



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA

Dayane Azevedo Padilha

**Caracterização de modelo tridimensional de melanoma e avaliação da atividade
antitumoral do sal de isotiurônio (SI-MF08)**

Florianópolis

2020

Dayane Azevedo Padilha

Caracterização de modelo tridimensional de melanoma e avaliação da atividade antitumoral do sal de isotiurônio (SI-MF08)

Dissertação submetida ao Programa de Pós Graduação em Farmácia da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Mestre em Farmácia

Orientadora:

Prof. Dr. Tânia Beatriz Creczynski Pasa

Co-orientador:

Prof. Dr. Juliano Andreoli Miyake

Florianópolis

2020

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Azevedo, Dayane
CARACTERIZAÇÃO DE MODELO TRIDIMENSIONAL DE
MELANOMA E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL DE
PACLITAXEL, TAMOXIFENO E O SAL DE ISOTIURÔNIO (SI-MF08)
Dayane Azevedo Padilha ; orientador, Tânia Beatriz Creczynski Pasa, 2020.
111 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências
da Saúde, Programa de Pós Graduação em Farmácia, Florianópolis, 2020.

Inclui referências.

1. Farmácia. 2. Melanoma II. 3. Modelo Tridimensional. 4. Célula Tronco Tumoral.
5. SI-MF08. I. Beatriz Creczynski Pasa , Tânia . II. Universidade Federal de Santa
Catarina. Programa de Pós Graduação em Farmácia. III. Título.

Dayane Azevedo Padilha

Caracterização de modelo tridimensional de melanoma e avaliação da atividade antitumoral do sal de isotiurônio (SI-MF08)

O presente trabalho em nível de mestrado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof.(a) Dr.(a) Ana Carolina Rabello de Moraes
Instituição UFSC

Prof.(a) Dr. Felipe Perozzo Daltoé
Instituição UFSC

Certificamos que esta é a versão original e final do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de Mestre em Farmácia.

Coordenação do Programa de Pós-Graduação

Prof.(a) Dr.(a) Tânia Beatriz Creczynski Pasa
Orientador(a)

Florianópolis, 2020.

Este trabalho é dedicado à minha família que sempre acreditou e depositou sua confiança em mim!

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha família, minha mãe Valéria, meu avô Jorvanil, minhas tias Sônia e Cristina e minha avó Marlene (*in memoriam*), que mesmo diante de circunstâncias desfavoráveis, apoiaram e incentivaram a alcançar os meus sonhos.

Ao meu pai Maurício, irmãs Gabriela e Kauana e irmão Juliano, tio Otacílio e minhas tias Odete e Dina que mesmo distantes são lembrados com muito amor e carinho.

Ao meu amado namorado e companheiro Ícaro que sempre acreditou no meu potencial e que planeja junto comigo um futuro lindo para nós dois.

À minha sogra Maria Salete que me acolheu e que junto com o Ícaro são minha família aqui em Florianópolis desde que escolhi iniciar minha história na Universidade Federal de Santa Catarina.

Aos meus amigos, Karina e Bernardo, com os quais criei laços muito fortes nos últimos anos, vocês fazem toda diferença no meu sábado à noite.

Às minhas amigas de Curitiba, em especial à Amanda e Eluana, amigas que eu trouxe do ensino médio para a vida, e que por isto conhecem toda a evolução pessoal e profissional pela qual passei.

Às minhas amigas da graduação, Thaís, Mauren, Malu, Elba, Mari, Ina e Paulina, ninguém sabe mais do que nós o como foi difícil alcançar o que cada uma de nós está alcançando.

Aos meus “amigos de bar” Carine, Schuster, Kaique, Carol, Jean, Yuri, Teshy, entre outros tantos, que nos poucos, mas bons encontros que temos, deixam a vida mais leve.

Às amigas empreendedoras, em especial Rhaíza e Marília, que são exemplos e que veem me ajudando a desenvolver inteligência emocional na vida e nos negócios.

Aos meus amigos de laboratório, cada um com sua essência tornou-me uma pesquisadora ainda mais apaixonada, essa experiência não teria sido a mesma sem vocês.

À minha orientadora professora Tânia, que para mim é exemplo da pesquisadora ética, competente e apaixonada pela profissão, como a qual quero me tornar.

Ao meu co-orientador professor Juliano, sempre muito paciente e solícito em me auxiliar com o que fosse preciso.

Aos membros da banca que aceitaram dispor de tempo e paciência na avaliação deste trabalho tão importante para minha trajetória profissional.

Aos servidores do Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia (LAMEB), Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME) e Laboratório de Técnicas Histológicas da UFSC por toda a ajuda e disponibilidade.

Às agências de fomentos CNPq e CAPES pelo suporte financeiro.

Ao universo por me permitir conhecer e conviver com tantas pessoas de tão bom coração.

“Estude a si mesmo, observando que o autoconhecimento traz humildade e sem humildade é impossível ser feliz.”

(Allan Kardec, 1804 – 1869)

RESUMO

O melanoma é um câncer de pele agressivo e com alta taxa de mortalidade. Atualmente, o tratamento padrão para esta doença é a dacarbazina, entretanto mesmo o tratamento com este agente antineoplásico proporciona a cura a apenas 1 a 2% dos pacientes. Uma das hipóteses para a malignidade de tumores sólidos como o melanoma é a heterogeneidade intra-tumoral ou a presença de células tronco tumorais (CTTs) que tenham capacidade de iniciar tumores, aumentar incidência de metástases, além de incrementar a resistência farmacoterapêutica. O modelo *in vitro* tridimensional é o mais indicado para estudos de CTTs, pois geralmente é induzido por meio de expansão clonal, apresenta vantagens, pois permite a interação célula-célula, interação célula-matriz extracelular, resposta farmacoterapêutica mais fidedigna, além da possibilidade de mimetizar o microambiente tumoral, quando comparado com modelos em monocamada. Tendo em vista a dificuldade de tratamento para o melanoma, nosso grupo de pesquisa tem estudado novos compostos com possível atividade antitumoral como o sal de isotiurônio MF08 (SI-MF08). Neste trabalho, um modelo de melanoesferas foi aprimorado, em que duas diferentes densidades celulares de B16F10 (célula de melanoma murino), em condições de expansão clonal, foram testadas, 100 e 1000 células por poço. As melanoesferas de 100 células/poço apresentaram viabilidade celular de $92 \pm 4\%$ com uma média de 323 ± 120 células/esfera, com morfologia esférica e volume na ordem de $0,003 \text{ mm}^3$ no sétimo dia de cultivo. Em análises histológicas, as melanoesferas de menor densidade apresentaram áreas acelulares, característicos de necrose, além de pequena quantidade de matriz extracelular. Com relação a CTT essas melanoesferas mostraram-se enriquecidas de CD44 (92%). Já as melanoesferas de 1000 células/poço também apresentaram alta viabilidade celular de $95 \pm 4\%$ com uma média de 3.726 ± 900 células/esfera, mas com morfologia menos esférica que as esferas de menor densidade e apresentou volume de $\sim 0,01 \text{ mm}^3$, no sétimo dia de cultivo. Em análise histológica estas melanoesferas também apresentaram área central acelular, no entanto menor quantidade de matriz extracelular que as de 100 células/poço. Entretanto, essas melanoesferas apresentaram-se enriquecidas de CD271 (95%). Com a finalidade de avaliar não somente a densidade celular, mas também a influência do microambiente tumoral na formação de esferoides utilizou-se uma cultura primária de células (CP), a partir de células extraídas de tumor induzido com células da linhagem B16F10. Assim, na condição de 100 células/poço as melanoesferas foram obtidas, a fim de comparar com a cultura da linhagem B16F10. A CP nas condições de cultivo 2D foi capaz de produzir uma maior quantidade de melanina que a B16F10. Na condição 3D, os esferoides apresentaram-se menos arredondados, menor viabilidade celular, menor quantidade de matriz extracelular e menor enriquecimento de CTTs, quando comparados às melanoesferas de B16F10. Por fim, avaliou-se a citotoxicidade do SI-MF08 no modelo 3D de B16F10 (100 células/poço), além de dois fármacos utilizados na clínica, o paclitaxel e o tamoxifeno. Os compostos SI-MF08, paclitaxel e tamoxifeno causaram a diminuição de CD44, de 92% para 9%, 8%, 11%, respectivamente. Diante do exposto, foi possível demonstrar que diferentes densidades celulares, mesmo que na condição de expansão clonal, e células obtidas de diferentes fontes, são capazes de modificar parâmetros importantes a cerca da estrutura, composição e presença de CTTs nas melanosferas. Adicionalmente, foram formados três diferentes modelos de melanoesferas, capazes de enriquecer os conhecimentos a cerca da atividade antitumoral de compostos sob CTTs.

Palavras-chave: melanoesferas, células tronco tumorais, melanogênese, sal de isotiurônio, paclitaxel, tamoxifeno.

Characterization of a three-dimensional model of melanoma and evaluation of the antitumor activity of the isothiuronium salt (SI-MF08)

Melanoma is an aggressive skin cancer with a high mortality rate. Currently, the standard treatment for this disease is dacarbazine. However even treatment with dacarbazine provides a cure for only 1 to 2% of patients. One of the hypotheses for the malignancy of solid tumors such as melanoma is the intra-tumor heterogeneity or the presence of tumor stem cells (CSCs). CSCs are capable of initiating tumors, increasing the incidence of metastases as well as pharmacotherapeutic resistance. The three-dimensional (3D) in vitro model is the most suitable for CSCs studies, because it allows cell-cell interaction, cell-extracellular matrix interaction, more reliable pharmacotherapeutic response, providing similar conditions of the tumor microenvironment when compared to bidimensional models (2D). In view of the difficulties in treating melanoma, our research group has been studying new compounds with possible antitumor activity, such as the isothiuronium salt MF08 (SI-MF08). In this work, a model of melanospheres was improved, in which two different cell densities of B16F10 (murine cell line), under conditions of clonal expansion, were tested, 100 and 1000 cells per well. The melanospheres of 100 cells/well showed cell viability of $92 \pm 4\%$ with an average of 323 ± 120 cells/sphere, with spherical morphology and volume of 0.003 mm^3 on the seventh day of culture. In histological analysis, melanospheres of lower density showed an acellular area, characterizing as necrosis, as well as a small amount of extracellular matrix. Regarding CSCs, these melanospheres were enriched with CD44 (92%). Melanospheres of 1000 cells/well, on the other hand, also showed high cell viability, of $95 \pm 4\%$, with an average of $3,726 \pm 900$ cells/sphere, but with a less spherical morphology than spheres of lower density and a volume of $\sim 0.01 \text{ mm}^3$, on the seventh day of cultivation. By the histological analysis an acellular central area was observed, however less extracellular matrix than the melanospheres of 100 cells/well. However, these melanospheres were enriched with CD271 (95%). To evaluate, not only cell density, but also the influence of the tumor microenvironment on spheroid formation, a primary cell culture (PC) was used, from cells extracted from a tumor induced with cells of the B16F10 lineage. Thus, in the condition of 100 cells/well the melanospheres were obtained, to compare with the B16F10 strain culture. Cells of the PC under 2D culture conditions were able to produce a greater amount of melanin than B16F10 cells. In the 3D condition, the spheroids were less rounded, presented less cell viable and less extracellular matrix as well as less CSCs enrichment, when compared to B16F10 melanospheres. Finally, the cytotoxicity of SI-MF08 was evaluated in the 3D model of B16F10 (100 cell/well), in addition to two drugs used in the clinic, paclitaxel and tamoxifen. The compounds SI-MF08, paclitaxel and tamoxifen caused a decrease in CD44, from 92% to 9%, 8%, 11%, respectively. All results together, allowed to demonstrate that different cell density, even in the condition of clonal expansion, and cells obtained from different sources, are capable of modifying important parameters regarding the structure, composition and the presence of CSCs in the melanospheres. In addition, three different models of melanospheroids were formed to enrich the knowledge about the antitumor activity of the compounds targeting CSCs.

Keywords: melanospheres, tumor stem cells, melanogenesis, isothiuronium salt, paclitaxel, tamoxifen.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Resumo melanogênese.....	19
Figura 2 - Representação esquemática das principais hipóteses da heterogeneidade tumoral.....	21
Figura 3 - Estrutura paclitaxel.....	28
Figura 4 - Estrutura tamoxifeno.....	28
Figura 5 - Estrutura do sal de isotiurônio SI-MF08.....	30
Figura 6 - Representação esquemática da formação de melanoesferas.....	33
Figura 7 - Melanoesferas de B16F10 formadas nas densidades iniciais de plaqueamento de 100 e 1000 células/poço em diferentes dias de cultivo.....	40
Figura 8 - Volume do quarto e sétimo dia de cultivo dos esferoides de B16F10 plaqueados inicialmente nas densidades de 100 e 1000 células/poço.....	42
Figura 9 - Coloração de hematoxilina/eosina, Mallory ou Sirius Red de cortes histológicos de melanoesferas de B16F10 na densidade de 100 células/poço.....	46
Figura 10 - Coloração de hematoxilina/eosina, Mallory ou Sirius Red de cortes histológicos de melanoesferas de B16F10 na densidade de 1000 células/poço.....	48
Figura 11 - Análise por microscopia confocal da distribuição interna de proteínas transmembranares de melanoesferas de B16F10 na densidade de 100 células/poço.....	51
Figura 12 - Análise por microscopia confocal da distribuição interna de proteínas transmembranares de melanoesferas de B16F10 na densidade de 1000 células/poço.....	53
Figura 13 - Quantificação de proteínas transmembranares por citometria de fluxo de modelo bidimensional e de melanoesferas formadas por B16F10 na densidade de 100 células/poço.....	55
Figura 14 - Quantificação de proteínas transmembranares por citometria de fluxo de modelo bidimensional e de melanoesferas formadas por B16F10 na densidade de 1000 células/poço.....	57
Figura 15 - Quantificação de proteínas transmembranares por citometria de fluxo de modelo bidimensional e tridimensional de melanoesferas formadas por B16F10 nas densidades celulares de 100 e 1000 células/poço.....	59
Figura 16 - Melanoesferas de cultura primária e B16F10 formadas na densidade inicial de plaqueamento de 100 células /poço em diferentes dias de cultivo.....	62
Figura 17 - Volume do quarto e sétimo dia de cultivo dos esferoides de B16F10 e cultura primária plaqueados inicialmente na densidade de 100 células /poço.....	64

Figura 18 - Quantificação da melanogênese induzida por IBMX em cultura primária e em B16F10 no modelo bidimensional.....	67
Figura 19 - Coloração de hematoxilina/eosina, Mallory ou Sirius Red de cortes histológicos de melanosferas de cultura primária na densidade de 100 células/poço.....	69
Figura 20 - Análise por microscopia confocal da distribuição interna de proteínas transmembranares de melanosferas de cultura primária na densidade de 100 células/poço...	71
Figura 21 - Quantificação de proteínas transmembranares por citometria de fluxo de modelo bidimensional e de melanosferas formadas por B16F10 ou cultura primária na densidade de 100 células/poço.....	73
Figura 22 - Figura esquemática do desenho experimental da incubação de esferoides de B16F10 (100 células/poço) com os compostos SI-MF08, paclitaxel ou tamoxifeno.....	76
Figura 23 - Quantificação de proteínas transmembranares por citometria de fluxo de melanosferas formadas por B16F10 na densidade de 100 células/poço após incubação com SI-MF08, Paclitaxel ou Tamoxifeno.....	79

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Média do diâmetro mensurado no quarto e no sétimo dia de cultivo de melanosferas de B16F10 formadas na densidade de 100 ou 1000 células/poço.....	41
Tabela 2 - Porcentagem de viabilidade e número de células viáveis por esferoide de B16F10 na densidade de 100 ou 1000 células /poço.....	44
Tabela 3 - Média do diâmetro mensurado no quarto e no sétimo dia de cultivo de melanosferas de B16F10 e cultura primária formadas na densidade de 100 células/poço.....	63
Tabela 4 - Porcentagem de viabilidade e número de células viáveis por esferoide de B16F10 na densidade de 100 ou 1000 células /poço.....	65
Tabela 5 - Definição da IC ₅₀ de paclitaxel, tamoxifeno e SI-MF08 em melanosferas de B16F10 (100 células/poço).....	77

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2D - Bidimensional

3D - Tridimensional

AMPC - Adenosina monofosfato cíclico

CCB - Centro de ciências biológicas

CCS - Centro de ciências da saúde

CD133 - Glicoproteína transmembranar proeminina 1

CD271 (p75) - Receptor de neurotrofina

CD44 - Glicoproteína transmembranar de adesão

C-KIT - Fator de crescimento dos mastócitos

CTT - Célula tronco tumoral

DMEM - Eagle modificado por dulbecco

EDN3 - Endotelina 3

EDNRB - Receptor B da endotelina

GSH - Glutathiona redutase

H&E - Hematoxilina/Eosina

HEPES - Ácido N- [2-Hidroxietil] Piperazina-N'-[2-Etanossulfônico]

IARC - International agency for research on cancer

IBMX - Isobutilmetilxantina

INCA - Instituto nacional do câncer

INF- α – Interferon α

LAMEB - Laboratório multiusuário de estudos em biologia

LCME – Laboratório central de microscopia eletrônica

MDS - Melanoma disseminativo superficial

MEC - Matriz extracelular

MITF - Fator de transcrição da microftalmia

MLA - Melanoma lentiginoso acral

MLM - Melanoma lentigo maligno

MN - Melanoma nodular

ROS - Reactive oxygen species

SFB - Soro fetal bovino

SI-MF08 - Sal de isotiurônio MF08

SNC – Sistema nervoso central

SOX10 - Y de determinação do sexo

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	15
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
2.1	CÂNCER	16
2.2	MELANOMA	17
2.3	Fatores de risco	18
2.4	MELANOGÊNESE	18
2.5	Heterogeneidade tumoral	20
2.6	GLICOPROTEÍNA TRANSMEMBRANAR DE ADESÃO (CD44)	22
2.7	GLICOPROTEÍNA TRANSMEMBRANAR PROEMININA 1 (CD133).....	22
2.8	RECEPTOR DE NEUROTROFINA (CD271)	23
2.9	MODELOS TRIDIMENSIONAIS PARA ESTUDO DO CÂNCER	24
2.10	CULTURA PRIMÁRIA PARA ESTUDO DO CÂNCER.....	25
2.11	MATRIZ EXTRACELULAR E CÂNCER.....	25
2.12	TRATAMENTOS PARA MELANOMA.....	27
2.13	SAIS DE ISOTIURÔNIO.....	29
3	OBJETIVOS.....	31
3.1	OBJETIVO GERAL	31
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	31
4	MATERIAIS E MÉTODOS	32
4.1	REAGENTES	32
4.2	CULTURA CELULAR	32
4.3	FORMAÇÃO DAS MELANOESFERAS.....	33
4.1	VOLUME DAS MELANOESFERAS	33
4.2	VIABILIDADE CELULAR	34
4.3	ENSAIO DA MELANOGÊNESE.....	34
4.4	ANÁLISE HISTOLÓGICA DAS MELANOESFERAS	35

4.5	ANÁLISE DOS MARCADORES DE CÉLULAS TRONCO TUMORAIS POR MICROSCOPIA CONFOCAL.....	35
4.6	ANÁLISE DOS MARCADORES DE CÉLULAS TRONCO TUMORAIS POR CITOMETRIA DE FLUXO	36
4.7	INCUBAÇÃO DE MELANOESFERAS COM SAL DE ISOTIURÔNIO (SI-MF08), PACLITAXEL OU TAMOXIFENO.....	36
4.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA	37
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
5.1	FORMAÇÃO DE MELANOESFERAS DE B16F10	38
5.2	CARACTERIZAÇÃO DE MATRIZ EXTRACELULAR NAS MELANOESFERAS DE B16F10 FORMADAS NA DENSIDADE CELULAR DE 100 E 1000 CÉLULAS/POÇO.....	44
5.3	AVALIAÇÃO DOS MARCADORES RELACIONADOS ÀS CÉLULAS TRONCO TUMORAIS DE MELANOESFERAS DE B16F10 NAS DENSIDADES CELULARES DE 100 E 1000 CÉLULAS/POÇO	49
5.4	FORMAÇÃO DE MELANOESFERAS DE CULTURA PRIMÁRIA DE B16F1060	
5.3	ENSAIO DA MELANOGÊNESE EM MODELO BIDIMENSIONAL.....	66
5.5	CARACTERIZAÇÃO DE MATRIZ EXTRACELULAR NAS MELANOESFERAS DE CULTURA PRIMÁRIA FORMADA NA DENSIDADE CELULAR DE 100 CÉLULAS/POÇO.....	68
5.6	AVALIAÇÃO DOS MARCADORES RELACIONADOS ÀS CÉLULAS TRONCO TUMORAIS DE MELANOESFERAS DE CULTURA PRIMÁRIA NA DENSIDADE CELULAR DE 100 CÉLULAS/POÇO	70
5.7	INCUBAÇÃO DE SI-MF08, PACLITAXEL E TAMOXIFENO EM MELANOESFERAS DE B16F10 NA DENSIDADE DE 100 CÉLULAS/POÇO	75
5.8	CARACTERIZAÇÃO DA PRESENÇA DE CTTS EM MELANOESFERAS APÓS INCUBAÇÃO COM SAL DE ISOTIURÔNIO (SI-MF08), PACLITAXEL E TAMOXIFENO	78
6	CONCLUSÃO	83
7	PERSPECTIVAS	85
	REFERÊNCIAS.....	87

1 INTRODUÇÃO

O câncer foi responsável em 2018 por 9,6 milhões de mortes e os gastos gerados devido a estas doenças chegaram a US\$ 1,16 trilhões de dólares no ano de 2010, sendo a segunda principal causa de morte mundial (STEWART, 2014; WHO, 2019). Entre os diversos tipos de câncer, o melanoma, desenvolvido a partir das células produtoras de melanina, foi responsável, em 2012, por aproximadamente 230.000 casos e 55.000 mortes no mundo (FERLAY et al., 2015). Apesar do melanoma ser responsável por apenas 4% dos cânceres de pele, esta doença possui uma alta taxa de mortalidade, cerca de 75% (ACS, 2019).

Os fatores de risco para o desenvolvimento de melanoma podem ser ambientais, principalmente pela alta exposição solar aos raios UV, fenótipo de pele e olhos claros, histórico de queimaduras de pele durante a vida, principalmente na infância, além de fatores genéticos, incluindo alterações dos genes CDKN2A e CDK4 (LWOOD; OPSON, 1997; READ et al., 2015; INCA, 2017).

O melanoma é uma doença altamente agressiva com opções de tratamento pouco eficazes. O quimioterápico mais utilizado para o tratamento de melanoma é a dacarbazina, agente antineoplásico alquilante de DNA (AL-BADR; ALODHAIB, 2016). No entanto, este fármaco proporciona a cura a apenas 1 a 2% dos pacientes com melanoma metastático (EIGENTLER et al., 2003; GARBE et al., 2012). Uma das hipóteses para a dificuldade de tratamento do melanoma é a presença de células tronco tumorais (SHAPIRO et al., 1981). Estas células indiferenciadas, ou células tronco tumorais (CTTs), facilitam a formação de metástases, geram recidivas da doença, além de induzirem à resistência farmacoterapêutica (MITRA et al., 2015; WANG et al., 2019).

Alguns modelos tridimensionais para o estudo do câncer são capazes de serem enriquecidos com CTTs, o que facilita o conhecimento sobre o comportamento deste subtipo celular, melhorando a obtenção de resultados para o estudo de novas moléculas com potencial atividade antitumoral (FEDER-MENGUS et al., 2008).

