



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	Erro! Indicador não definido.
Figura 11: Esferoides multicelulares formados a partir das células WM 35 ao decorrer de 14 dias. Barra equivale a 100 µm.	Erro! Indicador não definido.
Figura 12: Esferoides multicelulares formados a partir de células WM 35 pelo método de plaqueamento sobre matriz solidificada.	Erro! Indicador não definido.
Figura 13: Esferoides multicelulares formados a partir das células WM 278 ao decorrer de 14 dias. Barra equivale a 100 µm.	Erro! Indicador não definido.
Figura 14: Esferoides multicelulares formados a partir das células WM 1617 ao decorrer de 14 dias. Barra equivale a 100 µm.	Erro! Indicador não definido.
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. Erro! Indicador não definido.	
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. ...	Erro! Indicador não definido.
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	Erro! Indicador não definido.
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.....	Erro! Indicador não definido.
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 **Erro! Indicador não definido.**

Figura 20: Ensaio de Citotoxicidade em células WM 1617 cultivadas em monocamada variando a concentração da nanoemulsão AICIPc. **Erro! Indicador não definido.**

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

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 . .. **Erro! Indicador não definido.**

Figura 23: Ensaio de fototoxicidade em células WM 1617 cultivadas em monocamada variando a densidade de energia aplicada. (****) $p < 0,0001$ **Erro! Indicador não definido.**

Figura 24: Ensaios 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 **Erro! Indicador não definido.**

Figura 25 : Contração do Equivalente Dérmico observada no decorrer de 14 dias..... **Erro! Indicador não definido.**

Figura 26: Microfotografias apresentando o acompanhamento de esferoide multicelular WM 1617 não marcado em equivalente dérmico no decorrer de 12 dias. **Erro! Indicador não definido.**

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..... **Erro! Indicador não definido.**

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 **Erro! Indicador não definido.**

Figura 29: Fotomicrografias da microestrutura dos equivalentes dérmicos pós irradiação. Barra equivale a 100 μm **Erro! Indicador não definido.**

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.... **Erro! Indicador não definido.**

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.....	Erro! Indicador não definido.
2.1 Objetivos Específicos.....	Erro! Indicador não definido.
3. Materiais e Métodos.....	Erro! Indicador não definido.
3.1 Cultura celular.....	Erro! Indicador não definido.
3.2 Formação de esferoides multicelulares.....	Erro! Indicador não definido.
3.3 Caracterização morfológica dos esferoides multicelulares.....	Erro! Indicador não definido.
3.4 Preparo de nanoemulsão contendo ftalocianina de alumínio-cloro como fotoativo	Erro! Indicador não definido.
3.5 Estimativa da Viabilidade Celular dos esferoides multicelulares .	Erro! Indicador não definido.
3.6 Ensaios de internalização celular de ftalocianina de alumínio-cloro.....	Erro! Indicador não definido.
3.7 Ensaios de citotoxicidade.....	Erro! Indicador não definido.
3.8 Ensaios de Fotocitotoxicidade.....	Erro! Indicador não definido.
3.9 Preparo de equivalentes dérmicos.....	Erro! Indicador não definido.
3.10 Estudos da Cinética de Contração dos Equivalentes Dérmicos.....	Erro! Indicador não definido.
3.11 Marcação de esferoides multicelulares e inclusão em equivalentes dérmicos	Erro! Indicador não definido.
3.12 Estudos de microscopia confocal.....	Erro! Indicador não definido.
3.13 Ensaio de fotocitotoxicidade do Equivalente Dérmico.....	Erro! Indicador não definido.
3.14 Análise Estatística.....	Erro! Indicador não definido.
4. Resultados e Discussão.....	Erro! Indicador não definido.
4.1 Caracterização dos esferoides multicelulares.....	Erro! Indicador não definido.

