celular. A melanina protege a pele dos efeitos adversos da radiação UV, como o envelhecimento da pele, imunossupressão, inflamação e indução de câncer de pele não melanoma. O processo de bronzeamento da pele ocorre como uma resposta de defesa em que a melanina produzida pelos melanócitos

é transferida para os queratinócitos para que possam absorver e dissipar a energia ultravioleta. Esse processo ocorre uma vez que a radiação ultravioleta promove a ligação do hormônio α -melanócito-estimulante (α -MSH) ao seu receptor melanocortina receptor 1 (MC1R), que por sua vez estimula a sinalização intracelular nos melanócitos que promove o aumento da expressão de enzimas envolvidas na síntese de melanina (Miller e Mihm Jr, 2006; Davids e Kleemann, 2011; Müller e Kulms, 2018).

1.2 Modelos de pele

Modelos de pele são desenvolvidos pela engenharia de tecido. Eles se assemelham profundamente ao tecido normal da pele humana e são compostos por ambos os tecidos, epiderme e derme, permitindo a interação dos diferentes tipos celulares entre si e com a matriz extracelular circundante. Na literatura, estes sistemas também têm sido referidos como pele 3D, equivalentes de pele e pele artificial. Estes sistemas começaram a ser desenvolvidos após surgirem questionamentos sobre a utilização de animais para testes nos laboratórios e como uma forma de reduzir o número de voluntários para testes cutâneos mais avançados (Brohem *et al.*, 2011; Groeber *et al.*, 2011; Catarino, 2015; Lotz *et al.*, 2017).

Os modelos de pele estão sendo utilizados como substitutos aos métodos com animais para avaliar irritação, corrosividade, fototoxicidade e genotoxicidade de reagentes e cosméticos, além de poderem ser sintetizados para estudos de cânceres de pele e o estudo de possíveis tratamentos, assim como diversas patologias de pele, como psoríase, vitiligo e queloides, por exemplo. A alta procura por alternativas aos métodos com animais, levaram diversas empresas cosméticas a desenvolverem seus próprios modelos de pele reconstruída, como é o caso da L'Oréal e do grupo Boticário, além de diversos grupos de pesquisa no Brasil. Estes modelos possuem alta reprodutibilidade e baixa variabilidade, quando comparados à variedade de animais e modelos provenientes de cirurgia (Brohem *et al.*, 2011; Lotz *et al.*, 2017).

Existem quatro categorias de modelos de pele que são utilizados em avaliação de toxicidade e eficácia de substâncias em pele. São eles: os modelos *ex vivo*: biópsias de pele e modelos *in vivo*. Os modelos de cultura celular em monocamada e os modelos tridimensionais que compreendem os modelos de equivalente de epiderme e os equivalentes de pele completa, respectivamente, são exemplos de modelos *in vivo*. Os modelos de cultura celular em monocamada recebem o nome de Epiderme Humana

Reconstruída (ou *Reconstructed Human Epidermal* – RHE), são utilizados em ensaios de irritação e corrosão da pele e estão disponíveis comercialmente como SkinEthic™ RHE e EPISKIN™ RHE, por exemplo. Já os modelos tridimensionais recebem o nome de *Full-thickness* (do inglês, espessura completa), também conhecidos como modelo de pele completo ou Pele Reconstruída. A Pele Reconstruída é preparada a partir do plaqueamento de queratinócitos sobre um equivalente dermal derivado de fibroblastos embebidos em matriz de colágeno. Por ser mais complexo, este modelo estendeu a aplicabilidade para outras áreas da pesquisa dermatológica, permitindo a investigação do envelhecimento induzido por luz UVA e o papel das populações de fibroblastos reticulares e papilares, assim como o processo de glicação no envelhecimento. PhenionFT e EpidermFT são exemplos dos modelos de Pele Reconstruída disponíveis comercialmente. Eles têm sido utilizados em estudos de diversas aplicações como estudo dos efeitos ambientais e dependentes da idade, como penetração da pele, efeitos da radiação UV, metabolismo da pele, genotoxicidade, cicatrização de feridas, mecanismos de doenças e sensibilidade da pele. Cada modelo é desenvolvido com um determinado objetivo, de maneira que um modelo pode apresentar diversas vantagens para um estudo, mas para outro apresentar limitações. (Catarino, 2015; Lotz *et al.*, 2017; Bataillon *et al.*, 2019).

Um dos maiores desafios ao desenvolver um modelo de pele contendo derme e epiderme é estimular a diferenciação dos queratinócitos para formar o estrato córneo, que quando formado nos equivalentes epidérmicos assumem funções de barreira similares à epiderme humana, tornando os modelos uma ferramenta de avaliação de toxicidade cutânea, além de possibilitar a avaliação da absorção de medicações (Pennacchi, 2016).

1.3 Câncer

O crescimento anormal das células é referido comumente como “tumor” que pode ser classificado como benigno ou maligno dependendo do comportamento apresentado por essas células. Câncer é o nome dado aos tumores malignos que podem ser classificados de acordo com o tipo de célula, origem do tumor, assim como o estágio e a sua atual localização. O câncer foi mencionado pela primeira vez em papiros egípcios que datam aproximadamente de 1600 a.C. e foi tratado como doença incurável até o século XIX, quando as remoções cirúrgicas começaram a ser realizadas graças à maior eficiência das anestésias (Wu *et al.*, 2006; Naidoo *et al.*, 2018).

Os tumores malignos, ou ainda neoplasia maligna, frequentemente se espalham para tecidos vizinhos e movem-se através do corpo utilizando os sistemas linfáticos e circulatórios, causando metástase, ou seja, aparecimento do tumor em outros órgãos do corpo, o que dificulta o tratamento e erradicação das células cancerosas (Naidoo *et al.*, 2018).

1.4 Câncer de pele

Os cânceres de pele são aqueles que se originam na pele e são nomeados e identificados de acordo com as células das quais eles se originam assim como o comportamento clínico. Os três principais tipos de câncer de pele são carcinomas das células basais (CCB), carcinomas das células escamosas (CCE) e melanoma cutâneo maligno (Naidoo *et al.*, 2018).

Os carcinomas das células basais e células escamosas são comumente referidos como cânceres de pele não invasivos e não-melanômicos, ou não melanoma, uma vez que não se originam dos melanócitos e não possuem a característica de se espalhar para os tecidos circundantes saudáveis. Ambos os tipos de câncer são originados pelas células epiteliais queratinizadas devido à alta exposição de radiação UV, aparecendo mais comumente em áreas mais expostas à radiação solar como nariz, orelhas, rosto e parte de trás das mãos. CCB representam cerca de 75% dos casos de câncer de pele não melanoma e se originam das células localizadas na camada basal da epiderme com crescimento lento e taxa de metástase menor que 0,1% dos casos. Enquanto os CCE representam o restante dos casos de câncer de pele não melanoma e são ocasionados de queratinócitos epidérmicos displásicos com taxa de metástase que varia entre 0,3-3,7%. (Samarasinghe e Madan, 2012; Linares *et al.*, 2015; Naidoo *et al.*, 2018).

De acordo com o Instituto Nacional do Câncer (INCA), os cânceres de pele não melanoma correspondem a cerca de 30% de todos os diagnósticos de câncer do Brasil, sendo o tipo de câncer mais comum entre os brasileiros. A estimativa de casos de câncer de pele não melanoma para o ano de 2020 foi de 176.930, sendo que 1,47% ocasionaram em óbito. O câncer de pele não melanoma é mais comum em pacientes caucasianos e acima dos 40 anos, sendo raro em crianças e pessoas de pele escura (Instituto Nacional Do Câncer; Linares *et al.*, 2015).

1.5 Melanoma

Melanoma é um tumor que se origina de melanócitos, células que sintetizam o pigmento melanina, que estão alocados nas regiões mais profundas da epiderme e nas regiões iniciais da derme. É uma forma agressiva e invasiva de câncer de pele e é conhecido pela elevada resistência a diversas drogas, apresentando baixa taxa de sobrevivência e alta tendência à reincidência. O melanoma pode se apresentar inicialmente nos olhos, nas mucosas, na cútis ou sem sítio primário definido. Entre eles, o melanoma cutâneo o mais comum, representando 90% dos casos. O melanoma cutâneo maligno representa a forma mais agressiva e mortal de câncer de pele, apesar de representar cerca de 1% de todos os casos de tumores malignos de pele (Domingues *et al.*, 2018; Naidoo *et al.*, 2018; Hartman e Lin, 2019).

Foram previstos pelo Programa de Vigilância, Epidemiologia e Resultados Finais (Surveillance, Epidemiology, and End Results Program) do Instituto Nacional do Câncer (National Cancer Institute) 91.320 novos casos em 2018 nos Estados Unidos, com 9.320 mortes previstas para o mesmo ano, sendo o segundo tipo de câncer mais diagnosticado entre jovens adultos de idades entre 15 e 19 anos no país (Hartman e Lin, 2019). No Brasil, a estimativa prevista pelo Instituto Nacional do Câncer (INCA) para o ano de 2020 foi de 8.450 novos casos, sendo que 23,4% dos casos ocasionaram em óbito.

Dentre os diversos fatores de risco, estão: aumento da idade, histórico familiar de melanoma, histórico de queimaduras solares, histórico de cânceres de pele, pele clara, múltiplos nevos e nevos displásicos atípicos, além de bronzeamento artificial. Quando diagnosticado cedo, o melanoma cutâneo possui altas chances de cura, cerca de 95%, ao realizar uma excisão cirúrgica completa do tumor. Porém, após a metástase do tumor, o prognóstico é muito pobre, uma vez que é difícil localizar a sua origem e, portanto, determinar o melhor tratamento, dificultando a sobrevivência do paciente (Soengas e Lowe, 2003; Domingues *et al.*, 2018; Naidoo *et al.*, 2018; Hartman e Lin, 2019).

O melanoma se desenvolve de um único melanócito que sofre transformação e se torna uma célula maligna ou se desenvolve da disfunção de um nevo displásico já existente. Quando o melanoma sofre metástase e progride para outros órgãos do corpo que estão distantes do sítio original, ele é considerado melanoma metastático de estágio IV do câncer de pele (Naidoo *et al.*, 2018).

A progressão do melanoma (Figura 2) ocorre inicialmente a partir da proliferação de melanócitos normais até a formação de um nevo benigno que apresenta crescimento

limitado. Os nevos benignos são pequenos tumores cutâneos pigmentados, conhecidos popularmente como pinta ou mancha de pele e são considerados um tipo comum de lesão cutânea. A mencionada proliferação celular é associada à mutação no oncogene BRAF que ocorre no códon V600 de forma esporádica e ativa a via de sinalização mediada pela proteína quinase ativada por mitógenos (MAPK) que desencadeia mediadores de sinalização que promovem a sobrevivência, proliferação e apoptose celular. As proteínas mutantes codificadas por BRAF induzem à senescência pelo aumento da expressão do inibidor de quinase 4^a (INK4A), um supressor de tumor que regula negativamente a proliferação celular. Desta forma, um nevo benigno cessa o seu crescimento, porém, mutações adicionais podem tornar essas células livres das restrições de crescimento e, após décadas, evoluir para um nevo maligno. Após a formação de um nevo benigno, ele pode evoluir para um nevo displásico (ou atípico) que é caracterizado pelo crescimento anormal, aberrante e pode apresentar assimetria, bordas irregulares, múltiplas cores, aumento contínuo do diâmetro e atipia aleatória. O nevo displásico é conhecido como tumor pré-maligno, uma vez que pode não evoluir para a forma melanoma ou, ainda, regredir. A transformação de nevo benigno em nevo displásico é associada a lesões, ou mutações, nos genes que expressam o inibidor de ciclina dependente de quinase 2A (CDKN2A) e fosfatase homóloga a tensina (PTEN) que são supressores de tumor e promovem a regulação negativa da proliferação celular. As mutações associadas aos supressores ocasionam na diminuição ou perda de função original, permitindo a proliferação celular desenfreada (Miller e Mihm Jr, 2006; Elder, 2016).

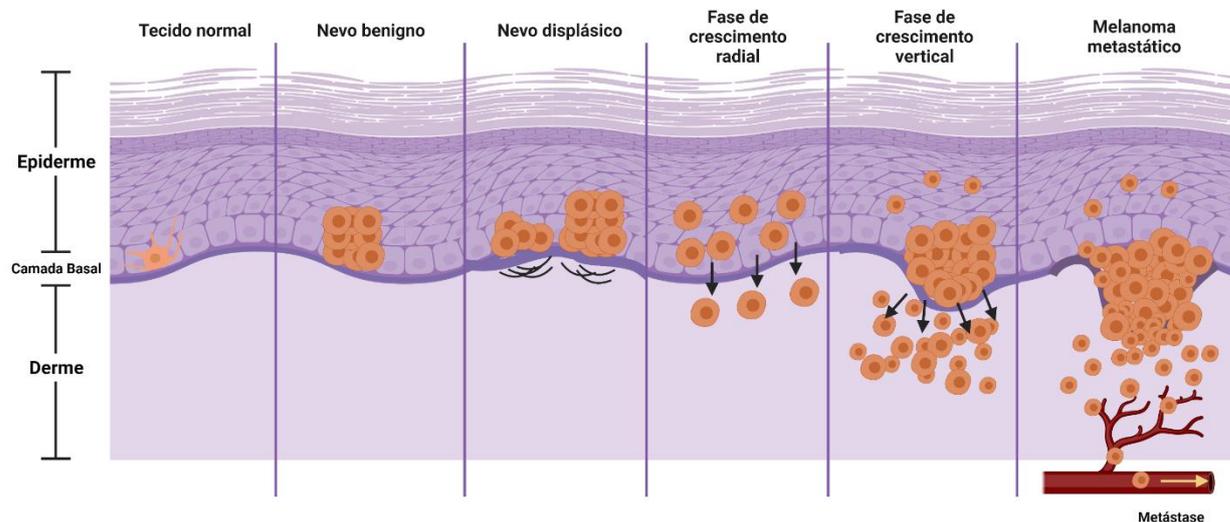
A partir do nevo displásico, as células adquirem a habilidade de crescer dentro da epiderme, além de poderem adentrar a derme papilar, camada superior da derme que é formada por tecido conjuntivo frouxo. O estágio em que as células começam a se espalhar dentro da epiderme é chamado de **fase de crescimento radial** e é caracterizada por não mais apresentar atipia aleatória, mas citomorfologia de câncer em toda lesão, além de apresentar aumento das lesões. É característico dessa fase a não apresentação de um aglomerado único tumoral, mas principalmente células com tendência à invasão e sobrevivência celular na derme. Durante esse processo, é observado o aumento da expressão da ciclina D1 (CCND1) que é um promotor de proliferação celular. A fase de crescimento radial é seguida pela **fase de crescimento vertical** que é caracterizada pela aquisição da habilidade pelas células de invadir efetivamente a derme e formar um nódulo expansivo, ampliando-se para a derme papilar, mas podendo estender-se para a derme reticular e hipoderme. Essa etapa, costuma ser difícil de identificar, uma vez que o nódulo

frequentemente apresenta simetria e homogeneidade quanto à coloração o que não é esperado para o método ABCDE que será apresentado posteriormente. Durante a fase de crescimento vertical, são observados diversos eventos moleculares, como a perda da expressão de E-caderina, molécula de adesão celular que ocorre em melanócitos e queratinócitos na epiderme e permite a associação entre os dois tipos celulares. É observado também o aumento anormal de expressão da N-caderina, molécula de adesão celular característica em carcinomas invasivos e que permite o espalhamento metastático ao permitir que as células do tumor interajam com os fibroblastos e endotélio vascular, uma vez que ambos expressam N-caderina. Também ocorre a expressão de $\alpha v \beta_3$ integrina, dímero que forma as moléculas de adesão celular cuja expressão apresenta aumento anormal, e expressão de metaloproteinase da matriz (MMP), que permite e promove o movimento de células cancerosas para um tecido alvo, uma vez que são necessárias para o extravasamento do tumor para a corrente sanguínea. Além das já mencionadas, também ocorre a expressão da proteína survivina (BIRC5), essencial para a divisão celular e permite a inibição da morte celular, além de ser expressa em células ativamente proliferativas, se não em todos os tipos de canceres. Outro evento observado é a redução da expressão da melastina 1 (TRPM1) que é identificado como gene supressor de metástase (Miller e Mihm Jr, 2006; Guo *et al.*, 2012; Elder, 2016; Wheatley e Altieri, 2019; Yao *et al.*, 2019).

A última etapa da progressão do melanoma é conhecida como melanoma metastático e sua principal característica é a dissociação do tumor primário e o consequente espalhamento para outras partes do corpo. A metástase pode ser dividida em locorregional, regional e distante. No caso do melanoma, a metástase locorregional é caracterizada pelo espalhamento do tumor para regiões distas em 5 cm ou mais do local primário. A metástase regional é caracterizada pelo surgimento de nódulos linfáticos, ou linfonodos. Já a metástase distante é caracterizada pelo espalhamento do melanoma para regiões da pele distantes do local primário, assim como para outros órgãos, como pulmão, fígado e cérebro. A **fase metastática** representa a principal característica que confere ao melanoma a sua letalidade em uma vasta maioria dos casos. Durante a fase metastática, ocorre, além do acúmulo dos já mencionados eventos moleculares, a ausência da melastina 1, também mencionada como mRNA. A melastina está presente em todos os melanócitos normais, assim como nos nevos benignos, porém é progressivamente diminuída a sua expressão durante a progressão do melanoma cutâneo a partir da fase de crescimento vertical e é parcial ou completamente perdido no melanoma metastático. A

perda da expressão desse mRNA está correlacionada com a espessura do tumor (Miller e Mihm Jr, 2006; Guo *et al.*, 2012; Elder, 2016).

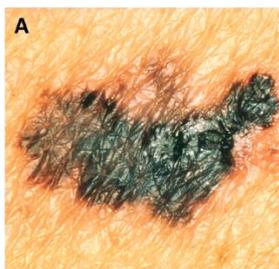
Figura 2: Progressão do melanoma cutâneo a partir de um único melanócito segundo o Modelo de Clarke.



Criado com BioRender.com

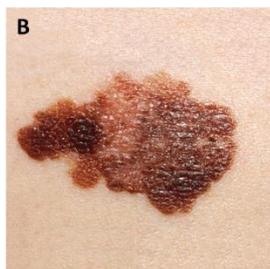
O melanoma cutâneo (Figura 3) é inicialmente diagnosticado pela inspeção visual da pele, observando os aspectos da pele utilizando o método ABCDE e o sinal de “patinho feio”. No primeiro, observa-se a assimetria, borda irregular, coloração, diâmetro e a evolução do nevo displásico. O segundo é utilizado quando o paciente apresenta múltiplos nevos displásicos e identifica-se os que se diferem da maioria, estes serão observados mesmo que não se enquadrem no método ABCDE. Tecnologias como microscopia confocal de reflectância e topografia de coerência óptica são exemplos de tecnologias empregadas para um diagnóstico pré-biopsia de maior precisão. O diagnóstico do melanoma cutâneo é confirmado após a biopsia da pele (Hartman e Lin, 2019).

Figura 3: Exemplos de Melanomas observados. **A:** Melanoma com diferentes tons de marrom, preto e castanho. **B:** melanoma característico. **C e D:** Melanomas com característica assimetria, borda irregular, variação de cor nas tonalidades de vermelho e marrom e grande diâmetro.



Melanoma com cores diferentes
National Cancer Institute

AV Number: AV-8809-4037
Criador: fotógrafo desconhecido
Criado em: setembro de 1988
Adicionado em: 01 de janeiro de 2001
Disponível em: <https://visualsonline.cancer.gov/details.cfm?imageid=2364>



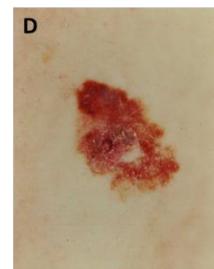
Melanoma
National Cancer Institute

AV Number: AV-8500-3850
Criador: fotógrafo desconhecido
Criado em: 1985
Adicionado em: 08 de setembro de 2011
Disponível em: <https://visualsonline.cancer.gov/details.cfm?imageid=9186>



Melanoma – lesão vermelha e marrom 1
National Cancer Institute

AV Number: CDR728451
Criador: Laurence Meyer, MD, PhD, University of Utah Health Sciences Center
Criado em: 05 de março de 2012
Adicionado em: 23 de abril de 2012
Disponível em: <https://visualsonline.cancer.gov/details.cfm?imageid=9244>



Melanoma – lesão vermelha e marrom 2
National Cancer Institute

AV Number: CDR728452
Criador: Laurence Meyer, MD, PhD, University of Utah Health Sciences Center
Criado em: 05 de março de 2012
Adicionado em: 23 de abril de 2012
Disponível em: <https://visualsonline.cancer.gov/details.cfm?imageid=9247>

1.6 Esferoides multicelulares (Cultura celular 3D)

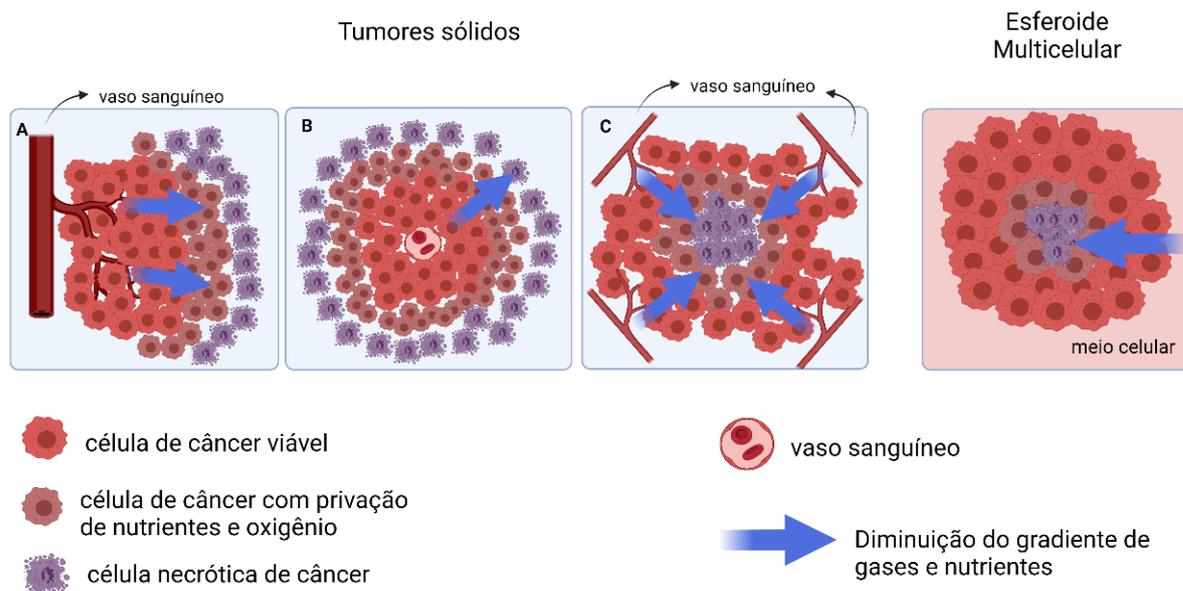
Os esferoides de culturas multicelulares começaram a ser desenvolvidos por Sutherland e colaboradores em 1970 para reproduzir o fenótipo funcional das células tumorais humanas e suas respostas à radioterapia. Esses esferoides são agregados celulares 3D e são utilizados para assemelhar-se às estruturas do tecido *in vitro*. Os esferoides são também conhecidos como tumoroides, tumorosferas, micromassa, ou ainda, tecido micro-fabricado e não necessariamente constituem-se em um formato esférico perfeito (Fennema *et al.*, 2013; Stadler *et al.*, 2015; Weiswald *et al.*, 2015; Fang e Eglén, 2017).

Diferentemente das células crescidas em monocamadas 2D, os esferoides desenvolvem importantes parâmetros fisiológicos de tumores heterogêneos como as justas interações célula-célula. Similarmente à situação *in vivo*, as esferas tumorais são expostas a gradientes de oxigênio, pH, nutrientes, fatores de crescimento, metabolitos e sinais solúveis para gerar zonas necróticas, hipóxias, quiescentes e proliferativas do núcleo interno à superfície. De forma semelhante, gradientes de drogas anticâncer também são gerados dentro dos esferoides partindo do exterior para o núcleo interno (Stadler *et al.*, 2015; Fang e Eglén, 2017).

Nos tumores sólidos *in vivo*, é possível observar os gradientes de distribuição de oxigênio, nutrientes, fatores hormonais e de crescimento, demais gases e, ainda, drogas utilizadas como tratamento do tumor, uma vez que a distribuição é reduzida conforme a região tumoral se afasta da vasculatura que é responsável por nutrir o tumor (Figura 4). Esses gradientes são resultado da difusão e convecção, que é definida como o movimento coletivo de agregados moleculares em um fluido e podem acontecer através da produção local e consumo competitivo das moléculas pelas células. Não somente a distância, mas também várias irregularidades dos vasos tumorais, como as paredes anormais dos vasos, arquitetura vascular anormal ou ainda densidade vascular irregular, contribuem para o acesso limitado de oxigênio pelas células tumorais. O acesso limitado determina que as células da camada externa do tumor, ou as que estejam mais próximas dos vasos sanguíneos recebam mais oxigênio e nutrientes do que aquelas que estão afastadas dos vasos tumorais cerca de 100 μm e a difusão de oxigênio está limitada a 130 μm de espessura do tecido, dependendo da taxa de consumo de O_2 do tecido. Sendo assim, as células que estão mais afastadas estão em hipóxia, uma vez que há a redução da disponibilidade de O_2 e diminuição da pressão parcial de O_2 . Em tumores muito pequenos, a hipóxia pode ser leve ou estar ausente, porém, os tumores maiores sofrem com a oxigenação que não é estática e está sujeita a flutuações temporais e regionais (Thoma *et al.*, 2014; Nunes *et al.*, 2019).