Considerando a baixa resposta terapêutica no tratamento de melanoma, novas moléculas com potencial atividade citotóxica vêm sendo estudadas. Entre elas, destacam-se os sais de isotiurônio. Em trabalhos anteriores realizados pelo nosso grupo de pesquisa, o sal de isotiurônio (SI-MF08) apresentou boa seletividade para células tumorais em comparação às células não tumorais, levando células de melanoma murino à morte celular apoptótica com bloqueio em G2/M (CISILOTTO et al., 2015; FERREIRA et al., 2017). O sal de isotiurônio

MF08 também demonstrou baixa toxicidade em modelo *in vivo* de melanoma em camundongos, sendo capaz de aumentar a sobrevivência dos animais (ASSUNÇÃO, 2017).

Nesta oportunidade, o objetivo é caracterizar diferentes modelos tridimensionais de melanoma com a linhagem celular de melanoma murino (B16F10) e de cultivo primário, com células provenientes de tumores induzidos por células B16F10, a fim de quantificar proteínas transmembranares relacionadas à presença de CTTs, matriz extracelular e viabilidade celular. Além de avaliar o efeito sobre volume de melanosferas, bem como sobre a presença das proteínas transmembranares relacionadas a CTTs, resultante da incubação com paclitaxel, tamoxifeno e SI-MF08.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 CÂNCER

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), câncer é um termo genérico de um grupo de doenças caracterizadas pelo crescimento exacerbado de células anormais capazes de invadir os tecidos do corpo, podendo espalhar-se para outros órgãos, além do órgão de origem, o que caracteriza o fenômeno conhecido como metástase ou infiltração no caso de cânceres hematológicos (STEWART, 2014).

Mais de 60% do total de casos de câncer no mundo estão concentrados em países em desenvolvimento localizados na África, Ásia, América Central e do Sul. Nestes locais, esta taxa pode atingir 70%. A alta taxa de mortalidade é relacionada à falta de diagnóstico precoce e ao baixo acesso da população ao tratamento adequado. Além disso, campanhas de vacinação, importantes na prevenção de cânceres associados às infecções, como câncer do colo do útero, são escassas bem como a deficiência na promoção da saúde, o que reforça a importância da manutenção de hábitos saudáveis durante a vida, incluindo evitar o uso do tabaco, evitar o sedentarismo e a obesidade, além de diminuir o consumo de alimentos industrializados (STEWART, 2014).

Nos Estados Unidos da América (EUA), foram estimados para o ano de 2016, aproximadamente 1 milhão e 700 mil novos casos de câncer e 600 mil mortes. As maiores incidências de novos casos foram câncer de próstata em homens (21%) e câncer de mama em mulheres (29%). Entretanto, os cânceres que atingiram o sistema respiratório (pulmão e

brônquios), foram os maiores causadores de morte, para ambos os sexos, no mesmo ano (ALTERI et al., 2016).

No Brasil, foi estimada, para o biênio de 2018 a 2019, a ocorrência de aproximadamente 600 mil novos casos de câncer por ano, sendo os mais frequentes o câncer de próstata em homens (68 mil – 31,7%) e câncer de mama em mulheres (60 mil – 29,5%), exceto câncer de pele não melanoma (INCA, 2017).

2.2 MELANOMA

Descrito primeiramente por René Laennec em 1812, melanoma é um tipo de câncer que se desenvolve a partir das células produtoras de melanina, os melanócitos (LAENNEC, 1812; WHITEMAN et al., 2012).

A doença foi classificada pela primeira vez por Mcgovern e colaboradores (1973), em quatro diferentes formas baseadas em aspectos clínicos e histopatológicos: 1. melanoma disseminativo superficial (MDS) que é iniciado com o crescimento horizontal ou radial, podendo possuir múltiplas cores; 2. melanoma lentigo maligno (MLM), que geralmente localiza-se na face e em locais expostos ao sol e tende a desenvolver-se em pessoas mais velhas; 3. melanoma lentiginoso acral (MLA), que aparece geralmente na palma das mãos e nas plantas dos pés com pigmentação heterogênea e com bordas irregulares; e 4. melanoma nodular (MN), que é usualmente marrom-preto, possui uma fase vertical agressiva e uma fase horizontal amena (MCGOVERN et al., 1973).

O melanoma é responsável por 4% dos cânceres de pele existentes. No entanto, apesar da relativa baixa frequência, é o câncer de pele com maior taxa de mortalidade, de aproximadamente 75% (ACS, 2019). No mundo, foi estimada para o ano de 2012 a incidência de aproximadamente 230.000 novos casos e 55.000 mortes causadas por melanoma. É uma doença com alta capacidade metastática, sendo a causa do aparecimento de aproximadamente 76.000 novos casos e 10.000 mortes, para ambos os sexos, nos EUA, no ano de 2016 (SOURCES, 2008; WHO, 2013; SIEGEL et al., 2014). Já para 2019 foram esperados 96.480 novos casos e 7.230 mortes consequentes de melanoma nos EUA (ACS, 2019).

2.3 FATORES DE RISCO

Segundo dados do Instituto Nacional de Câncer (INCA), os fatores de risco para o câncer de pele melanoma são: exposição aguda e repetida ao sol (raios ultravioletas - UV), principalmente na infância e adolescência; exposição à câmaras de bronzeamento artificial; fenótipo de pele e olhos claros, cabelos ruivos ou loiros, albinismo, assim como histórico familiar ou pessoal de câncer de pele (INCA, 2017; WHO, 2019).

A relação entre exposição ambiental a raios UV, especialmente UV-B, provenientes do sol e o aumento da incidência do melanoma já está bem estabelecida (GILCHREST,., 1999; PENNELLO et al., 2000). Sabe-se também que cinco ou mais episódios de queimaduras graves, durante a infância ou adolescência, são suficientes para dobrar o risco de desenvolver melanoma (LWOOD; OPSON, 1997). Um estudo caso-controle, publicado no ano de 2010, confirmou a relação entre o aumento do risco de melanoma e a exposição frequente às fontes artificiais de bronzeamento que emitem UV-A e UV-B, o que corrobora a afirmação da IARC (*International Agency For Research On Cancer*, 2012) que classifica as fontes artificiais de bronzeamento como agentes carcinogênicos (STEWART, 2014).

Fatores genéticos também estão substancialmente relacionados ao aumento da incidência de melanoma. O primeiro gene descoberto e relacionado ao melanoma foi o gene humano *rat sarcoma vírus* (RAS) (ALBINO et al., 1984). Atualmente, já é conhecida a existência de uma base genética complexa de alterações, incluindo os genes *cyclin-dependent kinase inhibitor 2A* (CDKN2A), *cyclin-dependent kinase 4* (CDK4), *BRCA1-associated protein-1* (BAP1), *protection of telomeres 1* (POT1), *adrenocortical dysplasia protein homolog* (ACD), *telomeric repeat binding factor 2 interacting protein* (TERF2IP) e *Telomerase RT* (TERT) que geram susceptibilidade familiar ao melanoma, além de outros genes ainda não completamente elucidados (READ et al., 2015).

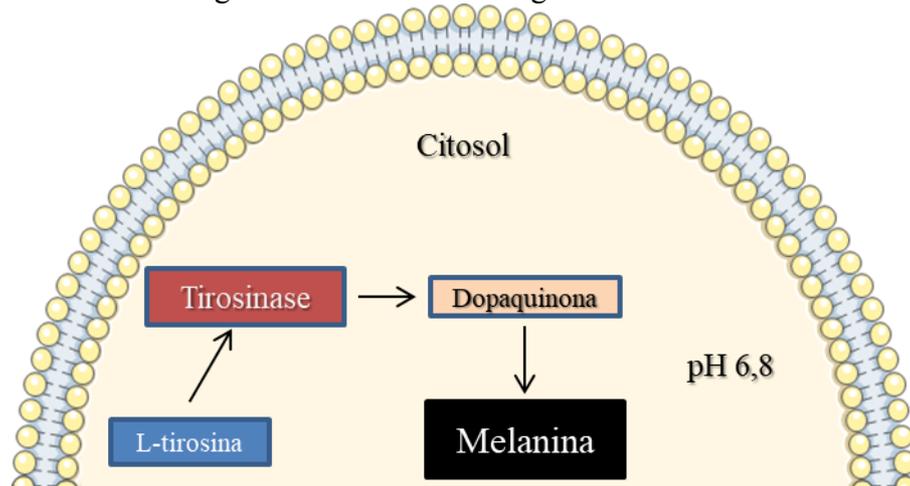
2.4 MELANOGÊNESE

O melanócito é a célula responsável pela pigmentação de cabelo, pele e olhos, podendo estar presente também em partes do corpo não visuais como sistema nervoso central (SNC) e sistema muscular (WHITEMAN et al., 2012). Esta célula é formada a partir de células da crista neural e regulada por uma série de vias de sinalização e fatores de transcrição, tais como: região Y de determinação do sexo (SOX10), fator de transcrição da

microftalmia (MITF), fator de crescimento dos mastócitos (c-KIT), endotelina 3 (EDN3) e receptor B da endotelina (EDNRB) (PRICE et al., 2001). Os melanócitos, células produtoras de melanina, são diferenciados a partir de melanoblastos e sintetizam grânulos melanossômicos constituídos por melanina (melanossomas semelhantes a lipossomas), convertida a partir da tirosina (BOISSY & NORDLUND, 1997).

A formação dos melanossomas possui quatro principais estágios: I - organização da matriz inicial; II - matriz já organizada, mas sem a produção de melanina; III - deposição de melanina (eumelanina ou feomelanina) e IV - melanossomas totalmente melanizados (preenchidos com melanina). Durante a melanogênese (Figura 1), existem fatores regulatórios importantes como MITF, por exemplo. O MITF, atua regulando a tirosinase, principal precursor na produção de melanina (SCHALLREUTER et al., 2007).

Figura 1 - Resumo melanogênese.



A produção de melanina é dependente de pH, sendo o pH 6,8, ótimo para este processo. Esta via consiste em uma cascata de três enzimas em que a L-tirosina é capaz de gerar a dopaquinona através da reação enzimática com a tirosinase. Após algumas etapas, aqui não descritas, e a influência de inúmeros fatores regulatórios, o processo melanogênico é concluído com a formação e armazenamento da melanina (SCHALLREUTER et al., 2007).

É interessante relatar que este processo de deposição de melanina pode estar alterado em doenças como o melanoma, podendo haver deposição de melanina sem a formação prévia dos melanossomas. Tendo em vista que lesões de melanoma tendem a ter hiper melanogênese e que este processo é dependente da enzima tirosinase (foco de alguns estudos que têm por objetivo a descoberta de compostos com possível atividade anti melanomas), a análise da melanogênese pode ser importante (PUPINYO et al., 2019; SLOMINSKI et al., 2019).

2.5 HETEROGENEIDADE TUMORAL

O microambiente tumoral é composto por uma complexidade celular de fibroblastos, células do sistema imune, células endoteliais, além de células tumorais, sob a regulação de fatores de crescimento, hormônios e citocinas. Este microambiente é responsável pelo desenvolvimento tumoral que inclui o processo de diferenciação celular (WU; DAI, 2017).

A diferenciação celular no microambiente tumoral correlaciona-se com o agravamento do câncer. Quando o tumor é composto majoritariamente por células diferenciadas, a doença tende a ter um bom prognóstico. Em contrapartida, tumores ricos em células indiferenciadas, correlacionam-se ao mau prognóstico da doença e possível recidiva do tumor (SHAPIRO et al., 1981). Esta heterogeneidade tumoral, caracterizada pela presença de células diferenciadas ou indiferenciadas, pode ser explicada por dois diferentes modelos (Figura 2).

Um dos modelos é baseado na hipótese estocástica, em que os tumores podem ser desenvolvidos por alterações clonais por meio de carcinógenos, ou seja, todas as células presentes no ambiente tumoral possuem potencial tumorigênico semelhante (NOWELL, 1950).

A segunda teoria é baseada na hipótese do modelo hierárquico, em que apenas uma subpopulação celular é capaz de iniciar o tumor e de autorrenovar-se, esta capacidade é intrínseca de células com características de células tronco tumorais (CTTs), as quais tem a capacidade de diferenciação e/ou autorrenovação, além de gerar metástases, recidiva do tumor e resistência farmacoterapêutica (DICK, 2003; KRESO; DICK, 2014; MITRA et al., 2015; WANG et al., 2019).

Figura 2 - Representação esquemática das principais hipóteses da heterogeneidade tumoral.

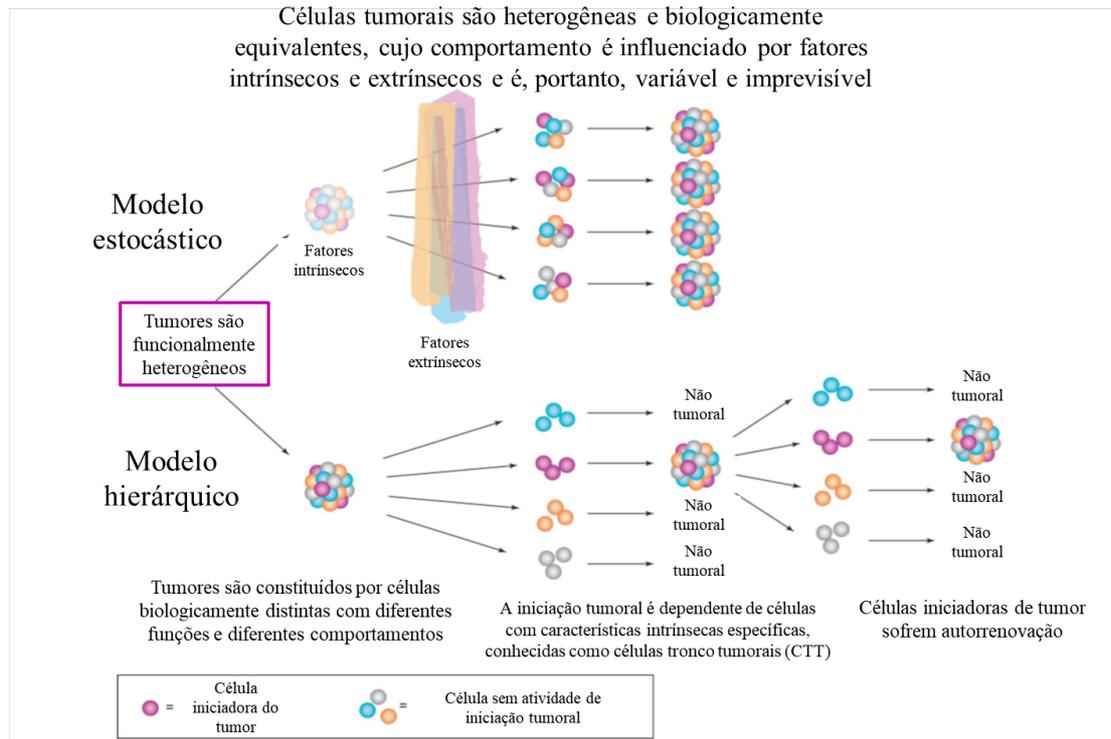


Imagem representativa das duas principais hipóteses relacionadas à heterogeneidade tumoral. No modelo estocástico as células heterogêneas possuem a mesma capacidade de sofrer influência de fatores extrínsecos ou intrínsecos, podendo ou não ser responsáveis pela iniciação tumoral, sendo este um processo aleatório. No modelo hierárquico, o tumor é composto por células também heterogêneas, porém a iniciação tumoral é dependente de células com característica de células tronco tumorais (CTTs), presentes no microambiente, sendo estes subtipos celulares capazes de induzir com maior facilidade a iniciação tumoral e a autorrenovação (Adaptado de DICK, et al., 2008).

Em 2003, pesquisadores identificaram por meio da expressão de marcadores de superfície celular CD44 e CD24, células capazes de iniciar tumores em câncer de mama (AL-HAJJ et al., 2003). Não existem marcadores específicos para CTTs e atualmente a identificação deste subtipo celular requer um painel de marcadores de superfície celular. Para o melanoma uma das combinações indicadas são os marcadores CD44, CD133 e CD271.

2.6 GLICOPROTEÍNA TRANSMEMBRANAR DE ADESÃO (CD44)

O CD44 é uma glicoproteína transmembranar de adesão (ligante de ácido hialurônico), responsável pela interação célula-matriz extracelular. Esta proteína está presente em tumores com alto grau de estadiamento, relaciona-se com metástases e quimiorresistência tumoral conferindo às CTTs melhor sobrevivência, pois proporciona resistência às espécies reativas de oxigênio (ROS) por meio da renovação da glutathione redutase (GSH) (GOLDSTEIN et al., 1989; ISHIMOTO et al., 2011).

Esta glicoproteína também está relacionada à proliferação, motilidade e invasão celular (KIM et al., 2008; SCHUMACHER et al., 2008; WILLENBERG et al., 2012). Estudo recente demonstrou a importância da presença do CD44 para o pior prognóstico de carcinoma avançado de origem gástrica. A presença desta proteína foi capaz de induzir a formação de esferoides, aumentar a diferenciação de CTTs, aumentar a proliferação celular, induzir a transformação epitelial na forma maligna por meio da ativação de fator autócrino (FU et al., 2020).

A relação entre a presença do CD44 e o mau prognóstico do melanoma é controversa enquanto estudos demonstram a relação direta entre CD44 e melanoma metastático e a baixa sobrevida dos pacientes, outros não encontraram esta relação (PATHOL, 1999; ZHU et al., 2018).

2.7 GLICOPROTEÍNA TRANSMEMBRANAR PROEMININA 1 (CD133)

O CD133 (proeminina 1) consiste em uma glicoproteína transmembranar composta por cinco domínios transmembranares (UTTNER, 1997). Singh e colaboradores (2003) identificaram a expressão de CD133 em tumores cerebrais e relacionaram a presença da proteína com a capacidade de iniciação de tumor, autorrenovação e resistência farmacoterapêutica (SINGH et al., 2003).

Já foi relatado que um aumento na expressão de CD133 estava relacionado com o mau prognóstico e à alta progressão de tumores humanos de câncer de ovário (LI et al., 2020). Outro estudo publicado em 2018 confirmou a capacidade de proliferação e de autorrenovação de células de melanoma positivas para CD133 obtidas por meio de biópsia cirúrgica. Após a caracterização e a quantificação de CD133, os autores observaram que células com maior porcentagem desta glicoproteína eram capazes de formar esferas com mais facilidade do que

as células com menos CD133, relacionando a presença deste marcador com a capacidade de iniciação tumoral (SIMBULAN-ROSENTHAL et al., 2019).

2.8 RECEPTOR DE NEUROTROFINA (CD271)

O CD271 é um receptor de neurotrofina, conhecido como p75, também ligado à presença de CTTs com alto potencial metastático e mau prognóstico de pacientes com melanoma (CIVENNI et al., 2011).

A presença deste marcador em alguns microambientes tumorais tem sido relatada em diversos estudos, como por exemplo um estudo de 2014 demonstrou que 71% de tumores de cabeça e pescoço eram CD271 positivos (MURILLO-SAUCA et al., 2014). No câncer de pele do tipo melanoma, a presença do CD271 levou a iniciação tumoral e a regeneração de análogos heterogêneos, isto é, formação de tumores com células heterogêneas, ou seja, com diferentes capacidades proliferativas e de diferenciação. A iniciação tumoral gerada pelo melanoma CD271 positivo foi comprovada quando os pesquisadores induziram tumorigênese em camundongos imunodeficientes ou imunocomprometidos com melanoma CD271 positivo ou negativo. No caso, foi observado que células CD271 positivas eram tumorigênicas para ambos os camundongos, diferentemente das células negativas para esta glicoproteína, que eram tumorigênicas somente para camundongos imunocomprometidos (CIVENNI et al., 2011).

Outro estudo relatou a expressão de p75 em melanoma metastático de cérebro. Este estudo confirmou a maior expressão de CD271 em linhagens celulares de melanoma altamente metastático, quando comparados a melanomas menos metastáticos ou mesmo melanócitos não tumorais (MARCHETTI et al., 2004).

Tendo em vista que as proteínas transmembranares CD44, CD133 e CD271 estão relacionadas à presença de CTTs e ao mau prognóstico do melanoma, escolheu-se trabalhar com estes três marcadores durante este estudo.

2.9 MODELOS TRIDIMENSIONAIS PARA ESTUDO DO CÂNCER

O modelo tridimensional (3D) vem se destacando desde os anos 90, quando pela primeira vez células mamárias inseridas em matriz extracelular foram capazes de formar uma estrutura tridimensional produtora de leite, diferente do modelo bidimensional (2D) da mesma linhagem. Este achado já demonstrava a capacidade funcional do modelo 3D, quando comparado ao modelo 2D (MA et al., 1990).

A cultura celular 2D é utilizada há muito tempo como forma de triagem de moléculas para posterior avaliação pré-clínica. Entretanto, o modelo 2D apresenta limitações e desvantagens quando comparado com o modelo 3D, tendo em vista que o modelo 2D possui condições mecânicas mais rígidas com gradiente de oxigênio e nutrientes em duas dimensões. O modelo 3D apresenta gradiente em três dimensões, o que mimetiza melhor a estrutura física dos tecidos, além da interação célula-célula e interação célula-matriz extracelular (BIRGERSDOTTER et al., 2005; HORVATH et al., 2016).

O modelo 3D também apresenta vantagens como: melhor característica fisiológica com relação à morfologia e sinalização celular já que modelos em monocamada tendem a ter um comportamento diferente do que é constatado *in vivo* (FOLEY, 2017). Com o modelo 3D também é possível fazer testes experimentais relativamente rápidos com produção de imagens microscópicas de qualidade com ou sem fixação, assim como no modelo 2D. Entretanto, diferente do modelo 2D, o modelo 3D pode ser utilizado para estudo de CTTs, já que possibilita o enriquecimento desta subpopulação de células em cultura, aumentando a heterogeneidade tumoral, mimetizando as condições do microambiente tumoral (YAMADA; CUKIERMAN, 2007).

Quando comparado ao modelo *in vivo*, o modelo tridimensional tende a gerar respostas mais fáceis e rápidas, tendo em vista que ensaios *in vivo* são altamente complexos e espécies animais são utilizadas, não necessariamente representando os respectivos efeitos em seres humanos (FOLEY, 2017).

Entretanto, assim como os outros modelos, o modelo 3D também possui desvantagens como variação na capacidade de mimetizar o tecido *in vivo*, ausência de vascularização e transporte molecular, assim como não ativação de vias de sinalização complexas, dificuldade também presente no modelo 2D, tais como a resposta do sistema imune, possível de ser avaliada em modelo *in vivo* (YAMADA; CUKIERMAN, 2007). Neste sentido, o modelo em estudo, apesar de mais complexo que o modelo em monocamada, tende

a responder perguntas simples de sistemas ainda em formação e sem a presença de estruturas complexas completamente formadas (FOLEY, 2017).

Como o principal objetivo do presente trabalho foi obter respostas pontuais, principalmente relacionadas à presença de CTTs no microambiente tumoral, o modelo tridimensional foi escolhido para o trabalho *in vitro* desenvolvido.

2.10 CULTURA PRIMÁRIA PARA ESTUDO DO CÂNCER

Além das já mencionadas limitações do uso extensivo de modelos bidimensionais de cultivo celular para o estudo de doenças como o câncer, outra limitação muito discutida nos meios acadêmicos é o uso de linhagens celulares imortalizadas. Estas linhagens são submetidas a várias passagens a fim de obterem-se crescimentos exponenciais quase infinitos, que podem gerar modificações genéticas e epigenéticas, além de haver a possibilidade de contaminações cruzadas entre as células em estudo (MASTERS; STACEY, 2007; LOVITT et al., 2016).