4.2	Estimativa da Viabilidade Celular dos esferoides multicelulares da WM 1617	
	Erro! Indicador não definido.	
4.3	Ensaio de internalização de AICIPc como fotoativo potencial no tratamento via Terapia Fotodinâmica.....	Erro! Indicador não definido.
4.4	Ensaio de Citotoxicidade das AICIPc nas linhagens WM 1617, na ausência de Luz	Erro! Indicador não definido.
4.5	Ensaio de fototoxicidade	Erro! Indicador não definido.
4.6	Estudos Cinéticos de Contração do Equivalente Dérmico.....	Erro! Indicador não definido.
4.7	Inclusão de esferoides multicelulares em equivalentes dérmicos mimetizando sistemas 3D de progressão tumoral metastática.....	Erro! Indicador não definido.
4.8	Ação da irradiação visível em modelos dérmicos contendo os esferoides de WM 1617, mimetizando os sistemas 3D de propagação melanocítica.....	Erro! Indicador não definido.
5.	Conclusões	29
6.	Referências	31

1. Introdução

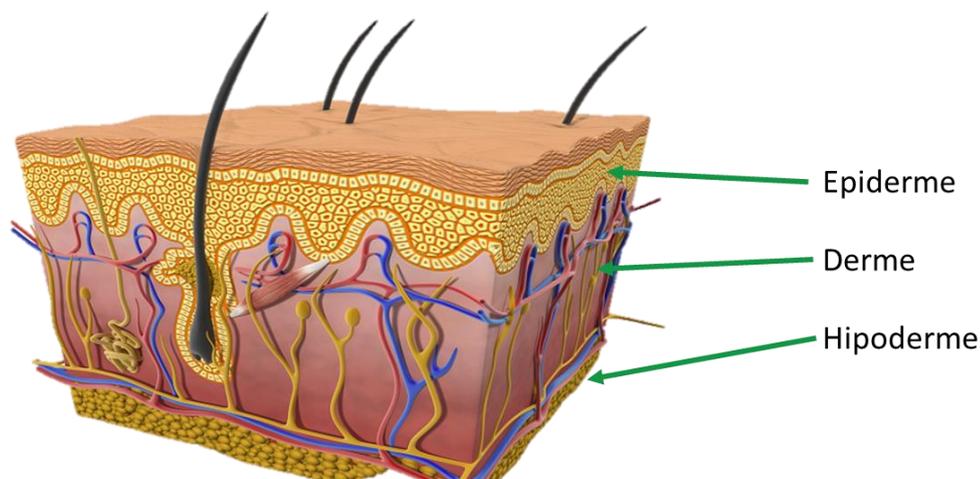
1.1 Pele

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).

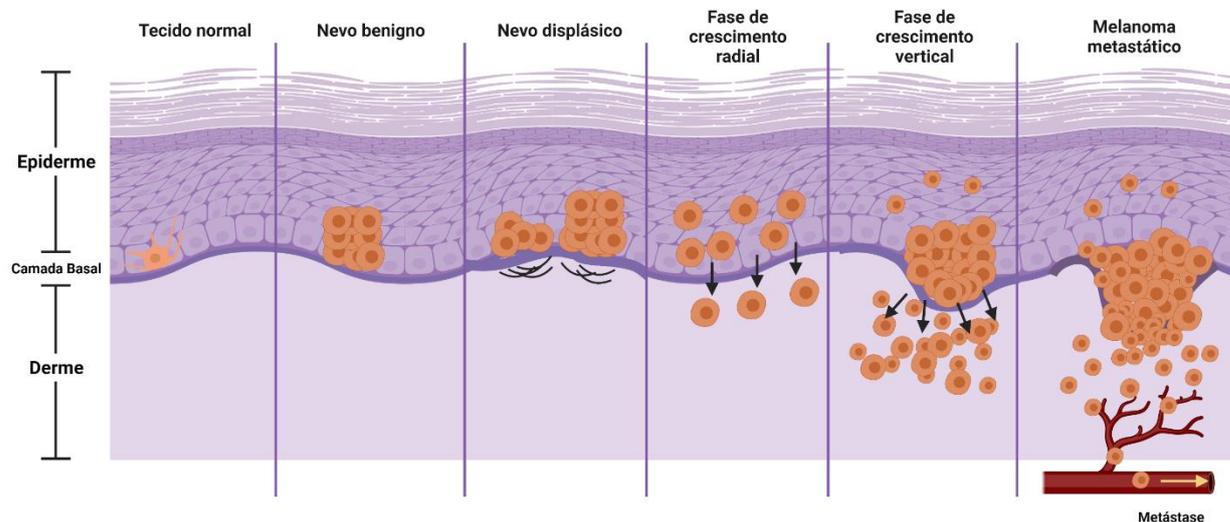
A partir do nevo displásico, as células adquirem a habilidade de crescer dentro da epiderme, além de poderem adentrar a derme papilar, camada superior da derme que é formada por tecido conjuntivo frouxo. O estágio em que as células começam a se espalhar dentro da epiderme é chamado de **fase de crescimento 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