A hipóxia leva à reprogramação substancial dos processos celulares mediados pelo fator induzível por hipóxia (HIF), família de fatores de transcrição que mediam a resposta adaptativa primária às mudanças da concentração de oxigênio no ambiente. As concentrações de HIF promovem a liberação de fatores de crescimento locais e hormônios sistêmicos que regulam a hematopoiese e angiogênese como eritropoietina (EPO), fator de crescimento endotelial vascular A (VEGF-A) e fator derivado de plaquetas B (PDGF-B), bem como fatores que regulam o recrutamento de células inflamatórias como fator 1α derivado de células estromais (SDF- 1α). A liberação desses fatores, assim como recrutamento e ativação de células endoteliais para vascularizar o tumor é uma estratégia de adaptação e sobrevivência utilizada por ele, uma vez que a liberação de HIF-1 promove a expressão de diversos fatores antiapoptóticos, fator que pode promover resistência do tumor à tratamentos (Thoma *et al.*, 2014; Nunes *et al.*, 2019).

Figura 4: Gradientes formados em esferoides tumorais multicelulares similares aos tumores sólidos *in vivo*. A, B e C representam os diversos tipos de irrigação do tecido tumoral, apresentando as regiões viáveis circundando próximas dos vasos tumorais de forma a receber melhor nutrição de oxigênio e outros gases e nutrientes necessários para o crescimento tumoral, enquanto as regiões necróticas se encontram afastadas dos vasos de alimentação. O esferoide multicelular já apresenta o contato das células viáveis com o meio de cultura saturado com oxigênio e nutrientes, enquanto as células necróticas se encontram alocadas no interior do esferoide.



Criado com BioRender.com

O esferoide multicelular, assim como o tumor *in vivo*, apresenta gradientes de O_2 , uma vez que as células proliferativas na região externa do esferoide resultam num maior consumo de O_2 (Figura 4). De forma semelhante à observada *in vivo*, a distância entre as células presentes no núcleo do esferoide e o meio celular aumenta com o crescimento do esferoide e a disponibilidade e difusão de O_2 do meio celular para o interior do esferoide é reduzida. Conforme o esferoide vai se desenvolvendo e crescendo, o interior do esferoide experimenta o ambiente de hipóxia, levando à morte celular de parte das células que compõem o núcleo esferoidal, mas também ocasionando na geração e liberação de fatores HIF que, por sua vez, promove a liberação de outros fatores, como mencionado acima, a fim de promover a sua sobrevivência e crescimento. A expressão de HIF, assim como de VEGF, está associada à resistência do esferoide a tratamentos, semelhante ao observado *in vivo*. A expressão desses fatores não é observada nas células cultivadas de forma bidimensional, desta forma, é possível dizer que os esferoides mimetizam os

tumores *in vivo* e podem ser utilizados no desenvolvimento de novos tratamentos, assim como descobrir estratégias que permitam superar a resistência às drogas já existentes (Nunes *et al.*, 2019).

Há quatro grupos em que os modelos de câncer flutuantes ou de base líquida podem ser classificados de acordo com a natureza das células utilizadas para a formação: esferoides tumorais multicelulares, tumorosferas, esferas originadas de tecido canceroso e esferoides multicelulares organotípicos. Iremos focar nos esferoides tumorais multicelulares. Os esferoides tumorais multicelulares são aqueles esferoides formados em condições não aderentes a partir de uma suspensão celular. As tumorosferas são os esferoides formados a partir da cultura e expansão das células estaminais cancerígenas. As esferas originadas de tecido canceroso são aquelas formadas a partir de células de câncer após a dissociação parcial do tecido tumoral. E os esferoides multicelulares organotípicos são os esferoides cultivados a partir do tecido canceroso cortado e mantido sob condições não aderentes. Na literatura, todos os tipos de modelos de câncer flutuantes são mencionados como Esferoides, uma vez que essa é a forma genérica para se referir à cultura de células em 3D (Stadler *et al.*, 2015; Weiswald *et al.*, 2015; Fang e Eglen, 2017).

Os esferoides possuem geometria bem definida e ótimas interações fisiológicas célula-célula e célula-matriz extracelular, mas também possuem diversos desafios práticos associados ao desenvolvimento e manutenção das culturas de esferoides. O tamanho uniforme, a formação de esferoides a partir de um número pequeno de células, o controle preciso de razões específicas de diferentes tipos celulares em co-cultura e a falta de ensaios compatíveis, confiáveis, simples e padronizados para testes com drogas elencam alguns dos desafios mencionados (Stadler *et al.*, 2015; Fang e Eglen, 2017).

Uma das primeiras técnicas desenvolvidas para crescimento de esferoides é a técnica da gota suspensa (Figura 5). A técnica consiste em transferir volumes específicos que variam entre 10 e 30 μL de suspensão celular para uma superfície. Então, sob a ação da gravidade, as células lentamente se acomodam no ponto mais baixo da gota, agregando-se e formando o esferoide. É uma técnica de caráter simples e econômico, uma vez que requer apenas material básico de laboratório, como micropipetas semiautomáticas, placas de Petri, placas de poços e meio de cultura celular. Porém, a técnica apresenta alto risco de perda celular ou, ainda, de esferoides durante as transferências de volume das suspensões celulares, assim como a troca de meio de cultura celular e a transferência de esferoide para utilização em testes. O método requer um manuseio cuidadoso e preciso dos líquidos, sendo este um dos maiores desafios da técnica,

porém é uma boa técnica para gerar esferoides celulares com bom controle sobre tamanho dos esferoides, além de obter um número considerável de esferoides no final do processo (Weiswald *et al.*, 2015; Liu *et al.*, 2021).

Figura 5: Representação fotográfica do método da gota suspensa para cultivo celular 3D



Arquivo pessoal

Uma técnica bem utilizada é o emprego de substratos de baixa aderência que agem como modificadores químicos das superfícies para as tornarem pouco aderentes. As células são dispensadas sobre os substratos e não podem se ligar ou aderir às superfícies, dessa forma, as células se agregam para formar esferoides através da interação célula-célula. O método mais comum para obter uma superfície de baixa aderência é através do revestimento da superfície principalmente com agarose, polietilenoglicol (PEG), galactose, álcool polivinílico (PVA) e diversos outros. O método permite a geração de grandes quantidades de esferoides celulares com o mínimo de necessidade do manuseio de líquidos, porém, não há um bom controle sobre o tamanho do esferoide, uma vez que as células são dispensadas sobre a superfície revestida sem um devido controle. Para superar esse último desafio mencionado, placas de poços são empregadas, sendo revestidas por esses materiais antes do processo de dispensação da suspensão celular ou adquirindo uma placa já preparada e revestida que se encontra disponível comercialmente. Essas placas disponíveis comercialmente são conhecidas como *Ultra-Low Attachment Well Plate*, ou seja, placa de poços ultra-baixa ligação ou aderência e são placas cujos poços possuem o formato em U e são revestidos de material que impedem a adesão celular aos poços, permitindo melhor interação entre as células, além de conferir

à técnica maior reprodutibilidade e aumentar o número de esferoides preparados no final do processo (Liu *et al.*, 2021).

Outra técnica bem utilizada é a manipulação magnética. Nessa técnica, as células são magnetizadas com nanopartículas paramagnéticas para que haja a rápida agregação por meio de magnetos. O magneto é posicionado acima ou abaixo da cultura celular para que as células possam ser agregadas em levitação ou na base da placa de cultura. Possui a vantagem de oferecer rápida agregação, além da mínima manipulação e do bom controle sobre o tamanho dos esferoides, aumentando a reprodutibilidade entre eles. É uma técnica promissora para a geração de esferoides em larga escala devido ao rápido tempo de resposta, bom controle do processo e mínimo trabalho de manipulação. Apesar de nanopartículas magnéticas não-tóxicas serem empregadas, ainda não é certo quais mudanças celulares elas podem conferir às células, uma vez que a aplicação de um fator externo a elas pode causar efeitos no comportamento e função celular (Shao *et al.*, 2020; Liu *et al.*, 2021).

1.7 Equivalente de pele melanoma

O melanoma é uma das neoplasias mais estudadas, devido, especialmente, à sua agressividade e alta capacidade de espalhamento. De modo a entender e estudar melhor o desenvolvimento do melanoma, assim como avaliar a eficácia de determinadas drogas em testes pré-clínicos, diferentes animais são utilizados durante os experimentos. Em muitos desses estudos, linhagens celulares de melanoma metastáticos ou células do tumor primário são injetados nas veias das caudas de camundongos para que se espalhem espontaneamente, ocasionando em metástase. Apesar de ser bem empregado, o uso de animais não prediz com segurança as respostas humanas a tratamentos, por exemplo, devido a diferenças fisiológicas e imunológicas. Desta forma, juntamente com o desenvolvimento da engenharia de tecidos, os modelos de pele 3D têm se tornado uma ferramenta atrativa para estudos relacionados ao melanoma (Vörsmann *et al.*, 2013; Marconi *et al.*, 2018; Müller e Kulms, 2018).

Os modelos de pele 3D incorporados de células tumorais têm se mostrado um excelente modelo para estudar a progressão e invasão do tumor, assim como um sistema para análises farmacológicas, reduzindo o tempo e o custo usualmente associados a experimentos com animais. Os equivalentes de pele melanoma (do inglês *melanoma skin equivalent* – MSE) representam os modelos de pele que contêm tumores melanômicos

que podem ser preparados com a adição das células ou de esferoides multicelulares de melanoma durante o semeio do equivalente epidérmico sobre o equivalente dérmico. Esses equivalentes têm sido utilizados em testes de eficácia de drogas, assim como a penetração farmacêutica e absorção dos fármacos e têm sido uma ferramenta muito útil no desenvolvimento de novas abordagens de tratamento. Como os MSE são compostos por populações celulares distintas apresentando células normais e tumorais, também podem ser utilizados para testar a toxicidade de drogas pela avaliação do efeito nas células vizinhas não transformadas, saudáveis (Vörsmann *et al.*, 2013; Marconi *et al.*, 2018).

Mas principalmente, os MSE são uma ferramenta inestimável para investigação da progressão e espalhamento do melanoma e podem ajudar no entendimento do processo que leva à mudança do crescimento radial para o vertical e à invasão no tecido subjacente. Além de permitir verificar a influência e importância das interações entre células saudáveis e tumorais na proliferação e progressão celular. As interações entre as células do tumor, células vizinhas não transformadas e a matriz extracelular são extremamente importantes e são responsáveis pelo controle do comportamento celular e homeostase do tecido. Estudos mostraram que o fator de crescimento do fibroblasto básico (do inglês *basic fibroblast growth factor* – bFGF) apresenta certa importância na promoção da proliferação do melanoma e invasão. Estudos também mostraram que os fibroblastos associados ao câncer (do inglês *cancer-associated fibroblasts* – CAFs), subpopulação de fibroblastos que adquirem um fenótipo modificado, têm um papel proeminente no desenvolvimento do câncer desde a iniciação até à progressão primária e metastática, além de influenciar na resistência a drogas (Marconi *et al.*, 2018).

Van Kilsdonk *et al.* (2010) descobriram que, apesar do comportamento invasivo ser determinado pelas próprias células que compõem o tumor melanômico, a interação entre as células de melanoma com os queratinócitos saudáveis circundantes desempenha um papel importante na invasão do melanoma. Também avaliaram a influência dos fatores de crescimento presentes na matriz extracelular do modelo de pele 3D e constataram que a arquitetura tecidual é necessária para o comportamento invasivo do melanoma. Hill *et al.* (2015) demonstraram que a invasão ativa de células de melanoma resulta na quebra da membrana basal dos colágenos tipo IV e VII, recapitulando com precisão o padrão de invasão precoce do melanoma observado *in vivo*, confirmando a importância e eficiência dos MSE na compreensão do comportamento dos melanomas.

1.8 Espécies Reativas de Oxigênio

O Oxigênio molecular (O_2) é essencial para a sobrevivência de todos os organismos aeróbios, uma vez que atua comoceptor final de elétrons pela enzima citocromo c oxidase durante a fosforilação oxidativa. A fosforilação oxidativa é um processo pelo qual a energia de oxirredução da cadeia transportadora de elétrons mitocondrial é convertida na ligação fosfato de alta energia do ATP. A citocromo c oxidase (ou complexo IV) é o componente enzimático final da cadeia transportadora de elétrons e catalisa a reação de redução de quatro elétrons do O_2 , gerando H_2O . Durante as reações que envolvem transferências de elétrons, metabólitos de O_2 parcialmente reduzidos e de alta reatividade podem ser formados. Esses metabólitos são conhecidos como Espécies Reativas de Oxigênio (ERO), uma vez que possuem alta reatividade quando comparadas com o oxigênio molecular, e são definidos quimicamente como moléculas reativas que contêm oxigênio, formados a partir da redução de um ou dois elétrons de O_2 . Essas espécies podem ser, por exemplo, o ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical hidroxila ($\cdot OH$), e oxigênio singlete (1O_2) (Thannickal e Fanburg, 2000; Zou *et al.*, 2017).

A principal fonte de ERO endógenos é a cadeia respiratória mitocondrial, uma vez que alguns elétrons escapam dos complexos I e III da cadeia transportadora de elétrons e reagem com o oxigênio molecular para formar o ânion superóxido, mas podem ser gerados por outras reações celulares de maneira dependente ou não-dependente de enzima. O ânion superóxido também pode ser gerado no citosol, induzido por reações enzimáticas e o peróxido de hidrogênio pode ser gerado como subproduto da oxidação em peroxissomos e pela oxidação proteica no retículo endoplasmático (Zou *et al.*, 2017).

Em condições fisiológicas normais, as espécies reativas de oxigênio são mantidas a um nível constante por um balanço entre a geração e a eliminação dessas espécies (Zou *et al.*, 2017). Essas espécies promovem as reações com moléculas por modificações oxidativas reversíveis, mas também atuam um papel crítico em vias de sinalização celular quanto ao metabolismo, crescimento, diferenciação e sinalização de morte celular. Baixos níveis de ERO promovem a proliferação e sobrevivência, enquanto a produção excessiva pode induzir a senescência e morte celular por efeitos de danos oxidativos em macromoléculas intracelulares, como proteínas, lipídeos, RNA e DNA (Bergamini *et al.*, 2004; Storz, 2005; Zou *et al.*, 2017; Kirtonia *et al.*, 2020) O radical hidroxila é uma espécie extremamente reativa com alto potencial oxidante e é o principal responsável por

dano ao DNA induzido por estresse oxidativo (Thannickal e Fanburg, 2000; Zou *et al.*, 2017).

O Estresse Oxidativo pode ser amplamente definido como uma alteração no equilíbrio do estado redox, que é o balanço entre os processos de geração de Espécies Reativas de Oxigênio e a eliminação destas espécies. Este desequilíbrio ocorre quando há superprodução de ERO ou diminuição de moléculas de defesa antioxidante. O Estresse Oxidativo promove a oxidação de lipídeos, de proteínas dos tecidos, do DNA e de biomoléculas que podem levar a uma grande sinalização celular anormal, além do controle redox disfuncional e morte celular por diversas vias, como apoptose, autofagia, necrose e ferroptose (Zou *et al.*, 2017; Figueroa *et al.*, 2018). O Estresse Oxidativo tem sido mencionado como causa de diversas doenças humanas, incluindo aterosclerose, fibrose pulmonar, câncer, doenças neurodegenerativas e envelhecimento (Thannickal e Fanburg, 2000). A exposição à luz ultravioleta, radiação, quimioterápicos ou agentes infecciosos podem induzir a produção destas espécies, e, conseqüentemente, induzir o Estresse Oxidativo (Figueroa *et al.*, 2018).

As espécies reativas de oxigênio são tradicionalmente consideradas como subprodutos tóxicos do metabolismo com um alto potencial de causar danos, desta forma, as células possuem mecanismos para se proteger e atenuar os potenciais danos causados pelas ERO. Uma dessas estratégias é o emprego de antioxidantes não enzimáticos como as vitaminas A, C e E, assim como antioxidantes enzimáticos como a superóxido dismutase (SOD), catalase e peroxidase glutatona (GPX) (Thannickal e Fanburg, 2000; Bergamini *et al.*, 2004; Storz, 2005; Liou e Storz, 2010; Zou *et al.*, 2017). A enzima SOD atua na redução do ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) em peróxido de hidrogênio (H_2O_2), enquanto as enzimas catalase e GPX atuam na eliminação de H_2O_2 ao reduzi-lo a H_2O (Thannickal e Fanburg, 2000; Zou *et al.*, 2017).

1.9 Tratamentos de câncer

Os tratamentos mais comuns para o câncer podem ser realizados através da cirurgia, quimioterapia, radioterapia ou transplante de medula óssea, sendo que em muitos dos casos é necessário combinar mais de uma modalidade. No Brasil, esses tratamentos são oferecidos pelo Sistema Único de Saúde (SUS) (Instituto Nacional Do Câncer).

Além dos tratamentos mais comuns, outros tratamentos têm sido amplamente pesquisados no decorrer dos últimos anos de forma a maximizar a eficácia de tratamento,

assim como diminuir os efeitos colaterais causados por eles. Alguns desses tratamentos são a Imunoterapia, Terapia-Alvo e Terapia Fotodinâmica.

1.10 Terapia-Alvo

Uma das bases para ocorrência do câncer é ditada pela alteração do perfil gênico celular que leva à mutação em proteínas e receptores que promovem a sobrevivência e a proliferação celular. Essas alterações genéticas podem distinguir uma célula saudável de uma célula cancerosa, desta forma, o sequenciamento do DNA humano permitiu o avanço em tecnologias que detectam essas mudanças genômicas, transcricionais, proteômicas e epigenéticas. As tecnologias combinadas com o desenvolvimento de novas drogas aceleraram a implementação de medicina personalizada que utiliza conceitos de bases genéticas e ambientais para determinar a prevenção, diagnóstico e tratamento individualizado (Tsimberidou, 2015; Lee *et al.*, 2018).

A terapia-alvo refere-se ao uso de drogas ou outras substâncias que têm por alvo moléculas específicas, ou alvos moleculares, que bloqueiam o crescimento e espalhamento das células de câncer. Os alvos moleculares incluem fatores de crescimento, moléculas de sinalização, proteínas do ciclo celular, moduladores de apoptose, moléculas que promovem a angiogênese, receptores de fator de crescimento e transdutores de sinal, entre outros, que interferem em uma variedade de processos celulares oncogênicos (Tsimberidou, 2015; Lee *et al.*, 2018).

No caso do melanoma cutâneo, cerca de 70% dos pacientes apresentam mutações em genes das principais vias de sinalização e essas mutações podem ser associadas com a proliferação das células do melanoma e o fenótipo maligno. A terapia-alvo utiliza pequenas moléculas inibidoras ou anticorpos que podem afetar essas proteínas mutadas que são importantes na progressão da doença. As pequenas moléculas são definidas como compostos de baixo peso molecular (< 900 Da) que são aptas a penetrar as células para direcionar proteínas específicas nas células. Para o melanoma são utilizados diversos tipos de inibidores na terapia-alvo sendo os principais: inibidores de BRAF, inibidores de MEK, inibidores de VEGF, inibidores das vias p13K-AKT-mTOR, inibidores de ciclina dependente de quinase e inibidores de ErbB4 (Domingues *et al.*, 2018; Lee *et al.*, 2018).

Dentre os inibidores mencionados, os inibidores BRAF e MEK foram aprovados pelo FDA baseando na significativa atividade antitumoral e a tolerabilidade dos pacientes com melanoma. As mutações BRAF são encontradas em 50% dos casos de melanoma e

em 62-72% dos pacientes com melanoma metastático, sendo uma mutação esporádica no códon V600 do oncogene BRAF. Drogas como Vemurafenibe e Dabrafenibe são inibidores de BRAF e foram aprovados pelo FDA em 2011 e 2013, respectivamente, enquanto aprovados pela Anvisa em 2011 e 2017, respectivamente. Estudos mostraram que 90% dos pacientes que receberam a Vemurafenibe apresentaram regressão tumoral (Anvisa; Miller e Mihm Jr, 2006; Tsimberidou, 2015; Domingues *et al.*, 2018).

A proteína quinase ativada por mitógenos (MAPK) em mamíferos é mencionada como MEK e está na via de sinalização da proteína quinase serina/treonina (Raf) codificada pelo gene BRAF, assim como a proteína RAS. No interior da célula, a proteína RAS é ativada e essa ativação promove a ativação da proteína Raf que irá promover a fosforilação da MEK, que por sua vez, irá desencadear uma série de mediadores de sinalização que irão promover a sobrevivência ou apoptose celular (Molina e Adjei, 2006). As mutações em NRAS, gene que codifica a proteína NRAS, estão associadas a 15% dos casos de melanoma. Estudos demonstraram que a utilização de inibidores de MEK apresentam atividade em melanomas que possuem a mutação NRAS, em contraste com os inibidores de BRAF. A inibição de MEK resultou na inibição de fatores de crescimento mediados por sinalização celular e, conseqüentemente, promoveram a diminuição da proliferação das células tumorais. Ascierto *et al.* (2013) e equipe verificaram que os pacientes com melanoma que possuíam a mutação em NRAS reagiram positivamente ao tratamento com inibidores de MEK, enquanto para o tratamento com inibidores de BRAF não apresentaram efeitos. A Trametinibe é um inibidor de MEK que foi aprovado pelo FDA em 2013 e pela Anvisa em 2016 e é utilizado como monoterapia ou em conjunto com a Dabrafenibe (inibidor de BRAF) (Anvisa; Miller e Mihm Jr, 2006; Tsimberidou, 2015; Domingues *et al.*, 2018).

1.11 Terapia Fotodinâmica

A Terapia Fotodinâmica (TFD) tem sido utilizada para tratamento de cânceres e diversas doenças, podendo estas ser doenças cardiovasculares, dermatológicas e oftalmológicas, como degeneração macular relacionada à idade (DMRI), além de ser utilizada para aplicações antivirais, antimicrobianas e antibacterianas, incluindo a esterilização do plasma sanguíneo e água. A TFD é um tratamento minimamente invasivo e mostra toxicidade insignificante, além de alta seletividade do tumor em relação ao tecido saudável, o que oferece vantagens tanto para o paciente quanto para o médico em relação aos tratamentos tradicionais de câncer, como as delicadas cirurgias ou as

dolorosas e cansativas sessões de radio e quimioterapia que ainda oferecem diversos efeitos colaterais. O tempo de recuperação também é minimizado, assim como a formação de tecidos desfigurados e de cicatrização. A TFD, na prática clínica, é utilizada com outras modalidades, como cirurgia e quimioterapia, mas também é utilizada como tratamento alternativo e, em alguns casos, é um adequado tratamento paliativo para pacientes com metástase (Josefsen e Boyle, 2012; Wei *et al.*, 2012; Ribeiro *et al.*, 2013; Zou *et al.*, 2017; Domingues *et al.*, 2018; Dos Santos *et al.*, 2019).

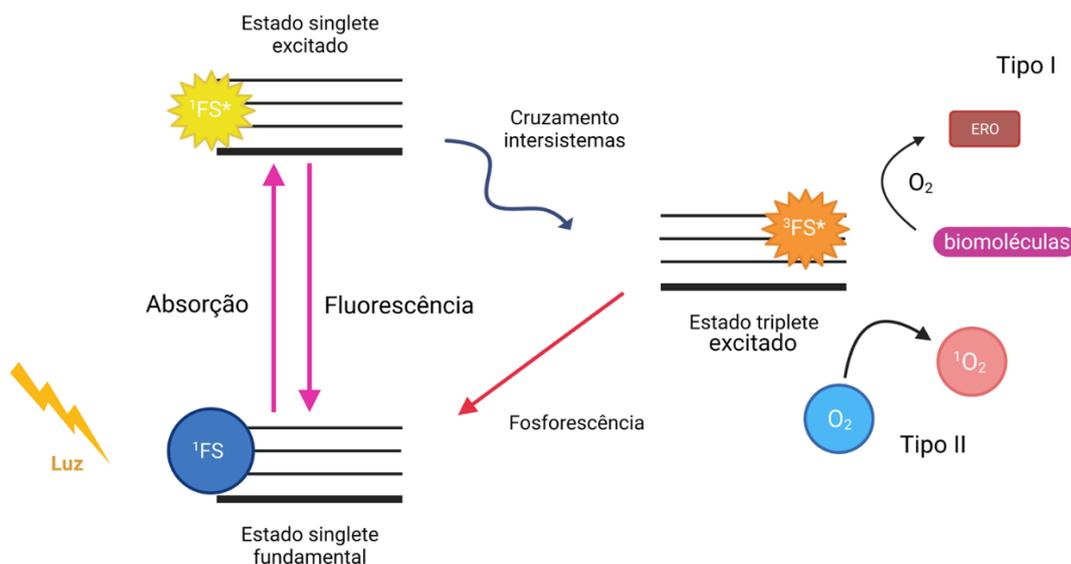
A Terapia é baseada em três processos: a excitação de um fotossensibilizador (FS), produção de Espécies Reativas de Oxigênio (ERO) e morte celular. Os fotossensibilizadores são administrados ao paciente, seja de forma sistêmica ou tópica, na ausência de luz e são, preferencialmente, absorvidos ou retidos por tecidos neoplásicos, uma vez que são melhor absorvidos em tecidos metabolicamente ativos. Quando a proporção ótima de fotossensibilizador nos tecidos doente e saudável é atingida, o fotossensibilizador é fotoativado com luz visível em um determinado comprimento de onda (normalmente no máximo de absorção do fármaco fotossensibilizador) em uma dose de luz cuidadosamente regulada que é aplicada sobre o tecido neoplásico por um tempo específico. A ativação do fotossensibilizador na presença de O₂ dissolvido nos tecidos leva à formação de ERO, espécies citotóxicas, que promovem a oxidação de uma grande variedade de biomoléculas celulares, assim como ácidos nucleicos, lipídeos e proteínas, levando a alterações graves nas cascatas de sinalização celular ou regulação da expressão gênica. Os danos irreversíveis desencadeados pelas ERO são observados tanto nas células do tumor como nos vasos sanguíneos associados ao tumor, o que irá causar deficiência na alimentação de nutrientes e oxigênio do tumor. Os danos causados culminam na morte celular por apoptose e/ou necrose e os danos a proteínas e membranas celulares são de particular importância para a TFD, uma vez que otimizam a eficiência citotóxica do processo (Josefsen e Boyle, 2012; Ribeiro *et al.*, 2013; Domingues *et al.*, 2018; Dos Santos *et al.*, 2019).