O uso de cultura primária, derivada de pacientes ou animais, tende a diminuir as limitações existentes com o uso de linhagens celulares imortalizadas e, apesar do uso de cultivo primário não ser muito comum, além de apresentar dificuldades metodológicas como dificuldade no estabelecimento da cultura, crescimento celular limitado, ou mesmo a presença de populações não homogêneas, o respectivo uso parece ser mais preditivo com o que ocorre *in vivo* e na clínica (SANDERCOCK et al., 2015; LOVITT et al., 2016). Por este motivo, optou-se por trabalhar com o cultivo primário de B16F10 a fim de compará-lo, sob alguns aspectos, com o cultivo da linhagem B16F10.

2.11 MATRIZ EXTRACELULAR E CÂNCER

A presença da matriz extracelular (MEC) é importante tanto na homeostasia de estruturas corporais saudáveis, como nas respostas às mais diversas doenças existentes. Os principais componentes da MEC são: colágenos, proteoglicanos e glicoproteínas tais como fibronectina, glicoproteína responsável pelo início, progressão e maturação da MEC, sendo importante no auxílio da montagem do colágeno tipo I e III; laminina, relacionada à parte estrutural da matriz, adesão, diferenciação, migração e resistência a apoptose, além de interagir com colágeno tipo IV, entre outras moléculas; fibrinogênio, glicoproteína crucial

para a hemostasia; elastina, principal responsável pela elasticidade das fibras da matriz; fibulina, glicoproteína auxiliar em processos como crescimento celular e tumoral, assim como na diferenciação e na angiogênese, além de outras moléculas aqui não mencionadas (SABATIER et al., 2009; MUIZNIEKS et al., 2010; HALPER; KJAER, 2014).

Como já relatado, a composição da MEC está alterada em doenças como o câncer. Em estudo publicado em 2011, foram analisadas biópsias de gengivas de pacientes separadas em epitélio normal, hiperqueratose, displasia leve, displasia moderada, displasia grave e carcinoma de células escamosas. No caso, foi observado que havia alterações na MEC como o colágeno, a microvasculatura, reações inflamatórias, além de outros componentes como perlecano e tenascina. Os resultados mostraram que, com o aumento da classificação displásica, houve aumento de reações inflamatórias, diminuição de colágeno tipo I, aumento do número de microvasos, possivelmente pelo processo relacionado à angiogênese, maior presença de tenascina e perlecano. Diante destes resultados, foi concluído que o aumento da classificação displásica, principalmente na fase de displasia moderada, causa alterações na constituição da matriz, comprovando que a composição da MEC é modificada durante a transformação maligna de tumores sólidos (YOKOYAMA et al., 2011).

Em contrapartida, nem todos os trabalhos relataram uma relação inversamente proporcional, quando avaliaram o aumento da progressão tumoral e a presença de colágeno tecidual. Acerbi e colaboradores (2015) concluíram que o aumento da malignidade do câncer de mama era acompanhado por enrijecimento da MEC e aumento da deposição de colágeno tipo I, além de maior infiltração de macrófagos pró-tumorais, relacionando o remodelamento da matriz com o mau prognóstico da doença (ACERBI et al., 2015).

Em outro estudo, foi avaliada a presença de colágeno na dentina de pacientes, o qual foi caracterizado por meio da coloração de Mallory, sendo que as amostras coradas em azul foram consideradas como colágeno saudável ou dentinas livres de cáries, e as amostras coradas em vermelho como colágeno alterado, pela presença da cárie na dentina analisada (LOHMANN et al., 2019).

A literatura vem demonstrando que modelos tridimensionais de cancer são capazes de mimetizar a função da matriz extracelular um estudo, por exemplo, com um modelo 3D de co-cultura (células tumorais, fibroblastos e monócitos) de câncer de pulmão de células não pequenas foi observada a liberação e atuação de componentes da MEC (colágeno tipo I, IV e fibronectina), além de outros componentes relacionados à malignidade da doença (REBELO et al., 2018). Em outro estudo, esferoides de câncer de pâncreas transplantados em meio de

colágeno tipo I foram analisados, em que a interação destes esferoides com a MEC foi revelada e correlacionada com a capacidade de crescimento e invasão do esferoide no meio transplantado (JAFARI; CRAMER, 2019). De fato, a literatura mostra que o modelo 3D tende a proporcionar uma maior interação célula-célula e célula-matriz extracelular, o que mimetiza melhor o que ocorre *in vivo*, se comparado ao modelo 2D (RYU et al., 2019).

2.12 TRATAMENTOS PARA MELANOMA

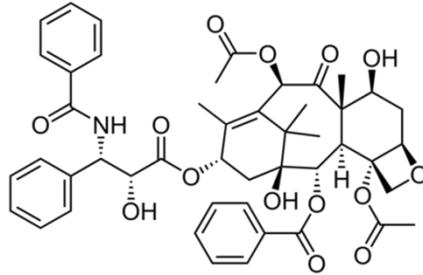
Os tratamentos para melanoma são definidos com base na análise histopatológica e estadiamento da doença (GARBE et al., 2016). A primeira escolha de tratamento para o melanoma é a excisão cirúrgica e, nos estádios iniciais da doença, a cirurgia torna-se curativa em 70 a 90% dos casos (HAUSCHILD et al., 2003). Contudo, em estádios mais avançados 30 a 80% dos pacientes podem ter recidiva mesmo após procedimento cirúrgico, sendo indicado, para estes pacientes, a terapia adjuvante com o uso da imunoterapia com Interferon- α (INF- α) (TSAO et al., 2004).

Existem casos em que a ressecção cirúrgica pode gerar disfunções graves do tecido ou mesmo resultados estéticos irreparáveis e, apesar de o melanoma ser resistente à radioterapia, nestes casos esta terapêutica é indicada. A radioterapia também é utilizada em tratamentos paliativos com o objetivo de melhorar a qualidade de vida dos pacientes (RATE et al., 1988; OLIVIER et al., 2007).

O tratamento da doença metastática, em que o tempo médio de vida do paciente é menos de um ano, é baseado no uso de quimioterápicos (BALCH et al., 2009). Não existe uma terapia padronizada para a doença neste estágio, porém o quimioterápico mais utilizado para o tratamento de melanoma é a dacarbazina e respectivos análogos, entretanto apenas 1 a 2% dos pacientes tendem a ter uma resposta duradoura após tratamento com este agente (EIGENTLER et al., 2003; PFLUGFELDER et al., 2011; GARBE et al., 2016). Neste sentido, novos fármacos ou fármacos clássicos no tratamento de outras doenças, que possam melhorar as taxas de cura do melanoma têm sido testados. A fotemustina, por exemplo, é da classe das nitrosureias, cujo uso demonstrou melhora na sobrevida de pacientes, se comparada à dacarbazina (AVRIL et al., 2004). Em contrapartida, estudo que comparou a combinação de cisplatina, carmustina e tamoxifeno não proporcionou benefícios aos pacientes (ATKINS et al., 2008).

O paclitaxel (Figura 3), outro agente antitumoral utilizado na clínica em tratamento composto com a carboplatina testado como protocolo terapêutico de segunda linha de tratamento proporcionou a estabilização da doença, em curto prazo, e aumento da sobrevida dos pacientes de 18 para 49 semanas (PFLUGFELDER et al., 2011).

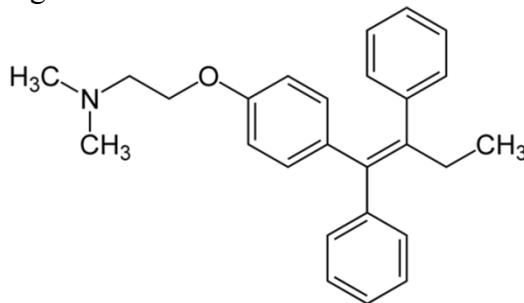
Figura 3 - Estrutura paclitaxel.



(AVENDAN, 2015)

O uso de terapia hormonal também vem sendo estudada. Uma meta-análise publicada em 2010 analisou o uso de um antagonista do estrogênio, o tamoxifeno (Figura 4) sobre aspectos como mortalidade, toxicidade e qualidade de vida dos pacientes com melanoma. Apesar da presença do tamoxifeno na farmacoterapia não ter sido capaz de modificar a sobrevida, além de ter aumentado consideravelmente a toxicidade hematológica, a eficácia foi maior se comparada aos tratamentos sem o tamoxifeno. Entretanto, esta terapia na clínica para melanoma ainda não é recomendada (BEGUERIE; XINGZHONG, 2010).

Figura 4 - Estrutura tamoxifeno.



(AVENDAN, 2015)

2.13 SAIS DE ISOTIURÔNIO

Tendo em vista a dificuldade de tratamento de melanoma, tem-se buscado novas terapias antitumorais com o objetivo de aumentar a sobrevida e a qualidade de vida dos pacientes com tratamentos que tenham menos efeitos adversos e sejam mais eficazes.

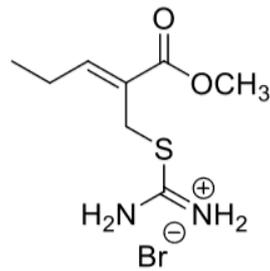
A atividade citotóxica dos sais de isotiurônio vem sendo estudada há algum tempo pelo nosso grupo de pesquisa. Cisilotto e colaboradores (2015) já demonstraram a atividade destes sais em linhagens celulares de melanoma, sendo que dois dos 28 compostos testados foram capazes de impedir a invasão celular e induzir a apoptose (CISILOTTO et al., 2015). Ferreira e colaboradores (2017) foram capazes de demonstrar que o bromidrato de metil (Z)-2-(isotioureidometil)-2-pentenoato (sal de isotiurônio MF08 ou SI-MF08) foi o mais seletivo entre os sais de isotiurônio estudados, causando morte apoptótica por bloqueio de ciclo em G2/M (FERREIRA et al., 2017); e um estudo mais recente analisando a via apoptótica em células de leucemia, mostrou que o SI-MF08 foi capaz de ativar a via extrínseca por meio do receptor de membrana Fas, induzir a ativação de caspase-8 e caspase-3 e dano mitocondrial que foi capaz de promover a morte celular (SARTORI et al., 2019). Ainda, em estudo pré-clínico em modelo de camundongo C57BL/6J/ Unib foi mostrado que o tratamento crônico com SI-MF08 apresentou baixa toxicidade, além de aumentar a sobrevida dos animais (ASSUNÇÃO, 2017).

O estudo deste composto em modelo 3D de melanoma foi iniciado por Marin e colaboradores (2018) que avaliaram a citotoxicidade do SI-MF08 e sua ação sob as proteínas transmembranares CD44 e CD133 relacionadas a CTTs. Neste trabalho, foi relatado que o SI-MF08 não foi capaz de diminuir significativamente a porcentagem das proteínas analisadas. Contudo, este foi um estudo preliminar em que foram utilizadas três diferentes concentrações definidas a partir de estudo de Assunção e colaboradores (2017).

Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi dar continuidade aos estudos da atividade do SI-MF08 sob a população celular CD44, CD133 e também CD271, utilizando a concentração inibitória mínima em modelo 3D e incubação de 72 horas, além da comparação da ação do composto com dois antitumorais clássicos, o paclitaxel e o tamoxifeno.

O SI-MF08 (Figura 5) foi sintetizado pelo Dr. Misael Ferreira, orientado pelo Professor Dr. Marcos Mandolesi Sá do Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Catarina.

Figura 5 - Estrutura do sal de isotiurônio SI-MF08.



(FERREIRA et al., 2017)

Considerando a relevância clínica e dificuldade de tratamento do melanoma, as vantagens já mencionadas com o uso de modelos tridimensionais e cultura primária para estudo do câncer, bem como a importância da presença de CTTs e MEC neste modelo (FEDER-MENGUS et al., 2008; SALEH, 2017; MARIN, 2018), visou-se caracterizar as melanosferas e avaliar a atividade do SI-MF08 nestas condições.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a influência da densidade e origem celular no modelo de cultura tridimensional de enriquecimento da população de células tronco tumorais para a prospecção de compostos antitumorais.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Aprimorar a condição de formação de melanosferas enriquecidas de CTTs variando a densidade celular no cultivo;
- Caracterizar as melanosferas formadas, pela medida do diâmetro e do volume, viabilidade celular, organização interna, presença de MEC e pelo padrão de expressão dos marcadores de CTTs (CD44, CD133 e CD271);
- Comparar o cultivo bidimensional e o modelo tridimensional quanto à presença de CTTs por meio da análise da expressão de CD44, CD133 e CD271;
- Definir a IC_{50} do SI-MF08, paclitaxel e tamoxifeno no modelo estabelecido;
- Avaliar o perfil de expressão dos marcadores de CTTs após incubação com os compostos;
- Caracterizar a capacidade melanogênica da cultura primária e da B16F10 em modelo 2D.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 REAGENTES

O meio de cultura Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), soro fetal bovino (SFB), penicilina, estreptomicina, ácido N- [2-Hidroxi-etil] piperazina-N'-[2-etanosulfônico] (HEPES) e a tripsina foram adquiridos da Gibco® (Grand Island, NY, EUA); o azul de tripano foi adquirido da Sigma® (St. Louis, MO, USA); a agarose foi obtida da Ludwig Biotec Ltda – BR; os anticorpos policlonais primários anti-CD44, anti-CD133 e anti-CD271 foram obtidos da Abcam (Cambridge, UK) e o anticorpo secundário anti-IgG conjugado ao fluorocromo Alexa488 foi obtido da Invitrogen® (Califórnia, EUA); o isobutilmetilxantina (IBMX) foi adquirido da Sigma® (St. Louis, MO, USA); o sal de isotiurônio SI-MF08 foi fornecido pelo professor doutor Dr. Marcus Mandolesi Sá do Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC, Florianópolis, SC, Brasil); o tamoxifeno foi adquirido da Sigma® (St. Louis, MO, USA); o paclitaxel foi doado pelo Imperial Hospital de Caridade (Florianópolis, SC); resina para a montagem de lâminas Entellan® adquirido da Sigma® (St. Louis, MO, USA), os corantes hematoxilina/eosina, Sirius Red e Mallory foram adquiridos da Sigma® (St. Louis, MO, USA).

4.2 CULTURA CELULAR

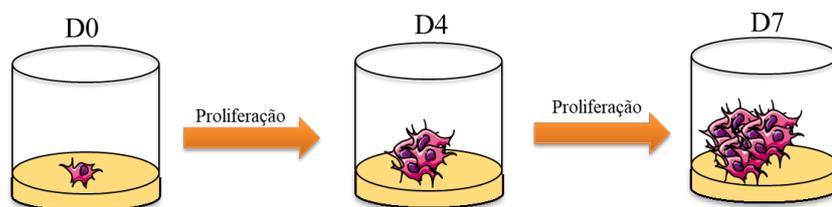
Foram utilizadas as linhagens de melanoma murino B16F10 obtidas do banco de células do Rio de Janeiro (ATCC® CRL-6475™) e da cultura primária (CP) proveniente de tumor induzido com células da linhagem B16F10 em camundongos isogênicos C57BL/6J/Unib e obtidas a partir de tecido tumoral congelado (ASSUNÇÃO, 2017). As células foram cultivadas em meio DMEM suplementado com 10% de SFB, 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina e 10 mM de tampão HEPES e mantidas em garrafas plásticas de poliestireno de cultura, incubadas em estufa a 37 °C e atmosfera com 5% de CO₂. Ao atingirem 80% de confluência, as células foram subcultivadas através da dissociação enzimática utilizando tripsina 0,25% durante seis minutos a 37 °C. Para a realização dos ensaios, as células foram contadas em câmara de Neubauer utilizando o corante Azul de Tripano 0,25% que permite diferenciar células viáveis de não viáveis. O corante é internalizado por células que apresentam a membrana plasmática rompida, corando-as de

azul. Somente as culturas que apresentaram mais de 95% de viabilidade (não coradas) foram utilizadas. O tempo de incubação e o número de células utilizadas foram apropriados para cada experimento.

4.3 FORMAÇÃO DAS MELANOESFERAS

A agarose foi diluída em água ultrapura formando uma solução na concentração de 2% (m/v). Após completa diluição em chapa aquecida (87°C), 30 µL/poço de agarose foram adicionados em placa de 96 poços com a ajuda de micropipetador eletrônico da marca Eppendorf. Em seguida, as placas foram esterilizadas por meio de UV em capela de fluxo laminar por 30 min. Após esterilização, as células (B16F10 e CP) foram plaqueadas na densidade de 100 e 1000 células/poço em meio DMEM suplementado com 10% SFB. As células foram incubadas em estufa à 37 °C e 5% de CO₂ durante sete dias (Figura 6). Além disso, no quarto dia de cultura, acrescentou-se meio de cultura para garantir o aporte nutricional das células. No sétimo dia, as melanoesferas foram coletadas e processadas para experimentos posteriores.

Figura 6 - Representação esquemática da formação de melanoesferas.



D0 = dia zero; D4 = quarto dia de incubação; D7 = sétimo dia de incubação.

4.1 VOLUME DAS MELANOESFERAS

O tamanho das melanoesferas foi analisado por meio da medida de cada esferoide em mm³. No quarto e no sétimo dia de cultivo foram obtidas fotomicrografias de 5 a 10 esferoides representativos em microscópio de luz Nikon Eclipse TS100 (aumento de 40×) por meio do software TC capture 4.3.0.605. Utilizou-se o software ImageJ para análise das fotos, e os diâmetros dos esferoides foram determinados aplicando-se a seguinte equação, em que raio é igual ao diâmetro dividido por dois ($R = \text{diâmetro}/2$) (IVANOV et al., 2014).

$$V (mm^3) = (4/3) \times \pi \times R^3$$

4.2 VIABILIDADE CELULAR

A viabilidade celular foi analisada por meio da técnica de azul de tripano. O corante é internalizado por células que apresentam a membrana plasmática rompida, corando-as de azul. Para isto, o meio de cultura dos esferoides foi retirado, os quais foram lavados em seguida com PBS 1× (pH 7,2). Após a retirada do PBS, realizou-se a dissociação enzimática por meio da adição de tripsina 0,25% durante seis min para a cultura bidimensional ou dez min para as esferas, ambas na temperatura de 37 °C. Após a dissociação, a ação da tripsina foi bloqueada com 10% de SBF e as células foram centrifugadas a 800 × g por 10 min. Descartou-se o sobrenadante e o pellet formado foi ressuscitado com azul de tripano e meio de cultivo na proporção de 1:2. As células foram contadas com o uso de câmara de Neubauer, células coradas em azul foram consideradas inviáveis e células não coradas em azul foram consideradas viáveis, os valores obtidos foram normalizados em porcentagem.

4.3 ENSAIO DA MELANOGÊNESE

O conteúdo total de melanina mista (eumelanina e feomelanina) foi quantificado por espectrofotometria após solubilização alcalina de acordo com o método já descrito na literatura (TSUBOI et al., 1998) com pequenas modificações. As células de linhagem B16F10 e CP foram semeadas em placas de seis poços na densidade de 1×10^6 células/poço. Após aderência celular ao fundo da placa (24 h), as células foram separadas em quadro diferentes condições: I. B16F10 controle (somente meio DMEM); II. B16F10 tratadas com 50 µM de IBMX (indutor de melanogênese); III. CP controle; IV. CP tratada com 50 µM IBMX. No quinto dia após aplicação ou não de IBMX, as células foram tripsinizadas e contadas em câmara de Neubauer para padronização do número de células por microtubo. Já com as células provenientes das respectivas condições de cultivo devidamente separadas, 1 mL da solução de NaOH 1N + 10% de dimetilsulfóxido Sigma® (St. Louis, MO, USA) foi acrescentado nas amostras, seguido de incubação por 30 min à 100°C.

4.4 ANÁLISE HISTOLÓGICA DAS MELANOESFERAS

A análise histológica foi realizada em colaboração com Prof. Dr. Juliano Andreoli Miyake e do técnico Gilberto Domingos Marloch, ambos do Departamento de Ciências Morfológica da UFSC.

Para a produção de lâminas histológicas, 10 melanoesferas foram coletadas no sétimo dia de cultivo, lavadas com PBS 1× e fixadas (4% paraformaldeído por 20 min). Após a fixação, as melanoesferas foram desidratadas em concentrações crescentes de álcool (70° > 80° > 95° > 100°). Após desidratação, os esferoides foram diafanizados em xilol e emblocados em paraplast. Após a solidificação do paraplast as peças foram cortadas em micrótomo com espessura de 5 µm, os cortes foram aplicados em lâminas previamente gelatinizadas.

A coloração das lâminas para a visualização das estruturas dos esferoides foi feita com hematoxilina/eosina (H&E), tricrômico de Mallory (Mallory) e Picrosirius (Sirius Red). As lâminas foram desparafinizadas em banhos com xilol e hidratadas com concentrações decrescentes de álcool (100% > 80% > 70%).

Para H&E, as lâminas foram lavadas, coradas com hematoxilina de Harris (1 min), lavadas novamente, coradas com eosina (30 s). Após a remoção do excesso de corante, o excesso de água das amostras foi retirado com banhos crescentes de álcool e xilol novamente. Para a coloração com Mallory, após desparafinização e hidratação, as lâminas foram lavadas e colocadas em contato com solução A (contém fucsina ácida) por 5 min. Em seguida na solução B (contém azul de anilina, Orange G e ácido fosfotúngstico) por 15 min. Para a coloração com Sirius Red, após desparafinização, as lâminas foram lavadas, colocadas em contato com o corante Sirius Red (1 h), lavadas, coradas com hematoxilina (3 min) e lavadas novamente. Após este procedimento, as lâminas foram preparadas com solução de montagem Entellan®.

4.5 ANÁLISE DOS MARCADORES DE CÉLULAS TRONCO TUMORAIS POR MICROSCOPIA CONFOCAL

A técnica aplicada para avaliar a presença de marcadores de superfície por fluorescência foi adaptada de metodologia padrão de imunohistoquímica (ARAUJO, 1981). As lâminas histológicas obtidas como descrito acima foram desparafinizadas em banhos com xilol e hidratadas com concentrações decrescentes de álcool (100% > 90% > 70%). Após a

hidratação, os sítios inespecíficos foram inibidos com leite (30 min) e as lâminas foram incubadas *overnight* a 4 °C em câmara úmida com anticorpos policlonais primários anti-CD44 (1:100), anti-CD133 (1:100) e anti-CD271 (1:200). Posteriormente, as lâminas foram lavadas e incubadas com anti-IgG conjugado ao fluorocromo Alexa-488 (1:400) no escuro também em câmara úmida, durante uma hora. O controle negativo foi composto por lâminas marcadas apenas com anti-IgG conjugado ao fluorocromo. A montagem das lâminas foi feita com glicerina tamponada e analisadas em microscópio confocal Leica DMI6000 B e as imagens obtidas foram analisadas no software LAS AF Lite.

4.6 ANÁLISE DOS MARCADORES DE CÉLULAS TRONCO TUMORAIS POR CITOMETRIA DE FLUXO

A expressão dos marcadores de células tronco tumorais CD44, CD133 e CD271 foi avaliada tanto em modelo 3D, quanto em células em cultura 2D. Após sete dias de cultivo 3D ou 24h de plaqueamento de células em cultura 2D, as células foram dissociadas com tripsina 0,25% e centrifugadas durante 10 min a 1500 × g. Para cada condição, foram recolhidas aproximadamente 30 melanoesferas. Após centrifugação, o sobrenadante foi descartado, o sedimento foi fixado com paraformaldeído 2% (20 min a 25 °C) e incubado com PBS contendo 5% de SFB durante 30 min para inativação dos sítios inespecíficos. Posteriormente, as células foram lavadas e incubadas com anti-IgG conjugado ao fluorocromo Alexa-488 (1:400) no escuro, durante uma hora. O controle negativo foi composto por células marcadas apenas com anti-IgG conjugado ao fluorocromo. Foram analisados 10.000 eventos por amostra. A aquisição foi feita em Citômetro de fluxo FACS Canto II (BD Biosciences) disponível no Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia (LAMEB). Os dados foram analisados pelo software Flowing 2.5.