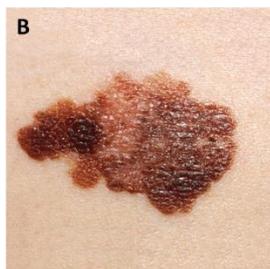
O melanoma cutâneo (Figura 3) é inicialmente diagnosticado pela inspeção visual da pele, observando os aspectos da pele utilizando o método ABCDE e o sinal de “patinho feio”. No primeiro, observa-se a assimetria, borda irregular, coloração, diâmetro e a evolução do nevo displásico. O segundo é utilizado 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>



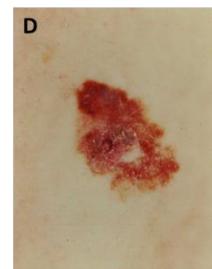
Melanoma
National Cancer Institute

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)

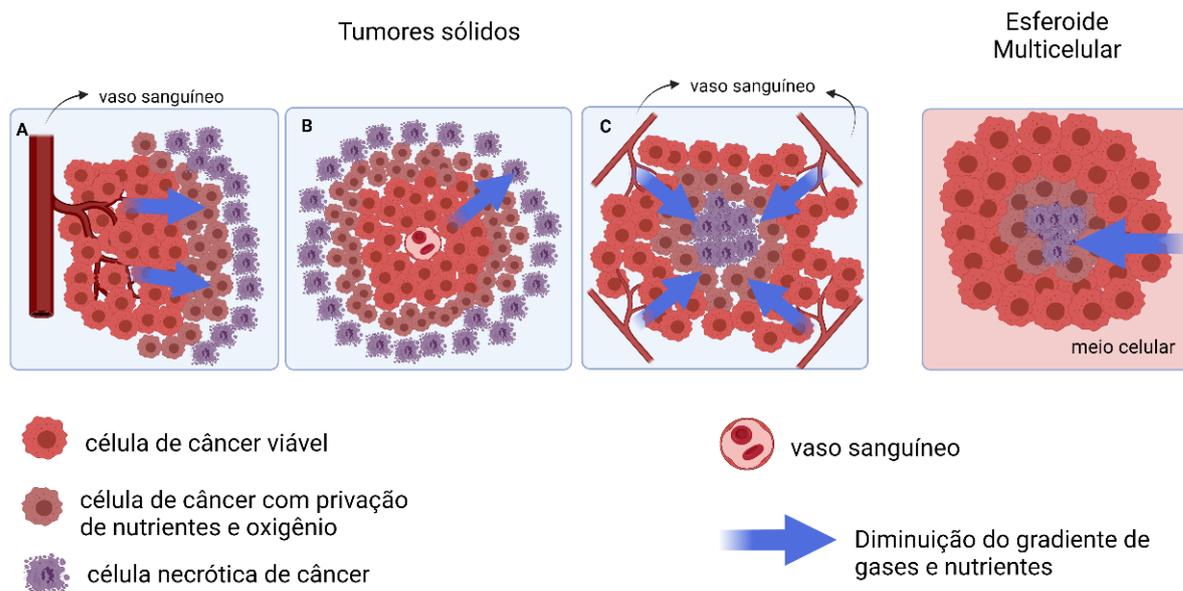
Os esferoides de culturas multicelulares começaram a ser desenvolvidos por Sutherland e colaboradores em 1970 para reproduzir o fenótipo funcional das células tumorais humanas e suas respostas à radioterapia. Esses esferoides são agregados celulares 3D e são utilizados para assemelhar-se às estruturas 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 glutathiona (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).