Os processos de ativação do fotossensibilizador, assim como a geração de ERO e, consequente, morte celular estão associados com a destruição ou regressão de um tumor. A regressão tumoral é relacionada a três principais mecanismos celulares. O primeiro é referente à formação de ERO na forma de radicais livres oxidantes e/ou oxigênio singlete induzidos pela TFD que podem matar as células diretamente induzindo à morte celular, como mencionado acima. O segundo é referente aos danos causados pelas ERO geradas ao tecido vascular associado ao tumor que levam a trombose ou hemorragia nos vasos

sanguíneos que alimentam o tumor, que em última instância levam à hipoxia que culminam na morte celular das células tumorais por privação de nutrição. O terceiro mecanismo refere-se à liberação de citosinas e inflamação aguda induzidas pela TFD no tecido tumoral que promovem a invasão de células imunes que promovem a destruição das células do tumor (Ribeiro *et al.*, 2013; Zou *et al.*, 2017).

A fotoativação ocorre uma vez que ao absorver a energia luminosa, o fotossensibilizador passa do seu estado fundamental (1F_s) para um estado eletronicamente excitado ($^1F_s^*$) de curto tempo de vida que pode levar ao estado tripleto ($^3F_s^*$), por cruzamento intersistemas, um estado eletronicamente excitado de relativo maior tempo de vida. Este então pode prosseguir em dois tipos de reações, os tipos I e II, ilustradas na Figura 6.

Figura 6: Diagrama de Jablonski apresentando os mecanismos de ação da TFD.



Criado com BioRender.com

A reação de tipo I consiste na reação direta do fotossensibilizador em estado tripleto com uma biomolécula de modo a transferir a energia absorvida através da transferência de um elétron/átomo de hidrogênio para formar radicais que interagem com oxigênio para produzir produtos oxigenados. As biomoléculas sofrem danos e ocorre a inicialização de reações radicalares em cadeia. As principais ERO geradas durante a transferência de energia do fotossensibilizador para as biomoléculas são os ânions superóxido ($O_2^{\cdot-}$) (Naidoo *et al.*, 2018; Dos Santos *et al.*, 2019).

A reação de tipo II consiste na transferência direta de energia do fotossensibilizador em estado triplete para o oxigênio molecular dissolvido nos tecidos para formar oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$), extremamente eletrofílico e capaz de causar danos às membranas, proteínas e DNA (Naidoo *et al.*, 2018; Dos Santos *et al.*, 2019).

Ambas as reações ocorrem simultaneamente e a razão entre os processos depende do tipo de fotossensibilizador utilizado, as concentrações de biomoléculas e oxigênio, assim como a afinidade de ligação entre o fotossensibilizador e a biomolécula. Por causa do tempo de meia-vida curta dos ERO, apenas as células que estão na região proximal à produção de ERO são diretamente afetadas pela TFD. O tempo de meia-vida do oxigênio singlete em sistemas biológicos é menor do que $0,04 \mu\text{s}$, e, por isso, seu raio de ação é menor do que $0,02 \mu\text{m}$. A extensão do dano causado pela luz e citotoxicidade é multifatorial e depende do tipo de fotossensibilizador, sua localização intra e extracelular, a dose total administrada, a dose total de exposição a luz, taxa de fluência da luz, disponibilidade de oxigênio e o tempo entre a administração da droga e a exposição a luz, sendo todos os fatores independentes (Dolmans *et al.*, 2003; Allison e Moghissi, 2013; Calixto *et al.*, 2016).

Estudos realizados em melanomas, mostraram eficácia do tratamento, especialmente em casos de melanomas cutâneos metastáticos que, além de possuírem o desafio de tratamento uma vez que não se encontram localizados, desenvolvem resistência aos fármacos utilizados nos tratamentos quimioterápicos. A combinação de TFD com o quimioterápico dacarbazine, em um estudo realizado por Biteghe e Davids (2016) apresentou diminuição da resistência ao tratamento tanto em melanomas pigmentados como não-pigmentados. Já a combinação de TFD com imunoestimuladores pode aumentar a eficiência de erradicação dos tumores iniciais, assim como as micrometastases, e diminuir os casos de reincidência de melanoma. A utilização de moléculas inibidoras, como discutido em Terapia-Alvo, também permitiu uma maior eficiência do tratamento (Baldea e Filip, 2012; Domingues *et al.*, 2018; Naidoo *et al.*, 2018).

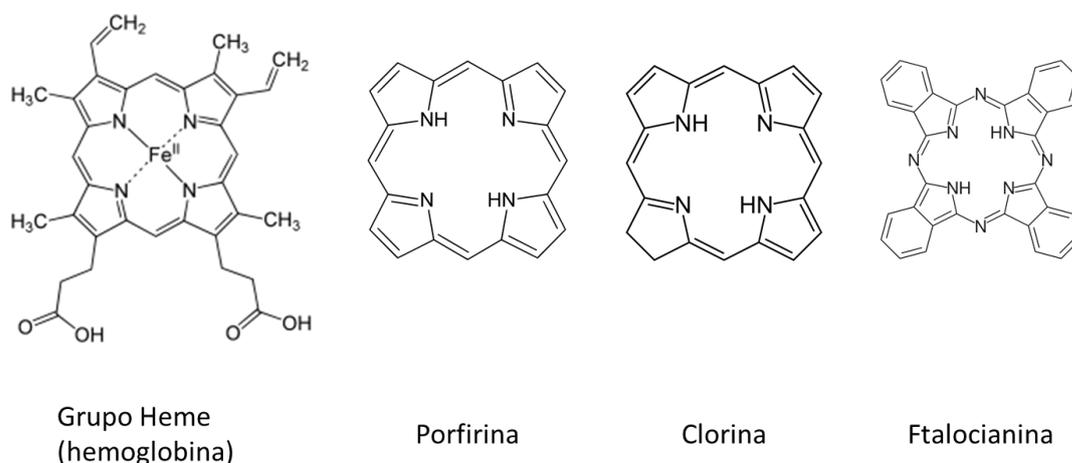
1.12 Fármacos Fotossensibilizadores

Os fotossensibilizadores (FS), também conhecidos como fármacos fotossensibilizadores, são moléculas que quando excitadas por energia luminosa podem utilizar a energia adquirida para induzir reações fotoquímicas produzindo agentes citotóxicos letais, desencadeando, em último caso, em morte celular e destruição do tecido. Eles são absorvidos pelas células em todo o corpo e são inofensivos quando na

ausência de luz e oxigênio molecular, de forma que não causam efeitos tanto em tecido saudável quanto tecido anormal. Porém, quando ativados por luz, é observado o efeito citotóxico (Josefsen e Boyle, 2012).

A vasta maioria dos FS empregados em TFD é baseada no cromóforo tetrapirrol, como porfirina, clorina e ftalocianina, uma vez que os macrociclos tetrapirrólicos possuem uma similaridade inerente às porfirinas presentes naturalmente na matéria vivente, como o grupo heme e a clorofila (Figura 7). Os FS que apresentam os macrociclos tetrapirrólicos em suas estruturas não apresentam toxicidade no escuro e têm sido amplamente pesquisados nas últimas décadas. As porfirinas são utilizadas excessivamente para aplicações de TFD, uma vez que são muito estáveis e representam a primeira geração de FS, apesar da estabilidade, tendem a induzir à fotossensibilidade dos tecidos saudáveis e não possui penetração profunda dos tecidos, relativo à baixa absorvância em 630 nm. O primeiro fotossensibilizador empregado clinicamente para a terapia do câncer foi uma mistura de porfirinas solúveis em água, chamadas de Derivados de Hematoporfirina que foram purificadas na forma de porfímero sódico e foi oficialmente aprovado ao redor do mundo, sendo comercializado como Photofrin. As clorinas são FS de segunda geração e são formas reduzidas de porfirina ou derivados de clorofila. Já as ftalocianinas possuem uma alta eficiência quando se trata de TFD, são de segunda geração e possuem um metal diamagnético iônico que permite a penetração de luz em tecidos mais profundos com efeitos colaterais fototóxicos bem menores (Agostinis *et al.*, 2011; Josefsen e Boyle, 2012; Naidoo *et al.*, 2018).

Figura 7: Estrutura química do Grupo Heme presente nas Hemoglobinas e as estruturas dos principais fotossensibilizadores: Porfirina, Clorina e Ftalocianina



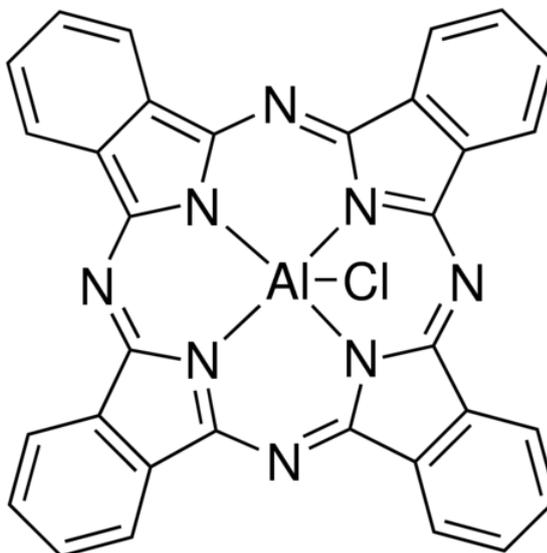
Os fármacos fotossensibilizadores, mais utilizados na TFD, absorvem na região do vermelho no espectro eletromagnético (640-710 nm), uma vez que a luz vermelha tem maior penetração nos tecidos e está dentro da “janela terapêutica”, a faixa de comprimento de onda do espectro eletromagnético entre 600 e 800 nm onde ocorre a maior penetração do tecido devido à falta de interferência de cromóforos endógenos que absorvam nessa região (Barbugli, 2010; Siqueira-Moura *et al.*, 2013).

A TFD se mostrou muito eficiente no tratamento de cânceres de pele não melanoma, especialmente em carcinomas das células basais, porém os melanomas cutâneos apresentaram fotoresistência aos fármacos fotossensibilizadores que absorvem em comprimentos de onda menores do que 600 nm. Acredita-se que essa fotoresistência esteja relacionada à melanina, pigmento produzido pelos melanócitos, que dispersa a luz visível de baixo comprimento de onda. Com base nestas premissas, nos últimos anos, existe um trabalho crescente de síntese ou isolamento de fármacos fotossensíveis que absorvam em comprimentos de onda maiores do que 630 nm, uma vez que este comprimento evita a dispersão da luz, já que o comprimento máximo de absorção da maior parte dos pigmentos endógenos absorvem em comprimentos de onda menores que 600 nm, principalmente a hemoglobina cujo comprimento máximo de absorção é próximo de 540 nm, enquanto a absorção máxima da melanina é de 420 nm. Para lesões pigmentadas, verificou-se que as metalofterrocianinas seriam bons fármacos fotossensibilizadores, uma vez que possuem o máximo de absorção entre 670-680 nm, na região do vermelho do espectro visível (Faber *et al.*, 2003; Nowis *et al.*, 2005; Primo *et al.*, 2008; Barbugli, 2010; Siqueira-Moura *et al.*, 2013).

A Ftalocianina de alumínio-cloro (AlClPc) (Figura 8) é um fotossensibilizador que possui um macrociclo tetrapirrólico e um íon metálico central (Al^{3+}) em sua estrutura, o que confere a ela as propriedades fotofísicas e fotoquímicas mais favoráveis para aplicação em TFD. Devido à sua estrutura molecular, essa classe de compostos altamente conjugados, como outros similares apresentam alta hidrofobicidade o que impede a sua aplicação direta no tecido biológico alvo por solubilização direta em meio aquoso fisiológico. Diversas estratégias de encapsulação vêm sendo desenvolvidas e utilizadas nos últimos anos para aumentar a solubilidade dos ativos, assim como a biodisponibilidade de compostos lipofílicos. O desenvolvimento de sistemas de “*drug delivery*”, ou sistemas veiculadores de fármacos, com ênfase especial no *design* e fabricação de sistemas para tratamento de câncer são elaborados com o intuito de minimizar a degradação do fármaco após a administração, prevenir efeitos colaterais

indesejáveis e sustentar e/ou aumentar a biodisponibilidade do medicamento na área alvo (Estevanato *et al.*, 2011; Siqueira-Moura *et al.*, 2013).

Figura 8: Estrutura química da ftalocianina de alumínio-cloro



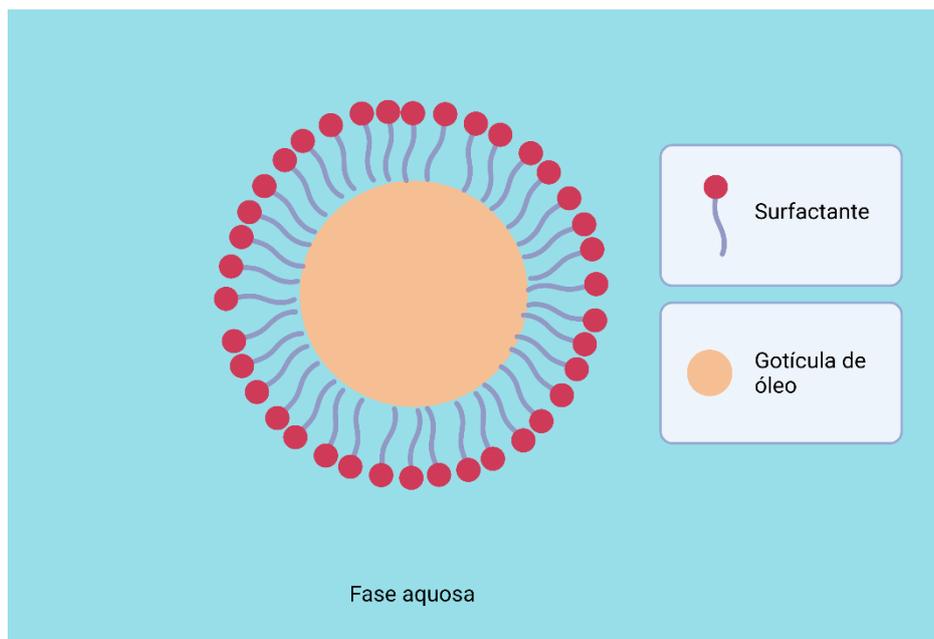
1.13 Veiculadores de Fármaco

Os veiculadores de fármaco são sistemas utilizados para transportar drogas terapêuticas pelo corpo com segurança para atingir alvos e efeitos terapêuticos desejados. Também mencionados como carreadores, esses sistemas são projetados para melhorar a solubilidade em água e a estabilidade química dos agentes ativos carreados, assim como aumentar a atividade farmacológica e reduzir os efeitos colaterais. Essas estruturas também protegem as moléculas carreadas da degradação prematura no ambiente biológico, aumenta a biodisponibilidade e prolonga a presença no sangue e captação celular, quando administrados pelo sistema circulatório. O principal objetivo de qualquer sistema veiculador de fármaco é fornecer e manter as concentrações terapêuticas do carregado no local algo desejado (Shah *et al.*, 2010; Ribeiro *et al.*, 2013; Sharifi *et al.*, 2020).

São exemplos de sistemas de veiculação de fármacos: lipossomo, nanopartículas lipídicas solidas, carreadores lipídicos nanoestruturados, nanoemulsão, nanocomposito, hidrogel, micelas poliméricas, nanoformulação “*spray-dried*”, nanofibras, óxido de grafeno, nanoconjugados, assim como nanosuspensões, nanoesferas, “*nanoshell*”, nanocapsulas e dendrímeros. Novos sistemas veiculadores de fármacos, como: micelas poliméricas, lipossomos, nanopartículas e nanoemulsões, vêm sendo desenvolvidos com compartimentos hidrofóbicos para solubilização de compostos altamente lipofílicos como as ftalocianinas (Shah *et al.*, 2010; Ribeiro *et al.*, 2013; Sharifi *et al.*, 2020).

Uma dessas estratégias de encapsulação e veiculação de fármacos é o preparo de Nanoemulsões (NE). A NE pode ser definida como dispersão coloidal de dois líquidos imiscíveis estabilizados por um surfactante apropriado. Essas dispersões podem ocorrer como óleo-em-água (Figura 9), ou ainda como água-em-óleo, sendo a primeira mais utilizada, uma vez que a grande parte dos fármacos utilizados no processo de encapsulação são altamente lipofílicos (Singh *et al.*, 2017).

Figura 9: Representação esquemática de nanoemulsão óleo-em-água



Criado com BioRender.com

O tamanho médio de gotículas dispersas está localizado entre 50 e 1000 nm, porém o tamanho médio das gotículas das formulações mais utilizadas está entre 100 e 500 nm. Uma formulação típica é constituída por um lipídeo (saturado ou insaturado), atuando como, base estrutural da nanoemulsão, associado a um agente emulsificante, como a lectina, e um meio diluente, no caso água (Shah *et al.*, 2010).

As NE podem ser processadas em diversas formas de dosagem como líquidos, cremes, sprays, géis, aerossóis, espumas e, ainda, podem ser administradas por diversas vias como a tópica, oral, intravenosa, intranasal, pulmonar e ocular. As maiores aplicações das NE estão no tratamento de infecção de sistemas reticuloendoteliais, terapia de reposição enzimática no fígado, tratamento de câncer e vacinação. As NE ainda têm sido bem estudadas como veiculador tópico, uma vez que promovem baixa irritabilidade da pele e possuem a habilidade de proteger quimicamente os fármacos da degradação por

luz ultravioleta, o que confere maior estabilidade à medicação (Jaiswal *et al.*, 2015; Singh *et al.*, 2017; Pandey *et al.*, 2018).

Uma vez que o número de casos de melanoma cresce todos os anos ao redor do mundo, assim como a preocupação referente a esse tipo de câncer devido à sua agressividade, este trabalho visa propor um modelo que se baseia na engenharia de tecidos para estudos *in vitro* dessa neoplasia associada a um tecido saudável de pele. De modo a servir como uma alternativa ao uso de animais no estudo de doenças como o melanoma, esse modelo será também utilizado para auxiliar no desenvolvimento de tratamento baseado nos princípios da Terapia Fotodinâmica.

2. Objetivo Geral

Verificar a interação e comportamento de uma cultura 3D (sistema esferoidais) contendo células de melanoma em três diferentes estágios de progressão tumoral associada a equivalentes dérmicos de fibroblastos saudáveis. Propõe avaliar os efeitos da terapia fotodinâmica sobre estes sistemas biomiméticos de câncer de pele.

2.1 Objetivos Específicos

- Cultivar e caracterizar os esferoides multicelulares sintetizados a partir de células dos três estágios de progressão tumoral de melanoma e sua associação aos sistemas de equivalentes dérmicos;
- Verificar interação das células de melanoma (em cultura 2D e 3D) com a nanoemulsão de ftalocianina de alumínio-cloro, avaliando a sua citotoxicidade e fototoxicidade frente aos processos usados na Terapia Fotodinâmica;

3. Materiais e Métodos

3.1 Cultura celular

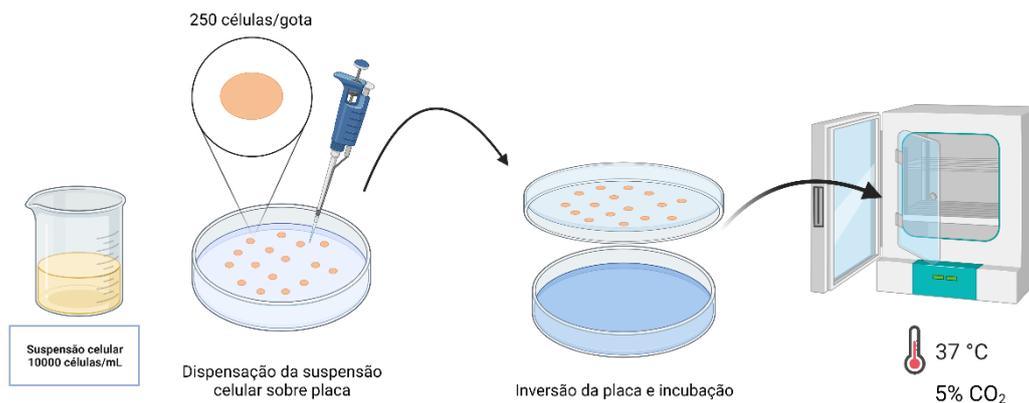
As células de melanoma WM 35 e WM 1552, cujo estágio de crescimento é radial, WM 278, cujo estágio de crescimento é vertical, e WM 1617, cujo estágio de crescimento é metastático, foram doadas pela Professora Doutora Enilza Maria Espreafico, e cultivadas em Meio Tumoral 2% (TU) composto pela mistura dos meios MCDB-153 (80% V/V, Sigma-aldrich, Alemanha) e Leibovitz's L-15 (20% V/V, Gibco, EUA), suplementado com insulina humana (5,0 mg mL⁻¹, Sigma-aldrich, Alemanha), CaCl₂ (2,0 mmol L⁻¹, Sigma-aldrich, Alemanha) e soro fetal bovino (SFB) (2% V/V, Gibco, EUA). As células de fibroblastos humanos foram cultivadas em meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium* - Gibco, EUA), suplementado com SFB (10% V/V, Gibco, EUA) e ampicilina/estreptomicina (20 µg mL⁻¹, USB Corporation, EUA). As células de melanoma foram descongeladas, em seguida, centrifugadas em meio Leibovitz's L-15 (10% SFB V/V, Gibco, EUA) por 10 minutos à 1500 RPM e cultivadas em garrafas de 25 cm² contendo 6 mL Meio TU até atingir 80% da confluência, após 48 horas; então, foram soltas das garrafas com o auxílio de Tripsina (0,5% V/V EDTA, Gibco, USA), centrifugadas em Leibovitz's L-15 (10% SFB V/V, Gibco, EUA) e mantidas em garrafas de 75 cm² contendo 11 mL de meio TU. As células WM 1617 foram mantidas e replicadas para garrafas de 25 cm². As células de fibroblastos foram descongeladas e centrifugadas com meio de cultura celular DMEM suplementado, em seguida, foram mantidas em garrafas de 75 cm² até atingir 80% de sua confluência. As células foram mantidas em atmosfera úmida a 37°C com 5% de CO₂. Elas foram expandidas e replicadas para dentro da necessidade de acordo com os procedimentos padrões realizados em Sala esterilizadas em Capela de Fluxo Laminar Classe II.

3.2 Formação de esferoides multicelulares

A formação de esferoides multicelulares foi realizada utilizando o método de cultura em gota suspensa, baseado no protocolo descrito por Müller e Kulms (2018). Para todas as linhagens estudadas, WM 35, WM 278, WM 1552 e WM 1617, aproximadamente 35 a 40 gotas de volume de 25 µL contendo 250 células por gota em meio de cultura TU 2% foram adicionadas à tampa de uma placa de cultura em suspensão não tratada, com dimensões 100 mm x 20 mm (Corning Inc., EUA). Ao fundo da placa, foi adicionado um volume de 10 mL de PBS (tampão fosfato-salino). A tampa foi cuidadosamente vertida sobre o fundo (Figura 10) e a placa foi incubada em atmosfera

úmida com 5% de CO₂ e temperatura de 37°C. A troca de 5 µL de meio de cada gota foi realizada a cada dois dias de cultura (exceto a primeira troca realizada após quatro dias). Para realizar a troca de meio, as tampas foram invertidas, 5 µL de meio foi removido de cada gota seguida da adição de 5 µL de meio.