4.7 INCUBAÇÃO DE MELANOESFERAS COM SAL DE ISOTIURÔNIO (SI-MF08), PACLITAXEL OU TAMOXIFENO

No cultivo tridimensional, as melanoesferas foram incubadas com paclitaxel (de 0,05 à 100 µM), tamoxifeno (de 0,1 à 35 µM) e SI-MF08 (de 0,25 à 75 µM) e, após 72 h de incubação, a viabilidade celular foi analisada por meio da técnica de azul de tripano e a IC₅₀

foi determinada por meio da análise do volume e da viabilidade dos esferoides para cada condição.

4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão. Para a análise estatística foi utilizado o programa Graphpad Prism® utilizando o teste t-Student pareado, o teste t-Student não pareado ou a análise de variância ANOVA de uma via seguida de pós-teste Tukey. Resultados com $p \leq 0,05$ foram considerados significativos.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O melanoma é um câncer de pele agressivo e com alta taxa de mortalidade, possui fatores de risco tanto genéticos quanto ambientais, além de ser de difícil tratamento. Atualmente, o medicamento mais utilizado para melanoma é a dacarbazina, à qual leva a cura a apenas 1 – 2% dos pacientes (EIGENTLER et al., 2003; PFLUGFELDER et al., 2011; INCA, 2017; ACS, 2019). Uma das razões para a dificuldade de tratamento em cânceres como o melanoma é a heterogeneidade intra-tumoral que pode ser explicada tanto pela hipótese estocástica (em que todas as células tumorais possuem potencial para iniciar o tumor), quanto pela hipótese mais aceita e conhecida como modelo hierárquico (em que a capacidade de iniciação tumoral parte das células tronco tumorais - CTT) (NOWELL, 1950; SHAPIRO et al., 1981; DICK, 2003; KRESO; DICK, 2014; MITRA et al., 2015; WANG et al., 2019).

Neste estudo, foram caracterizados modelos tridimensionais com o objetivo de estudar a presença das CTTs, tendo em vista que estes modelos são hoje utilizados para enriquecimento deste subtipo celular *in vitro* (MIN et al., 2015). É importante relatar que a formação do esferoide por meio da expansão clonal (em que uma única célula é capaz de gerar um esferoide com alta porcentagem de CTTs) tem como característica no plaqueamento inicial da formação destas esferas, uma densidade abaixo de 20 células/ μL (REYNOLDS; WEISS, 1992; SINGEC et al., 2006; MARIN, 2018).

Neste sentido, foram escolhidas as densidades celulares de 100 células/poço (0,5 células/ μL) e 1000 células/poço (5 células/ μL), ambas em condições de incubação para expansão do tipo clonal a fim de avaliar se a alteração da densidade celular modificaria aspectos como formação de esferas assim como morfologia, viabilidade celular, presença de MEC e de CTTs (SINGEC et al., 2006; MARIN, 2018).

5.1 FORMAÇÃO DE MELANOESFERAS DE B16F10

Tendo em vista as peculiaridades do modelo 3D de cultivo celular para o estudo de doenças como o câncer, em nosso primeiro experimento foi avaliada a capacidade de formação de melanoesferas de B16F10 tanto na densidade de 100 quanto na densidade de 1000 células/poço e foram calculados os diâmetros (μm), os volumes (mm^3), bem como as

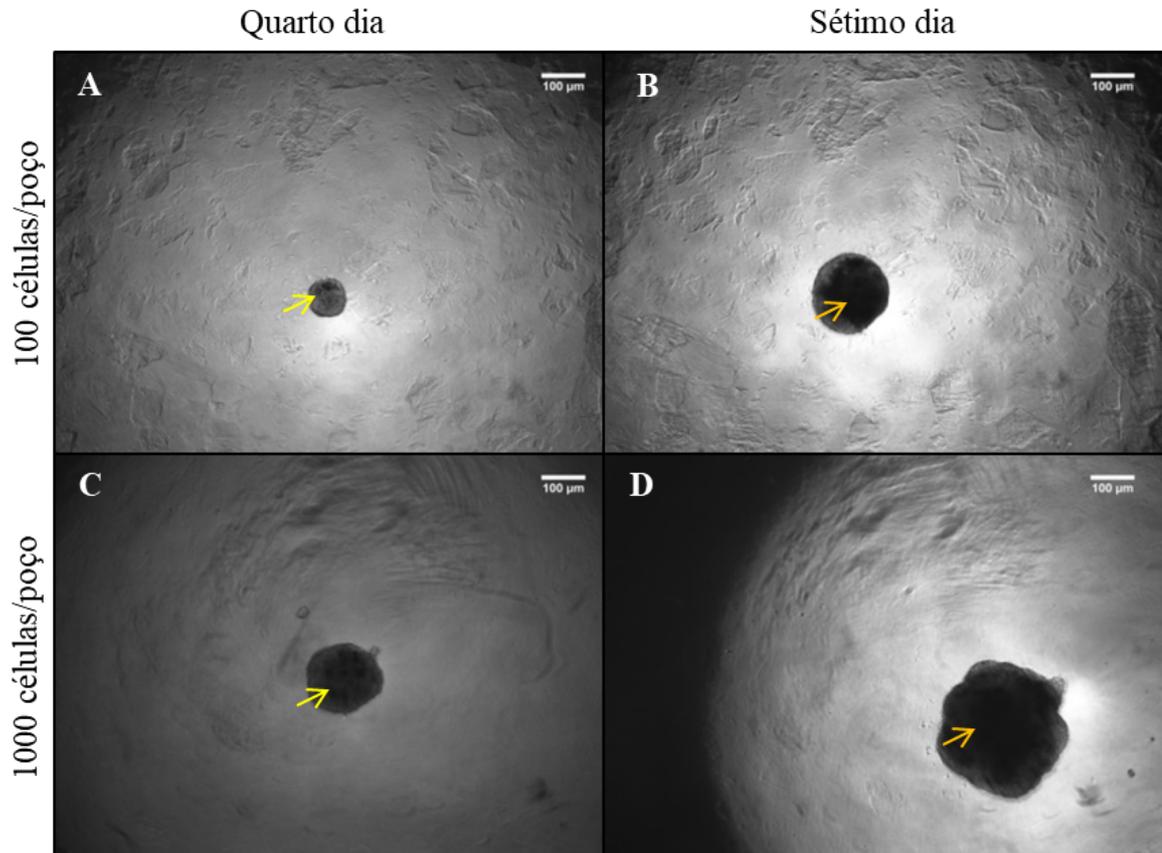
viabilidades de cada uma das condições avaliadas (YAMADA; CUKIERMAN, 2007; IVANOV et al., 2014).

As metodologias utilizadas para a formação de esferoides têm como principal característica impedir a adesão celular na superfície do suporte de incubação (placa ou garrafa de cultura celular), nestas condições não aderentes, células sem características de CTTs tendem a não sobreviver (MIN et al., 2015). O modelo aqui utilizado para a formação das melanoesferas foi padronizado em nosso laboratório, em que foi demonstrada a possibilidade de induzir a formação de esferas em placas de 96 poços recobertas com gel de agarose à 2% sem a necessidade de adicionar fatores de crescimento ou retirar do meio de cultivo SFB, como usualmente estes modelos 3D para estudo de CTT são realizados (FEDER-MENGUS et al., 2008; MARIN, 2018).

Na Figura 7, é possível observar imagens representativas de melanoesferas de B16F10 formadas na densidade de 100 e de 1000 células/poço tanto no quarto quanto no sétimo dia de incubação, demonstrando que, independente das condições e nas densidades escolhidas, foi possível a formação das melanoesferas.

Nas imagens da Figura 7 podemos observar que as esferas de B16F10, nas densidades de 100 e 1000 células /poço, nos dois diferentes dias de cultivo, possuem morfologia diferente entre si. As esferas de menor densidade celular são mais esféricas que as esferas de maior densidade celular. Importante mencionar que variabilidades morfológicas na formação de esferoides são comuns e que o aumento na densidade celular inicial da formação da melanoesfera (Figura 7 C e 7 D) pode ser a razão da diferença. Também é possível visualizar uma diferença na coloração das melanoesferas, tanto no quarto quanto no sétimo dia de cultivo. No quarto dia, as esferas, tanto de 100 quanto de 1000 células/poço, estão com núcleo menos pigmentado e com pequenos grânulos escuros (seta amarela), sendo possivelmente o início da formação de áreas de necrose. Já no sétimo dia de cultivo, as melanoesferas de ambas as condições apresentam núcleos bem mais pigmentado (seta laranja), possivelmente característica de núcleo necrótico já formado (ZANONI et al., 2016; RYU et al., 2019).

Figura 7 - Melanoesferas de B16F10 formadas nas densidades iniciais de plaqueamento de 100 e 1000 células/poço em diferentes dias de cultivo.



Imagens representativas de esferoides de B16F10 na densidade inicial de plaqueamento de 100 e 1000 células/poço obtidas por microscopia ótica em microscópio de luz Nikon Eclipse TS100 por meio do software TC capture 4.3.0.605. A-B) Imagens representativas de esferoides obtidos no quarto e sétimo dia de cultivo na densidade de 100 células/poço. C-D) Imagens representativas de esferoides obtidos no quarto e sétimo dia de cultivo na densidade de 1000 células/poço. Seta amarela: núcleo pigmentado e com pequenos grânulos escuros em melanoesferas de diferentes densidades celulares no quarto dia de cultivo. Seta laranja: núcleo pigmentado e com pequenos grânulos escuros em melanoesferas de diferentes densidades celulares no sétimo dia de cultivo. Barra de escala: 100 µm, magnificação: 4 ×.

A partir das imagens obtidas por microscopia de luz Nikon Eclipse TS100 por meio do software TC capture (Figura 7) foi possível mensurar o diâmetro em µm de cada condição de melanoesfera formada (Tabela 1). O diâmetro é medido por meio da área calculável de uma extremidade à outra do esferoide.

Como podemos observar na Tabela 1, a média dos diâmetros mensurados entre as melanoesferas de B16F10 na densidade de 1000 células/poço foram de 183 ± 27 µm no quarto dia e 330 ± 32 µm no sétimo dia. Já para as melanoesferas de menor densidade celular (100 células/poço) os diâmetros foram de 90 ± 7 µm (quarto dia) e 185 ± 7 µm (sétimo dia).

Já era perceptível na Figura 7 que as melanoesferas formadas inicialmente com maior densidade celular seriam maiores, tanto no quarto quanto no sétimo dia de cultivo. Foi possível observar que com o plaqueamento inicial na densidade celular aumentado em 10

vezes (de 100 para 1000 células/poço) os diâmetros das melanoesferas de maior densidade foram praticamente o dobro dos diâmetros das melanoesferas de menor densidade.

Tabela 1 - Média do diâmetro mensurado no quarto e no sétimo dia de cultivo de melanoesferas de B16F10 formadas na densidade de 100 ou 1000 células/poço.

	B16F10 100 céls/poço	B16F10 1000 céls/poço
Média ± DP diâmetro (µm) quarto dia	90 ± 7	183 ± 27
Média ± DP diâmetro (µm) sétimo dia	185 ± 7	330 ± 32

Tabela representativas da média ± DP do diâmetro (µm) mensurado por meio do software ImageJ através da área calculável do comprimento entre as duas extremidades dos esferoides de B16F10 formados na densidade inicial de plaqueamento de 100 e 1000 células/poço.

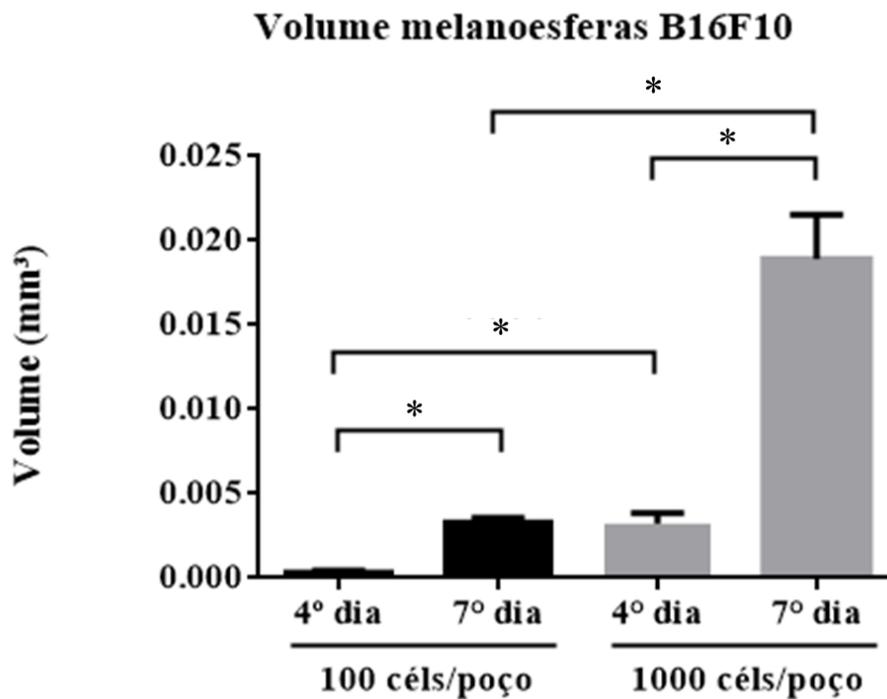
A partir das imagens obtidas (Figura 7) e dos diâmetros mensurados (Tabela 1), foi possível calcular o volume (mm³) das melanoesferas formadas (Figura 8) (IVANOV et al., 2014). Os trabalhos a cerca de modelos 3D e o respectivo uso na pesquisa podem ser avaliados tanto por área, quanto por volume. Por isto, apresentar os resultados em duas diferentes medidas permite a melhor comparação entre os dados deste trabalho com os trabalhos presentes na literatura.

A média dos volumes de melanoesferas de B16F10 (100 células/poço) no quarto dia foi de 0,0004 mm³ e no sétimo dia foi de 0,003 mm³, o que equivale a um aumento de 7,5 vezes no volume das melanoesferas do quarto para o sétimo dia. Já a média dos volumes de B16F10 (1000 células/poço) foi de 0,003 mm³ (quarto dia) e de 0,01 mm³ (sétimo dia), um aumento de aproximadamente 3,5 vezes. Quando comparadas as duas condições, no quarto dia, a esfera de maior densidade celular foi 7,5 vezes maior que a melanoesfera de menor densidade. Em contrapartida, quando as duas diferentes condições foram comparadas no sétimo dia de cultivo houve um aumento de 3,5 vezes na esfera de maior densidade. Estes dados corroboram o que é visto na Figura 7, em que a melanoesfera de menor densidade celular no menor tempo de cultivo apresentou também menor volume (Figura 7 A). Quando observamos as melanoesferas do sétimo dia (B16F10 – 100 células/poço) e do quarto dia

(B16F10 – 1000 células/poço) é perceptível que as diferentes condições formaram melanosferas de tamanho semelhante (Figura 7 B e Figura 7 C). Já quando comparadas as duas condições no sétimo dia de cultivo, é visual que a melanosfera de maior densidade apresenta maior volume (Figura 7 D).

A Figura 8 só comprova o que foi visualizado na Figura 7, em que melanosferas de mesma densidade são maiores no sétimo dia de cultivo se comparado ao quarto dia e que melanosferas de maior densidade são maiores que as de menor densidade independente do dia de cultivo avaliado.

Figura 8 - Volume do quarto e sétimo dia de cultivo dos esferoides de B16F10 plaqueados inicialmente nas densidades de 100 e 1000 células/poço.



Representação gráfica do volume calculado por meio do diâmetro do esferoide, obtido através do software ImageJ, das melanosferas de B16F10 formadas na densidade inicial de plaqueamento de 100 e 1000 células/poço, nos diferentes dias de cultivo. Teste estatístico t-student pareado e teste estatístico t-student não pareado. * ($p \leq 0,0001$). N = 3.

Apesar de a maior parte dos trabalhos acerta do uso de modelos 3D para estudo de CTTs expor a necessidade do uso de fatores de crescimento, além da ausência de SFB para o desenvolvimento destes modelos, em nosso estudo os esferoides foram formados em condições normais de cultivo celular (com soro fetal bovino e sem a necessidade de acrescentar ao meio fatores de crescimento) diminuindo com isto os custos e facilitando o desenvolvimento do modelo estudado (FEDER-MENGUS et al., 2008; MARIN, 2018). A

metodologia aqui desenvolvida teve por objetivo estimular a expansão clonal induzida por meio do plaqueamento de baixa densidade celular em condições não aderentes. Neste trabalho, avaliamos melanoesferas formadas na densidade de 100 (0,5 células/ μL) e de 1000 células por poço (5 células/ μL) e ambas as densidades obtiveram aumento significativo do volume. Nossos resultados corroboram Marin et al (2018) que ao desenvolverem melanoesferas de B16F10 na densidade de 100 células por poço, demonstraram aumento significativos no tamanho das melanoesferas do quarto para o sétimo dia (SINGEC et al., 2006; MARIN, 2018).

O trabalho de Saleh e colaboradores (2017), ao desenvolverem melanoesferas sem o objetivo de enriquecimento de CTTs, diferente do presente estudo, formaram esferoides de B16F10 na densidade de 12.000 células por poço (60 células/ μL) sem que houvesse aumento significativo no tamanho das melanoesferas do quarto para o sétimo dia de cultivo. Este resultado pode ser resposta da densidade celular no plaqueamento inicial do esferoide, que por se tratar de uma densidade não característica de expansão clonal (<20 células/ μL) levou à formação das melanoesferas por agregação celular o que pode não ter permitido o aumento significativo de tamanho do esferoide do quarto para o sétimo dia (SINGEC et al., 2006; MIN et al., 2015; SALEH, 2017; MARIN, 2018).

Com a finalidade de avaliar a viabilidade celular das melanoesferas formadas, no sétimo dia de cultivo as esferas foram coletadas e analisadas por meio da técnica de azul de tripam e contadas em câmara de Neubauer. As melanoesferas, nas duas densidades celulares analisadas, apresentaram uma média de mais de 90% de viabilidade celular, com 92 ± 4 para a densidade de 100 células/poço e 95 ± 4 para a densidade celular de 1000 células/poço. Com relação ao número de células viáveis por esferoide, a melanoesfera de menor densidade teve uma média de 323 ± 120 células/esfera, já a melanoesfera de 1000 células/poço teve uma média de 3729 ± 900 células/esfera, o que dá um aumento de mais de 10 vezes no número de células por melanoesfera.

Tabela 2 - Porcentagem de viabilidade e número de células viáveis por esferoide de B16F10 na densidade de 100 ou 1000 células /poço.

Sétimo dia	B16F10 (100 céls/poço)	B16F10 (1000 céls/poço)
Média ± DP da viabilidade (%)	92 ± 4	95 ± 4
Média ± DP do número de células viáveis por esferoide	323 ± 120	3.729 ± 900

Tabela representativa da média ± DP da porcentagem (%) da viabilidade e da média do número de células viáveis por esferoide obtidas por meio da viabilidade celular pela técnica de azul de tripam e contagem em câmara de Neubauer de B16F10 formados na densidade inicial de plaqueamento de 100 e 1000 células/poço.

5.2 Caracterização de matriz extracelular nas melanoesferas de B16F10 formadas na densidade celular de 100 e 1000 células/poço

Considerando a importância na diferenciação da composição da matriz extracelular em doenças como o câncer e tendo em vista que a literatura mostra que modelos 3D exibem maior interação célula-célula e célula-matriz extracelular, a presença da MEC foi avaliada neste estudo (YOKOYAMA et al., 2011; ACERBI et al., 2015; RYU et al., 2019).

Este estudo caracterizou a presença da matriz extracelular nos modelos tridimensionais desenvolvidos por meio das colorações de Mallory e Sirius Red. A coloração H&E foi utilizada para identificar núcleo e citoplasma, comprovando a presença celular nos modelos 3D em estudo. (MIENALTOWSKI; BIRK, 2014; SHARMA et al., 2015; RITTIÉ, 2017; LIPAR et al., 2018; LOHMANN et al., 2019).

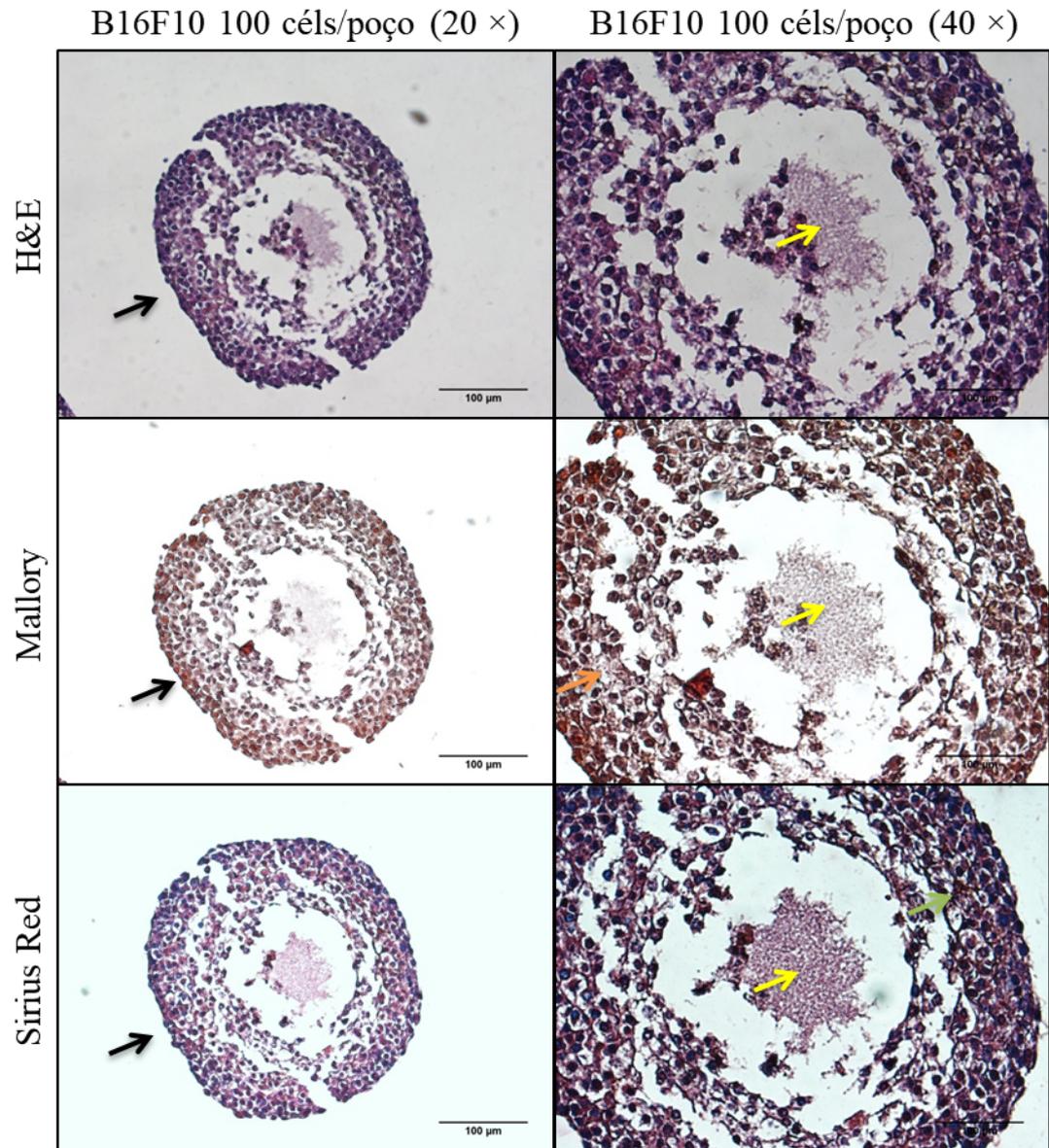
Diferente da coloração por Mallory, o qual cora o colágeno em azul, a coloração por Sirius Red é uma técnica histoquímica baseada na birrefringência do colágeno. O picrosirius (ou Sirius Red) liga-se aos colágenos I, II e III, corando-os em vermelho vibrante. (MIENALTOWSKI; BIRK, 2014; SHARMA et al., 2015; RITTIÉ, 2017).