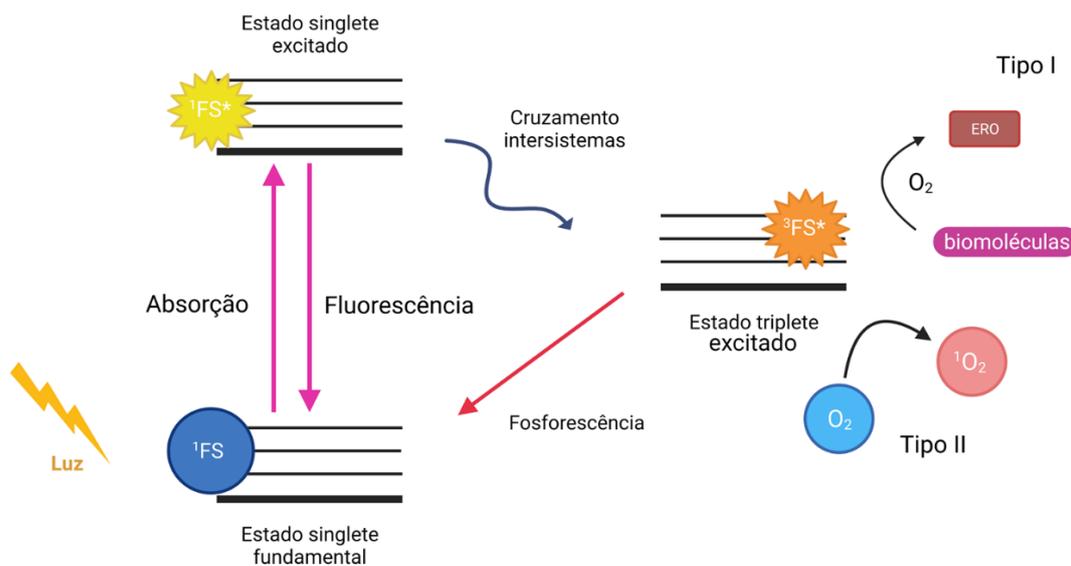
A Terapia é baseada em três processos: a excitação de um fotossensibilizador (FS), produção de Espécies Reativas de Oxigênio (ERO) e morte celular. Os fotossensibilizadores são administrados ao paciente, seja de forma sistêmica ou tópica, na ausência de luz e são, preferencialmente, absorvidos ou retidos 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).