Figura 10: Representação esquemática do protocolo de formação de esferoides multicelulares pelo método da gota suspensa



Criado com BioRender.com

3.3 Caracterização morfológica dos esferoides multicelulares

A caracterização morfológica dos esferoides para as linhagens foi realizada por imagens de microscópio ótico obtidas com o auxílio de um microscópio Zeiss Axiovert 40 CFL (Carl Zeiss, Göttingen, Alemanha) acoplado com uma câmera digital de alta resolução Axio-cam- 40 CFL (Carl Zeiss, Göttingen, Alemanha) e objetiva de 5x. As imagens obtidas foram analisadas com relação ao tamanho, esfericidade, rugosidade e circunferência 2D utilizando *software* ImageJ (Fiji package) (*National Institutes of Health*, Bethesda, Maryland, EUA). Um *script* de macro foi escrito para automatizar o processo (Macro S1) como descrito por Ivanov *et al.* (2014). Os parâmetros de forma, assim como o diâmetro, foram obtidos e classificados de acordo com a função de análise de imagem do software. O diâmetro de Feret foi utilizado para estimar o diâmetro médio dos esferoides, uma vez que é calculado a partir da mais longa distância entre dois pontos. O parâmetro “Roundness” foi utilizado para verificar o quão próximo da forma de um círculo está a imagem 2D do esferoide, o valor 1,0 indica um círculo perfeito, enquanto os valores próximos de 0,0 indicam formas mais alongadas; este parâmetro é dado pela relação matemática:

$$4 * \frac{[Area]}{\pi * [eixo\ principal]^2}.$$

O parâmetro “Circularity” é determinado pela relação matemática:

$$4\pi * \frac{[Area]}{[Perímetro]^2};$$

o valor 1.0 indica um círculo perfeito, enquanto os valores próximos de 0.0 indicam deformidades na superfície analisada. O parâmetro “Aspect Ratio” é determinado pela razão entre os eixos de uma elipse, o valor 1.0 indica um círculo.

3.4 Preparo de nanoemulsão contendo ftalocianina de alumínio-cloro como fotoativo

O preparo das Nanoemulsões (NE) foi realizado por meio da técnica de emulsificação espontânea, como descrito por (Primo *et al.*, 2008) com adaptações. Para a fase orgânica, contendo 75,00 mg de lecitina de soja - Epikuron 75 (Lucas Meyer S.A.) foram dissolvidos em 10 mL de acetona (Sigma-aldrich, Alemanha) a temperatura constante de 55°C. Em seguida, 800,00 µg do agente fotossensibilizador (AICIPc) e 250 µL de óleo Edenor EvV 85 KR (Cosmoquímica, Brasil) foram também adicionados à mesma solução, sob agitação magnética até completa solubilização. Para a fase aquosa, foram adicionados inicialmente 75,00 mg de Pluronic F68 (Sigma-aldrich, Alemanha), que possui função de surfactante, dissolvidos em 20 mL de água ultrapura filtrada em filtro Millipore 0,22 µm. A nanoemulsão se formou pela lenta injeção da fase orgânica à fase aquosa sob agitação magnética constante (300 rpm por 30 minutos) a 55°C. A solução final foi transferida para um balão de fundo redondo de 25 mL e o solvente foi evaporado em um rotaevaporador R-210/215 (Bushi, Brasil) à pressão reduzida com temperatura de aproximadamente 55°C e velocidade de rotação do balão de 125 rpm, até obter um volume final de 10 mL.

3.5 Estimativa da Viabilidade Celular dos esferoides multicelulares

Em função dos resultados preliminares observados com as linhagens WM 35, WM 278, WM 1552 e WM 1617, as células WM 1617 foram escolhidas para a realização dos demais estudos. Este tipo celular, como descrito, apresenta características morfológicas desejáveis, além de representar o estágio de crescimento metastático, esta característica impacta na propagação de outros focos de câncer, assim como promove o aumento da letalidade da doença, tornando-a de mais difícil tratamento e maior agressividade.

Para a estimativa da viabilidade celular dos esferoides multicelulares, o meio de cultura celular de cada gota contendo esferoide em seu dia de cultivo específico foi retirado e ao esferoide foi adicionado um volume de 20 µL de solução de LIVE/DEAD™

Viability/Cytotoxicity Kit, *for mammalian cells* (Invitrogen, EUA). A placa contendo os esferoides foi incubada por 30 min em temperatura ambiente na ausência de luz, então foi visualizada em microscópio confocal de varredura a laser Leica Platform TCS SP8 (Leica Microsystems, Alemanha). 20 esferoides celulares foram separados e transferidos cada um, em um volume de 15 μL de meio celular, para um poço de uma placa de 96 poços. A cada poço, foi acrescentado 85 μL de solução de AlamarBlue™ Cell Viability Reagent (Invitrogen, EUA) em RPMI 1640 sem vermelho fenol (BioWest, França) suplementado com 1% de SFB a placa foi incubada por 24 horas. 40 μL de cada poço foi transferido para uma nova placa que foi lida em leitora de placas Cytation 5 (Biotek, EUA) utilizando o Software Gen 5 (Biotek, EUA).

3.6 Ensaios de internalização celular de ftalocianina de alumínio-cloro

Os estudos em monocamada foram realizados em placa de 96 poços após 24h do plaqueamento de 10.000 células/poço utilizando Meio de Cultura TU 2%. Para verificar a eficiência de internalização celular do fármaco fotossensibilizador (PS), foram utilizadas as soluções preparadas em meio RPMI 1640 sem vermelho fenol (BioWest, França) suplementado com 1% de SFB contendo ftalocianina de alumínio-cloro solubilizada em DMSO (dimetilsulfóxido, Sigma-Aldrich, Alemanha) na concentração total de 5 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Foi avaliado neste estudo a nanoemulsão carregada de ftalocianina de alumínio-cloro (NE-AICIPc) em uma faixa de concentrações de 0,5, 1,5, 3,0 e 5,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Após a aplicação dos ativos, a placa foi incubada por 3h em atmosfera úmida com 5% de CO_2 e temperatura de 37°C.

Para a verificação do tempo ótimo de internalização do fármaco para as células WM 1617 em monocamada, foram adicionadas às células a NE-AICIPc em meio RPMI sem fenol suplementado com 1% de SFB na concentração de 0,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Essas células foram incubadas em atmosfera úmida com 5% de CO_2 e temperatura de 37°C pelos períodos de 1, 2, 3, 4, 5 e 6 horas. Após o período de incubação correspondente para cada ensaio, o meio foi removido dos poços que foram cuidadosamente lavados com PBS e substituídos por meio DMEM FluoroBrite (Gibco, EUA). As placas foram lidas em leitora de placas Cytation 5 (Biotek, EUA) utilizando o Software Gen 5 (Biotek, EUA) para avaliar espectroscopicamente, por meio da fluorescência, a quantidade de fotoativo incorporado.

Os estudos em esferoides multicelulares cultivados por 11 dias foram realizados após a retirada do meio de cultura das gotas e adição de um volume de 20 μL de nanoemulsão contendo o fotossensibilizador de ftalocianina de alumínio-cloro em meio

RPMI 1640 sem vermelho fenol (BioWest, França) na concentração de $1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ a cada gota. A tampa da placa foi invertida novamente e incubada em atmosfera úmida com 5% de CO_2 e temperatura de 37°C pelos períodos de 0,5, 1,5, 2,5, 4 e 6 horas. Após os períodos de incubação, o meio de cultura contendo a formulação foi retirado. Cuidadosamente $20 \mu\text{L}$ de PBS foram adicionados e retirados de cada gota para lavagem dos esferoides. Finalmente, $20 \mu\text{L}$ de meio TU 2% foram adicionados a cada gota. Para verificação qualitativa da internalização celular do fármaco, a placa contendo os esferoides tratados foi visualizada em microscópio confocal de varredura a laser Leica Platform TCS SP8 (Leica Microsystems, Alemanha). De modo a manter a integridade dos esferoides, a tampa da placa visualizada diretamente, sem a realização da transferência dos esferoides para lamínulas ou placas com fundo de vidro. Em seguida, as imagens obtidas foram analisadas utilizando software ImageJ (Fiji package) (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, EUA) de modo a obter a intensidade de fluorescência apresentada em cada esferoide tratado em Fluorescência Celular Total Correlacionada (FCTC). Já para verificação quantitativa, oito esferoides tratados foram separados e transferidos para um microtubo e, então, centrifugados a 1200 rpm por 10 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante foi cuidadosamente descartado e o precipitado resultante dos oito esferoides foram ressuspensos em 1 mL de PBS que foi centrifugado novamente. O precipitado resultante foi ressuspendido em 1 mL de álcool isopropílico (Sigma-aldrich, Alemanha) e deixado sob refrigeração por 20 horas. Em seguida, o volume de $250 \mu\text{L}$ referente a cada microtubo foi transferido para uma placa de 96 poços que foram lidos em leitora de placas Cytation 5 (Biotek, EUA) utilizando o Software Gen 5 (Biotek, EUA).

3.7 Ensaios de citotoxicidade

Para a realização dos estudos de citotoxicidade em células melanômicas, as células WM 1617 plaqueadas em monocamada foram tratadas com NE-AICIPc nas concentrações 0,5, 1,5, 3,0 e $5,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ e AICIPc livre na concentração de $5 \mu\text{mol L}^{-1}$, como descrito na seção 3.6, pelo período de 4 horas em atmosfera úmida com 5% de CO_2 e temperatura de 37°C . Após o período de incubação, o tratamento foi retirado dos poços que foram cuidadosamente lavados com PBS e acrescidos de meio Tumoral 2%. A placa foi novamente incubada por 24 horas. Então, o meio de cultura celular foi retirado e os poços foram lavados novamente com PBS e acrescidos de solução de MTT (brometo de 3-4,5-dimetil-tiazol-2-il-2,5-difeniltetrazólio), versão comercial Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide (Sigma-Aldrich, Alemanha), em meio RPMI 1640 sem vermelho

fenol (BioWest, França) em concentração de $0,75 \text{ mg mL}^{-1}$. A placa foi incubada novamente por um período de 4 horas, então, a solução foi retirada dos poços e um volume de $200 \mu\text{L}$ de álcool isopropílico (Sigma-aldrich, Alemanha) foi adicionado a cada poço. A placa foi deixada sob agitação orbital por 20 minutos e lida em leitora de placas Cytation 5 (Biotek, EUA) utilizando o Software Gen 5 (Biotek, EUA).

Os esferoides multicelulares WM 1617 foram tratados com NE-AICIPc e AICIPc livre administrados nas concentrações de $0,5$, $1,0$, $2,0$ e $5,0 \mu\text{mol L}^{-1}$, como descrito na seção 3.6. A placa foi incubada por 4 horas em atmosfera úmida com 5% de CO_2 e temperatura de 37°C . Após 24 h, o ensaio de viabilidade AlamarBlue foi realizado nos esferoides tratados, como descrito na seção 3.5.

3.8 Ensaios de Fotocitotoxicidade

As células WM 1617 plaqueadas em monocamada foram tratadas com NE-AICIPc na concentração de $0,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ por 4 h em atmosfera úmida com 5% de CO_2 e temperatura de 37°C , assim como um controle contendo nanoemulsão vazia, como descrito na seção 3.6. Após o tratamento, os poços foram irradiados com laser-diodo Eagle (QuantumTech., Brasil) com feixe de excitação em 670 nm em doses de energia de 0 , $1,0$, $5,0$, $10,0$ e $25,0 \text{ J cm}^{-2}$. 24 horas após a irradiação, o meio de cultura celular foi descartado e os poços foram lavados cuidadosamente com PBS para receber a solução de MTT, como descrito na seção 3.7.

Já os esferoides multicelulares preparados com as células WM 1617 foram tratados com NE-AICIPc administrada na concentração de $1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ por 4 h em atmosfera úmida com 5% de CO_2 e temperatura de 37°C , como descrito na seção 3.6. Após o tratamento, cada gota foi irradiada com laser-diodo Eagle com densidades de energia variando na faixa de 0 , $5,0$, $10,0$, $25,0$, $50,0$ e $100,0 \text{ J cm}^{-2}$. Após 24h, os ensaios de viabilidade celular AlamarBlue e LIVE/DEAD foram empregados, como descrito na seção 3.5.

Para avaliar o comportamento desses esferoides após a irradiação, também foi realizado o acompanhamento dos esferoides por até 24 horas após a irradiação por meio do microscópio óptico Zeiss Axiovert 40 CFL (Carl Zeiss, Göttingen, Alemanha) acoplado com uma câmera digital de alta resolução Axiocam- 40 CFL (Carl Zeiss, Göttingen, Alemanha) e objetiva de 5x.

3.9 Preparo de equivalentes dérmicos

Os equivalentes dérmicos foram preparados a partir de uma mistura de proporções pré-estabelecidas após padronização com base na metodologia desenvolvida por Primo *et al.* (2011). Entre os componentes utilizados, foi empregado meio de cultura celular DMEM concentrado 1,76 vezes, SFB (9% V/V), suspensão de colágeno do tipo I na concentração $3,0 \text{ mg mL}^{-1}$ e suspensão celular contendo $2,0 \times 10^5$ células mL^{-1} em meio de cultura celular DMEM suplementado como mencionado na seção **3.1**. A mistura foi homogeneizada com cuidado para evitar a formação de bolhas e, então, transferida para uma placa de cultura celular de 6 poços. A placa foi incubada por 45 minutos em atmosfera úmida com 5% de CO_2 e temperatura de 37°C . Movimentos circulares delicadas, foram aplicados à mistura em processo de solidificação para soltura do sistema das paredes da placa de cultura utilizada para preparo. A placa foi mantida em incubadora. O meio de cultura celular foi trocado ou suplementado a cada 48 horas.

3.10 Estudos da Cinética de Contração dos Equivalentes Dérmicos

A contração dérmica foi acompanhada por meio da medição da variação do diâmetro médio do equivalente ao longo do tempo por até 14 dias. Para a determinação dos diâmetros foram realizadas fotografias (com celular Galaxy J5 Prime, Samsung, Coreia do Sul) das placas de 6 poços contendo os equivalentes seguidos de medição com o auxílio de uma régua. Para verificar alterações na microestrutura desses equivalentes, o acompanhamento também se deu por imagens de microscopia ótica com o auxílio de um microscópio Zeiss Axiovert 40 CFL (Carl Zeiss, Göttingen, Alemanha) acoplado com uma câmera digital de alta resolução Axiocam-40 CFL (Carl Zeiss, Göttingen, Alemanha) e objetiva de 5x.

3.11 Marcação de esferoides multicelulares e inclusão em equivalentes dérmicos

Foram empregados esferoides multicelulares WM 1617 com 11 dias de cultivo celular marcados com NE-AICIPc na concentração de $1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$. Os esferoides foram, então, transferidos para equivalentes dérmicos preparados com antecedência de cinco dias. Com o auxílio de uma micropipeta semiautomática, a transferência do esferoide multicelular foi feita um a um. Os equivalentes dérmicos contendo os esferoides multicelulares marcados foram mantidos em atmosfera úmida com 5% de CO_2 e temperatura de 37°C por 30 minutos. Na sequência, foi adicionado ao sistema 2 mL de meio DMEM suplementado para cultura celular a cada equivalente dérmico. Os sistemas foram mantidos em incubação e sob observação por 7 dias. Outros equivalentes foram preparados para que esferoides não marcados e marcados com a nanoemulsão vazia e

nanoemulsão contendo o fármaco fotossensibilizador (AICIPc), pudessem ser avaliados. Os esferoides adicionados ao Equivalente Dérmico sem prévia marcação foram observados em microscópio confocal de varredura a laser Leica Platform TCS SP8 (Leica Microsystems, Alemanha) utilizando-se o módulo de contraste de fase. Antes da realização da observação no microscópio, as bordas da placa foram seladas com fita adesiva para evitar a abertura durante o procedimento, de maneira a preservar os sistemas durante os dias de observação.

3.12 Estudos de microscopia confocal

Após o oitavo dia de inclusão dos esferoides ao equivalente, o meio de cultura celular foi retirado e os equivalentes foram cuidadosamente lavados duas vezes com solução de PBS 10,0 mM. Um volume de 1 mL de solução tamponada de formaldeído 10% foi adicionado e o sistema foi incubado por 30 minutos sob refrigeração. A solução foi retirada e o sistema foi novamente lavado duas vezes com PBS. Uma solução de glicina/PBS (Sigma-aldrich, Alemanha) foi adicionada e incubada a temperatura ambiente por 15 minutos, então a solução foi retirada e o sistema foi novamente lavado com PBS. Em seguida, uma solução de Triton X-100 0,1% (Sigma-aldrich, Alemanha) foi adicionada e incubada também por 15 minutos a temperatura ambiente; após o período de incubação, a solução foi retirada e o sistema lavado com PBS. Então o sistema foi incubado com marcador DAPI (0,1875 mg mL⁻¹, 4',6-diamidino-2-phenylindole, dihydrochloride) (Invitrogen, EUA) por 40 minutos em temperatura ambiente, para posteriormente ser novamente lavado e incubado com marcador Alexa Fluor® 488 phalloidin (0,125% V/V PBS, Invitrogen, EUA) por 40 minutos em temperatura ambiente. O marcador foi retirado e o sistema lavado duas vezes cuidadosamente. O sistema então foi transferido com a ajuda de uma espátula para uma placa com fundo de vidro contendo FluoroMount-G Mounting Medium (Invitrogen, EUA), de modo que a face do equivalente que recebeu todos os marcadores ficasse em contato com o vidro. As imagens de microscopia confocal foram realizadas em microscópio confocal de varredura a laser Leica Platform TCS SP8 e objetivas de 5 e 20x (Leica Microsystems, Alemanha).

3.13 Ensaio de fotocitotoxicidade do Equivalente Dérmico

Equivalentes dérmicos, com cinco dias de proliferação, foram transferidos para placas de Petri de cultivo celular com o auxílio de uma espátula esterilizada. Então, foi adicionado um volume de 2 mL de meio DMEM (Gibco, EUA) suplementado com 10% SFB. Os equivalentes foram irradiados com densidade de energia de 0, 5,0, 10,0 e 25,0 J cm⁻² em um sistema de LED Box 660 nm e Light Chamber associados a um Controlador

de emissores de Luz (Black Box Smart) (BioLambda, Brasil). Após a irradiação, a microestrutura dos esferoides foi avaliada por até 48 horas com o auxílio um microscópio óptico Zeiss Axiovert 40 CFL (Carl Zeiss, Göttingen, Alemanha) acoplado com uma câmera digital de alta resolução Axiocam- 40 CFL (Carl Zeiss, Göttingen, Alemanha) e objetiva de 5x.

Equivalentes dérmicos após 3 dias de inclusão de esferoides multicelulares tratados com NE-AICIPc em concentração $1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ foram irradiados com dose total de energia de 25 J cm^{-2} . Após 24 horas após a irradiação, o meio celular foi retirado e cada sistema foi lavado cuidadosamente com PBS. Adicionou-se $600 \mu\text{L}$ de solução de LIVE/DEAD™ Viability/Cytotoxicity Kit, for mammalian cells (Invitrogen, EUA) deixados a temperatura ambiente em abrigo de luz para incubação por 40 minutos. Na sequência, os sistemas foram observados em microscópio confocal de varredura a laser Leica Platform TCS SP8 (Leica Microsystems, Alemanha).

3.14 Análise Estatística

Os dados obtidos foram analisados por meio do Software PRISM (GraphPad, EUA) e apresentados como média \pm desvio padrão da média para as amostras preparadas em triplicata. As diferenças estatisticamente significantes serão consideradas para valores de $p < 0,05$. Os gráficos foram produzidos por meio do Software PRISM (GraphPad, EUA) e OriginPro (OriginLab Corporation, EUA).

4. Resultados e Discussão

4.1 Caracterização dos esferoides multicelulares

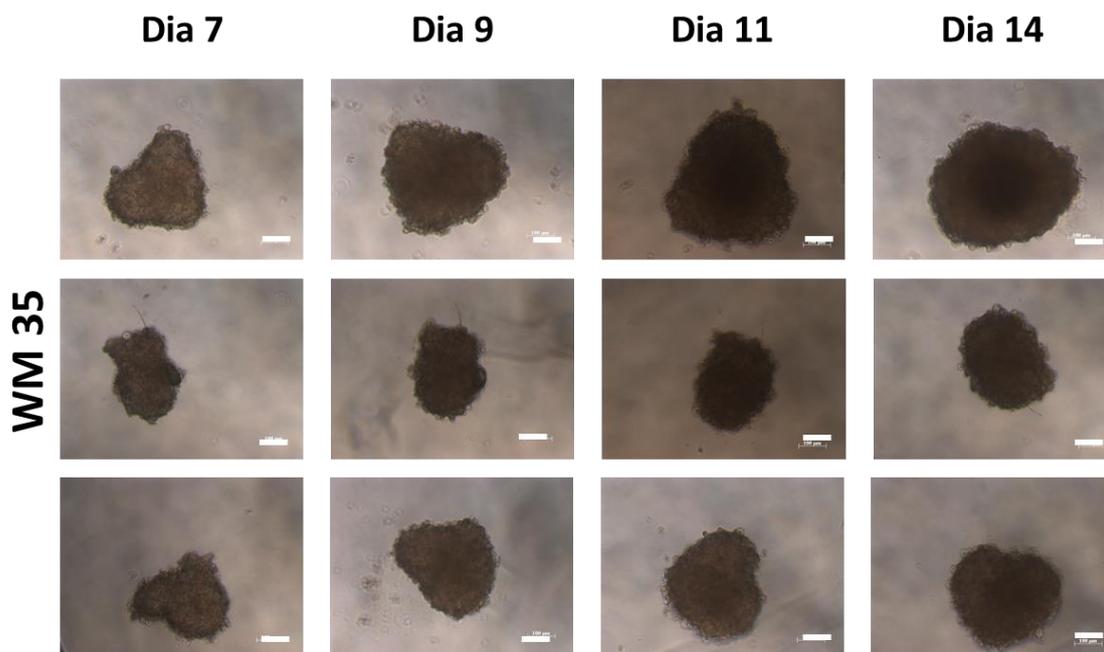
Os sistemas esferoidais, contendo as células em estudo, foram desenvolvidos considerando-se a analogia entre os sistemas 3D e os sistemas tumorais em desenvolvimento em humanos. Nos últimos anos, vários estudos têm sido conduzidos utilizando estes sistemas, que de certa forma representam melhor os estados de progressão e crescimento tumoral do que os observados em estudo *in vivo* (pequenos animais) e em Humanos (Vörsmann *et al.*, 2013; Marconi *et al.*, 2018; Müller e Kulms, 2018). Assim adotamos como padrão estudos com tais sistemas, para as linhagens que permitem sua produção, reprodutibilidade e utilização dentro da janela de tempo experimental.

Os esferoides multicelulares foram formados utilizando o método de gota suspensa (Müller e Kulms, 2018). O método foi padronizado para as linhagens de células de melanoma: WM 35, WM 1552, WM 278 e WM 1617. Estas quatro linhagens foram escolhidas como modelos de representação dos três estágios de progressão de lesões melanômicas: o estágio de crescimento radial (WM 35 e WM 1552), crescimento vertical (WM 278) e metastático (WM 1617). Essas células foram isoladas entre as décadas de 1970 e 1980 pelo Instituto Wistar a partir de amostras cedidas pelo Departamento de Patologia Cirúrgica do Hospital da Universidade da Pensilvânia, nos Estados Unidos da América. As células de Melanoma Wistar (do inglês, *Wistar Melanoma* – WM) WM 35 foram isoladas a partir de um melanoma de espalhamento superficial de uma mulher de 24 anos. As WM 1552 foram isoladas a partir de um melanoma de espalhamento superficial de um homem de 72 anos. E as células WM 278 e WM 1617 foram isoladas de uma mesma paciente, sendo as células WM 1617 resultado da reincidência do tumor na forma metastática (Herlyn *et al.*, 1990; Hsu *et al.*, 2002).

Inicialmente, foram preparados esferoides multicelulares de células WM 35, que possuem um estágio de crescimento radial para tumores melanômicos, durante 14 dias de estudos. Como ilustrado na Figura 11, essas células se associaram espontaneamente e tenderam a permanecer agregadas com uma certa facilidade até pelo menos 14 dias de cultivo. Um limiar parcialmente definido na fronteira dos agregados é indicativo de um

certo grau de interação célula-célula, importante para os processos de agregação e compactação que levam à formação de esferoides multicelulares de compactação firme.

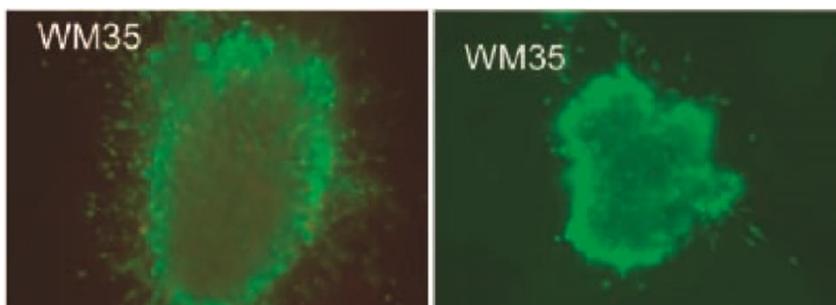
Figura 11: Esferoides multicelulares formados a partir das células WM 35 ao decorrer de 14 dias. Barra equivale a 100 μm .



A análise das microfotografias destes esferoides multicelulares foi realizada utilizando o software ImageJ (Fiji package) e um script de macro (Macro S1) como descrito por Ivanov *et al.* (2014), que consistiu na extração do “background”, permitindo a localização e delimitação do esferoide e consequente análise pelo software.

Smalley *et al.* (2006) observaram também a formação de esferoides multicelulares a partir das células WM 35. Os autores empregaram uma metodologia que consistiu em preparar um berço de ágar, agarose ou uma mistura de ambos em uma placa de poços e, então, plaquear as células sobre a matriz solidificada (Slipicevic *et al.*, 2008). A Figura 12 apresenta os esferoides mencionados.

Figura 12: Esferoides multicelulares formados a partir de células WM 35 pelo método de plaqueamento sobre matriz solidificada.