A Figura 9 é composta por cortes histológicos de melanoesferas de B16F10 (100 cél/poço), corados com H&E (Figura 9 A e Figura 9 B), Mallory (Figura 9 C e 9 D) e Sirius Red (Figura 9 E e Figura 9 F), nas ampliações de 20 × e 40 ×. A partir das imagens representativas, foi possível observar que os núcleos e os citoplasmas foram corados pela H&E. Na mesma figura observou-se também a presença de matriz extracelular por meio da coloração arenosa azulada de Mallory (seta laranja). O Sirius Red foi contra corado com

Hematoxilina e foi observada em algumas imagens a presença de uma coloração avermelhada também identificando a presença de matriz extracelular (seta verde). Entretanto, como a quantidade de matriz extracelular é pequena, não foi possível fazer uso de microscopia com luz polarizada, para identificar e diferenciar tipos de colágenos (I e III) nas amostras coradas com Sirius Red.

Podemos observar na coleção de imagens da Figura 9 que as células (B16F10 - 100 células/poço) formam melanoesferas, com uma maior concentração de células localizadas na periferia ou borda das melanoesferas (seta preta). Possivelmente, essas células encontram-se unidas entre si para manterem-se na periferia da melanoesfera e entre elas há pouca quantidade de matriz extracelular. No interior da melanoesfera, podemos observar ausência de células, porém uma granulação, possivelmente devido à aglutinação de algum material amorfo por causa do processo de fixação do material (seta amarela). O material aglutinado possivelmente trata-se de elementos de matriz extracelular, como glicosaminoglicanas e proteoglicanas. Essa organização de células na periferia da melanoesfera pode ser consequência da maior concentração de nutrientes e de oxigênio, quando comparado com a região central. Apesar de os esferoides aqui formados possuírem diâmetros menores que 500 μm (Tabela 1), diâmetros mínimos necessários para a formação de necrose, de fato, as áreas centrais acelulares mostram uma região central necrótica, possivelmente devido a baixa infusão de nutrientes e oxigênio, que também ocorre em tumores sólidos não vascularizados em formação (BIRGERSDOTTER et al., 2005; FEDER-MENGUS et al., 2008; HORVATH et al., 2016; RYU et al., 2019).

Figura 9 - Coloração de H&E, Mallory ou Sirius Red de cortes histológicos de melanoesferas de B16F10 na densidade de 100 células/poço.



Imagens representativas obtidas por microscopia de campo claro de cortes histológicos de melanoesferas de B16F10 formadas na densidade de 100 células/poço. Coloração de hematoxilina/eosina (Figura 12 A e Figura 12 B), Mallory (Figura 12 C e Figura 12 D) e Sirius Red (Figura 12 E e Figura 12 F). Células localizadas na periferia ou borda da estrutura (seta preta); granulação, possivelmente devido à aglutinação de algum material amorfo por causa do processo de fixação do material (seta amarela); matriz extracelular por meio da coloração arenosa azulada de Mallory (seta laranja) e presença de uma coloração avermelhada identificando a presença de matriz extracelular (seta verde). Magnificação: 20 × e 40 ×. Barra de escala: 100 µm.

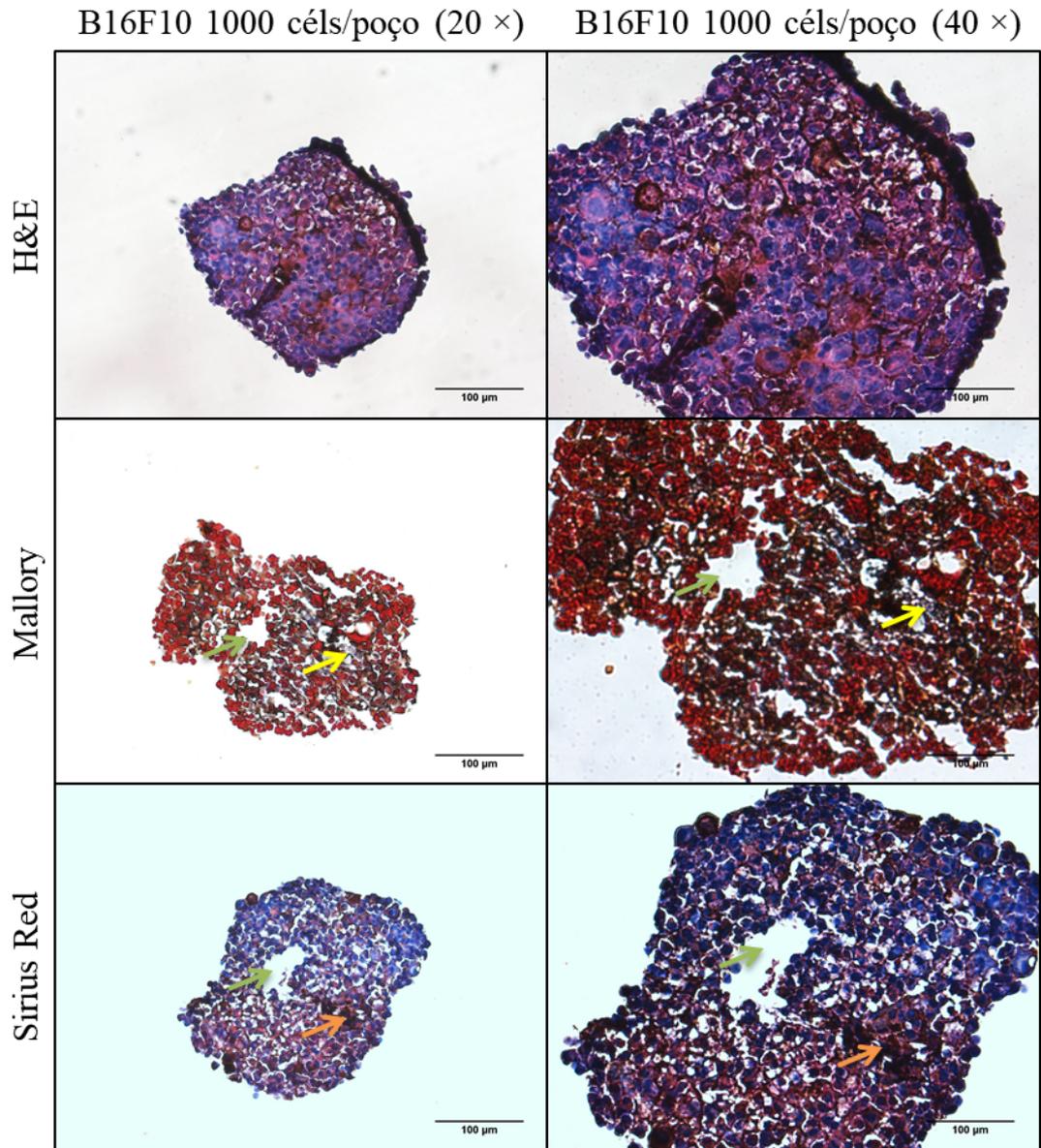
A Figura 10 (B16F10 de 1000 células/poço) também é composta por uma coleção de imagens formadas por cortes histológicos de 5 μm , corados com H&E (Figura 10 A e Figura 10 B), Mallory (Figura 10 C e Figura 10 D) e Sirius Red (Figura 10 E e Figura 10 F), nas magnificações de $20\times$ e $40\times$.

A partir das imagens representativas, núcleos e citoplasmas das melanoesferas formadas nesta densidade também foram coradas por H&E, assim como na condição B16F10 (100 células/poço), também foi possível observar uma pequena quantidade de matriz extracelular por meio da coloração azulada de Mallory (seta amarela). O Sirius Red foi contra corado com Hematoxilina, sendo observada em algumas imagens a presença de uma coloração avermelhada (seta laranja), sem a possível diferenciação de colágeno.

Diferente do que foi observado na Figura 9 (B16F10 na densidade de 100 células/poço), as melanoesferas de B16F10 na densidade de 1000 células/poço representadas na Figura 10 são amorfas (sem formato bem definido), ou seja, não possuem formação esférica e parecem ser mais densas. Visualmente, estas esferas possuem maior quantidade celular possivelmente devido ao maior número de células no plaqueamento inicial (dia zero) para a formação do esferoide. Estas imagens corroboram o que foi encontrado na contagem destas células (Tabela 2), que mostra que melanoesferas de B16F10 na densidade de 1000 células/poço possuem em média 3.729 ± 900 células por esferoide, diferente da esfera de menor densidade que tem em média 323 ± 120 células por melanoesfera.

Devido a maior densidade de células, essas melanoesferas parecem apresentar menor quantidade de matriz extracelular, quando comparadas com as melanoesferas formadas com 100 células. Porém, é possível observar uma coloração azulada e avermelhada ao redor das células nas colorações de Mallory e Sirius Red (respectivamente) mostrando a presença de MEC. Por meio da Figura 10, também é possível observar área central acelular (seta verde), mesmo que aparentemente de menor tamanho se comparado à Figura 9 (seta amarela) (FEDER-MENGUS et al., 2008; RYU et al., 2019).

Figura 10 - Coloração de hematoxilina/eosina, Mallory ou Sirius Red de cortes histológicos de melanosferas de B16F10 na densidade de 1000 células/poço.



Imagens representativas obtidas por microscopia de campo claro de cortes histológicos de melanosferas de B16F10 formadas na densidade de 1000 células/poço. Coloração de H&E (figura 13 A), Mallory (figura 13 B) e Sirius Red (figura 13 C). Matriz extracelular por meio da coloração azulada de Mallory (seta amarela); coloração avermelhada de Sírius Red característica de MEC (seta laranja); área central (seta verde). Magnificação: 20 × e 40 ×. Barra de escala: 100 µm.

Tendo em vista que as melanoesferas avaliadas por meio de técnicas histológicas (Figura 9 e Figura 10) apresentaram uma região acelular que parece ser uma área de necrose possivelmente decorrente da baixa concentração de oxigênio e nutrientes no centro da melanoesfera, e conhecendo a relação existente entre presença de CTTs (subtipo celular resistente à ambiente de hipóxia) em modelos 3D de melanoma e os marcadores CD44, CD133 e CD271, o primeiro experimento de caracterização de CTTs foi por meio da avaliação da distribuição interna de CD44, CD133 e CD271 através de imunohistoquímica (FEDER-MENGUS et al., 2008; RYU et al., 2019).

5.3 AVALIAÇÃO DOS MARCADORES RELACIONADOS ÀS CÉLULAS TRONCO TUMORAIS DE MELANOESFERAS DE B16F10 NAS DENSIDADES CELULARES DE 100 E 1000 CÉLULAS/POÇO

As proteínas transmembranares CD44, CD133 e CD271 foram escolhidas para este estudo, pois além de serem marcadores relacionados com as características de CTTs como metástase, quimiorresistência, iniciação tumoral, autorrenovação e o mau prognóstico da doença, também são encontrados no melanoma (GOLDSTEIN et al., 1989; SINGH et al., 2003; CIVENNI et al., 2011; ISHIMOTO et al., 2011; MURILLO-SAUCA et al., 2014; SIMBULAN-ROSENTHAL et al., 2019).

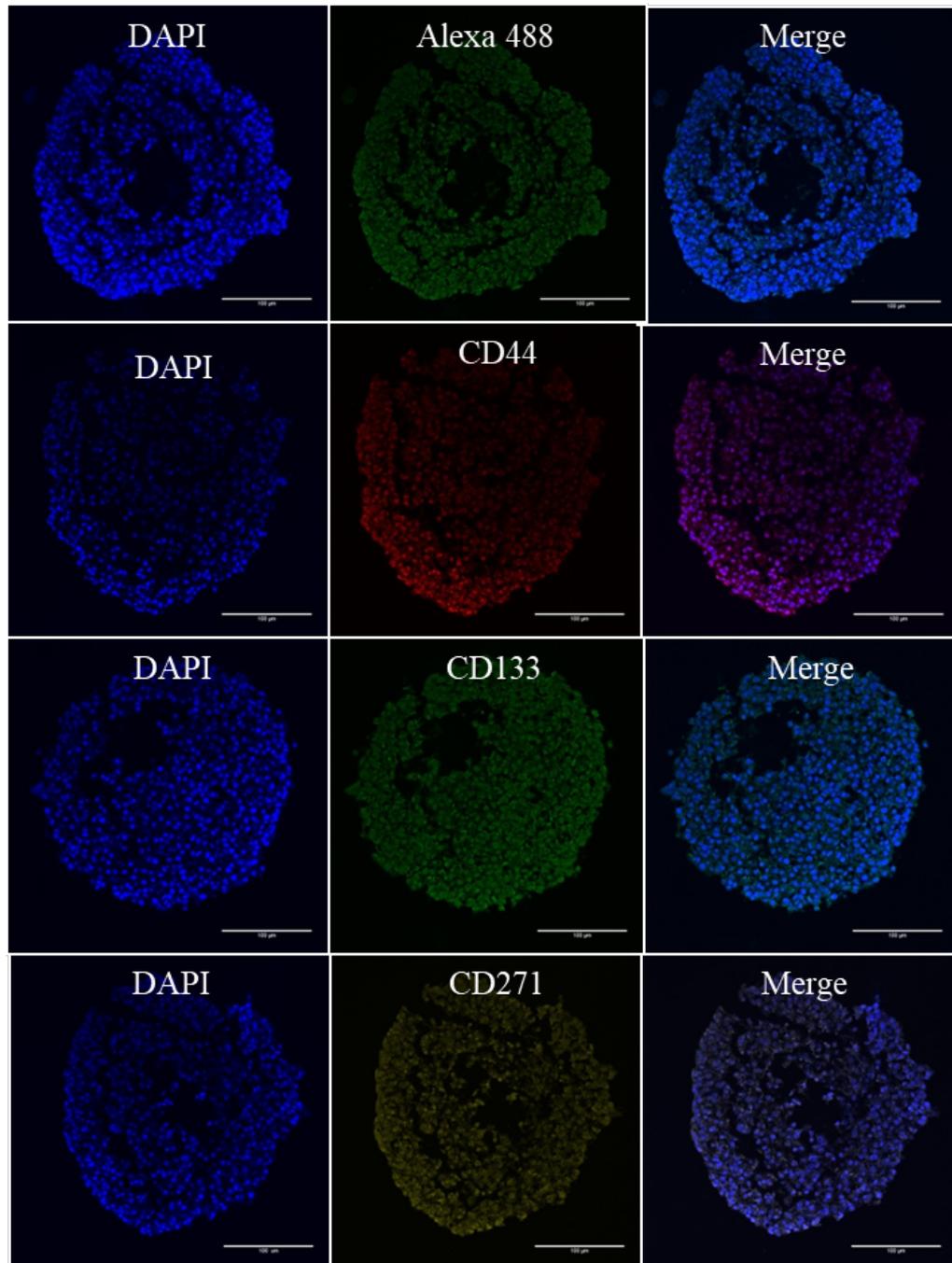
A subpopulação de células com características de CTTs pode ser caracterizada por meio da presença e identificação das glicoproteínas transmembranares já mencionadas (CD44, CD133 e CD271) e, tendo em vista que modelos 3D *in vitro* são ferramentas muito utilizadas no estudo de CTTs em tumores sólidos para avaliar prognóstico e tratamento de tumores como melanoma, este modelo foi utilizado neste estudo (AL-HAJJ et al., 2003; FANG et al., 2005; YAMADA; CUKIERMAN, 2007; SIMBULAN-ROSENTHAL et al., 2019; FU et al., 2020).

Na Figura 11, é possível observar que a melanoesfera de B16F10 (100 células/poço) visualmente apresentam os marcadores de superfície CD44 (vermelho), CD133 (verde) e CD271 (amarelo), por meio da análise da fluorescência com o auxílio da microscopia confocal. O DAPI (azul) foi utilizado como um marcador de núcleo e a combinação das imagens foi utilizada com a sobreposição do núcleo com as proteínas transmembranares em análise para definir as respectivas localizações. O anticorpo Alexa 488 (verde) foi utilizado como controle negativo, com a finalidade de avaliar fluorescência residual inespecífica que

pode ter ocorrido durante o procedimento experimental. Na Figura 11 é possível observar que o Alexa 488 (utilizado como controle negativo) apresenta fluorescência residual, esta limitação pode ter ocorrido em decorrência do processamento das melanoesferas no momento da desparafinização descrita no tópico ‘Análise histológica das melanoesferas’, o que dificulta a confirmação da presença de CD44, CD133 e CD271 nos esferoides formados.

Com relação aos aspectos morfológicos, assim como já havia sido observado na microscopia de luz (Figura 7 A e 7 B), bem como na microscopia de campo claro dos cortes histológicos de melanoesferas de B16F10 em menor densidade (Figura 9), a microscopia confocal (Figura 11) mostra esferoides com formato esférico e com a presença, em alguns dos cortes, de uma maior concentração de células na periferia. Este efeito, possivelmente, é devido à diminuída quantidade de oxigênio e nutrientes no interior da esfera (FEDER-MENGUS et al., 2008; RYU et al., 2019).

Figura 11 - Análise por microscopia confocal da distribuição interna de proteínas transmembranares de melanoesferas de B16F10 na densidade de 100 células/poço.



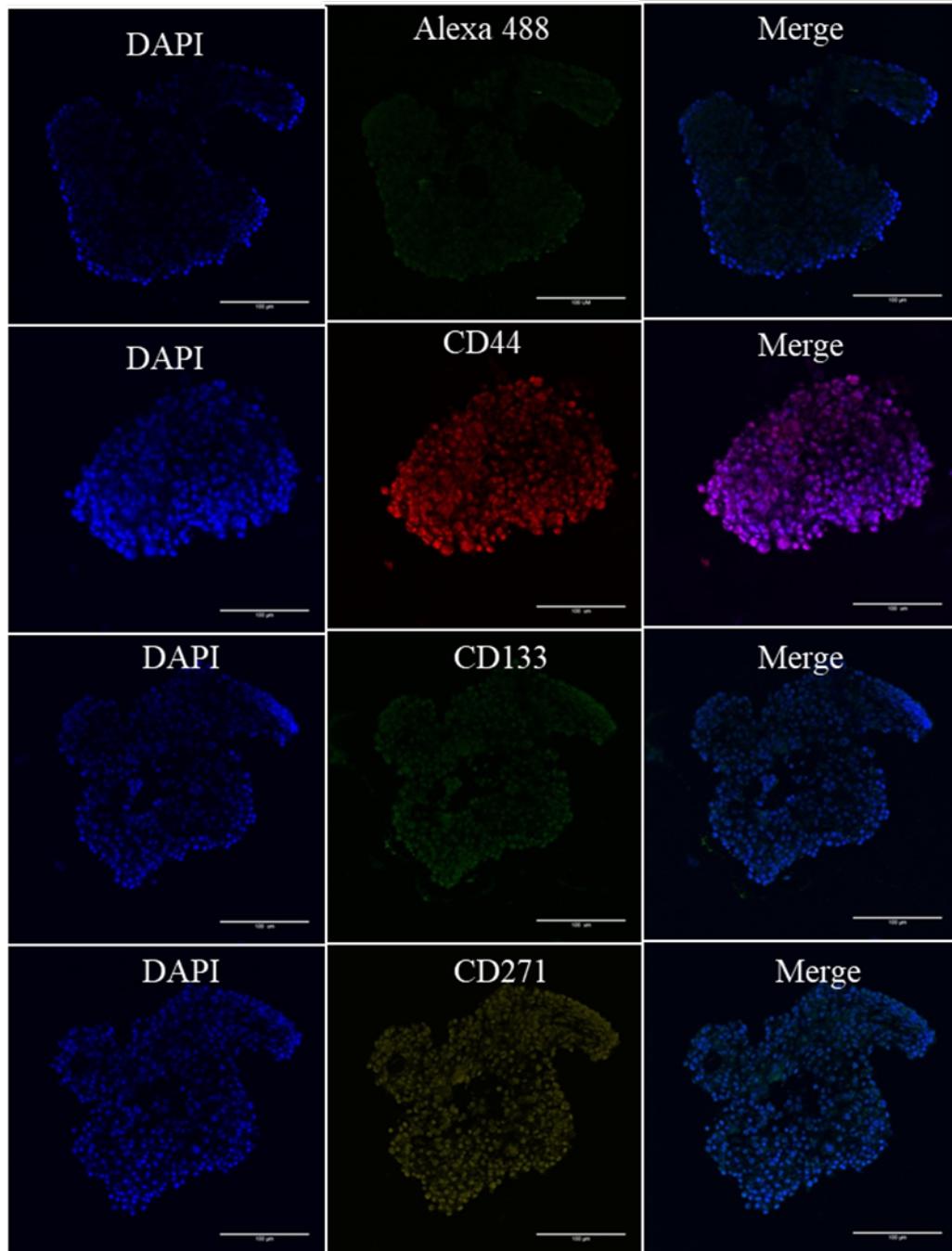
Imagens representativas obtidas por microscopia confocal de cortes histológicos de melanoesferas de B16F10 formadas na densidade de 100 células/poço: Marcação nuclear com DAPI (azul); Controle (Alexa 488); Células CD44 positivas (vermelho); Células CD133 positivas (verde); Células CD271 (amarelo). Magnificação: 20 ×. Barra de escala: 100 µm.

Assim como na Figura 11, a Figura 12 (B16F10 na densidade de 1000 células/poço) também é composta por imagens de cortes histológicos analisados por microscopia confocal.

A fluorescência de núcleo (DAPI em azul), bem como de CD44 (vermelho), CD133 (verde) e CD271 (amarelo) foram observadas. Diferente do que é mostrado na Figura 11, em que o controle negativo (Alexa 488) apresentou intensa fluorescência, na Figura 12 é possível observar que o controle negativo (Alexa 488 em verde) apesar de ainda pouco fluorescente, apresenta uma intensidade menor quando comparado à Figura 11 (B16F10 na densidade de 100 células/poço).

Diferente dos parâmetros morfológicos visualmente observados na Figura 11, a Figura 12 (B16F10 na densidade de 1000 células/poço) é composta por melanoesferas amorfas, como já havia sido observado na análise histológica referente às esferas na mesma condição de formação (Figura 10).

Figura 12 - Análise por microscopia confocal da distribuição interna de proteínas transmembranares de melanosferas de B16F10 na densidade de 1000 células/poço.