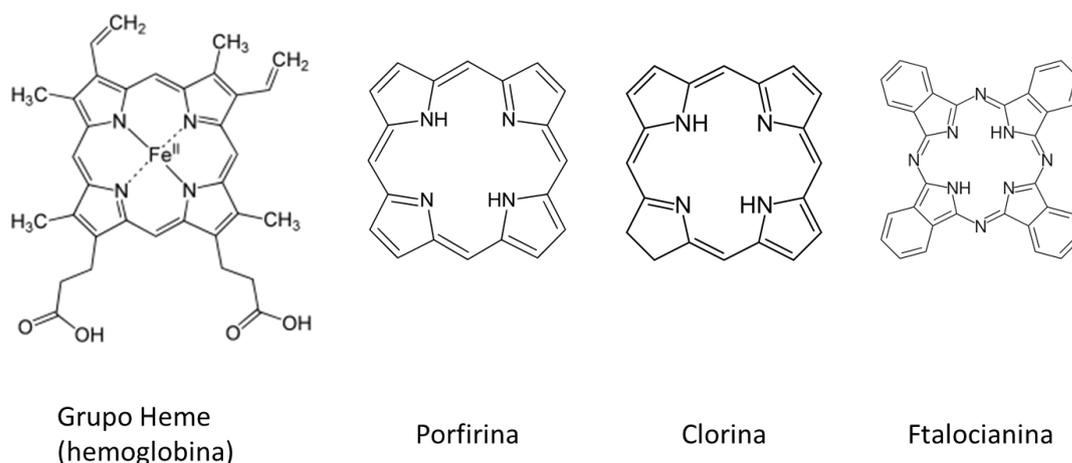
1.12 Fármacos Fotossensibilizadores

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 absorbância 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



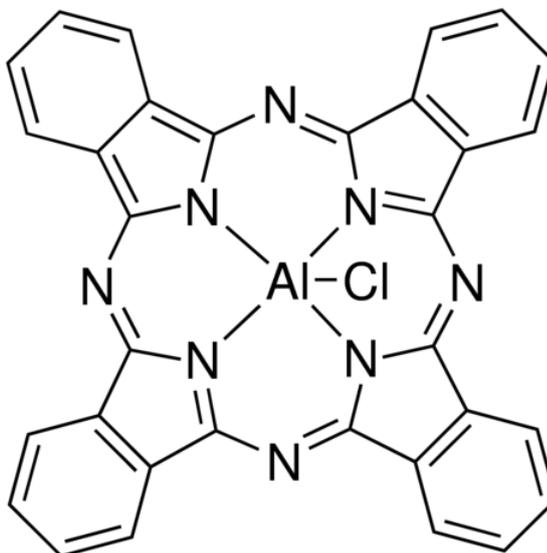
Os fármacos fotossensibilizadores, mais utilizados na TFD, absorvem na região do vermelho no espectro eletromagnético (640-710 nm), uma vez que a luz vermelha tem maior penetração nos tecidos e está dentro da “janela terapêutica”, a faixa de comprimento de onda do espectro eletromagnético entre 600 e 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



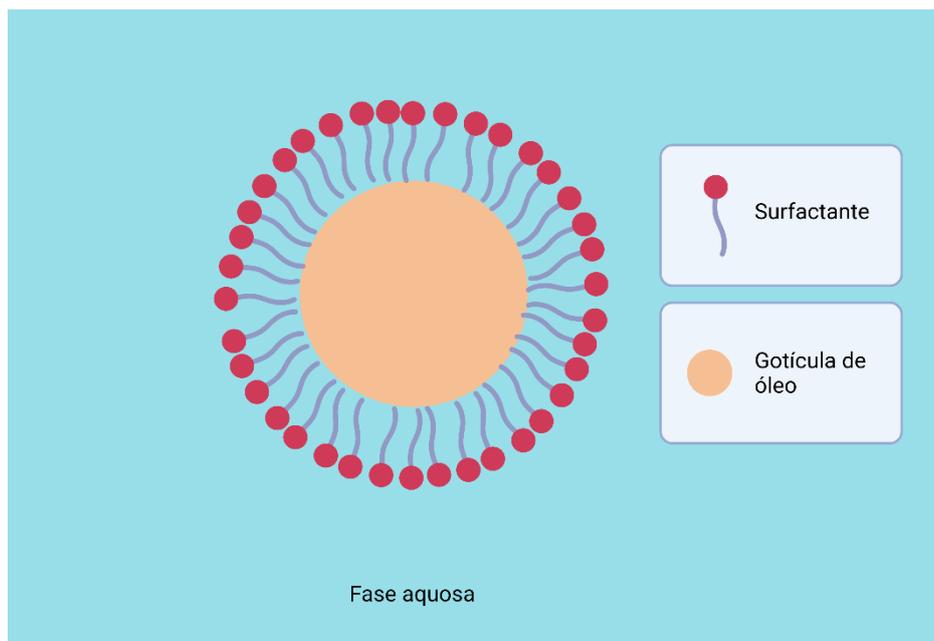
1.13 Veiculadores de Fármaco

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. 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.

3. 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.