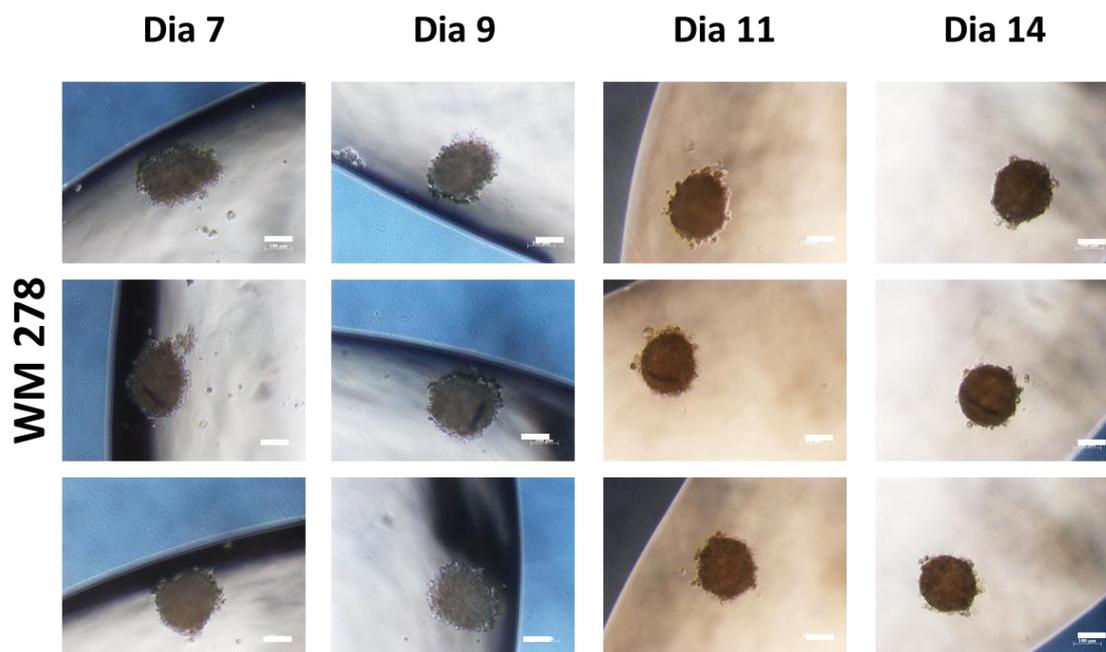
(Adaptada de Smalley *et al.* (2006))

Apesar de os autores não mencionarem dados de morfologia e tamanho e empregarem uma metodologia distinta da usada neste trabalho, foi possível verificar ao observar as Figuras 11 e 12 que, apesar de metodologias diferentes, os esferoides obtidos pela nossa técnica apresentaram o mesmo comportamento morfológico, o que valida nosso protocolo de desenvolvimento e o modelo esferoidal como proposto.

O mesmo tipo de ensaio foi também empregado para as células da linhagem celular WM 278, que apresenta um estágio de crescimento vertical de melanoma. Comparado a WM 35, as células WM 278 (Figura 13) apresentaram a formação de esferoides multicelulares com formato mais próximo do esférico desde os primeiros dias de cultura, demonstrando que o processo de compactação dos agregados celulares em direção a esferoides de compactação firme foi mais efetivo para a WM 278 quando comparado a WM 35. Além disso, pôde-se observar que no dia 14 de acompanhamento temporal, o limiar dos esferoides se tornaram bem mais definido, o que sugere uma

interação célula-célula mais pronunciada e persistente como esperado (Stadler *et al.*, 2015).

Figura 13: Esferoides multicelulares formados a partir das células WM 278 ao decorrer de 14 dias. Barra equivale a 100 μm .

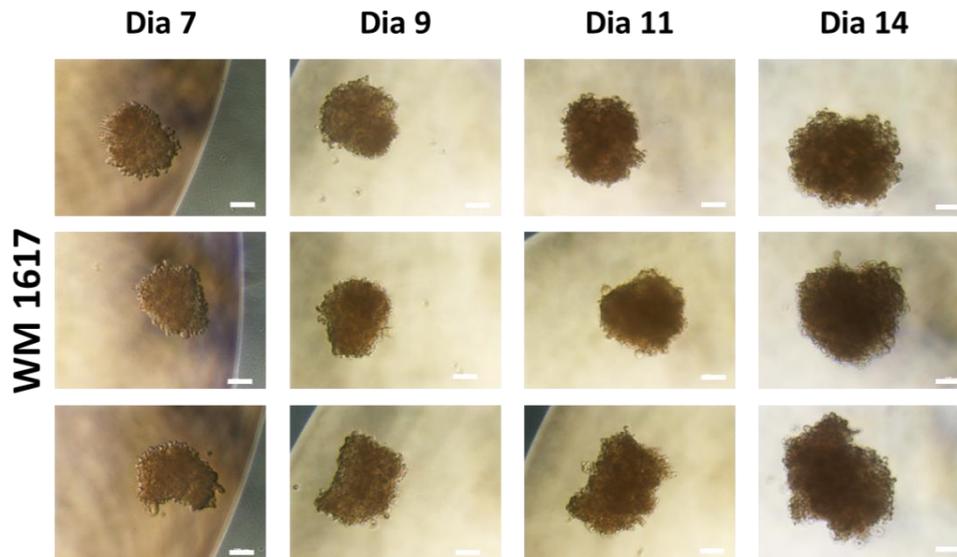


Foi possível verificar que o diâmetro médio dos esferoides diminuiu ao longo do tempo, o que evidencia um processo de compactação bastante significativo, diferente do obtido com as células WM 35. Esse tipo de comportamento sugere que as interações célula-célula foram fortes a ponto de apresentar uma organização que permitisse a contração do esferoide de maneira a torná-lo mais esférico (Stadler *et al.*, 2015).

Na sequência, foram estudados os sistemas esferoidais para a linhagem de células WM 1617, que apresentam um estágio de crescimento metastático de melanoma. Cabe ressaltar que este modelo se destaca dos demais, no que se diz ao processo de câncer de pele, uma vez que é sabido que o melanoma é um dos tipos mais agressivo do câncer de pele, como descrito na introdução, e como o processo de metástase deste tipo de câncer impacta substancialmente na propagação de câncer secundário e na letalidade da doença. Como ilustrado na Figura 14, as células WM 1617 apresentaram a formação de agregados multicelulares sem um formato definido, mas apresentaram proliferação celular periférica, como foi possível observar especialmente no décimo quarto dia. Foi possível observar a ausência de um limiar definido demonstrando uma interação célula-célula fraca. Essa característica poderia ser, ao menos em parte, a força propulsora da

característica metastática do melanoma devido à facilidade de migração em detrimento à interação célula-célula.

Figura 14: Esferoides multicelulares formados a partir das células WM 1617 ao decorrer de 14 dias. Barra equivale a 100 μm .

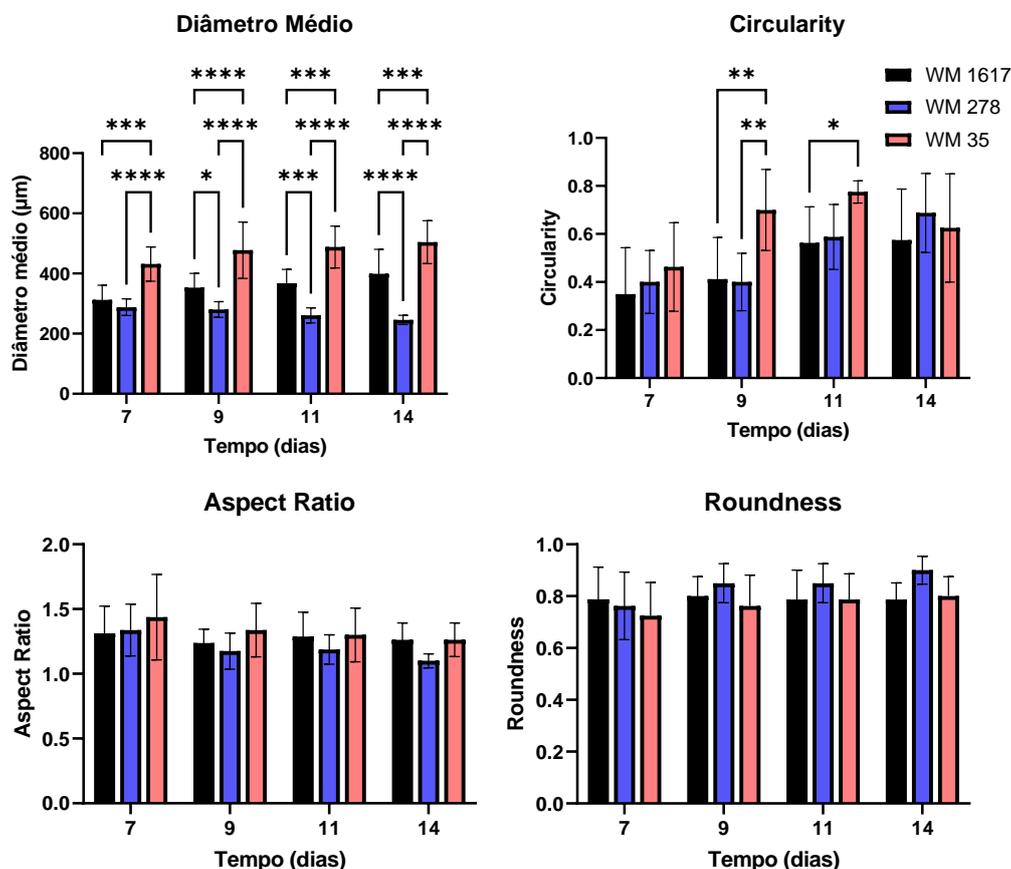


Na sequência foram estudados os sistemas esferoidais multicelulares a partir das células WM 1552, que apresentaram um estágio de crescimento radial melanômico. Os agregados celulares obtidos a partir dessa linhagem demonstram dissociação ao longo do tempo, não adquirindo, assim, um formato esférico. Essa dificuldade em se associarem e permanecerem agregadas, pelo menos quando formado pela metodologia da gota suspensa, sugere a mais fraca interação célula-célula entre todas as linhagens aqui estudadas. Trabalhos de Olbryt *et al.* (2017) indicaram que a formação de esferoides a partir deste tipo de célula pelo método *Ultra-Low Attachment* (ULA) resultou em sistemas mais estáveis. Nesta metodologia o plaqueamento foi realizado sobre uma placa com revestimento ligado covalentemente a superfície o que inibe a fixação celular e permite que as células possam se agrupar, formando os esferoides multicelulares como desejado. Amaral *et al.* (2017) demonstraram que o tipo de metodologia empregada influencia diretamente na formação de esferoides multicelulares. Em seu trabalho, ele apresentou a formação de esferoides formados a partir de células de câncer de bexiga (RT4) utilizando os métodos de gota suspensa e ULA, obtendo para a primeira metodologia um diâmetro médio de 270 μm , enquanto para a segunda metodologia foi observado, um diâmetro médio de 400 μm .

A tendência fraca das células WM 1552 de se agregarem e formar esferoide multicelular impossibilitou a padronização e completa caracterização desses tipos de agregados. Como a linhagem celular WM 35 apresentou uma formação eficaz para esferoides multicelulares, associado ao fato de que ambas apresentam o mesmo estágio de crescimento, optou-se por suspender as atividades com as células WM 1552 e utilizar somente a linhagem WM 35 como modelo para esse estágio de crescimento melanômico.

Os dados parametrizados de diâmetro médio, “Roundness”, “Aspect Ratio” e “Circularity” obtidos para as células WM 35, WM 278 e WM 1617 estão dispostos na Figura 15, que apresenta a comparação gráfica entre os dados obtidos individualmente para os esferoides multicelulares analisados para cada tipo de célula. Não foram apresentados dados dos esferoides formados a partir das células WM 1552, uma vez que não foi atingida a quantidade de esferoides necessárias para obter um mínimo de 8 nos dias em questão, além da dificuldade de formação e a tendência à dissociação deles, como mencionado acima. O diâmetro médio observado para os esferoides mencionados no décimo quarto dia de cultura foi de aproximadamente 500 μm para WM 35, 250 μm para WM 278 e 400 μm para WM 1617. Não há menção dos esferoides dessas células utilizando esse mesmo método de formação de esferoides chamado de gota suspensa na literatura, porém Müller e Kulms (2018) mencionam que as células 451-LU atingem um diâmetro médio de aproximadamente 500 μm aos 12 dias de cultivo celular em gota suspensa em placa de cultura de 10 cm de diâmetro partindo dessa mesma metodologia e concentração celular inicial, enquanto Vörsmann *et al.* (2013) mencionam que essas mesmas células atingem o diâmetro médio de 500 μm ao final de 15 dias de cultura em gota suspensa. As células 451-LU são células de melanoma cutâneo de crescimento metastático e seu diâmetro médio final pode ser comparado com o crescimento das células WM 1617 que apesar de apresentarem um mesmo estágio de crescimento, não apresentaram mesmo diâmetro médio ao final de 14 dias.

Figura 15: Comparação gráfica dos dados obtidos para diâmetro médio, “Circularity”, “Aspect Ratio” e “Roundness” dos esferoides formados a partir das células WM 1617, WM 278, WM 1552 e WM 35. (*) $p < 0,05$; (**) $p < 0,01$; (***) $p < 0,001$; (****) $p < 0,0001$.



Ao final dos 14 dias de acompanhamento temporal, foi possível verificar que para o parâmetro “Roundness” não houve uma diferença grande entre os esferoides formados a partir das diferentes células, apresentando o maior valor de 0,90 para os esferoides formados pelas células WM 278, aproximadamente 0,80 para os esferoides formados pelas células WM 35 e WM 1617. Também foi possível observar uma proximidade de valores para o parâmetro “Aspect Ratio”, apresentando o menor valor de 1,10 para os esferoides formados pelas células WM 278 e 1,26 para os formados pelas células WM 35 e WM 1617. Já para o parâmetro “Circularity” houve discrepância entre os esferoides formados pelas diferentes células. Os esferoides formados pelas células WM 278 apresentaram o valor de 0,69, enquanto os formados pelas WM 35 apresentaram o valor de 0,63, os formados pelas WM 1617 apresentaram o valor de 0,58.

Uma vez que os parâmetros “Roundness” e “Aspect Ratio” levam em consideração o formato 2D e a comparação com um círculo perfeito, pôde-se dizer que

os esferoides formados pelas células WM 278 foram os esferoides que mais se aproximaram do formato esférico, enquanto os formados pelas células WM 1617 e WM 35 apresentaram morfologia semelhantes, apesar de apresentar formatos mais alongados. Quanto ao parâmetro “Circularity” que relaciona a área do esferoide analisado com o perímetro observado, o que se relaciona com a rugosidade da superfície do esferoide analisado, foi possível dizer que os esferoides formados pelas células WM 278 apresentaram a menor rugosidade e apresentaram um limite bem definido, assim como os esferoides formados pelas células WM 35 que também apresentaram um limite bem definido, porém não tão definido quanto o observado para as células WM 278. Já os esferoides formados pelas células WM 1617 apresentaram um limite menos definido do que os citados.

Dentre as técnicas utilizadas nos estudos de formação dos esferoides, a de plaqueamento sobre uma matriz de ágar ou agarose solidificada tem sido a que resulta em um sistema ordenado de crescimento. Slipicevic *et al.* (2008), Shellman *et al.* (2003) e Smalley *et al.* (2005) referenciaram a formação de esferoides multicelulares a partir de células WM 35, porém não apresentaram dados de tamanho ou parâmetros de morfologia. Olbryt *et al.* (2017) estudaram a formação de esferoides multicelulares a partir de células WM 35, WM 278 e WM 1552, além de outras linhagens de melanoma, como 451-LU, utilizando a o método *Ultra-Low Attachment* (ULA). Larson *et al.* (2014) se utilizaram da mesma técnica para formar esferoides de outras duas linhagens de melanoma metastático, as linhagens A2058 e A375. Smalley *et al.* (2008), Wang *et al.* (2014) e Beaumont *et al.* (2015) utilizaram a metodologia de plaqueamento sobre matriz de agarose solidificada utilizando as células C8161, linhagem de melanoma metastático. Beaumont *et al.* (2015) permitiram o crescimento em cultura das C8161 por 72 horas, obtendo um diâmetro médio entre 500 e 600 μm .

Após a caracterização quanto a tamanho e morfologia, além de considerar o grau de agressividade e propagação deste modelo de câncer de pele associado aos fatores de risco deste tipo de célula de induzir outros tipos de câncer secundários, a linhagem celular WM 1617 foi escolhida para ser utilizada como modelo esferoidal de tumor em todos os demais experimentos, assim como a associação aos sistemas mais complexos de Dermo Equivalentes representativos da progressão tumoral. O seu diâmetro médio próximo de 400 μm configura um tamanho apreciável para os experimentos utilizando a interação dos mesmos com estrutura de pele tridimensional, como demonstrado por Müller e Kulms (2018) e Vörsmann *et al.* (2013). Além dos fatores morfológicos, foi levado em conta a

baixa interação célula-célula apresentada por essas células, o que tende a facilitar os processos de invasão celular e mimetizar o processo de metástase do melanoma juntamente com o estágio de crescimento metastático apresentado por essas células. Assim como verificado, as células WM 1617 também apresentaram a formação de agregados celulares que tendem a se manter unidos durante a manipulação, além da alta reprodutibilidade entre os plaqueamentos. Todas essas características são consideradas importantes para os demais experimentos de inclusão de esferoides nos modelos tridimensionais propostos. É importante mencionar que as células WM 278 e WM 35 possuem padrão e são interessantes para experimentos posteriores, porém foi necessário escolher uma linhagem entre as verificadas para a continuação deste trabalho.

4.2 Estimativa da Viabilidade Celular dos esferoides multicelulares da WM 1617

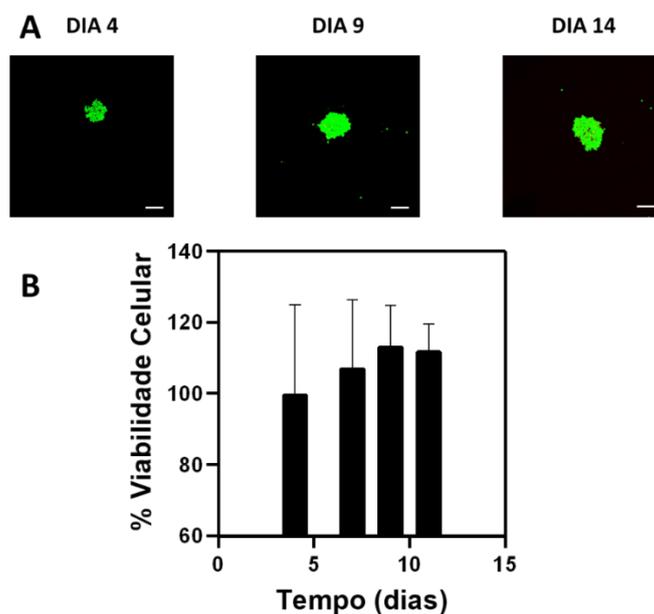
As células WM 1617 escolhidas dentre as demais linhagens para continuação dos estudos apresenta um comportamento de crescimento metastático que pode, como esperado, reproduzir comportamentos de invasão celular com maior eficiência e permite avaliarmos os efeitos do tratamento com luz, sobre o processo de propagação, recidiva e metástase do câncer de pele do tipo melanômico. O objetivo deste experimento foi determinar o melhor dia de crescimento do esferoide multicelular para sua manipulação e aplicação nos demais experimentos. O experimento baseou-se na estimativa da viabilidade celular dos esferoides multicelulares WM 1617 utilizando o ensaio de viabilidade *LIVE/DEAD* e o ensaio de viabilidade Alamar Blue.

O ensaio de viabilidade *LIVE/DEAD* consistiu na visualização das células vivas, com a membrana plasmática íntegra, e mortas, com a membrana plasmática danificada, que compõem os esferoides multicelulares. Enquanto o ensaio de viabilidade Alamar Blue permitiu observar a metabolização do indicador resazurina a resorufina indicando as células metabolicamente ativas, que indiretamente implica que as células estão vivas. Sendo assim, ambos os testes deveriam implicar em um mesmo resultado de viabilidade celular do esferoide multicelular.

Os esferoides multicelulares foram marcados com ambos os marcadores fluorescentes do kit *LIVE/DEAD* para que a viabilidade celular pudesse ser estimada e, então, padronizar em qual dia de crescimento celular o esferoide seria colhido e empregado nos demais experimentos (Figura 16A). Os esferoides foram colhidos nos dias de cultivo celular 4, 7, 9, 11 e 14. Foi possível verificar que a viabilidade dos esferoides

permanece alta e constante até o 14^o dia, apresentando poucas células mortas em seu interior. Já quanto à metabolização de resazurina (Figura 16B), foi observado um aumento significativo entre os primeiros dias de cultivo celular, mas mantendo-se constante nos últimos dias de cultivo.

Figura 16: Acompanhamento do crescimento de esferoides multicelulares WM 1617 utilizando **A:** o Kit de Viabilidade *LIVE/DEAD* para estimar a viabilidade celular em cada dia do crescimento **B:** o reagente de viabilidade celular *AlamarBlue*. Barra equivale a 200 μm .



Foi observado que a sensibilidade dos esferoides multicelulares quanto à manipulação aumenta com o passar dos dias. Sendo assim, apesar da viabilidade celular se manter alta, assim como a metabolização, optou-se por utilizar os esferoides multicelulares em seu 11^o dia de cultivo. Uma vez que o agregado celular ainda permanece bem estruturado durante a manipulação, o que possivelmente garantiria a reprodutibilidade.

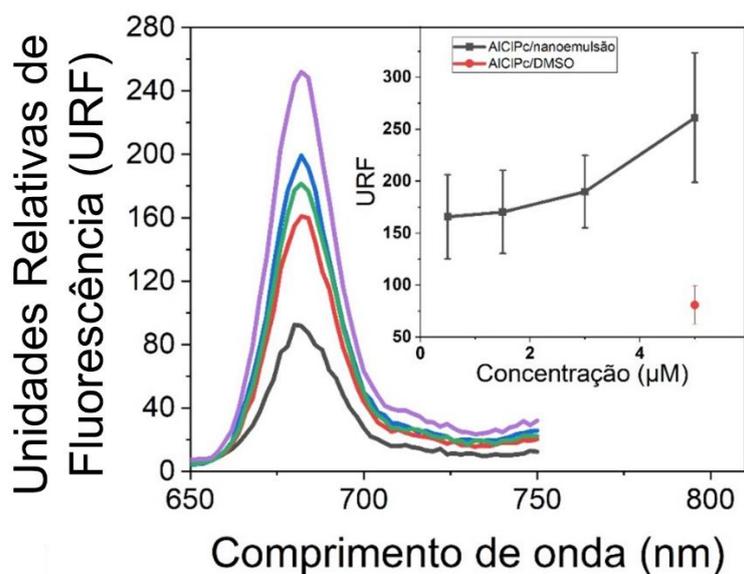
4.3 Ensaios de internalização de AICIPc como fotoativo potencial no tratamento via Terapia Fotodinâmica

Para os ensaios de internalização em monocamada, a ftalocianina de alumínio-cloro foi formulada inicialmente em nanoemulsão e administrada *in vitro*. Além disso, a ftalocianina de alumínio-cloro foi também dissolvida em DMSO e administrada *in vitro*, como controle, uma vez que este solvente promove uma solubilização do

fotossensibilizador e serve como parâmetro de eficiência de internalização para outros métodos de veiculação. O DMSO (dimetilsulfóxido) é um solvente orgânico aprótico polar com baixa toxicidade celular em concentrações menores que 10% v/v, sendo utilizado amplamente na criopreservação celular. Devido à sua natureza anfifílica, também é utilizado para dissolver pequenas moléculas de fármacos hidrofóbicos a serem empregados em estudos *in vitro* quanto *in vivo*. É utilizado como importante veiculador de fármacos tópicos e transdermais, uma vez que possui a capacidade de aumentar a permeabilidade da pele (Notman *et al.*, 2006; Galvao *et al.*, 2014).

A **Figura 17** mostra os resultados da internalização celular da molécula de AICIPc livre e formulada em nanoemulsão após tratamento por um período de 3 horas de incubação. A AICIPc formulada em nanoemulsão apresentou maior internalização que a AICIPc livre, como esperado. Mesmo a mais baixa concentração de NE-AICIPc, $0,5 \mu\text{mol L}^{-1}$, apresentou uma internalização de 2,4 vezes maior do que a AICIPc livre em concentração 10 vezes maior, $5,0 \mu\text{mol L}^{-1}$. Os resultados sugerem que a nanoemulsão foi significativamente mais eficaz na entrega da AICIPc às células quando comparado à sua forma livre. Isso se dá devido aos processos de auto-agregação da AICIPc quando em meio aquoso, o que dificulta a sua internalização pelas células *in vitro* (Calori e Tedesco, 2016; Jayme *et al.*, 2016). É importante ressaltar que o processo de auto-agregação da AICIPc incorporadas a sistemas veiculadores não dificulta a sua incorporação por células (Calori e Tedesco, 2016), uma vez que o modo de interação ocorre entre a nanopartícula carreadora e a célula, ou seja, não envolve o fotossensibilizador.