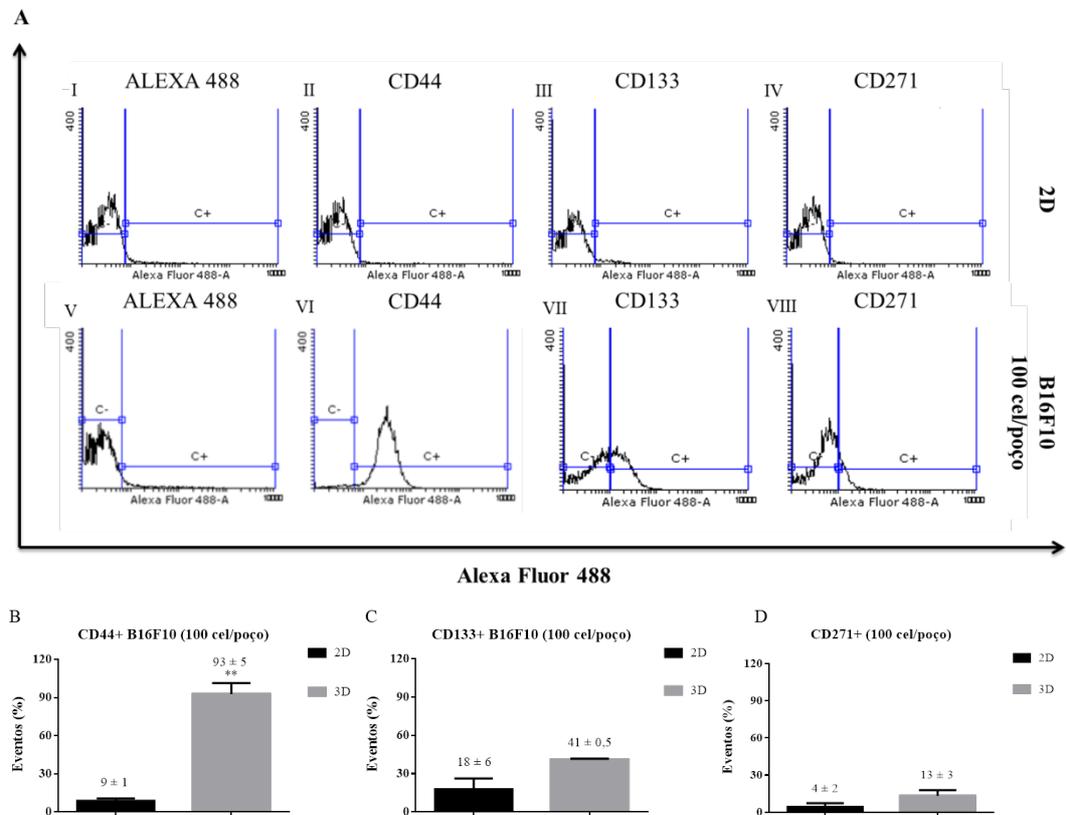


Imagens representativas obtidas por microscopia confocal de cortes histológicos de melanosferas de B16F10 formadas na densidade de 1000 células/poço: Marcação nuclear com DAPI (azul); Controle (Alexa 488); Células CD44 positivas (vermelho); Células CD133 positivas (verde); Células CD271 (amarelo). Magnificação: 20 ×. Barra de escala: 100 µm.

Devido à limitação do aparecimento de fluorescência no controle negativo tanto das melanosferas de B16F10 na densidade de 100 células/poço (Figura 11), quanto nas melanosferas de 1000 células/poço (Figura 12), com os resultados da fluorescência não foi possível confirmar a presença das proteínas CD44, CD133 e CD271 nas melanosferas analisadas e, portanto, a metodologia de citometria de fluxo foi utilizada com o objetivo de analisar quanto a presença de CD44, CD133 e CD271 nos modelos tridimensionais aqui formados.

Na Figura 13 é possível observar a presença de CD44, CD133 e CD271 em melanosferas de B16F10 na densidade de 100 células/poço, comparando-as com o modelo 2D de mesma linhagem celular por meio de citometria de fluxo. A partir dos resultados, observamos um aumento expressivo de $9 \pm 1\%$ para $93 \pm 5\%$ de eventos CD44 positivas (Figura 13 B), quando comparamos o modelo 3D com o modelo 2D. Embora não estatisticamente significativos, os marcadores CD133 e CD271 (Figura 13 C e Figura 13 D, respectivamente) também apresentaram aumento de $18 \pm 6\%$ (modelo 2D) para $41 \pm 0,5\%$ (modelo 3D) para o CD133. Já para o CD271, a porcentagem de eventos positivos aumentou de $4 \pm 2\%$ (modelo 2D) para $13 \pm 3\%$ (modelo 3D).

Figura 13 - Analisar a presença de proteínas transmembranares por citometria de fluxo de modelo bidimensional e de melanosferas formadas por B16F10 na densidade de 100 células/poço.



A) Histograma representativo da análise de eventos positivos para CD44, CD133 e CD271 obtido por meio do software Flowing 2.5.1. Cultura 2D de B16F10: alexa (I), CD44 (II), CD133 (III) CD271 (IV). Cultura 3D de B16F10 de esferoide formados com a densidade de 100 células /poço: controle (V), CD44 (VI), CD133 (VII), CD271 (VIII). B) Representação gráfica da análise de CD44+ em cultivo 2D de B16F10 e cultivo 3D de B16F10 na densidade de 100 células /poço. C) Representação gráfica da análise de CD133+ em cultivo 2D de B16F10 e cultivo 3D de B16F10 na densidade de 100 células /poço. D) Representação gráfica da análise de CD271+ em cultivo 2D de B16F10 e cultivo 3D de B16F10 na densidade de 100 células /poço. Teste estatístico t-student não pareado. ** ($p \leq 0,05$). N = 3.

Sabendo que a presença de CTTs, caracterizadas neste estudo, por meio das proteínas transmembranares CD44, CD133 e CD271 sugere aumento de metástase, capacidade de iniciação tumoral e proliferação celular, além de aumento de malignidade, analisou-se a presença destas proteínas a fim de caracterizar o modelo 3D desenvolvido (CIVENNI et al., 2011; SIMBULAN-ROSENTHAL et al., 2019; FU et al., 2020). A partir dos resultados, foi possível observar que a proteína transmembranar de adesão CD44 aumentou de $9 \pm 1\%$ no modelo 2D para $93 \pm 5\%$ no modelo 3D.

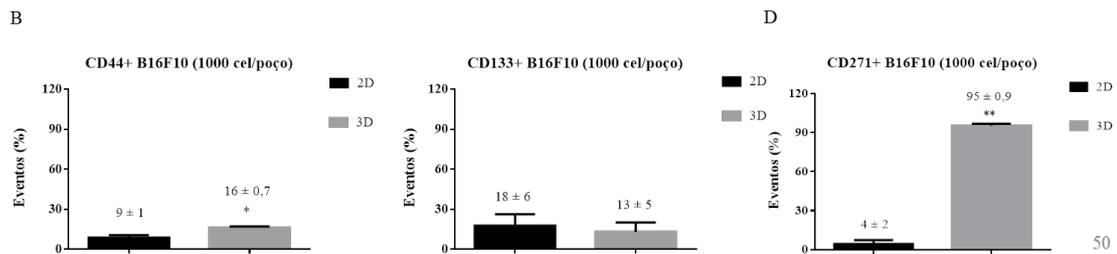
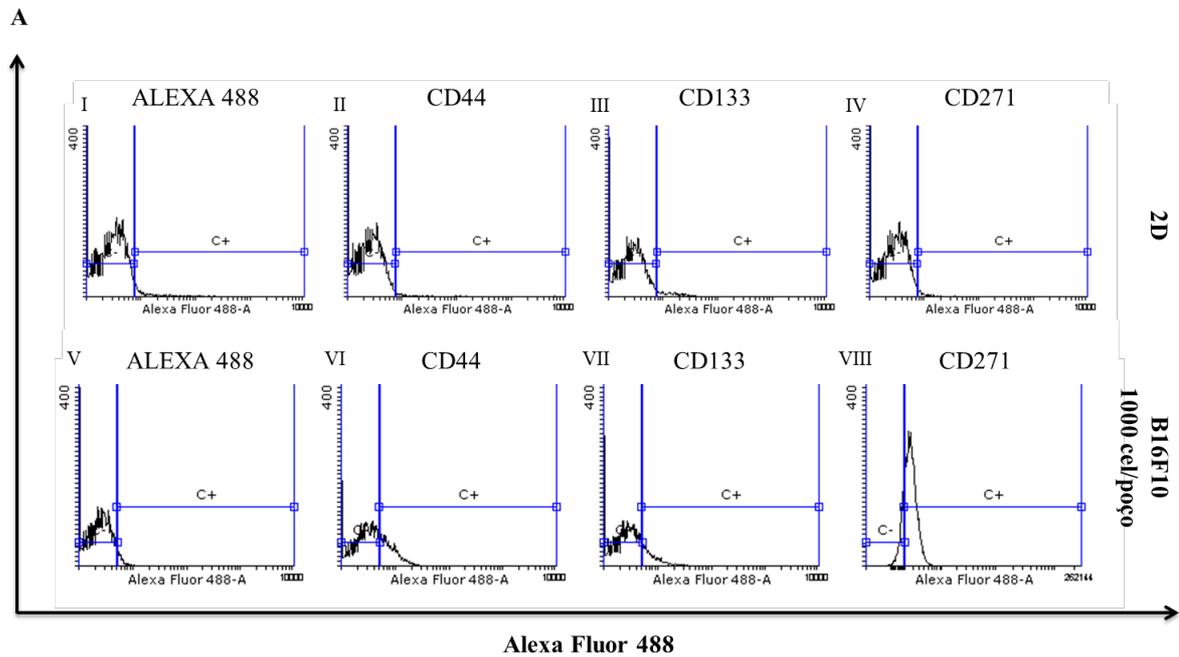
O resultado aqui obtido corrobora os resultados de Marin e colaboradores (2018) que já demonstraram um enriquecimento na quantidade de CD44 positivo em modelo 3D formado nas mesmas condições de cultivo desenvolvido durante seu trabalho (MARIN, 2018).

Sabendo que o CD44 é uma proteína de adesão, conhecida como ligante de ácido hialurônico, relacionado à presença de matriz extracelular e hoje alvo de alguns medicamentos antitumorais, possivelmente o modelo 3D nas condições aqui desenvolvidas esteja produzindo maior quantidade de MEC, quando comparado ao modelo 2D, levando ao aumento na porcentagem deste ligante (FELEMBAN et al., 2018; LI, J. et al., 2020).

É importante mencionar que tumores em estado avançado e de mau prognóstico, já apresentaram uma relação direta com a presença de CD44 e, possivelmente, o modelo 3D nas condições desenvolvidas esteja mimetizando este processo, se comparado ao modelo 2D (GOLDSTEIN et al., 1989; ISHIMOTO et al., 2011; FU et al., 2020). Outro estudo avaliou a capacidade de autorrenovação e diferenciação do subtipo celular positivo para CD44, ao analisar a atividade destas células em camundongo imunocomprometidos e comprovou que os tumores gerados a partir das células CD44 positivas eram capazes de mimetizar a heterogeneidade original do tumor (diferenciação) além de passar essa característica aos tumores subsequentes (autorrenovação) (PRINCE et al., 2007).

Na Figura 14, mostra-se a quantificação dos marcadores transmembranares CD44, CD133 e CD271 em melanoesferas de B16F10 na densidade de 1000 células/poço, comparando-as com o respectivo modelo 2D. Com os dados foi possível observar que o marcador CD133 não modificou a expressão (Figura 14 C), entretanto o marcador CD44 dobrou a porcentagem de positividade, do modelo 2D para o modelo 3D (Figura 14 B). Curiosamente, esta condição para formação de melanoesfera, induziu um aumento expressivo de $4 \pm 2\%$ para $95 \pm 0,9\%$ de células CD271 positivas (Figura 14 D), quando comparamos o modelo 3D com o modelo 2D.

Figura 14 – Análise de proteínas transmembranares por citometria de fluxo de modelo bidimensional e de melanoesferas formadas por B16F10 na densidade de 1000 células/poço.



A) Histograma representativo da análise de células positivas para CD44, CD133 e CD271 obtido por meio do software Flowing 2.5.1. Cultura 2D de B16F10: alexa (I), CD44 (II), CD133 (III) CD271 (IV). Cultura 3D de B16F10 de esferoide formados com a densidade de 1000 células /poço: controle (V), CD44 (VI), CD133 (VII), CD271 (VIII). B) Representação gráfica da análise de CD44+ em cultivo 2D de B16F10 e cultivo 3D de B16F10 na densidade de 100 células /poço. C) Representação gráfica da análise de CD133+ em cultivo 2D de B16F10 e cultivo 3D de B16F10 na densidade de 1000 células /poço. D) Representação gráfica da análise de CD271+ em cultivo 2D de B16F10 e cultivo 3D de B16F10 na densidade de 1000 células /poço. Teste estatístico t-student não pareado. * ($p < 0,05$) e ** ($p < 0,005$). N = 3.

Diferente do modelo tridimensional de menor densidade celular, em que as tumoresferas foram enriquecidas com CD44, o modelo 3D com maior densidade celular (1000 células/poço) foi enriquecido com CD271.

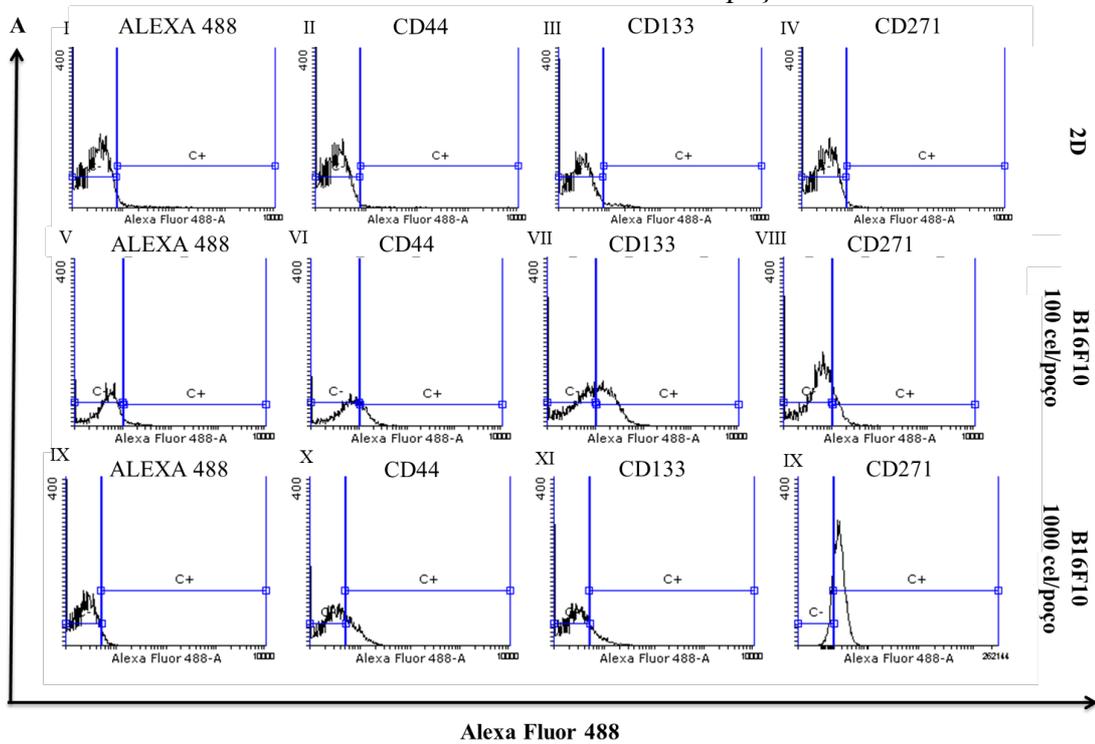
Considerando que o receptor de neurotrofina (CD271) está aumentado em melanoma com alto potencial metastático e capacidade de iniciação tumoral, possivelmente o aumento em 10 vezes na densidade inicial de plaqueamento das melanoesferas tenha induzido à expressão de fatores diretamente relacionados à metástase (CIVENNI et al., 2011). Outro estudo a cerca da atuação da proteína CD271, encontrou uma correlação direta entre elevada

expressão de CD271 positivos e a recidiva do melanoma, o que indica a relação entre a presença desta proteína com o mau prognóstico da doença (IELSEN et al., 2018).

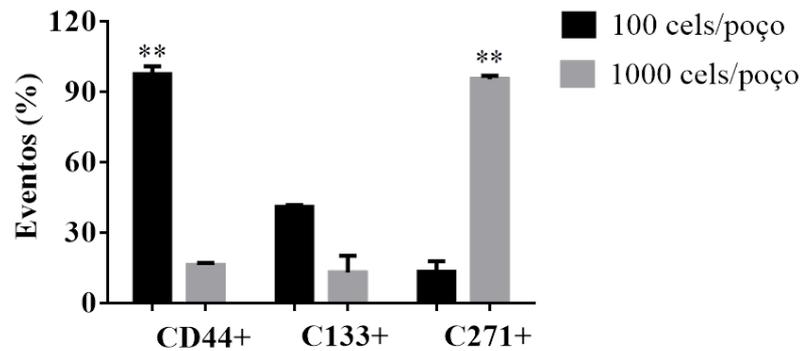
As características da expressão do marcador de superfície CD271 em modelo tridimensional de B16F10 na densidade de 1000 células/poço ainda não foram relatadas na literatura. Assim, o aumento expressivo desta proteína no modelo e nas condições aqui mencionadas é de grande valia para que no futuro seja possível aprofundar os conhecimentos a respeito deste marcador de superfície e atuação no melanoma. Também é importante relatar que apesar de terem sido formados esferoides característicos de expansão clonal, a modificação da densidade celular no plaqueamento inicial para a formação da melanoesfera é capaz de resultar em esferoides com diferentes características, principalmente no que diz respeito à presença de proteínas transmembranares relacionadas a CTTs, formando com isto diferentes modelos esferoides que podem vir a facilitar os estudos futuros da presença e atuação deste subtipo celular no melanoma (MARCHETTI et al., 2004; PRINCE et al., 2007; CIVENNI et al., 2011).

Quando comparadas as expressões das proteínas relacionadas às CTTs entre as melanoesferas de B16F10 nas densidades de 100 e 1000 células/poço (Figura 15) torna-se mais fácil à visualização das diferenças existentes entre as duas condições. A imagem representativa (Figura 15 B) demonstra o aumento da proteína CD44 no modelo de menor densidade celular, de $16 \pm 0,7\%$ (B16F10 na densidade de 1000 células/poço) para $93 \pm 5\%$ (B16F10 na densidade de 100 células/poço). Em contrapartida, para o marcador CD271, a melanoesfera de menor densidade apresentou $13 \pm 3\%$ de positividade e a melanoesfera de maior densidade apresentou $95 \pm 0,9\%$.

Figura 15 - Análise de proteínas transmembranares por citometria de fluxo de modelo bidimensional e tridimensional de melanoesferas formadas por B16F10 nas densidades celulares de 100 e 1000 células/poço.



B



A) Histograma representativo da análise de células positivas para CD44, CD133 e CD271 obtido por meio do software Flowing 2.5.1. Cultura 2D de B16F10: alexa (I), CD44 (II), CD133 (III) CD271 (IV). Cultura 3D de B16F10 de esferoide formados com a densidade de 1000 células /poço: controle (V), CD44 (VI), CD133 (VII), CD271 (VIII). B) Representação gráfica da análise de CD44+, CD133+ e CD271+ positivos em cultivo 2D de B16F10 e em cultivo 3D de B16F10 na densidade de 1000 células /poço. C) Representação gráfica da análise de CD44+ em cultivo 2D de B16F10 e cultivo 3D de B16F10 na densidade de 100 células /poço. D) Representação gráfica da análise de CD133+ em cultivo 2D de B16F10 e cultivo 3D de B16F10 na densidade de 1000 células /poço. E) Representação gráfica da análise de CD271+ em cultivo 2D de B16F10 e cultivo 3D de B16F10 na densidade de 1000 células /poço. Teste estatístico t-student não pareado. ** ($p \leq 0,005$). N = 3.

Com base nos resultados aqui encontrados, em que a simples modificação da densidade celular inicial, característica de expansão clonal, na formação das melanoesferas foi capaz de modificar a expressão de diferentes marcadores de CTTs, sendo o modelo de

B16F10 (100 células/poço) enriquecido pelo marcador de superfície CD44 e o modelo de B16F10 (1000 células/poço) enriquecido pela proteína transmembranar CD271, mostramos que diferentes expressões de proteínas de superfície estão relacionadas com as diferentes condições de cultivo à qual estas melanoesferas foram formadas. Importante relatar que, assim como as condições de cultivo, a atuação de diferentes microambientes tumorais também pode modificar a expressão de marcadores de CTTs. Com base nisto, aplicou-se o cultivo primário de B16F10 anteriormente estabelecido, no modelo de melanoesferas de menor densidade, com a finalidade de avaliar se a passagem desta linhagem celular pelo microambiente tumoral murino seria capaz de modificar a expressão das proteínas de superfície relacionadas às CTT, assim como demonstrado nas diferentes densidades celulares avaliadas (AILLES; WEISSMAN, 2007; MARIN, 2018).

5.4 FORMAÇÃO DE MELANOESFERAS DE CULTURA PRIMÁRIA DE B16F10

A utilização da cultura primária na pesquisa possui vantagens quando comparada ao uso de linhagens celulares estabelecidas. As linhagens imortalizadas estabelecidas e em uso na pesquisa são submetidas a inúmeras passagens celulares e durante este processamento podem adquirir alterações fenotípicas e genotípicas, o que pode diminuir a heterogeneidade tumoral no caso de linhagens tumorais, bem como aumentar as diferenças biológicas quando comparadas a modelos *in vivo*, por exemplo. Isto pode vir a diminuir a relevância e a equivalência para a pesquisa de modelos de câncer que utilizam linhagens estabelecidas quando comparados os resultados obtidos por modelos *in vivo* ou mesmo do cultivo primário proveniente de tumores *ex-vivo*. Vale ressaltar que o microambiente tumoral, ao qual o cultivo primário foi exposto, pode ter induzido modificações genotípicas e fenotípicas nesta linhagem celular (OSBORNE et al., 1987; BURDALL et al., 2003; HIORNS et al., 2004; TRÉDAN et al., 2007; WU; DAI, 2017). Por este motivo, escolheu-se trabalhar com o cultivo primário de B16F10 a fim de compará-lo com o cultivo já estabelecido da mesma linhagem celular e em uso no laboratório sob aspectos como capacidade melanogênica no cultivo em monocamada, morfologia das esferas formadas, diâmetro, volume, viabilidade, presença de matriz extracelular, bem como características na expressão de marcadores de CTT.