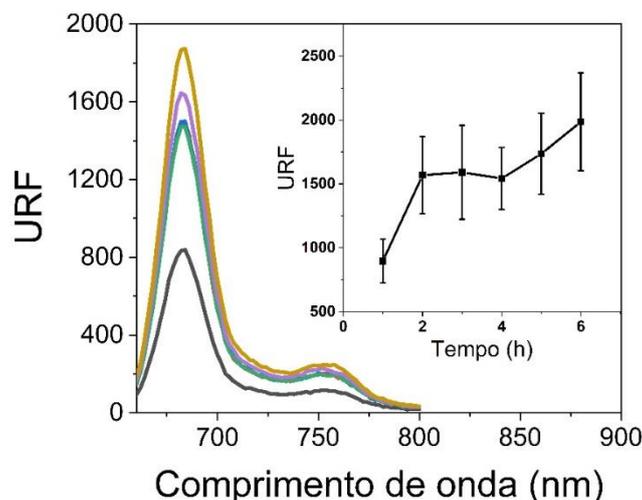
Figura 17: Comparação entre a internalização apresentada pela ftalocianina de alumínio-cloro livre solubilizada em DMSO e formulada em nanoemulsão após administração em células WM 1617 cultivadas em monocamada. A coloração cinza representa a AlClPc livre na concentração de $5,0 \mu\text{mol L}^{-1}$. As formulações NE-AlClPc representam respectivamente: vermelho representa $0,5 \mu\text{mol L}^{-1}$, azul representa $1,5 \mu\text{mol L}^{-1}$, verde representa $3,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ e lilás representa $5,0 \mu\text{mol L}^{-1}$.



Já para determinar o tempo ótimo de internalização da AlClPc em células de WM 1617, foram realizados estudos de cinética de internalização de NE-AlClPc.

Figura 18: Tempo de internalização de AlClPc através da aplicação de nanoemulsão carregada de ftalocianina de alumínio-cloro em células WM 1617 cultivadas em monocamada. A internalização de NE-AlClPc representa respectivamente: cinza representa 1 h, vermelho

representa 2 h, azul representa 3 h, verde representa 4 h, lilás representa 5 h e amarelo representa 6 h.

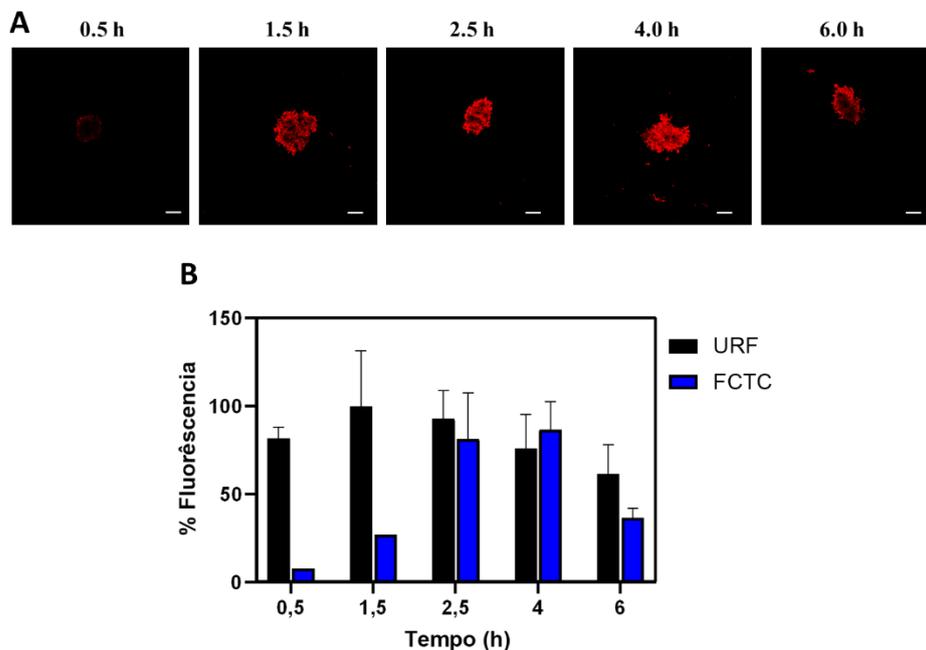


De acordo com os resultados dispostos na **Figura 18**, as primeiras duas horas foram críticas quanto à internalização da AICIPc veiculada em nanoemulsão em células WM 1617 em monocamada. Um patamar foi observado entre os tempos 2, 3 e 4 horas, seguido de um novo aumento na internalização nos tempos 5 e 6 horas. A causa dessas variações são complexas e não foram totalmente compreendidas nesses estudos podendo envolver, por exemplo, processos de desagregação e reestruturação da AICIPc na membrana celular, como observado em estudos empregando membranas lipídicas (Calori, 2016). Como tempo ótimo, optou-se pelo tempo de incubação de 4 horas para as células cultivadas em monocamada.

Já como mencionado anteriormente, as células WM 1617 expandidas num modelo mais complexo 3D como esferoides apresentam parâmetros fisiológicos distintos quando comparadas as células crescidas em monocamada o que como esperado, influenciam desde a proliferação até a necrose celular, assim como a geração de zonas de hipóxia (Stadler *et al.*, 2015; Fang e Eglén, 2017). São exemplos os gradientes de oxigênio, pH, fatores de crescimento, entre outros. A geração de zonas de hipóxia, assim como os observados nos tumores sólidos *in vivo*, influencia na resistência dessas estruturas quanto aos tratamentos, uma vez que muitos fármacos dependem de oxigênio para induzir o efeito anticâncer de forma efetiva através da formação de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) que são responsáveis por causar danos a nível celular (Nunes *et al.*, 2019). Uma vez que existem diferenças fisiológicas entre os métodos, foi necessário realizar a padronização, dos ensaios de internalização, também para o cultivo celular em modelos 3D (esferoides).

A Figura **19** apresenta os resultados obtidos após os ensaios de internalização de AICIPc veiculados em nanoemulsão em esferoides multicelulares. Os resultados obtidos a partir dos ensaios quantitativos foram apresentados em porcentagem após normalização dos dados obtidos em Unidades Relativas de Fluorescência (URF) (Figura **19B**) e os resultados obtidos a partir dos ensaios qualitativos (Figura **19A**) por meio da análise e cálculo das imagens obtidas foram apresentados em porcentagem após normalização desses dados em Fluorescência Celular Total Correspondente. A normalização foi realizada para possibilitar a comparação entre os dois parâmetros utilizados.

Figura 19: **A:** Internalização de AICIPc em esferoides multicelulares. **B:** Ensaios quantitativo e qualitativo para determinar melhor tempo de internalização de AICIPc através da aplicação de NE-AICIPc em esferoides multicelulares preparados a partir de células WM 1617. Barra equivale 200 μm .



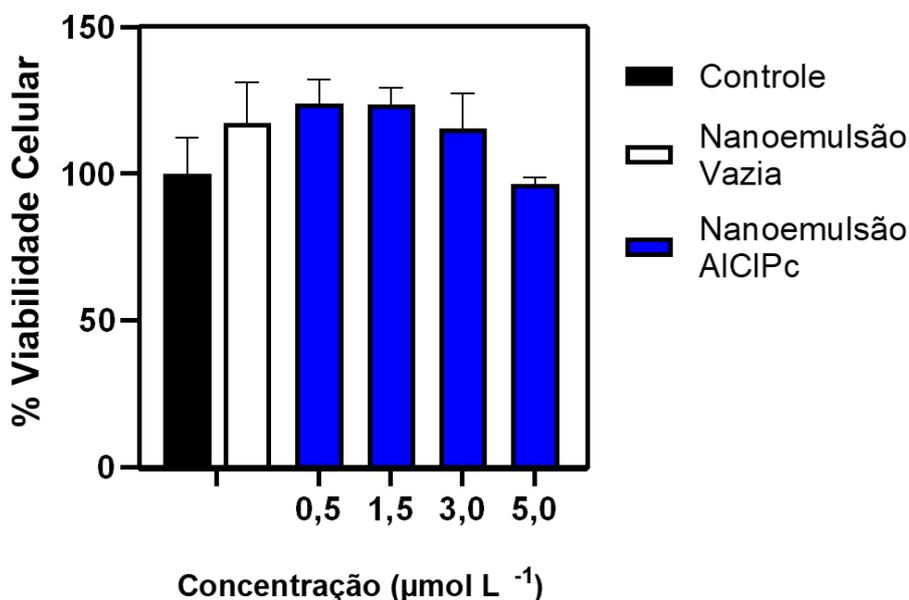
Nas primeiras horas, a internalização em esferoides apresentou a mesma tendência que a observada em monocamada. De modo interessante, houve uma queda nos valores de intensidade de fluorescência após 4 horas de incubação. Isso parece ser devido a efeitos de auto-agregação intracelular da AICIPc por efeitos de concentração que suprimem a intensidade de fluorescência em linhagem celular íntegra, como descrito por Calori e Tedesco (2020), e não refletem diretamente a quantidade AICIPc internalizada. Portanto, similar à monocamada, o tempo de internalização de 4h foi o mais indicado para os estudos posteriores. É válido mencionar que foram realizados testes preliminares utilizando DMSO nos agregados celulares, porém foi observada grande dissociação, por isso não foram realizados os demais experimentos com esse solvente e os esferoides multicelulares.

4.4 Ensaios de Citotoxicidade das AICIPc nas linhagens WM 1617, na ausência de Luz

Assim como foram padronizados o tipo de veiculador de fármaco e o tempo ótimo de incubação, foi necessário padronizar a concentração de fármaco que seria utilizada nos demais estudos. Para isso, foi necessário determinar a citotoxicidade da formulação utilizada, ou seja, verificar se o tratamento com o fármaco gerou morte celular. Verificou-

se que a nanoemulsão de AICIPc apresentou baixa toxicidade e alta viabilidade celular após o tratamento nas células WM 1617 cultivadas em monocamada (Figura 20).

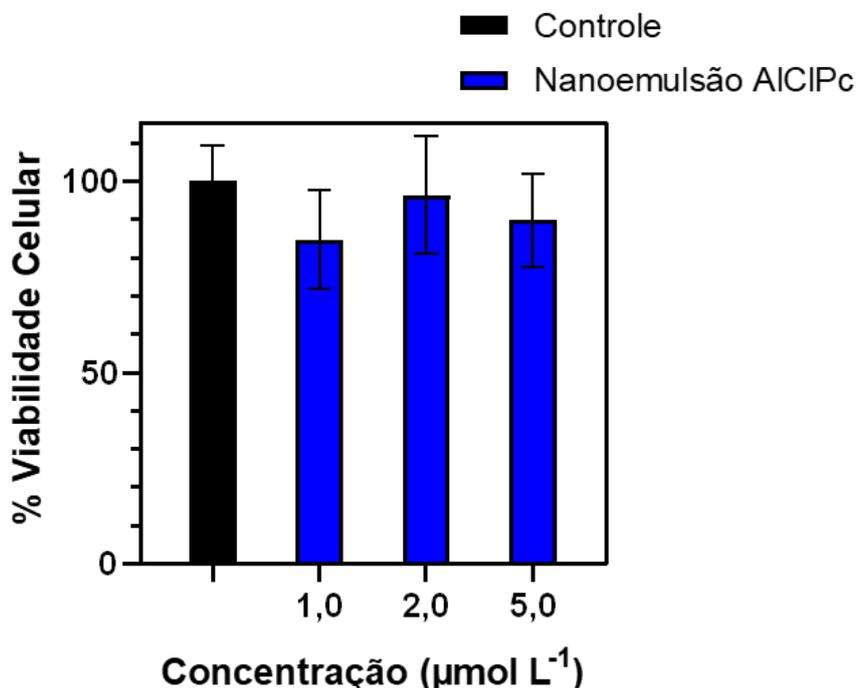
Figura 20: Ensaio de Citotoxicidade em células WM 1617 cultivadas em monocamada variando a concentração da nanoemulsão AICIPc.



Padronizou-se, então, a concentração de 0,5 µmol L⁻¹ para a realização dos demais testes utilizando a célula WM 1617 cultivadas em monocamada, uma vez que é escolhida a menor concentração que ocasione no melhor efeito. Sendo assim, apesar de a concentração de 1,5 µmol L⁻¹ também apresentar alta viabilidade, é necessário levar em consideração a tendência de auto-agregação da nanoemulsão, além das questões envolvendo o custo-benefício associado.

Já os tratamentos realizados em diferentes concentrações de AICIPc nas células WM 1617 estruturadas como esferoide multicelular apresentaram viabilidade elevada (Figura 21). Comparando-se os resultados de viabilidade obtidos tanto para a cultura em monocamada quanto para a cultura em 3D, foi notório que apesar do aumento da concentração, independentemente do método de cultura celular, as células apresentaram alta viabilidade.

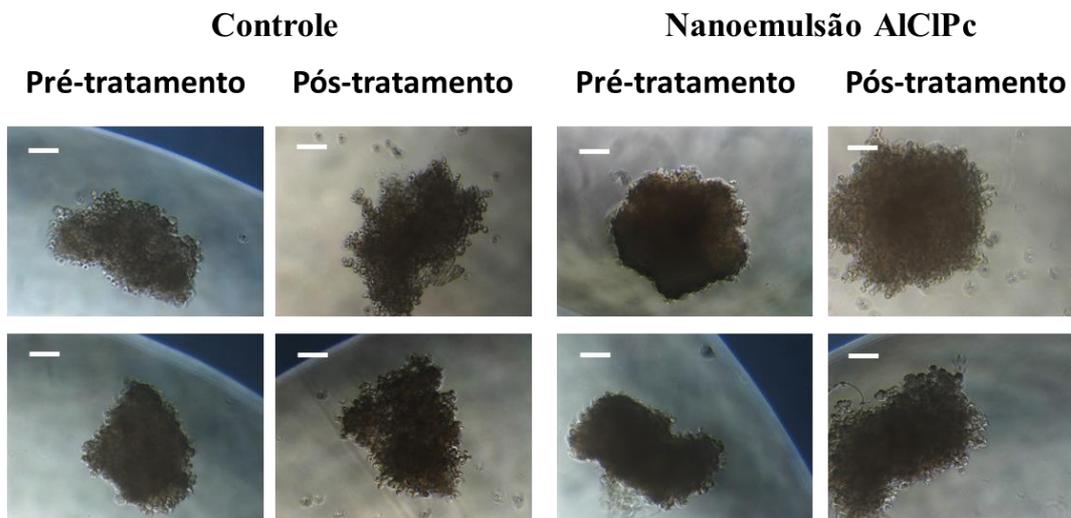
Figura 21: Ensaio de Citotoxicidade em esferoides multicelulares formados pelas células WM 1617 variando a concentração da nanoemulsão vazia e contendo AICIPc.



Para concentrações maiores que 1,0 µmol L⁻¹, foram observados efeitos significativos sobre a estruturação dos esferoides, assim como início de dissociação celular dos esferoides após manipulação. Desse modo, optou-se por empregar a concentração de 1,0 µmol L⁻¹ como concentração padrão nos demais estudos. Não foi utilizada a concentração de 0,5 µmol L⁻¹, por ser uma estrutura 3D, a área superficial de contato na nanoemulsão com as células diminui, assim é necessário aumentar a oferta de fármaco para que ocorra uma internalização suficiente. Como observado na Figura 22, a manipulação do esferoide multicelular, mesmo sendo realizada de maneira cuidadosa pode ocasionar em pequenas regiões dissociativas. Apesar de não ter sido utilizado qualquer tratamento, somente a troca de meio celular, os esferoides utilizados como controle apresentaram poucos pontos de dissociação, fator que ocorreu de maneira mais aparente com o tratamento de NE-AICIPc.

Verificar os efeitos da NE-AICIPc nas células sem a irradiação de luz é de suma importância, uma vez que é necessário que não se observe efeitos de morte celular na ausência da ativação luminosa. Isso para segurança do tratamento, mas também para maior controle do processo de tratamento.

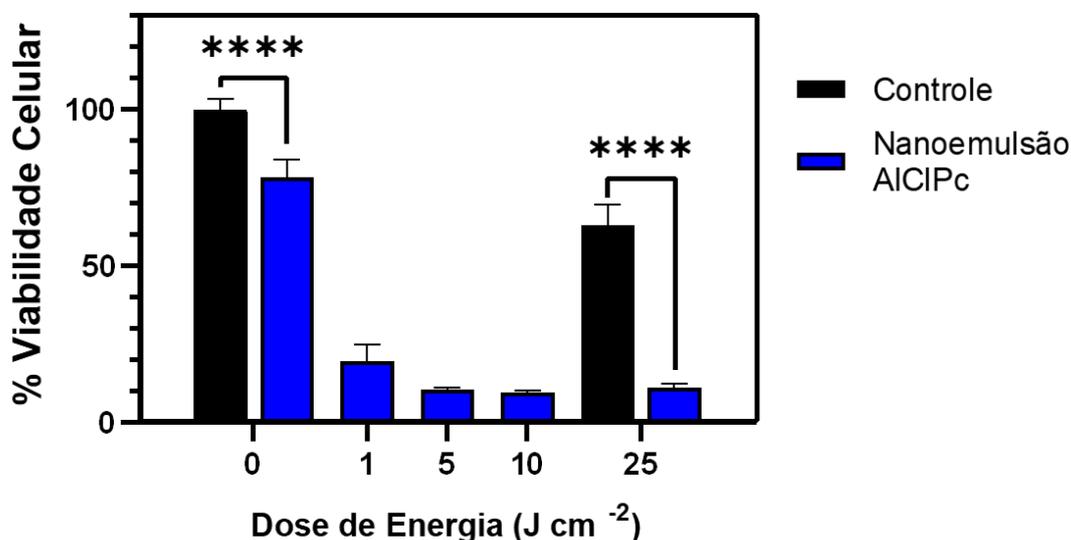
Figura 22: Acompanhamento do esferoide multicelular antes e depois do tratamento proposto com NE-AICIPc em concentração de $1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$. Barra equivale a $100 \mu\text{m}$.



4.5 Ensaio de fototoxicidade

Os ensaios de fototoxicidade realizados em células WM 1617 cultivadas em monocamada obtiveram os seguintes resultados. As células foram tratadas com NE-AICIPc na concentração de $0,5 \mu\text{mol L}^{-1}$. Para a menor dose de energia de $1,0 \text{ J cm}^{-2}$, as células tratadas obtiveram viabilidade celular em torno de 20%, ($19,6 \pm 5,5\%$). Para as doses de $5,0$ e $10,0 \text{ J cm}^{-2}$, as viabilidades diminuíram para $10,4 \pm 0,8$ e $9,7 \pm 0,6\%$, respectivamente. E para a dose de energia de 25 J cm^{-2} , a dose mais alta de energia, a viabilidade celular permaneceu em torno de $11 \pm 1,3\%$. Foi possível verificar que, o máximo de morte celular gerada permaneceu em torno de 90% e poderia ser devido a diversos fatores como o esgotamento de O_2 no interior das células, assim como o funcionamento dos sistemas antioxidantes agindo sobre os EROs e até mesmo a internalização de AICIPc de forma não homogênea pelas células, por exemplo.

Figura 23: Ensaio de fototoxicidade em células WM 1617 cultivadas em monocamada incubadas com formulação NE-AICIPc na concentração de $0,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ variando a densidade de energia aplicada. (****) $p < 0,0001$.



Observando a **Figura 23**, foi possível verificar que a dose de energia ótima para tratar essas células em monocamada é de 5 J.cm^{-2} , uma vez que foi a menor dose de energia que provocou o maior dano celular.

Já para as células WM 1617 cultivadas como esferoides multicelulares, a viabilidade celular para os esferoides multicelulares irradiados ($\lambda = 670 \text{ nm}$) foi avaliada por ensaios de LIVE/DEAD (**Figura 24**). A viabilidade celular diminuiu em função da dose de energia empregada, demonstrando que as células mortas sofreram a ação intracelular do fármaco acrescido da aplicação de luz. De modo interessante, para as doses de energia mais baixas, 0 e 5 J cm^{-2} , o processo de morte celular foi heterogêneo e mais acentuado para células dispostas nas regiões interfaciais dos esferoides. Em contraponto, esferoides tratados com a dose mais alta, 25 J cm^{-2} , apresentaram processo de morte celular ao longo de todo o esferoide. É importante ressaltar que, como observado por imagens de microscopia confocal (**Figura 24**), as células viáveis remanescentes apresentaram pouca sobreposição com a marcação realizada pela AICIPc, enquanto as células mortas (vermelhas) apresentaram sobreposição significativa com a marcação em AICIPc. Isso poderia indicar uma distribuição heterogênea de AICIPc ao longo dos esferoides, possivelmente devido a diferenças em densidades micro locais das células nos esferoides. É sabido que o curto tempo de vida de parte dos EROs formados em TFD, especialmente $^1\text{O}_2$ (oxigênio singlete), exige que a sua formação ocorra no meio intracelular para que processos de

morte celular sejam alcançados. Deste modo, a formação de ERO em regiões extracelulares ou em células vizinhas apresenta pouco ou nenhum efeito sobre a viabilidade celular de células livres do fotossensibilizador.

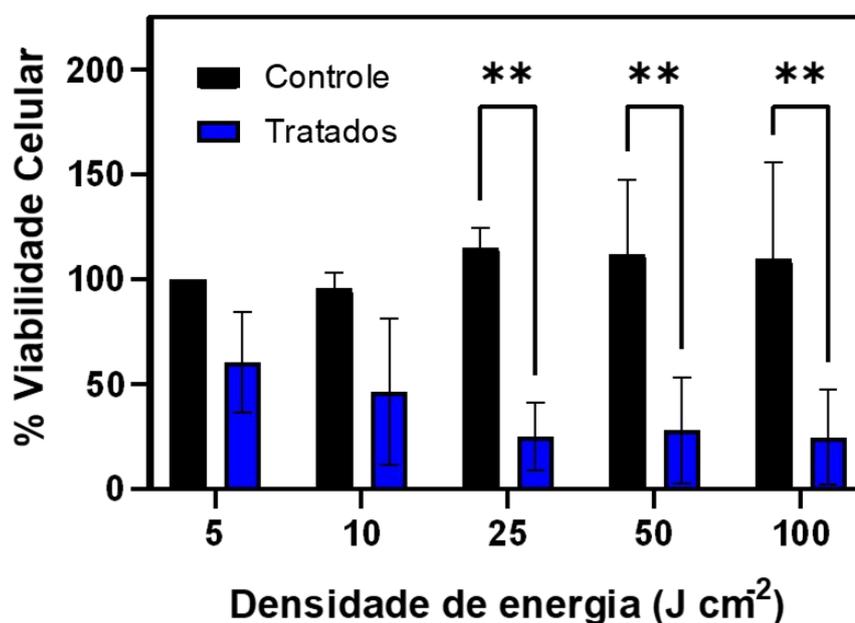
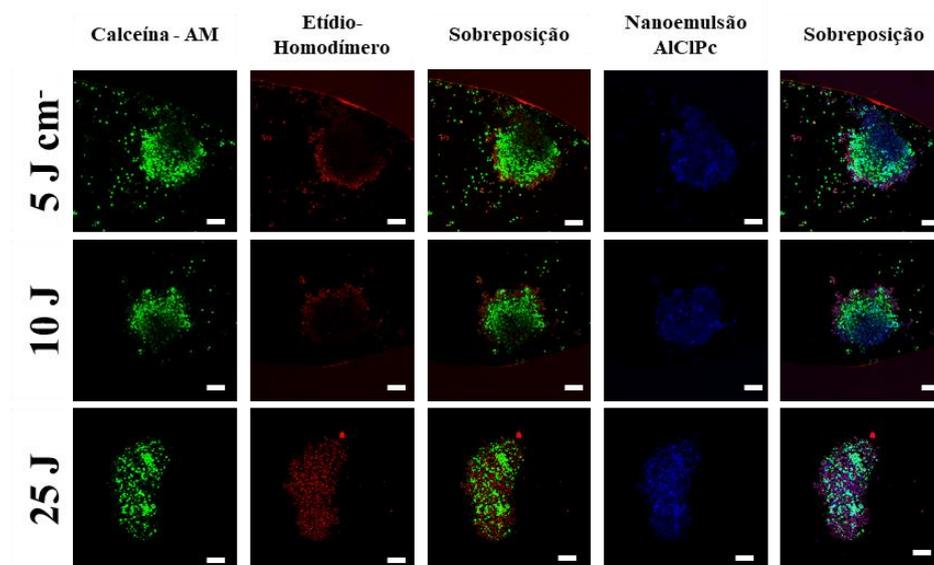
Uma vez que a dose de energia mais alta foi capaz de ativar processos de morte celular ao longo de todo o esferoide, conclui-se que houve internalização de AICIPc por todas as células do esferoide, mas com uma distribuição heterogênea, o que poderia estar correlacionado a diferenças de densidade micro locais nos esferoides. Em células contendo pouca AICIPc, as doses mais baixas de energia poderiam não ter sido eficientes para se alcançar o limiar de dose, ou seja, o número mínimo de fótons absorvidos por unidade de área necessário para a ativação de processos de morte celular (Ochsner, 1997; Zhu *et al.*, 2015).

Como segundo método de avaliação de viabilidade celular, foi empregado ensaio de Alamar Blue. Após a irradiação dos esferoides multicelulares tratados com a NE-AICIPc, foi possível perceber que a maior taxa de morte celular ocorreu na aplicação das maiores doses de energia, similar aos resultados obtidos por ensaios de LIVE/DEAD. Os valores de viabilidade celular obtidos foram de 50, 60, 24,8, 28 e 24,5% para as doses de 5, 10, 25, 50 e 100 J cm⁻², respectivamente.

Sendo assim, foi possível afirmar que o tratamento do esferoide multicelular com a nanoemulsão de AICIPc assim como a aplicação de luz é viável para gerar a morte celular nessas estruturas tridimensionais e são dose- e concentração-dependente.

Baseado nos resultados de viabilidade celular, nós escolhemos a dose de energia de 25 J cm⁻² como padrão para os estudos futuros, uma vez que essa dose desencadeia processos de morte celular efetivos para a concentração de AICIPc empregada.

Figura 24: Ensaios quantitativo e qualitativo de fototoxicidade em esferoide multicelular formado a partir de células WM 1617 e tratados com NE-AICIPc na concentração de $1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$. A coloração verde indica a marcação de células vivas com calceína AM, enquanto a coloração vermelha indica a marcação de células mortas com etídio-homodímero-1 e a coloração azul indica a marcação das células a partir da internalização de AICIPc. A primeira sobreposição refere-se à sobreposição das imagens obtidas com marcação de Calceína AM e Etídio-Homodímero-1 e a segunda sobreposição refere-se à sobreposição das imagens das células vivas, mortas e tratadas com nanoemulsão de AICIPc. (**) $p < 0,01$. Barra equivale a $200 \mu\text{m}$.



Apesar de ter sido utilizada uma mesma linhagem celular para ambos os métodos de cultivo (2D e 3D), é importante reiterar que justamente por causa da diferença estrutural entre os métodos que as diferenças nas condições para os tratamentos são

geradas. Um dos fatores que causa o aumento da dose de energia necessária para gerar a morte celular quando se altera a cultura celular bidimensional para a tridimensional é a superfície de contato. A célula em monocamada tem condições de internalizar de forma mais homogênea o fármaco do que a célula em aglomerado celular em que um gradiente é gerado e as células superficiais permanecem mais em contato com o fármaco e por isso podem internalizar uma maior quantidade de FS quando comparado às células de regiões mais internas dos esferoides. De mesma maneira quanto à forma que essas células interagem com a luz. As células cultivadas em monocamada recebem de forma homogênea a radiação e, dessa forma, necessitam de uma dose de energia menor para gerar o dano celular esperado. Já as células em estrutura tridimensional recebem a radiação nas células superficiais e é necessária maior energia para que a luz possa ser recebida nas células do interior do esferoide.

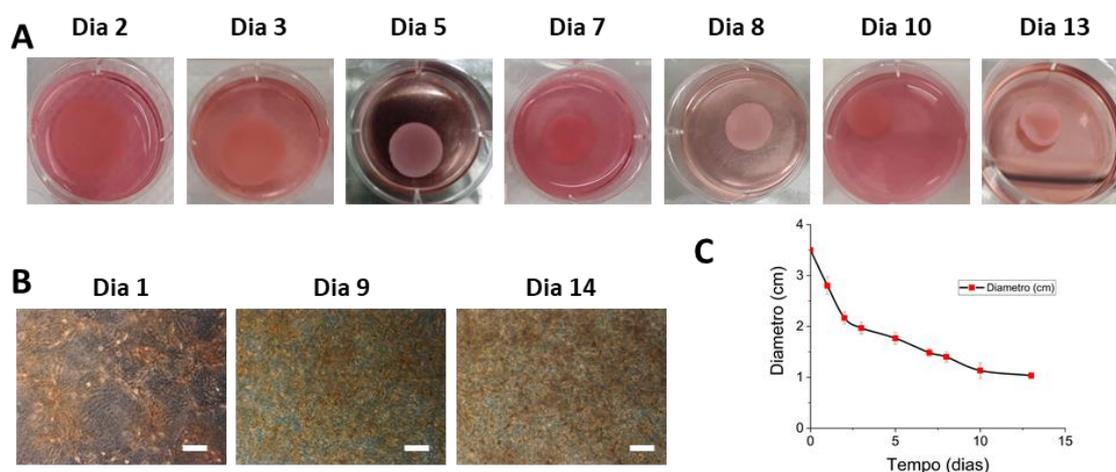
Além disso, a interação da luz com o fármaco fotossensibilizador internalizado pelas células, como mencionado anteriormente, na presença de oxigênio dissolvido leva à produção de Espécies Reativas de Oxigênio pela redução da molécula de oxigênio. A alta produção dessas espécies gera um desequilíbrio do estado redox, ocasionando no estresse oxidativo que promove a oxidação de lipídeos, de proteínas dos tecidos, do DNA, além da apoptose e morte celular (Figueroa *et al.*, 2018). É importante notar que a presença de oxigênio dissolvido é essencial para que ocorra a morte celular, porém, em esferoides multicelulares existe um gradiente de oxigênio, como nos tumores *in vivo*, em cujo interior é apresentado uma baixa concentração de oxigênio, aumentando a sua resistência quanto à morte celular.

4.6 Estudos Cinéticos de Contração do Equivalente Dérmico

Quando os fibroblastos são incorporados a uma matriz de colágeno, promovem a reorganização desta rede, produzindo um arranjo mais denso das fibrilas de colágeno ao expulsar as moléculas de água presentes na matriz, o que promove, conseqüentemente, a contração dessa matriz. O processo de contração do gel de colágeno contendo fibroblastos se assemelha ao processo de contração da cicatriz no processo de cura de uma ferida normal ou à contração do tecido característica da fibrose, desta forma, o gel de colágeno com fibroblastos incorporados são mencionados como equivalentes dérmicos na literatura (Bell *et al.*, 1979; Rompré *et al.*, 1990; Zhu *et al.*, 2001)

Ao realizar o acompanhamento da contração dérmica dos equivalentes preparados, foi possível observar a tendência de uma contração rápida nos primeiros dias, seguida de uma contração mais suave até a estabilização do diâmetro médio desses equivalentes. Foi possível verificar que no quinto dia de acompanhamento, o equivalente apresentou contração de 50% de seu diâmetro comparado com seu tamanho inicial, como apresentado na Figura 25. Yang *et al.* (1997) relacionam esse comportamento de rápida contração inicial com a fase de adaptação das células incorporadas à nova matriz extracelular, fase *Lag*, que pode durar até os cinco primeiros dias após o cultivo celular. De acordo com os nossos resultados a fase de contração rápida ocorreu durante os primeiros três dias após o preparo dos equivalentes. Entre os dias 3 e 10, notou-se a contração constante, mas de maneira mais lenta do que durante a contração rápida, até à sua estabilização da contração após os 10 dias. No dia 14, os equivalentes apresentaram contração de 70,5% de seu diâmetro. Além de verificar a contração dos equivalentes de forma macroscópica, foi possível acompanhar a formação e proliferação da malha celular apresentada pelos fibroblastos ancorados nas fibrilas de colágeno. No dia 2, foi possível observar uma baixa densidade de células na matriz. Uma densidade intermediária foi notada no dia 9. No dia 14, foi observado uma alta densidade de células na malha com poucas lacunas na malha de fibroblastos-colágeno.

Figura 25 : Contração do Equivalente Dérmico observada no decorrer de 14 dias. **A:** Fotografias apresentando os equivalentes dérmicos cultivados no decorrer de 13 dias. **B:** Microfotografias apresentando a estrutura microscópica dos equivalentes dérmicos no decorrer de 14 dias. **C:** Representação Gráfica do diâmetro (cm) dos equivalentes dérmicos com o passar dos dias. Barra equivale 100 μm .



Nos últimos dias de cultura celular dos equivalentes dérmicos ocorreu a formação de uma bainha pelas suas bordas indicando a finalização do processo de contração. A contração do equivalente dérmico é associada com a indução da apoptose dos fibroblastos, que leva à perda da densidade celular. Foi percebido que em matrizes de colágeno encolhidas, o conteúdo total do DNA diminuiu, indicando que quanto maior o grau de encolhimento, maior será a diminuição no conteúdo do DNA, parte devido à apoptose celular (Mio *et al.*, 1996; Yang *et al.*, 1997; Zhu *et al.*, 2001; Nho *et al.*, 2006). (Bride *et al.*, 2004) observaram que durante a quantificação da apoptose dos equivalentes em seus experimentos haviam poucos núcleos apoptóticos corados positivamente que coexistiam com os núcleos em divisão no décimo dia de experimento. Então, ocorreu um aumento gradativo das células apoptóticas de maneira que após 26 dias de cultura celular, fosse identificada a maior densidade desses núcleos apoptóticos.

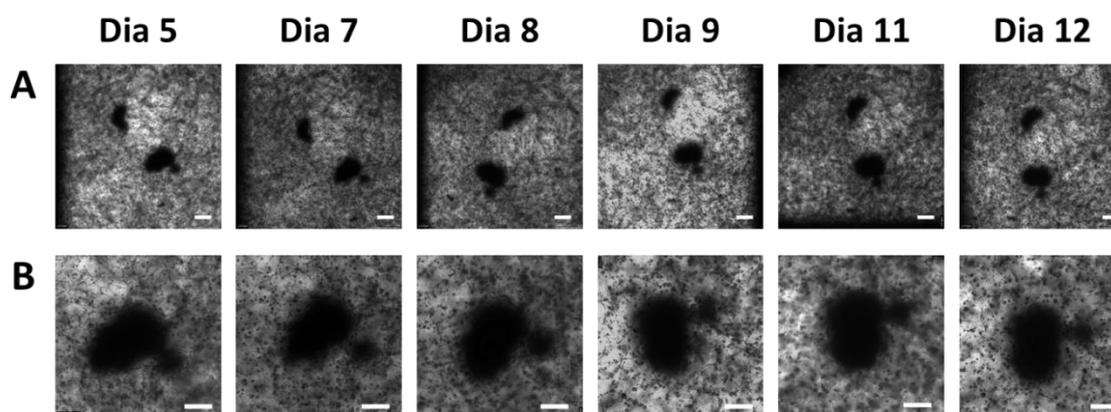
A fim de realizar o acoplamento dos sistemas tridimensionais esferoidais e dermais, percebeu que seria necessário utilizar uma janela de tempo de forma que ambas as estruturas permanecessem viáveis. Sendo assim, optou-se por realizar a inclusão dos esferoides nos equivalentes dérmicos que estivessem no seu quinto dia de cultivo celular, uma vez que as células já tivessem saído da fase de adaptação celular e apresentassem uma malha mais fechada, mas que também garantissem a viabilidade celular dessas estruturas. Desta forma, os esferoides foram incluídos no quinto dia de cultivo celular dos

equivalentes dérmicos e acompanhados até, no máximo, o décimo quinto dia, ou seja, até dez dias após a inclusão dos esferoides.

4.7 Inclusão de esferoides multicelulares em equivalentes dérmicos mimetizando sistemas 3D de progressão tumoral metastática

É importante destacar que os esferoides foram manipulados cuidadosamente durante o experimento para evitar o estresse mecânico ao sistema multicelular que pudesse provocar a sua dissociação. No dia 5, os equivalentes dérmicos apresentavam contração de aproximadamente 50% de suas estruturas, indicando uma malha celular fechada e ideal para receber os esferoides multicelulares sem que as lacunas em suas estruturas facilitassem a invasão celular e a integração entre os dois sistemas. Uma malha celular bem fechada tende a mimetizar com maior segurança a estrutura dérmica da pele humana. Após a inclusão dos sistemas esferoidais e nos equivalentes dérmicos, foi realizado um acompanhamento utilizando o contraste de fase do microscópio de varredura a laser confocal (Figura 26). Durante o acompanhamento, foi possível verificar o aumento da densidade celular do equivalente dérmico com o passar dos dias. Além disso, foi observado o crescimento e a tendência de aumento da esfericidade dos esferoides incluídos no tecido.

Figura 26: Microfotografias apresentando o acompanhamento de esferoide multicelular WM 1617 não marcado em equivalente dérmico no decorrer de 12 dias. **A:** Aproximação de 5x. **B:** Aproximação de 10x. Barra equivale a 200 μm .



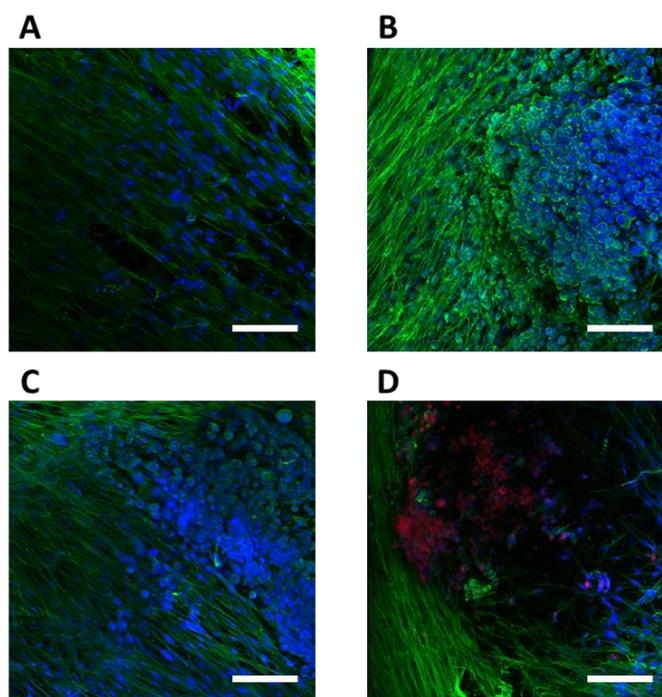
Foi interessante observar que entre os dias 5 e 7, o pequeno agregado celular associado ao esferoide iniciou o processo de desassociação, enquanto no dia seguinte (dia 8), foi possível observar a agregação e proliferação deste pequeno agregado ao agregado

celular maior. Esse comportamento pode ter sido devido a alguns fatores, como a contração do equivalente dérmico e proliferação dos fibroblastos que compõem esses equivalentes. Conforme essas células se proliferam, elas possuem a capacidade de se alinharem formando uma rede de células juntamente com a matriz de colágeno, desta forma, essas células podem ter provocado a proximidade desses agregados, impedindo que se dissociassem completamente. Mas além dessa aproximação, foi possível verificar a proliferação das células dos esferoides, o que indicam a invasão celular do esferoide multicelular no tecido dermal.

A Figura **27** apresenta os modelos acoplados após 8 dias da inclusão dos esferoides marcados com AICIPc aos equivalentes. A microfotografia apresentada na Figura **27A** indicou a estrutura de malha celular bem definida, com as fibras alinhadas e as células seguindo um único direcionamento, semelhante ao que se pode encontrar na derme humana, assim como verificado anteriormente.

O acoplamento dos esferoides multicelulares de WM 1617 sem tratamento é observado na Figura **27B**. Nota-se um processo de invasão celular com o desprendimento de células do esferoide em direção ao tecido vizinho. As células desprendidas do esferoide possuem as mesmas características morfológicas das células que compõem o esferoide, ou seja, o formato arredondado.

Figura 27: Microfotografias obtidas com microscópio confocal de varredura a laser Leica Platform TCS SP8. A coloração verde indica marcação com Alexa Fluor® 488 phalloidin, faloidina, que cora os filamentos de actina presentes no citoesqueleto. A coloração azul indica marcação com DAPI, que cora regiões de DNA ricas em adenina-timina. A coloração vermelha indica a presença de AICIPc, presente no meio intracelular. **A:** Equivalente dérmico controle. **B:** Equivalente dérmico contendo esferoide multicelular não tratado. **C:** Equivalente dérmico contendo esferoide multicelular tratado com nanoemulsão vazia. **D:** Equivalente dérmico contendo esferoide multicelular tratado com NE-AICIPc de concentração $0,5 \mu\text{mol L}^{-1}$. Barra equivale a $100 \mu\text{m}$.



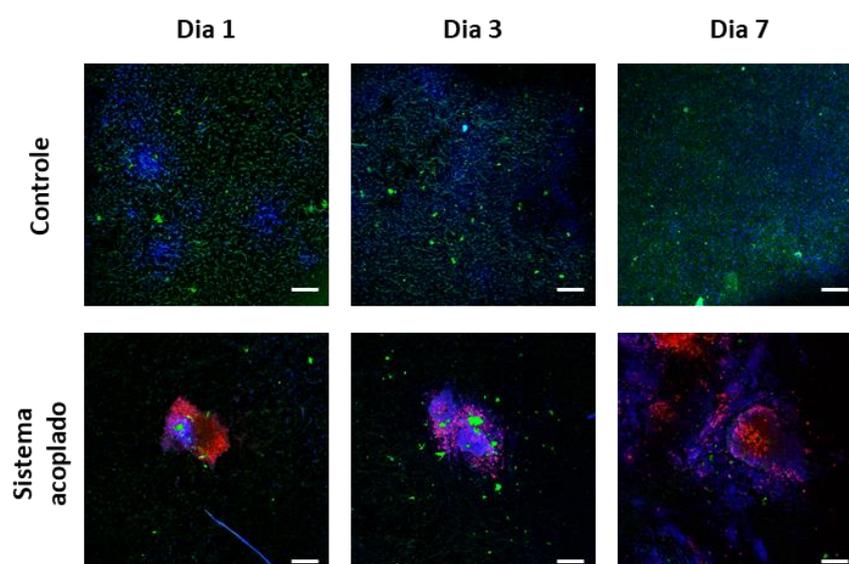
Já a Figura 27C permitiu observar, não somente a invasão celular como na figura 27B, mas também a perda do formato esférico característico dos esferoides. Esse comportamento pode ter ocorrido devido ao seu tratamento com a nanoemulsão vazia, permitindo supor que a formulação possa causar um enfraquecimento das ligações que mantêm o formato do esferoide, e por isso, permite que as células se soltem da estrutura com maior facilidade do que quando não sofre um tratamento.

A Figura 27D permitiu pontuar, não somente o que foi observado para a Figura 27C, ou seja, a perda da estrutura esférica, assim como, a perceptível invasão celular, mas também que o esferoide multicelular pôde ser marcado com a AICIPc, ou seja, as células, mesmo em uma estrutura tridimensional, o que implica diferenças quando comparado com a estrutura em monocamada (bidimensional), as células internalizam o fármaco fotossensibilizador. Foi utilizada a concentração de $0,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ para verificar o

comportamento inicial do esferoide incluído na matriz de colágeno. Após a verificação de que o esferoide mantém unido apesar da perda do formato esférico, foi utilizada a concentração padronizada de NE-AICIPc para esferoides multicelulares WM 1617. Além de manter o fármaco internalizado por mais de 8 dias, demonstrando uma estabilidade e possibilitando acompanhar o sistema em uma série de dias, além de aplicar a luz vermelha sobre o sistema para verificar os efeitos da Terapia Fotodinâmica.

A evolução dos esferoides multicelulares foi acompanhada por 7 dias, como apresentado na Figura 28. É importante ressaltar que após 11 dias, a estrutura do equivalente dérmico já estava contraída demasiadamente, impossibilitando a sua observação por microscopia óptica. Como ilustrado na Figura 28, após um dia de inclusão, pôde-se perceber que o esferoide se manteve unido com a estrutura bem delimitada pelas moléculas de AICIPc internalizadas. Já após três dias de inclusão, notou-se uma dispersão de algumas células do esferoide contendo moléculas do fármaco em direção ao equivalente dermal, ao redor do esferoide multicelular. Apesar desse espalhamento, o esferoide também apresentou boa conservação de ser formato esferoidal.

Figura 28: Microfotografias apresentando o acompanhamento do Equivalente Dérmico incluído de Esferoide Multicelular marcado com AICIPc (Sistema acoplado) por 7 dias com microscópio confocal de varredura a laser Leica Platform TCS SP8. Utilizando os marcadores Alexa Fluor® 488 phalloidin, faloidina (verde), DAPI (azul) e AICIPc (vermelho). Barra equivale a 200 µm.



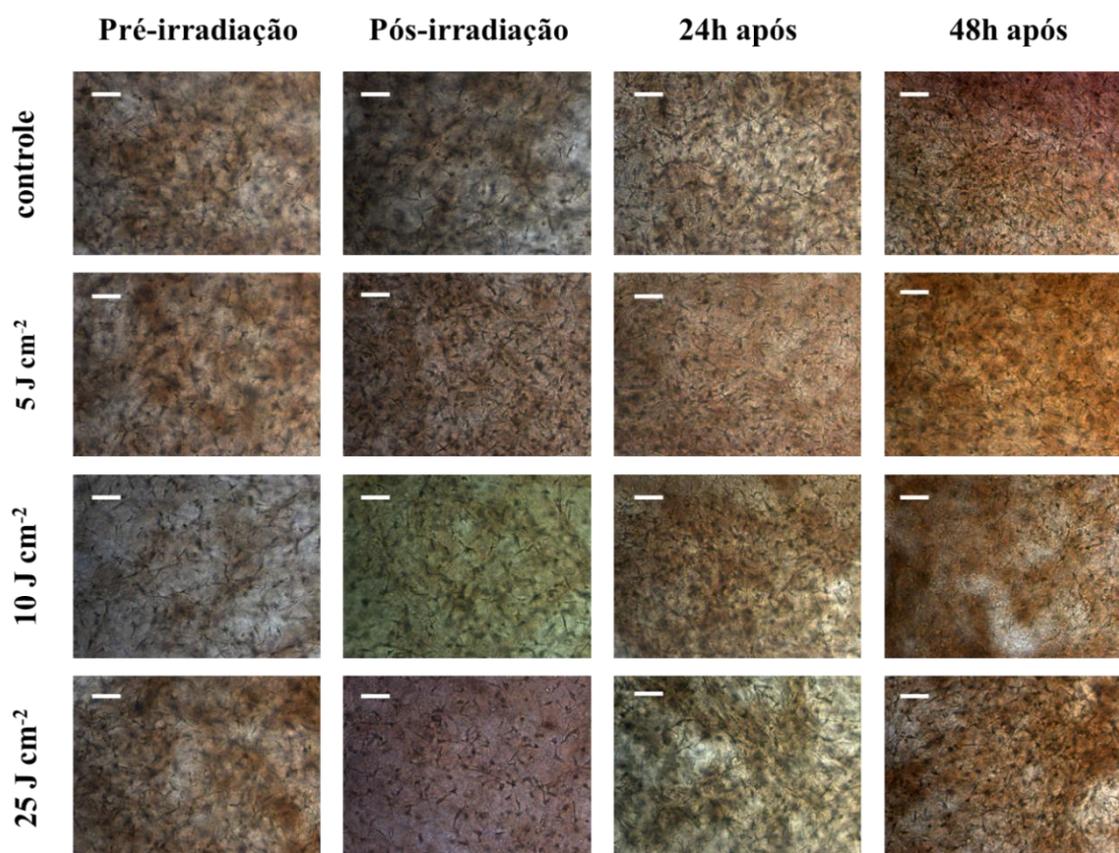
Neste experimento, os esferoides multicelulares foram marcados com NE-AICIPc de concentração $1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$, de modo a verificar a evolução do esferoide incluído na matriz de colágeno, assim como a estabilidade do fármaco internalizado para a realização da aplicação de luz ao sistema. Após 7 dias da inclusão entre os sistemas, foi possível

observar a dispersão de células marcadas com AICIPc espalhando-se na malha de colágeno.

4.8 Ação da irradiação visível em modelos dérmicos contendo os esferoides de WM 1617, mimetizando os sistemas 3D de propagação melanocítica

A aplicação de luz sobre os tecidos dérmicos, nas doses de energia de 5, 10 e 25 J cm⁻², não resultou em diferença significativa entre os tecidos irradiados, independentemente das doses de energia utilizadas. Esse resultado se manteve tanto, imediatamente quanto após 48 horas da aplicação (Figura 29). De modo similar, não houve diferenças significativas na contração dérmica dos tecidos quando comparado ao controle.

Figura 29: Fotomicrografias da microestrutura dos equivalentes dérmicos pós irradiação. Barra equivale a 100 μm.



Após a inclusão dos sistemas equivalente dérmico e esferoide multicelular, foi realizada a aplicação de luz em alta dose de energia (25 J cm⁻²) para verificar as possíveis respostas de ambas as estruturas 3D.

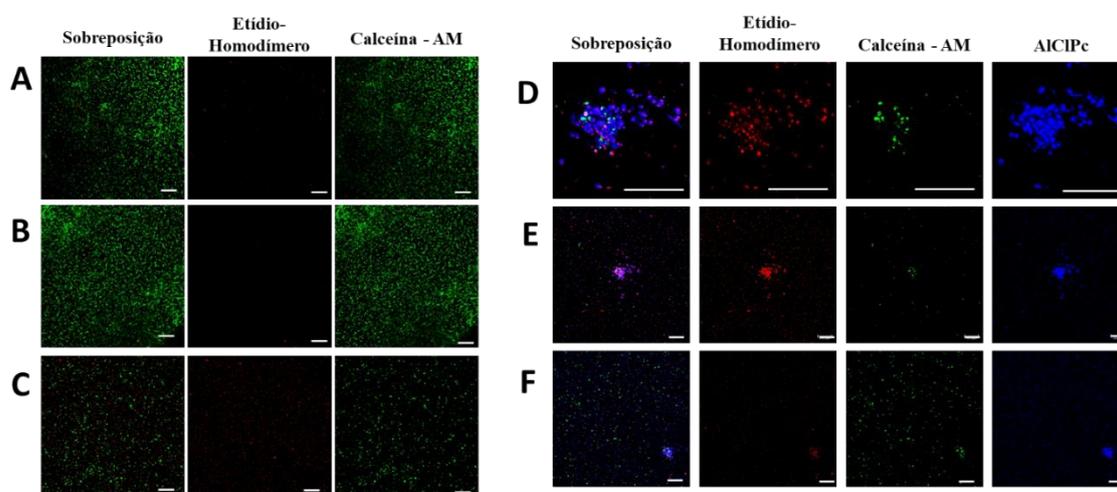
Na Figura 30 está ilustrado o sistema dermal controle e o sistema dermal irradiado com a dose de energia, assim como o equivalente dérmico incluído de esferoide

multicelular incubado com NE-AICIPc. Para os equivalentes dérmicos irradiados com as densidades de energia de 0 e 25 J cm⁻², foi observado alta viabilidade do tecido (Figuras **30A** e **30B**) com poucos indícios de morte celular. Ainda foi observado uma boa organização celular do tecido em questão. A alta viabilidade sugere que a aplicação de luz na ausência de AICIPc não resultou em danos ao tecido.