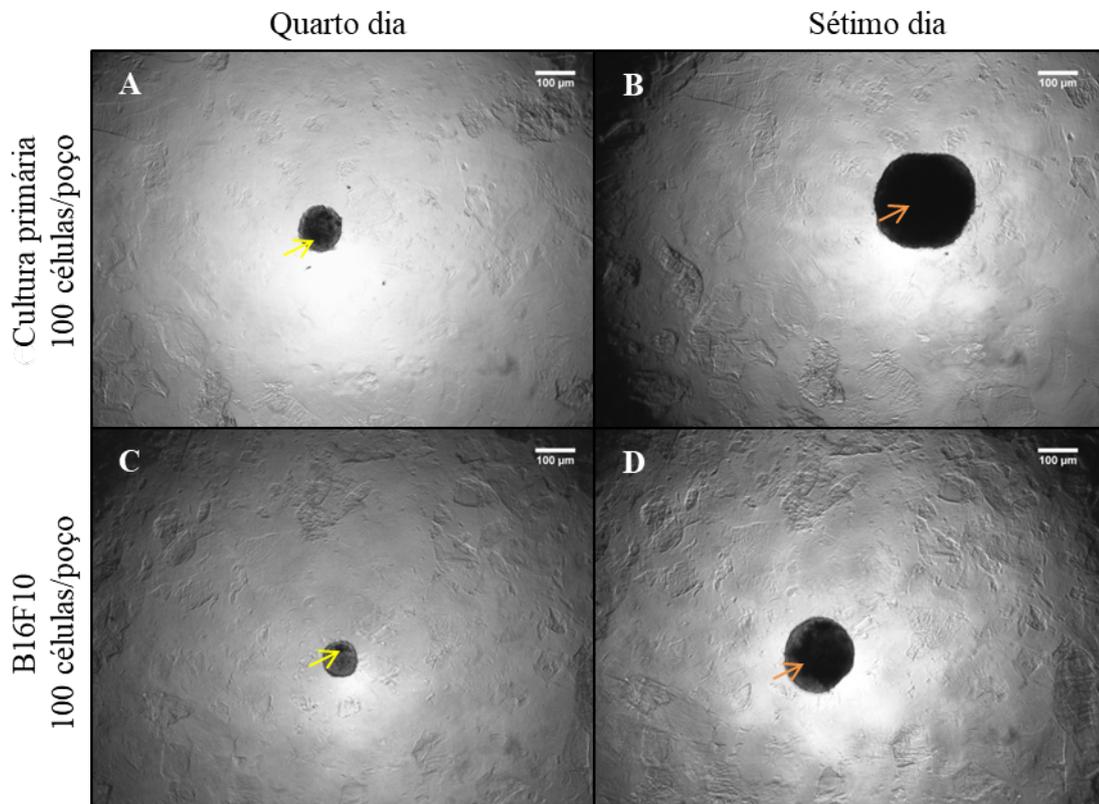
Para o estabelecimento da cultura primária (CP), em estudo prévio Assunção e colaboradores induziram a formação de tumor em camundongos C57BL/6J/Unib fêmeas, por

meio da inoculação subcutânea de células B16F10 (ASSUNÇÃO, 2017). Posteriormente, a cultura primária foi estabelecida por MARIN (2018).

As linhagens B16F10 e CP foram utilizadas para a formação de esferoides sob as mesmas condições já descritas neste trabalho (placas de 96 poços recobertas com 30 μ L de gel de agarose a 2% e densidade celular de 100 células/poço). Como pode ser observado na Figura 16, foi possível a obtenção de melanoesferas de B16F10, bem como de cultura primária após quatro dias e manutenção em cultivo até sete dias, como já descrito (MARIN, 2018). As melanoesferas da cultura primária, mesmo tendo sido formadas com a mesma densidade celular e mesmas condições de cultivo, parecem maiores no quarto e no sétimo dia de incubação, se comparadas às esferas de B16F10.

Nas imagens da Figura 16, podemos observar que as esferas da cultura primária são menos esféricas que as esferas de B16F10, no sétimo dia de cultivo. É importante relembrar que diferenças morfológicas na formação de esferoides são comuns, principalmente quando esferas formadas de linhagens celulares de origens diferentes são comparadas. Na Figura 16, também é possível visualizar diferença na coloração das melanoesferas de B16F10 e do cultivo primário, que no quarto dia apresenta o que parecem ser grânulos escurecidos (seta amarela) característico de locais com baixa perfusão de oxigênio e nutrientes. No sétimo dia estes grânulos parecem ocupar todo o centro do esferoide formando o que parece ser um núcleo necrótico preto e compacto (seta laranja) (ZANONI et al., 2016; RYU et al., 2019).

Figura 16 - Melanoesferas de cultura primária e B16F10 formadas na densidade inicial de plaqueamento de 100 células /poço em diferentes dias de cultivo.



Imagens representativas de esferoides de cultura primária e B16F10 obtidos no quarto dia e no sétimo dia de cultivo na densidade de 100 células/poço obtidas por microscopia ótica em microscópio de luz Nikon Eclipse TS100 por meio do software TC capture 4.3.0.605. A) Imagens representativas de esferoides de cultura primária após quatro dias de cultivo. B) Imagens representativas de esferoides de cultura primária obtidos no sétimo dia de cultivo. C) Imagens representativas de esferoides de B16F10 no quarto dia de cultivo. D) Imagens representativas de esferoides de B16F10 no sétimo dia de cultivo. Seta amarela: núcleo pigmentado e com pequenos grânulos escuros em melanoesferas de diferentes densidades celulares no quarto dia de cultivo. Seta laranja: núcleo pigmentado e com pequenos grânulos escuros em melanoesferas de diferentes densidades celulares no sétimo dia de cultivo. Barra de escala: 100 µm, magnificação 4 ×.

As imagens da Figura 16 nos permitiram avaliar os diâmetros dos esferoides (Tabela 3) para posterior cálculo do volume (mm^3) das melanoesferas formadas (IVANOV et al., 2014).

A partir das imagens obtidas por microscopia de luz (Figura 16), foi possível mensurar o diâmetro em µm de cada condição de melanoesfera formada (Tabela 3).

Como podemos observar na Tabela 3, a média dos diâmetros mensurados das melanoesferas de B16F10 na densidade de 100 células/poço foram 90 ± 7 µm no quarto dia e 185 ± 7 µm no sétimo dia. Já para as melanoesferas de cultura primária (100 células/poço) os diâmetros foram de 104 ± 11 µm (quarto dia) e 246 ± 20 µm (sétimo dia). Visualmente, na Figura 16, as melanoesferas formadas com cultivo primário eram maiores, tanto no quarto quanto no sétimo dia de cultivo que as formadas com B16F10. Foi possível observar que com

o plaqueamento da CP os diâmetros das melanoesferas tiveram aproximadamente 18 μm e 74 μm de diâmetros a mais que as esferas de B16F10, no quarto e no sétimo dia de incubação, respectivamente.

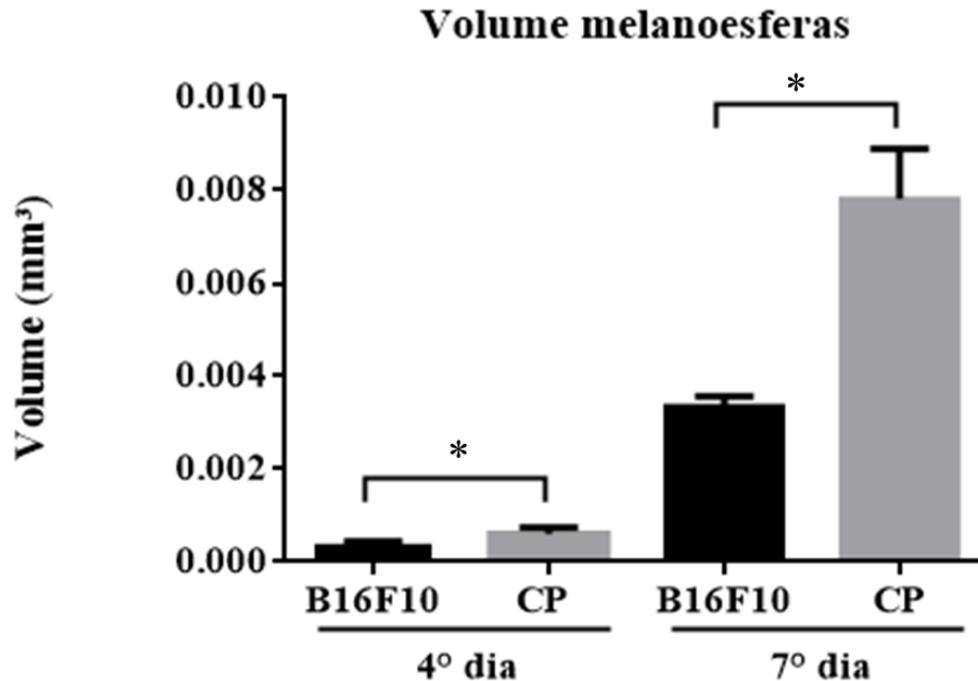
Tabela 3 - Média \pm DP do diâmetro mensurado no quarto e no sétimo dia de cultivo de melanoesferas de B16F10 e cultura primária formadas na densidade de 100 células/poço.

	B16F10 100 céls/poço	CP 100 céls/poço
Média \pm DP do diâmetro (μm) quarto dia	90 \pm 7	104 \pm 11
Média \pm DP do diâmetro (μm) sétimo dia	185 \pm 7	246 \pm 20

Tabela representativas da média \pm DP do diâmetro (μm) mensurado por meio do software ImageJ através da área calculável do comprimento entre as duas extremidades de esferoides de B16F10 e de cultura primária formados na densidade inicial de plaqueamento de 100 células/poço.

A Figura 17 compara os volumes das melanoesferas de B16F10 e de cultura primária, formadas na densidade celular inicial de 100 células/poço em diferentes dias de cultivo. Como anteriormente exposto, a média dos volumes de melanoesferas de B16F10 (100 células/poço) no quarto dia foi de 0,0004 mm^3 e no sétimo dia foi de 0,003 mm^3 . Já a média dos volumes de cultura primária (100 células/poço) foi de 0,0006 mm^3 (quarto dia) e de 0,008 mm^3 (sétimo dia). Com isto, quando as duas condições foram comparadas no quarto dia, a cultura primária teve um volume 1,5 vezes maior que a B16F10. Já quando foi comparado o sétimo dia de incubação, o aumento do volume da CP foi de aproximadamente 3 vezes. Estes dados estão de acordo com o que é visto na Figura 16, tendo em vista que quando observamos as melanoesferas nas quatro diferentes condições CP e B16F10 no quarto ou sétimo dia, todas apresentam volumes diferentes entre si.

Figura 17 - Volume do quarto e sétimo dia de cultivo dos esferoides de B16F10 e cultura primária plaqueados inicialmente na densidade de 100 células /poço.



Representação gráfica do volume calculado por meio do diâmetro do esferoide, obtido através do software ImageJ, das melanosferas de B16F10 e cultura primária formadas na densidade inicial de plaqueamento de 100 células /poço, nos diferentes dias de cultivo. Teste estatístico t-student não pareado. * ($p \leq 0,0001$). N = 3.

A viabilidade celular e o número de células por esferoide da cultura primária também foi feita por meio da coleta e avaliada no sétimo dia de esferas por meio da técnica de azul de tripam com contagem em câmara de Neubauer (Tabela 4). Como já exposto anteriormente, as melanosferas de B16F10 (100 células/poço) apresentaram viabilidade de $92 \pm 4\%$ e uma média de 323 ± 120 células/esfera. Em contrapartida, as esferas de cultura primária apresentaram menor viabilidade com porcentagem de $78 \pm 13\%$ com uma média de 536 ± 57 células/esfera. O maior número de células do cultivo primário só comprova o que foi visualizado na Figura 16, tendo em vista que visualmente as esferas de cultivo primário parecem maiores e com maior número de células que as de B16F10.

Tabela 4 - Porcentagem de viabilidade e número de células viáveis por esferoide de B16F10 na densidade de 100 ou 1000 células /poço.

Sétimo dia	B16F10 (100 céls/poço)	CP (100 céls/poço)
Média ± DP da viabilidade (%)	92 ± 4	78 ± 13
Média ± DP do número de células viáveis por esferoide	323 ± 120	536 ± 57

Tabela representativa da média ± DP da porcentagem (%) da viabilidade e da média do número de células viáveis por esferoide obtidas por meio da viabilidade celular pela técnica de azul de tripam e contagem em câmara de Neubauer de B16F10 formados na densidade inicial de plaqueamento de 100 e 1000 células/poço.

A partir dos resultados foi possível observar diferenças na característica, pigmentação, e morfologia (Figura 16), diâmetro (Tabela 3), volume (Figura 17) e viabilidade (Tabela 4) na formação de melanosferas de B16F10 e de cultivo primário, mesmo sob as mesmas condições não aderentes para a reprodução do modelo 3D. Estes resultados diferem do esperado já que a cultura primária foi obtida a partir de tumores sólidos de linhagem B16F10 implantada em camundongos C57BL/6J/Unib (ASSUNÇÃO, 2017). Estas diferenças podem estar relacionadas ao fato de que na cultura primária, as células foram expostas ao microambiente tumoral do camundongo, diferente das células B16F10 não submetidas ao processo.

É importante ressaltar que já foi demonstrada a relevância do microambiente para a progressão e metástase tumoral, e já é conhecido que nestes microambientes estão presentes citocinas e fatores de crescimento determinantes para o prognóstico das doenças. Estudos no tema vêm demonstrando que microambientes tumorais, compostos por células endoteliais, fibroblastos, células do sistema imune, entre outras, são capazes de influenciar a resposta terapêutica dos fármacos liberando fatores de crescimento, hormônios e citocinas que possam induzir resistência farmacoterapêutica. Ainda, apesar do cultivo primário possivelmente ser composto somente por B16F10, a recente interação da cultura primária com os outros componentes celulares mencionados, pode ter induzido estas células a expressar as modificações fenotípicas observadas (TRÉDAN et al., 2007; FEDER-MENGUS et al., 2008; WU; DAI, 2017).

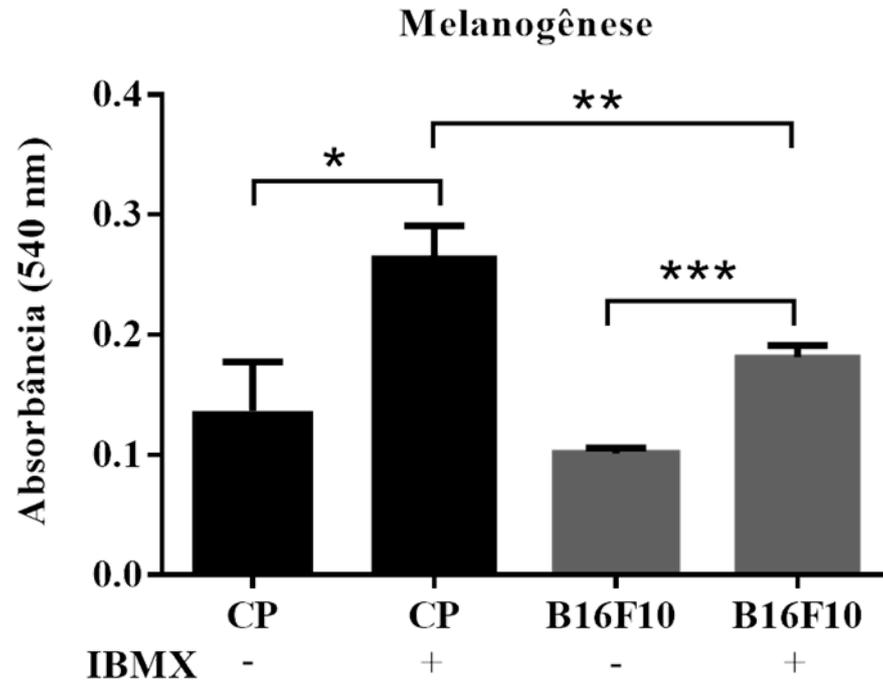
Para ambas as densidades analisadas, já era esperado que os esferoides formados com maior número de células durante o plaqueamento inicial tivessem também, maior número de células no sétimo dia de cultivo. Já as diferenças observadas na viabilidade e no número de células por esferoide da B16F10 para a cultura primária, podem ser resposta da possível dificuldade no estabelecimento deste tipo de cultivo. Tendo em vista que a cultura primária obtida a partir de tumores *ex vivo* tendem a ter crescimento celular limitado, ou mesmo a presença de populações não homogêneas, podendo os resultados terem sido consequências das características deste cultivo celular (SANDERCOCK et al., 2015; LOVITT et al., 2016).

5.3 ENSAIO DA MELANOGÊNESE EM MODELO BIDIMENSIONAL

Tendo em vista que o processo de melanogênese também pode estar alterado no melanoma, sendo um processo intrínseco dos melanócitos (SLOMINSKI et al., 2019), foi avaliada a capacidade melanogênica tanto de B16F10 quanto da cultura primária de B16F10. O objetivo foi de observar se, assim como a B16F10 em estudo, a cultura primária formada a partir da mesma linhagem celular seria capaz de produzir melanina por meio da melanogênese induzida pela IBMX. A IBMX estimula a melanogênese pelo aumento da adenosina monofosfato cíclico (AMPC) intracelular, responsável por elevar as concentrações de tirosinase responsáveis pela produção de melanina (SCHALLREUTER et al., 2007; BAE et al., 2016).

Os dados da Figura 18 demonstram por meio de técnica colorimétrica que o IBMX foi capaz de induzir a produção de melanina tanto na cultura primária quanto na B16F10. A condição, cuja incubação inclui IBMX apresentou maior absorvância se comparada ao controle negativo não induzido. A capacidade melanogênica do cultivo primário induzido pelo IBMX foi maior se comparada com a linhagem B16F10, podendo esta diferença na capacidade melanogênica também ser resposta da passagem das células pelo microambiente tumoral, como já mencionado anteriormente.

Figura 18 - Quantificação da melanogênese induzida por IBMX em cultura primária e em B16F10 no modelo 2D.



Representação gráfica da capacidade melanogênica induzida por IBMX comparado ao controle não induzido por IBMX de cultura primária e de B16F10 por meio da detecção de melanina pela absorbância em 540 nm. A quantificação de melanina foi padronizada por meio da contagem do número de células em câmara de Neubauer pelo método de azul de tripano. Teste estatístico t-student não pareado. * ($p \leq 0,05$), ** ($p \leq 0,005$) e *** ($p \leq 0,001$). N = 3.

A análise do processo de melanogênese, avaliada no modelo bidimensional, parece corroborar o que é visualizado na imagem da Figura 16, em que tanto no quarto quanto no sétimo dia, os esferoides formados a partir da cultura primária aparentam ser mais pigmentados do que as melanosferas de B16F10. É importante relatar que a hiper melanogênese é um processo comum em pacientes com lesões resultantes de melanoma maligno e, portanto, o cultivo primário por ter entrado em contato com o microambiente tumoral pode estar representando melhor um tumor *in vivo*, já que foi capaz de produzir maior quantidade de melanina quando comparado com a linhagem B16F10 (PUPINYO et al., 2019).

Outra hipótese é baseada no estudo de Meira e colaboradores que demonstraram que a B16F10, após indução de melanogênese por meio da ativação da via melanogênica pela L-tirosina, apresentou uma diminuição da respiração celular sem perda de membrana celular mitocondrial, sugerindo a entrada das células em um estado quiescente, estado este que talvez

esteja sendo melhor representado do que ocorreria *in vivo* pelo cultivo primário em comparação com a própria B16F10 (MEIRA et al., 2016).

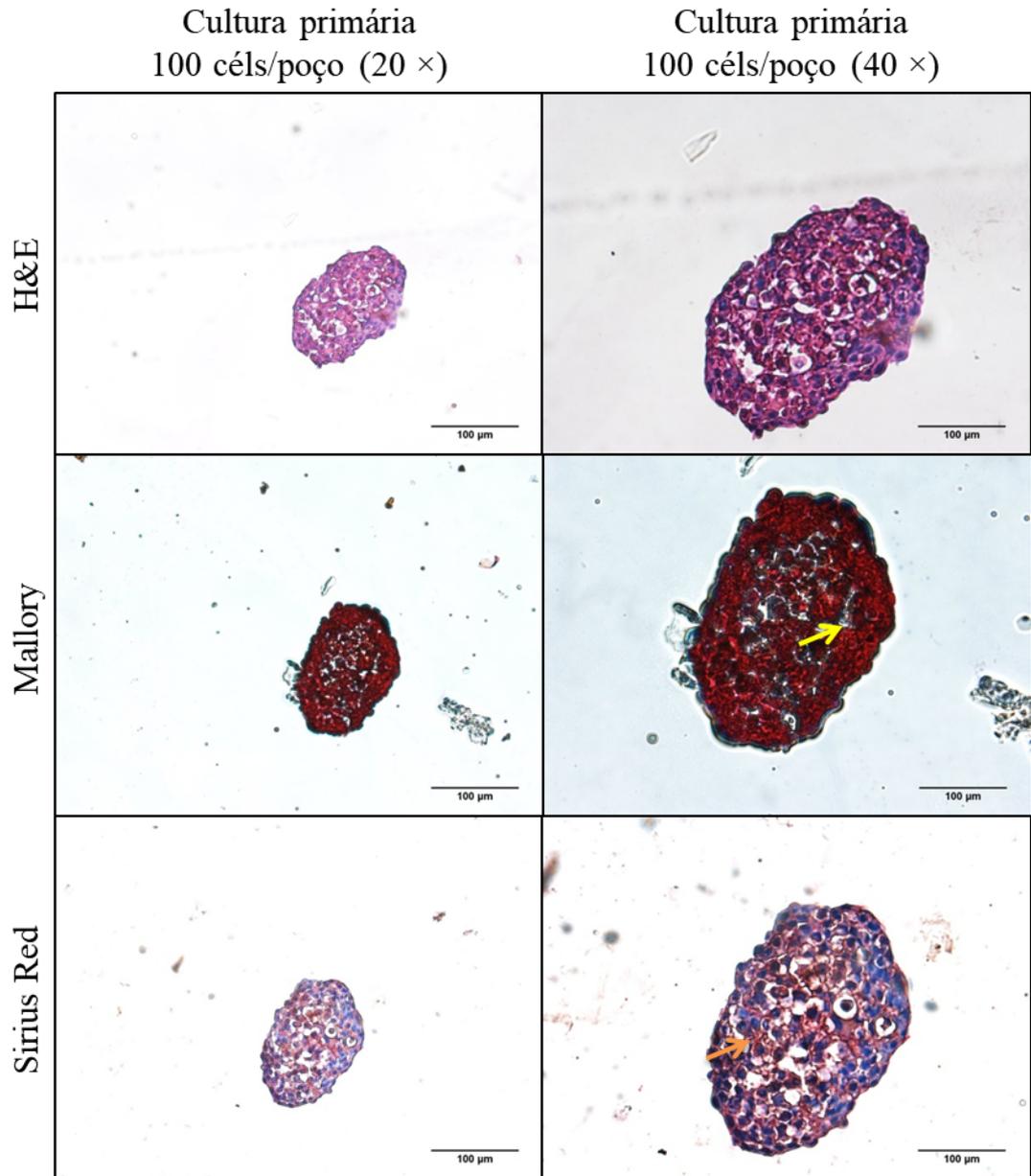
Neste trabalho, a B16F10 e a cultura primária foram avaliadas quanto à capacidade melanogênica, induzida ou não por IBMX no modelo bidimensional. Considerando que os modelos tridimensionais de melanoma são o foco deste trabalho, são necessários mais experimentos a fim de avaliar o metabolismo melanogênico para cada um dos modelos tridimensionais aqui estudadas, a fim de realizar correlações com o prognóstico da doença.

5.5 CARACTERIZAÇÃO DE MATRIZ EXTRACELULAR NAS MELANOESFERAS DE CULTURA PRIMÁRIA FORMADA NA DENSIDADE CELULAR DE 100 CÉLULAS/POÇO

Tendo em vista que a MEC está alterada em doenças como o câncer e levando em consideração que cultivo primário foi recentemente exposto as influências do microambiente tumoral, avaliou-se a presença da MEC no modelo 3D formado pelo cultivo primário, com a finalidade de analisar se as condições às quais esta linhagem foi submetida poderiam ter modificado a presença da MEC, se comparada ao modelo tridimensional de igual densidade da B16F10 (AILLES; WEISSMAN, 2007; YOKOYAMA et al., 2011)

Na Figura 19, os cortes histológicos de 5 μ m foram formados com cultura primária na densidade celular de 100 células/poço. A coloração de H&E (Figura 19 A e Figura 19 B), Mallory (Figura 19 C e Figura 19 D) e Sirius Red (Figura 19 E e Figura 19 F), também está bem evidente. Estas melanoesferas apresentam-se como esferas sólidas, com alta densidade celular. Devido a essa alta densidade celular, a matriz extracelular fica pouco evidente, o que pode ser observado são alguns resquícios de pigmentação azul na coloração de Mallory (seta amarela), bem como algumas estruturas vermelhas na coloração de Sirius Red (seta laranja) que poderiam indicar uma pequena quantidade de MEC, mas devido à dificuldade de visualização nas amostras seriam necessários mais experimentos que pudessem comprovar a presença da matriz nestas esferas.