Em contraponto, o tecido dermal que recebeu o esferoide multicelular tratado com NE-AICIPc apresentou significativo aumento de morte celular nas células do tecido normal após a aplicação de luz (Figuras **30C** e **30F**). O aumento da sensibilidade das células de fibroblastos que compõem o equivalente dérmico pode ser decorrente da presença dos esferoides multicelulares que provocam a falta de alinhamento homogêneo das células na matriz de colágeno. Uma vez que os sistemas tridimensionais não são simples, mas são compostos de complexas interações célula-célula, vias de sinalização, assim como diferentes gradientes que simulam o comportamento *in vivo*, o acoplamento desses sistemas pode levar a respostas diferentes do esperado. É interessante ressaltar que esses danos ao tecido também podem ser decorrentes da geração de EROs após processos de interação entre o fármaco e a luz, em uma dose suficientemente alta de energia. Como observado por Souza et al. (2021), a irradiação de luz do tecido dérmico com AICIPc (0,5 µmol L⁻¹) após em suficiente baixa energia (1,2 J cm⁻²) leva ao aumento da proliferação da rede de actina, promoção da síntese de colágeno, produção de ERO, facilitação da diferenciação para miofibroblastos entre outras respostas.

As Figuras **30D** e **30E** ilustram o esferoide previamente marcado, assim como a morte celular ocasionada após a aplicação de luz. Foi possível verificar que as células que apresentavam sinal de fluorescência para AICIPc também apresentaram sinal de fluorescência para Etídio-Homodímero indicando a morte das células que internalizaram o fotossensibilizador.

Figura 30: Microfotografias obtidas com microscópio confocal de varredura a laser Leica Platform TCS SP8. A coloração verde indica marcação das células vivas com Calceína – AM, enquanto a coloração vermelha indica marcação das células mortas com Etídio-Homodímero e a coloração azul indica a presença de células que internalizaram a NE-AICIPc. **A:** Equivalente Dérmico Controle. **B:** Equivalente Dérmico Controle irradiado. **C:** Região de Equivalente Dérmico distante do local da inclusão de esferoide multicelular marcado com NE-AICIPc após irradiação. **D, E e F:** Esferoide multicelular incluído em equivalente dérmico marcado com AICIPc após irradiação. **D:** Aproximação de 20X. **E:** Aproximação de 5X. **F:** Aproximação de 5X, porém apresentando o tecido dérmico ao redor do esferoide multicelular. Barra equivale a 200 μm .



Também foi possível perceber ao comparar as Figuras 30C e 30F que a distância do esferoide multicelular no equivalente dérmico foi um fator para obter, no final, uma maior ou menor viabilidade celular; o tecido mais próximo do esferoide recebeu maior quantidade do fotossensibilizador do que os tecidos nas regiões mais periféricas do equivalente. Comparando essas duas figuras, ainda foi possível perceber o espalhamento de células do esferoide multicelular contendo AICIPc internalizado.

Apesar de ter sido utilizada uma concentração de AICIPc já padronizada para ocasionar a morte do esferoide multicelular, foi observado o espalhamento das moléculas do fármaco, influenciando na sobrevivência do tecido. A Figura 27, presente na seção 4.7, apresenta o esferoide celular tratado com concentração de AICIPc de $0,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ e foi possível observar que as moléculas tenderam a não espalhar pelo tecido, enquanto o dobro dessa concentração ocasionou no espalhamento, como observado na Figura 28 presente na mesma seção contendo $1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ de AICIPc.

5. Conclusões

Embora o método de cultura em gota suspensa não ser utilizado com frequência, para o crescimento de esferoides multicelulares a partir de células de melanoma o método se mostrou altamente eficaz, uma vez que promoveu o crescimento de esferoides multicelulares que apresentaram reprodutibilidade, para um conjunto diferenciado de linhagens melanômicas.

Foi possível observar a formação de esferoides multicelulares utilizando as células de melanoma em estágios de crescimento distintos WM 35, WM 278 e WM 1617, representando os estágios de crescimento radial, vertical e metastático, respectivamente.

A inclusão dos esferoides multicelulares aos modelos equivalentes dérmicos mostrou ser viável e, como previsto, conseguiu de forma eficiente mimetizar um ambiente tumoral *in vivo*. Os esferoides multicelulares mostraram uma internalização do fármaco fotossensibilizador passível de ser usado na fotobiomodulação e tratamento sinérgico por TFD. Como proposto, abre uma nova frente de estudos envolvendo modelos *in vitro* de crescimento, invasão e proliferação tumoral. Ademais, foi possível verificar a marcação com marcadores fluorescentes tanto da estrutura tridimensional do esferoide quanto o equivalente dérmico, permitindo a visualização eficiente do sistema individual e acoplado.

As células WM 1617 utilizadas em um grande número de estudos, por apresentar um estágio de crescimento metastático e muito agressivo, indicaram que o tratamento com NE-AICIPc no sistema completo 3 D e em monocamada responderam muito bem ao tratamento com luz visível modulando a resposta celular. As doses de 5 J cm^{-2} para as células cultivadas em monocamada e de 25 J cm^{-2} para as células cultivadas como esferoides mostraram uma excelente resposta. Os estudos envolvendo o sistema completo (Equivalente Dermal 3D e Esferoides Melanômicos) levaram a uma morte celular no ambiente tumoral, inserido no sistema dermal, dentro do esperado com um mecanismo predominantemente apoptótico indispensável para estudos e tratamento de sistemas altamente invasivos e metastáticos.

Este trabalho foi pioneiro nesta abordagem de inserção de sistemas esferoidais multicelulares neoplásicos, em diferentes graus de evolução, em um sistema mimético de pele 3D com o objetivo de estudar os processos de progressão, invasão e crescimento tumoral. Foi possível também avaliar os efeitos da Terapia Fotodinâmica e da Fotobiomodulação no tratamento de neoplasias cutâneas e controle destas, além do estudo

para tratamento adequado. Este trabalho também obteve resultados animadores quanto à utilização da Terapia Fotodinâmica nos modelos desenvolvidos, uma vez que foi possível observar a morte celular do tecido neoplásico com a conservação do tecido saudável, o que permitiu observar *in vitro* os processos envolvendo o tratamento quando *in vivo*, o que demonstra maior mimetização do que os estudos envolvendo o crescimento celular bidimensional e abrindo novas oportunidades de estudo para os demais tipos de neoplasias e doenças.

6. Referências

AGOSTINIS, P. et al. Photodynamic therapy of cancer: an update. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 61, n. 4, p. 250-281, 2011.

ALLISON, R. R.; MOGHISSI, K. Photodynamic therapy (PDT): PDT mechanisms. **Clinical endoscopy**, v. 46, n. 1, p. 24-29, 2013.

AMARAL, R. L. et al. Comparative analysis of 3D bladder tumor spheroids obtained by forced floating and hanging drop methods for drug screening. **Frontiers in physiology**, v. 8, p. 15, 2017.

ANVISA. Consultas - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Disponível em: < <https://consultas.anvisa.gov.br/#/medicamentos/> >. Acesso em: 02 de set de 2021.

ASCIERTO, P. A. et al. MEK162 for patients with advanced melanoma harbouring NRAS or Val600 BRAF mutations: a non-randomised, open-label phase 2 study. **The lancet oncology**, v. 14, n. 3, p. 249-256, 2013.

BALDEA, I.; FILIP, A. Photodynamic therapy in melanoma—an update. **Journal of Physiology pharmacology**, v. 63, n. 2, p. 109-118, 2012.

BARBUGLI, P. A. **Estudo dos efeitos da terapia fotodinâmica na progressão tumoral e em modelos celulares tridimensionais**. 2010. 107 p Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto - SP.

BATAILLON, M. et al. Characterization of a new reconstructed full thickness skin model, T-Skin™, and its application for investigations of anti-aging compounds. **International Journal of molecular sciences**, v. 20, n. 9, 2019.

BEAUMONT, K. A. et al. Imaging-and flow cytometry-based analysis of cell position and the cell cycle in 3D melanoma spheroids. **Journal of visualized experiments: JoVE**, n. 106, 2015.

BELL, E.; IVARSSON, B.; MERRILL, C. Production of a tissue-like structure by contraction of collagen lattices by human fibroblasts of different proliferative potential in vitro. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 76, n. 3, p. 1274-1278, 1979.

BERGAMINI, C. M. et al. Oxygen, reactive oxygen species and tissue damage. **Current pharmaceutical design**, v. 10, n. 14, p. 1611-1626, 2004.

BRIDE, J. et al. Indication of fibroblast apoptosis during the maturation of disc-shaped mechanically stressed collagen lattices. **Archives of dermatological research**, v. 295, n. 8, p. 312-317, 2004.

BROHEM, C. A. et al. Artificial skin in perspective: concepts and applications. **Pigment cell & melanoma research**, v. 24, n. 1, p. 35-50, 2011.

CALIXTO, G. M. F. et al. Nanotechnology-based drug delivery systems for photodynamic therapy of cancer: a review. **Molecules**, v. 21, n. 3, 2016.

CALORI, I. R. **Preparação, caracterização e propriedades de lipossomas contendo o ácido-ciano-4-hidroxicinâmico e o agente fotossensibilizador AICIPc: um novo sistema carreador específico com ação sinérgica aplicado a terapia fotodinâmica**. 2016. 123 p. Dissertação (Mestre em Ciências). Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto - SP.

CALORI, I. R.; TEDESCO, A. C. Lipid vesicles loading aluminum phthalocyanine chloride: Formulation properties and disaggregation upon intracellular delivery. **Journal of Photochemistry Photobiology B: Biology**, v. 160, p. 240-247, 2016.

CALORI, I. R.; TEDESCO, A. C. Aluminum chloride phthalocyanine in MCF-7: Rationally accounting for state of aggregation of photosensitizers inside cells. **Dyes Pigments**, v. 173, 2020.

CATARINO, C. M. **Desenvolvimento de epiderme equivalente sobre membrana do tipo transwell e membrana biopolimérica**. 2015. 116 p Dissertação (Mestre em Farmácia). Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, Universidade de São Paulo, São Paulo - SP.

DANSO, M. O. et al. An ex vivo human skin model for studying skin barrier repair. **Experimental dermatology**, v. 24, n. 1, p. 48-54, 2015.

DAVIDS, L.; KLEEMANN, B. Combating melanoma: the use of photodynamic therapy as a novel, adjuvant therapeutic tool. **Cancer Treatment reviews**, v. 37, n. 6, p. 465-475, 2011.

DOLMANS, D. E.; FUKUMURA, D.; JAIN, R. K. Photodynamic therapy for cancer. **Nature reviews cancer**, v. 3, n. 5, p. 380-387, 2003.

DOMINGUES, B. et al. Melanoma treatment in review. **ImmunoTargets and therapy**, v. 7, p. 35-49, 2018.

DOS SANTOS, A. F. et al. Photodynamic therapy in cancer treatment-an update review. **Journal of cancer metastasis and treatment**, v. 5, 2019.

ELDER, D. E. Melanoma progression. **Pathology**, v. 48, n. 2, p. 147-154, 2016.

ESTEVANATO, L. et al. Preliminary biocompatibility investigation of magnetic albumin nanosphere designed as a potential versatile drug delivery system. **International journal of nanomedicine**, v. 6, p. 1709-1717, 2011.

FABER, D. J. et al. Light absorption of (oxy-) hemoglobin assessed by spectroscopic optical coherence tomography. **Optics letters**, v. 28, n. 16, p. 1436-1438, 2003.

FANG, Y.; EGLIN, R. M. Three-dimensional cell cultures in drug discovery and development. **Slas discovery: Advancing Life Sciences R&D**, v. 22, n. 5, p. 456-472, 2017.

FENNEMA, E. et al. Spheroid culture as a tool for creating 3D complex tissues. **Trends in biotechnology**, v. 31, n. 2, p. 108-115, 2013.

FIGUEROA, D.; ASADUZZAMAN, M.; YOUNG, F. Real time monitoring and quantification of reactive oxygen species in breast cancer cell line MCF-7 by 2', 7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFDA) assay. **Journal of pharmacological and toxicological methods**, v. 94, p. 26-33, 2018.

GALVAO, J. et al. Unexpected low-dose toxicity of the universal solvent DMSO. **The FASEB Journal**, v. 28, n. 3, p. 1317-1330, 2014.

GROEBER, F. et al. Skin tissue engineering—in vivo and in vitro applications. **Advanced drug delivery reviews**, v. 63, n. 4-5, p. 352-366, 2011.

GUO, H.; CARLSON, J. A.; SLOMINSKI, A. Role of TRPM in melanocytes and melanoma. **Experimental dermatology**, v. 21, n. 9, p. 650-654, 2012.

HARTMAN, R. I.; LIN, J. Y. Cutaneous melanoma—a review in detection, staging, and management. **Hematology/Oncology Clinics**, v. 33, n. 1, p. 25-38, 2019.

HERLYN, M. et al. Growth-regulatory factors for normal, premalignant, and malignant human cells in vitro. **Advances in cancer research**, v. 54, p. 213-234, 1990.

HILL, D. S. et al. A novel fully humanized 3D skin equivalent to model early melanoma invasion. **Molecular cancer therapeutics**, v. 14, n. 11, p. 2665-2673, 2015.

HSU, M.-Y.; ELDER, D. E.; HERLYN, M. Melanoma: the Wistar melanoma (WM) cell lines. In: (Ed.). **Human cell culture**: Springer, 2002. p.259-274.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER, I. Câncer de Pele Melanoma. Disponível em: < <https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-de-pele-melanoma> >. Acesso em: 16 de set de 2021.

IVANOV, D. P. et al. Multiplexing spheroid volume, resazurin and acid phosphatase viability assays for high-throughput screening of tumour spheroids and stem cell neurospheres. **PloS one**, v. 9, n. 8, 2014.

JAIWAL, M.; DUDHE, R.; SHARMA, P. K. Nanoemulsion: an advanced mode of drug delivery system. **3 Biotech**, v. 5, n. 2, p. 123-127, 2015.

JAYME, C. C.; CALORI, I. R.; TEDESCO, A. C. Spectroscopic analysis of aluminum chloride phthalocyanine in binary water/ethanol systems for the design of a new drug delivery system for photodynamic therapy cancer treatment. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular Biomolecular Spectroscopy**, v. 153, p. 178-183, 2016.

JOSEFSEN, L. B.; BOYLE, R. W. Unique diagnostic and therapeutic roles of porphyrins and phthalocyanines in photodynamic therapy, imaging and theranostics. **Theranostics**, v. 2, n. 9, p. 916-966, 2012.

KIRTONIA, A.; SETHI, G.; GARG, M. The multifaceted role of reactive oxygen species in tumorigenesis. **Cellular Molecular Life Sciences**, p. 1-25, 2020.

LARSON, A. R. et al. Melanoma spheroid formation involves laminin-associated vasculogenic mimicry. **The American journal of pathology**, v. 184, n. 1, p. 71-78, 2014.

LEE, Y. T.; TAN, Y. J.; OON, C. E. Molecular targeted therapy: treating cancer with specificity. **European journal of pharmacology**, v. 834, p. 188-196, 2018.

LINARES, M. A.; ZAKARIA, A.; NIZRAN, P. Skin cancer. **Primary care**, v. 42, n. 4, p. 645-659, 2015.

LIU, G.-Y.; STORZ, P. Reactive oxygen species in cancer. **Free radical research**, v. 44, n. 5, p. 479-496, 2010.

LIU, D.; CHEN, S.; WIN NAING, M. A review of manufacturing capabilities of cell spheroid generation technologies and future development. **Biotechnology Bioengineering**, v. 118, n. 2, p. 542-554, 2021.

LOTZ, C. et al. Cross-linked collagen hydrogel matrix resisting contraction to facilitate full-thickness skin equivalents. **ACS applied materials & interfaces**, v. 9, n. 24, p. 20417-20425, 2017.

MARCONI, A. et al. Progress in melanoma modelling in vitro. **Experimental dermatology**, v. 27, n. 5, p. 578-586, 2018.

MILLER, A. J.; MIHM JR, M. C. Melanoma. **New England Journal of Medicine**, v. 355, n. 1, p. 51-65, 2006.

MIO, T. et al. Regulation of fibroblast proliferation in three-dimensional collagen gel matrix. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal**, v. 32, n. 7, p. 427-433, 1996.

MOLINA, J. R.; ADJEI, A. A. The ras/raf/mapk pathway. **Journal of Thoracic Oncology**, v. 1, n. 1, p. 7-9, 2006.

MÜLLER, I.; KULMS, D. A 3D organotypic melanoma spheroid skin model. **Journal of visualized experiments: JoVE**, n. 135, 2018.

NAIDOO, C.; KRUGER, C. A.; ABRAHAMSE, H. Photodynamic therapy for metastatic melanoma treatment: A review. **Technology in cancer research & treatment**, v. 17, p. 1-15, 2018.

NHO, R. S. et al. PTEN regulates fibroblast elimination during collagen matrix contraction. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 44, p. 33291-33301, 2006.

NOTMAN, R. et al. Molecular basis for dimethylsulfoxide (DMSO) action on lipid membranes. **Journal of the American Chemical Society**, v. 128, n. 43, p. 13982-13983, 2006.

NOWIS, D. et al. Direct tumor damage mechanisms of photodynamic therapy. **Acta Biochimica Polonica**, v. 52, n. 2, p. 339-352, 2005.

NUNES, A. S. et al. 3D tumor spheroids as in vitro models to mimic in vivo human solid tumors resistance to therapeutic drugs. **Biotechnology and bioengineering**, v. 116, n. 1, p. 206-226, 2019.

OCHSNER, M. Photophysical and photobiological processes in the photodynamic therapy of tumours. **Journal of Photochemistry Photobiology B: Biology**, v. 39, n. 1, p. 1-18, 1997.

OLBRYT, M. et al. Bis-anthracycline WP760 abrogates melanoma cell growth by transcription inhibition, p53 activation and IGF1R downregulation. **Investigational new drugs**, v. 35, n. 5, p. 545-555, 2017.

PANDEY, M. et al. Perspectives of nanoemulsion strategies in the improvement of oral, parenteral and transdermal chemotherapy. **Current pharmaceutical biotechnology**, v. 19, n. 4, p. 276-292, 2018.

PENNACCHI, P. C. **Desenvolvimento de pele humana reconstruída contendo equivalente dérmico glicado na avaliação da eficácia e toxicidade de compostos anti-glicação**. 2016. 145 p. Tese (Doutorado em Farmácia). Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, Universidade de São Paulo, São Paulo - SP.

PRIMO, F. L.; BENTLEY, M. V.; TEDESCO, A. C. Photophysical studies and in vitro skin permeation/retention of Foscan[®]/nanoemulsion (NE) applicable to photodynamic therapy skin cancer treatment. **Journal of nanoscience nanotechnology**, v. 8, n. 1, p. 340-347, 2008.

PRIMO, F. L. et al. In vitro evaluation of chloroaluminum phthalocyanine nanoemulsion and low-level laser therapy on human skin dermal equivalents and bone marrow mesenchymal stem cells. **J Current medicinal chemistry**, v. 18, n. 22, p. 3376-3381, 2011.

RIBEIRO, A. P. D. et al. Photodynamic inactivation of planktonic cultures and biofilms of *Candida albicans* mediated by aluminum-chloride-phthalocyanine entrapped in nanoemulsions. **Photochemistry photobiology**, v. 89, n. 1, p. 111-119, 2013.

ROMPRÉ, P. et al. Influence of initial collagen and cellular concentrations on the final surface area of dermal and skin equivalents: a Box-Behnken analysis. **In vitro cellular & developmental biology**, v. 26, n. 10, p. 983-990, 1990.

SAMARASINGHE, V.; MADAN, V. Nonmelanoma skin cancer. **Journal of cutaneous and aesthetic surgery**, v. 5, n. 1, 2012.

SHAH, P.; BHALODIA, D.; SHELAT, P. Nanoemulsion: A pharmaceutical review. **Systematic reviews in pharmacy**, v. 1, n. 1, 2010.

SHAO, C. et al. Development of cell spheroids by advanced technologies. **Advanced Materials Technologies**, v. 5, n. 9, p. 1-16, 2020.

SHARIFI, S. et al. Anti-microbial activity of curcumin nanoformulations: New trends and future perspectives. **Phytotherapy Research**, v. 34, n. 8, p. 1926-1946, 2020.

SHELLMAN, Y. G. et al. Release of vascular endothelial growth factor from a human melanoma cell line, WM35, is induced by hypoxia but not ultraviolet radiation and is potentiated by activated Ras mutation. **Journal of investigative dermatology**, v. 121, n. 4, p. 910-917, 2003.

SINGH, Y. et al. Nanoemulsion: Concepts, development and applications in drug delivery. **Journal of controlled release**, v. 252, p. 28-49, 2017.

SIQUEIRA-MOURA, M. P. et al. Development, characterization, and photocytotoxicity assessment on human melanoma of chloroaluminum phthalocyanine nanocapsules. **Materials Science Engineering: C**, v. 33, n. 3, p. 1744-1752, 2013.

SLIPICEVIC, A. et al. The fatty acid binding protein 7 (FABP7) is involved in proliferation and invasion of melanoma cells. **BMC cancer**, v. 8, n. 1, p. 1-13, 2008.

SMALLEY, K. S. et al. Up-regulated expression of zonula occludens protein-1 in human melanoma associates with N-cadherin and contributes to invasion and adhesion. **The American journal of pathology**, v. 166, n. 5, p. 1541-1554, 2005.

SMALLEY, K. S. et al. Multiple signaling pathways must be targeted to overcome drug resistance in cell lines derived from melanoma metastases. **Molecular cancer therapeutics**, v. 5, n. 5, p. 1136-1144, 2006.

SMALLEY, K. S. et al. In vitro three-dimensional tumor microenvironment models for anticancer drug discovery. **Expert opinion on drug discovery**, v. 3, n. 1, p. 1-10, 2008.

SOENGAS, M. S.; LOWE, S. W. Apoptosis and melanoma chemoresistance. **Oncogene**, v. 22, n. 20, p. 3138-3151, 2003.

- STADLER, M. et al. Increased complexity in carcinomas: Analyzing and modeling the interaction of human cancer cells with their microenvironment. *Seminars in Cancer Biology*, 2015, Elsevier. p.107-124.
- STORZ, P. Reactive oxygen species in tumor progression. **Front Biosci**, v. 10, n. 1-3, p. 1881-1896, 2005.
- THANNICKAL, V. J.; FANBURG, B. L. Reactive oxygen species in cell signaling. **American Journal of Physiology-Lung Cellular Molecular Physiology**, v. 279, n. 6, p. 1005-1028, 2000.
- THOMA, C. R. et al. 3D cell culture systems modeling tumor growth determinants in cancer target discovery. **Advanced drug delivery reviews**, v. 69, p. 29-41, 2014.
- TSIMBERIDOU, A.-M. Targeted therapy in cancer. **Cancer chemotherapy pharmacology**, v. 76, n. 6, p. 1113-1132, 2015.
- VAN KILSDONK, J. W. J. et al. Keratinocytes drive melanoma invasion in a reconstructed skin model. **Melanoma research**, v. 20, n. 5, p. 372-380, 2010.
- VÖRSMANN, H. et al. Development of a human three-dimensional organotypic skin-melanoma spheroid model for in vitro drug testing. **Cell death disease**, v. 4, n. 7, p. 1-11, 2013.
- WANG, Q. et al. Targeting glutamine transport to suppress melanoma cell growth. **International journal of cancer**, v. 135, n. 5, p. 1060-1071, 2014.
- WEI, Y. et al. Enhancement of photodynamic antitumor effect with pro-oxidant ascorbate. **Lasers in surgery medicine**, v. 44, n. 1, p. 69-75, 2012.
- WEISWALD, L.-B.; BELLET, D.; DANGLES-MARIE, V. Spherical cancer models in tumor biology. **Neoplasia**, v. 17, n. 1, p. 1-15, 2015.
- WHEATLEY, S. P.; ALTIERI, D. C. Survivin at a glance. **Journal of Cell Science**, v. 132, n. 7, p. 1-8, 2019.
- WU, H.-C.; CHANG, D.-K.; HUANG, C.-T. Targeted therapy for cancer. **J Cancer Mol**, v. 2, n. 2, p. 57-66, 2006.
- YANG, E.-K. et al. Contraction Behavior of Collagen Gel and Fibroblasts Activity in Dermal Equivalent Model. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 7, n. 4, p. 267-271, 1997.
- YAO, X. et al. Luteolin inhibits proliferation and induces apoptosis of human melanoma cells in vivo and in vitro by suppressing MMP-2 and MMP-9 through the PI3K/AKT pathway. **Food & function**, v. 10, n. 2, p. 703-712, 2019.

ZHU, T. C. et al. In-vivo singlet oxygen threshold doses for PDT. **Photonics lasers in medicine**, v. 4, n. 1, p. 59-71, 2015.

ZHU, Y. et al. Contraction of fibroblast-containing collagen gels: initial collagen concentration regulates the degree of contraction and cell survival. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal**, v. 37, n. 1, p. 10-16, 2001.

ZOU, Z. et al. Induction of reactive oxygen species: an emerging approach for cancer therapy. **Apoptosis**, v. 22, n. 11, p. 1321-1335, 2017.