Figura 19 - Coloração de hematoxilina/eosina, Mallory ou Sirius Red de cortes histológicos de melanosferas de cultura primária na densidade de 100 células/poço.



Imagens representativas obtidas por microscopia de campo claro de cortes histológicos de melanosferas de cultura primária formadas na densidade de 100 células/poço. Coloração de H&E (figura 14 A), Mallory (figura 14 B) e Sirius Red (figura 14 C). Matiz extracelular observada pela pigmentação azul na coloração de Mallory (seta amarela) e pela coloração vermelha de Sirius Red (seta laranja). Magnificação: 20 × e 40 ×. Barra de escala: 100 µm.

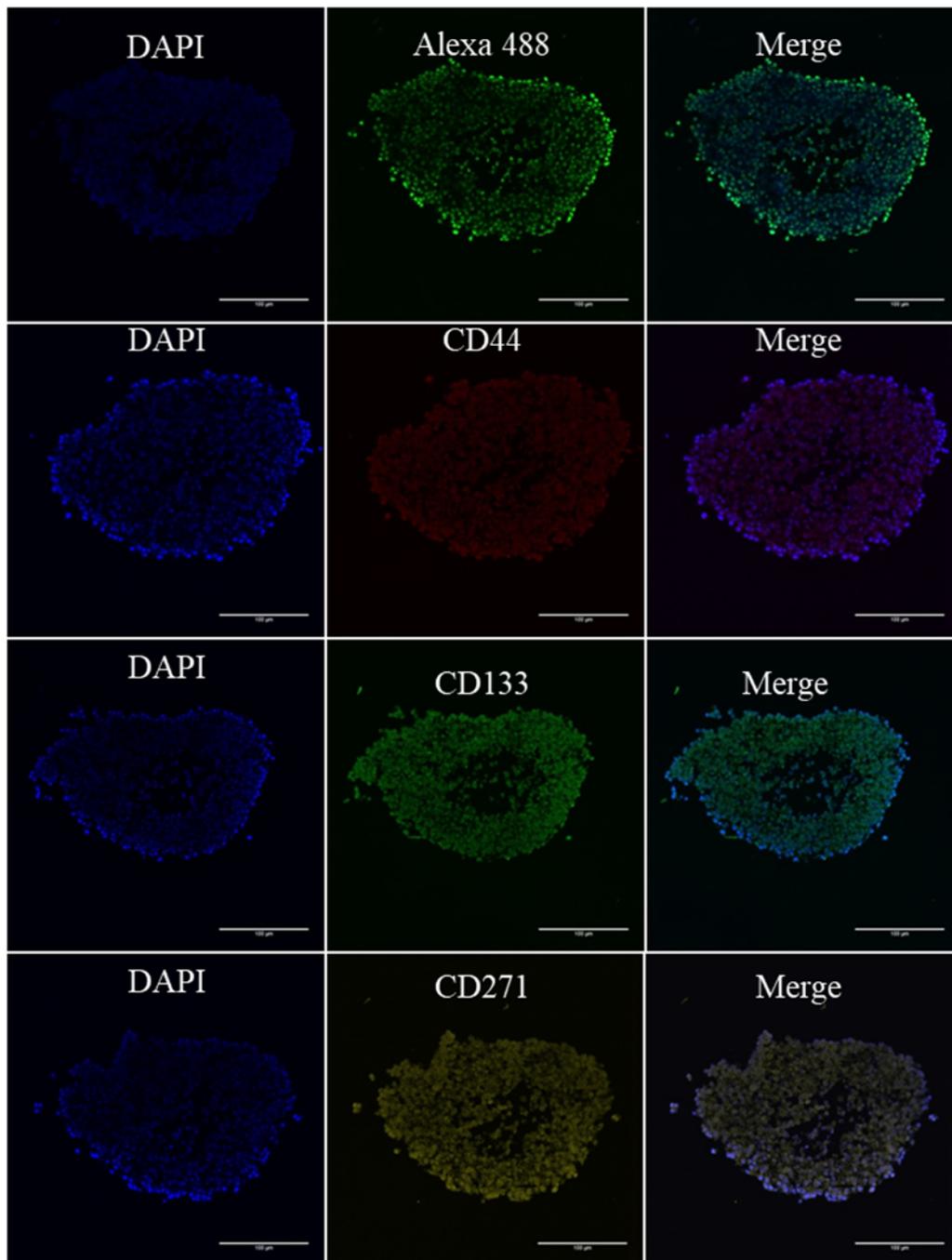
5.6 AVALIAÇÃO DOS MARCADORES RELACIONADOS ÀS CÉLULAS TRONCO TUMORAIS DE MELANOSFERAS DE CULTURA PRIMÁRIA NA DENSIDADE CELULAR DE 100 CÉLULAS/POÇO

Analisou-se a presença das proteínas transmembranares CD44, CD133 e CD271 no modelo 3D de cultivo primário por imunofluorescência (Figura 20) a fim de avaliar se, em decorrência da exposição da cultura primária ao microambiente tumoral, haveria alguma alteração na presença destes marcadores (AILLES; WEISSMAN, 2007).

A Figura 20 apresenta imagens histológicas da fluorescência de DAPI (marcação de núcleo), controle negativo Alexa 188 (verde), CD44 (vermelho), CD133 (verde) e CD271 (amarelo). Assim como foi observado para os cortes das melanosferas de B16F10 nas densidades de 100 células/poço (Figura 11) e 1000 células/poço (Figura 12) também houve fluorescência inespecífica do controle negativo Alexa 488, demonstrando mais uma vez a limitação da avaliação de imunofluorescência em cortes histológicos de modelo 3D de melanoma.

Com relação à morfologia apresentada na Figura 20, é possível observar que este modelo 3D possui formato mais oval como já havia sido observado na Figura 19 na técnica histológica das esferas formadas nesta condição, sendo na análise por microscopia confocal possível visualizar algumas esferas com células mais periféricas e com o que parece ser um núcleo necrótico, o que não havia sido anteriormente observado na Figura 19, em que é perceptível que as células foram capazes de preencher todo o centro do esferoide, possivelmente esta diferença seja resultado da menor profundidade do corte do esferoide representada da Figura 19, o qual parece ser um corte mais superficial do que os cortes presentes na Figura 20.

Figura 20 - Análise por microscopia confocal da distribuição interna de proteínas transmembranares de melanosferas de cultura primária na densidade de 100 células/poço.



Imagens representativas obtidas por microscopia confocal de cortes histológicos de melanosferas de cultura primária formadas na densidade de 100 células/poço: Marcação nuclear com DAPI (azul); Controle (Alexa 488); Células CD44 positivas (vermelho); Células CD133 positivas (verde); Células CD271 (amarelo). Magnificação: 20 ×. Barra de escala: 100 μm.

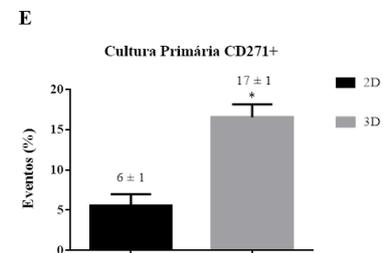
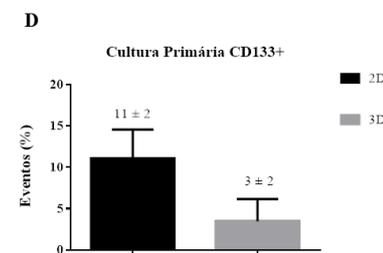
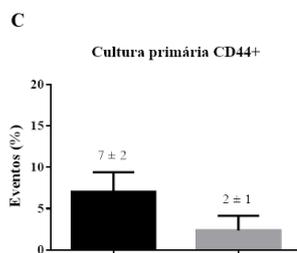
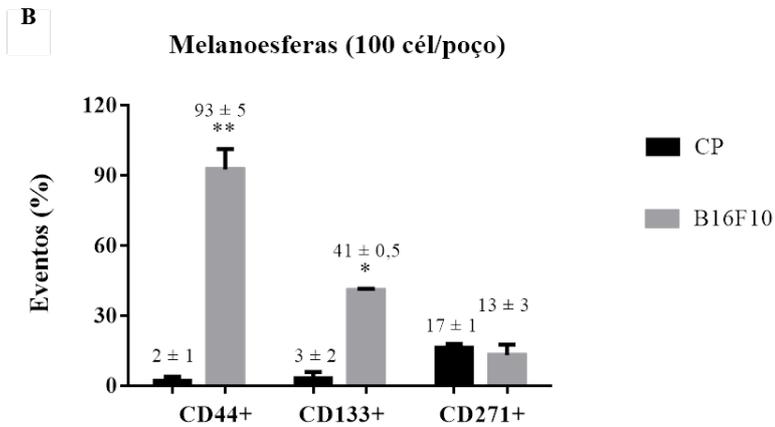
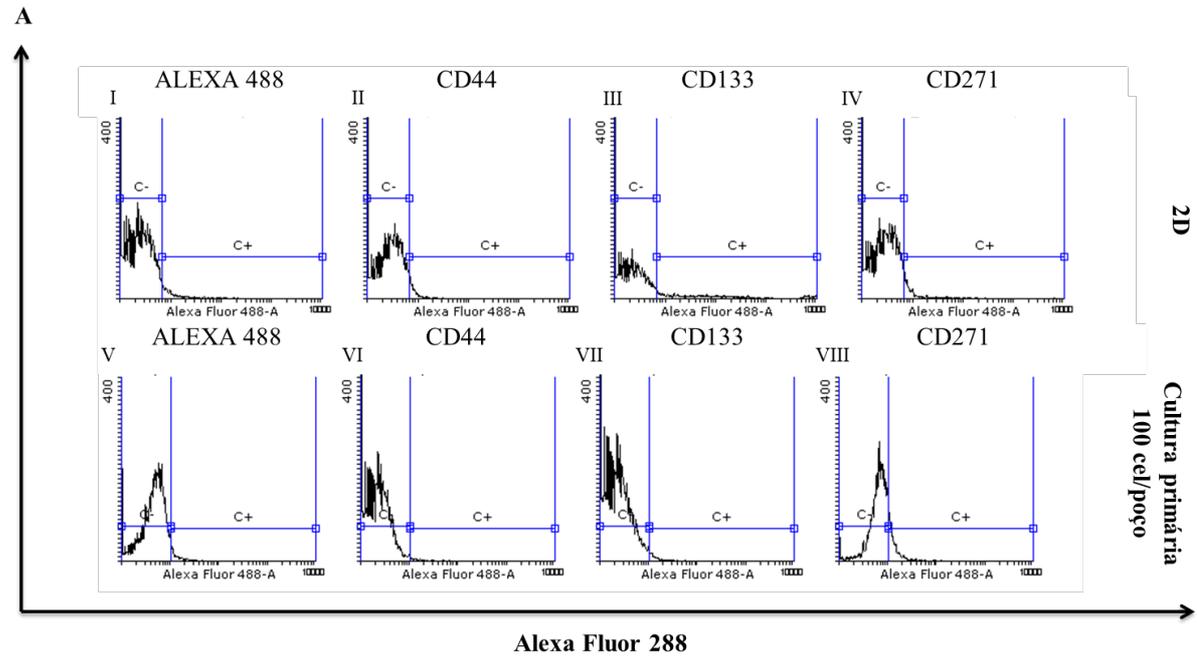
É importante relatar que não existe um padrão de imunomarcacão para o melanoma e por este motivo foram escolhidos CD44, CD133 e CD271 que já foram relatados na literatura por terem relacão com a presença de CTTs e o melanoma. Marin et al (2018) demonstraram a presença de CD44 e CD133 por fluorescência em melanoesferas tridimensionais de B16F10 e de cultura primária na densidade de 100 células/poço, e ao utilizarem Alexa 488 como controle negativo, não observaram fluorescência inespecífica.

Entretanto, nosso experimento foi feito em cortes histológicos com o objetivo de avaliar a distribuicão interna destes marcadores, tendo em vista que as melanoesferas possuem diferentes gradientes de oxigênio e nutrientes dependendo da localizacão do esferoide o que poderia modificar a presença de CTT, tendo em vista que este subtipo celular é resistência a ambientes com pouco oxigênio (BIRGERSDOTTER et al., 2005; FEDER-MENGUS et al., 2008; HORVATH et al., 2016). A análise de fluorescência por microscopia confocal mostra que as possíveis marcaçoes relacionadas às CTTs não mostram nichos específicos ou bem localizados nas melanoesferas, ao contrário, estao presentes tanto na borda, quanto no centro da melanoesfera, ou seja, mesmo havendo diferença na difusao de oxigênio e nutrientes, não houve modificacão na distribuicão das proteínas transmembranares em estudo. A própria metodologia de avaliacao de fluorescência em cortes histológicos padronizada neste trabalho precisa ser melhorada a fim de diminuir as ligacões inespecíficas do Alexa 488 que podem ter acontecido em decorrência do processamento da amostra, para assim obter melhores resultados.

Assim, como avaliado nos modelos de melanoesferas de B16F10 nas densidades de 100 e 1000 células/poço, e com a finalidade de comprovar a presença de CD44, CD133 e CD271, também foram quantificados os marcadores de superfície na cultura primária por citometria de fluxo.

Quando avaliado o cultivo primário (Figura 21), o CD271 foi o único marcador de membrana que apresentou aumento de 6 ± 1 para $17 \pm 1\%$ do modelo 2D para o modelo 3D, respectivamente (Figura 21 E). Em contrapartida, quando foram comparados os modelos 3D de B16F10 e de cultura primária formados na densidade de 100 células/poço, a linhagem B16F10 foi a que apresentou maior enriquecimento pelos marcadores de CD44+ (de $2 \pm 1\%$ para $93 \pm 5\%$ entre CP e B16F10, respectivamente) e CD133+ (de $3 \pm 2\%$ para $41 \pm 0,5\%$) (Figura 21 B).

Figura 21 - Análise de proteínas transmembranares por citometria de fluxo de modelo bidimensional e de melanosferas formadas por B16F10 ou cultura primária na densidade de 100 células/poço.



A) Histograma representativo da análise de células positivas para CD44, CD133 e CD271 obtido por meio do software Flowing 2.5.1. Cultura 2D de cultivo primário: alexa (I), CD44 (II), CD133 (III) CD271 (IV).

Cultura 3D de cultivo primário de esferoides formados com a densidade de 100 células /poço: controle (V), CD44 (VI), CD133 (VII), CD271 (VIII). B) Representação gráfica da análise de CD44+, CD133+ e CD271+ positivos em cultivo 3D de B16F10 e de cultura primária na densidade de 100 células /poço. C) Representação

gráfica da análise de CD44+ em cultivo 2D e em cultivo 3D de cultura primária na densidade de 100 células /poço. D) Representação gráfica da análise de CD133+ em cultivo 2D e em cultivo 3D de cultura primária na densidade de 100 células /poço. E) Representação gráfica da análise de CD271+ em cultivo 2D e em cultivo 3D de cultura primária na densidade de 100 células /poço. Teste estatístico t-student não pareado. * ($p \leq 0,05$) e ** ($p \leq 0,005$). N = 3.

As diferenças existentes na expressão de marcadores de superfície relacionados às CTTs já são conhecidas. Em estudo publicado em 2019, foi apresentada a variabilidade existente das quantidades de CD44 e CD271 em dois diferentes tipos celulares de câncer de cabeça e pescoço, demonstrando que a linhagem SCC12 apresentou 42,6% de positividade para CD44+/CD271+, em contrapartida a linhagem SCC38 apresentou 23,1% (CD44+/CD271+), o que demonstra a diferença existente entre linhagens que apesar de serem do mesmo tipo tumoral, possuem origens diferentes, assim como as linhagens de B16F10 e cultura primária aqui estudada (ELKASHTY et al., 2019).

Quando foram isoladas células positivas para CD271 de linhagem celular KYSE70 (carcinoma de células escamosas esofágicas humanas), esta proteína representava 7,5% do tumor, tendo as CD271 positivas maior capacidade de formação de esferas, maior expressão de genes relacionada às CTTs e maior resistência farmacoterapêutica, quando comparadas às CD271 negativas (LI et al., 2015).

O pouco enriquecimento de CTTs no modelo 3D da cultura primária obtido por expansão clonal pode ser resposta à passagem destas células pelo microambiente tumoral. Importante lembrar que neste microambiente as células tumorais estão expostas à atuação de macrófagos, além de outras células do sistema imune que podem ter modificado a presença das proteínas transmembranares relacionadas às CTTs. A heterogeneidade tumoral é uma das principais hipóteses para a dificuldade de tratamento do câncer, por este motivo, na clínica há pacientes que podem ou não responder aos tratamentos convencionais e, tendo em vista os resultados aqui obtidos, a cultura primária apresentou resultados diferentes do modelo formado com B16F10 sob as mesmas condições de plaqueamento, demonstrando que as características de CTTs são dependentes tanto da densidade celular plaqueada para a formação do esferoide, quanto da passagem ou não da célula pelo microambiente tumoral. A continuidade do estudo é importante para comprovar a agressividade dos modelos aqui estudados, a fim de avaliar capacidade metastática, capacidade de iniciação tumoral e capacidade clonogênica (SHAPIRO et al., 1981; GHOSH et al., 2005; FEDER-MENGUS et al., 2008; ACERBI et al., 2015; WU; DAI, 2017).

Com base nos resultados prévios da análise morfológica, viabilidade celular e da quantificação de marcadores de CTT, escolheu-se trabalhar com melanoesferas de B16F10

(100 células/poço) para avaliar a atividade dos compostos SI-MF08, paclitaxel e tamoxifeno sob os marcadores de CTT quantificados no modelo em estudo. Para a escolha deste modelo levou-se em consideração que as melanoesferas desta condição foram as que apresentaram morfologia mais homogênea com formato mais esférico que as melanoesferas de B16F10 na maior densidade, o que se correlaciona com menor variabilidade em estudo de citotoxicidade de compostos em modelo 3D (ZANONI et al., 2016). Tendo em vista que o foco do trabalho é o possível enriquecimento de CTTs no modelo 3D analisado, a cultura primária não foi escolhida já que foi a condição estudada com menor expressão de marcadores relacionados ao enriquecimento de CTTs, além de ter apresentado menor viabilidade, se comparada às melanoesferas de B16F10.

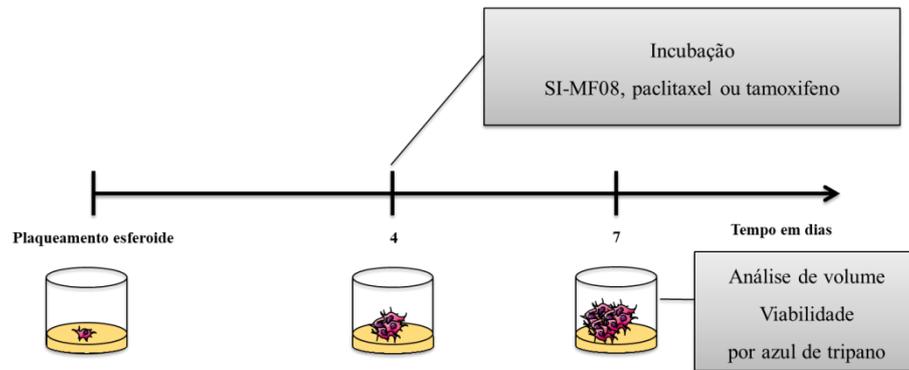
5.7 INCUBAÇÃO DE SI-MF08, PACLITAXEL E TAMOXIFENO EM MELANOESFERAS DE B16F10 NA DENSIDADE DE 100 CÉLULAS/POÇO

O protocolo de tratamento para melanoma ainda é controverso e não existe um padrão de tratamento para estádios avançados da doença, sendo que a sobrevida média dos pacientes é de menos de oito meses (BALCH et al., 2009; GARBE et al., 2016).

O primeiro teste de triagem da concentração do fármaco em uso foi baseado no estudo de Assunção (2017) que avaliou a atividade do sal de isotiurônio MF08 e relatou a IC_{50} de 35 μ M para este composto, quando incubado por 24h em modelo 2D de B16F10. Diferente do modelo 2D, no modelo 3D, comumente se utiliza maior tempo de incubação na análise de compostos, pois a mesma concentração de um determinado composto tende a demorar mais tempo para atingir o centro do esferoide e, portanto, para obter o mesmo efeito quando comparado ao modelo 2D (SALEH, 2017; MARIN, 2018).

Os esferoides foram incubados do quarto ao sétimo dia de cultivo com os compostos escolhidos, quando foram feitas fotomicrografias que possibilitaram o cálculo do volume das esferas, bem como a coleta para posterior análise de viabilidade por azul de tripano (Figura 22).

Figura 22 - Figura esquemática do desenho experimental da incubação de esferoides de B16F10 (100 células/poço) com os compostos SI-MF08, paclitaxel ou tamoxifeno.



No dia zero, as células foram plaqueadas em condições não aderentes, e após 4 dias de cultivo, quando formadas, as melanosferas foram incubadas com diferentes concentrações de SI-MF08, paclitaxel ou tamoxifeno por 72 h. No último dia de incubação, as esferas foram fotografadas em microscópio de luz com o auxílio do software TC capture sendo possível com as imagens calcular o volume (mm^3), posteriormente as esferas foram coletadas sendo analisada a viabilidade por meio da técnica de azul de tripano.

Neste trabalho, foram escolhidos os fármacos paclitaxel e tamoxifeno, já utilizados como antitumorais na clínica, com a finalidade de compará-los com o composto SI-MF08. O paclitaxel foi o primeiro agente estabilizador de microtúbulos identificado e já é utilizado como tratamento de segunda escolha para melanoma metastático, quando dacarbazina e respectivos análogos, que consistem na primeira escolha de tratamento, já não fazem mais efeito (PFLUGFELDER et al., 2011).

O tamoxifeno, fármaco inibidor de receptores de estrogênio, também já foi utilizado na clínica para melanoma e apesar de ainda não estar em protocolos de tratamento, os estudos vem demonstrando que o uso de terapias combinadas ao tamoxifeno foram capazes de melhorar a eficácia terapêutica do tratamento do melanoma (BEGUERIE; XINGZHONG, 2010).

Apesar de a dacarbazina ser o fármaco de primeira escolha para tratamento de melanoma, este composto não foi escolhido para este trabalho por se tratar de um pró-fármaco que necessita de metabolismo hepático de primeira passagem por meio do citocromo P450 (metabolismo não mimetizado no modelo experimental de cultivo celular aqui escolhido) (RAMOS, 2012).

A determinação da IC_{50} foi realizada a partir dos valores de volume dos esferoides, pois não foi possível quantificar a viabilidade, devido ao número reduzido de células ocasionando um grande desvio padrão dos resultados.

A partir dos volumes calculados como descrito no tópico ‘Volume das melanosferas’ obtidos após incubação com as diferentes concentrações de paclitaxel, tamoxifeno e SI-MF08, e considerando o volume da melanosfera controle (não incubada com nenhum composto) como 100%, foi possível fazer uma regressão linear de volume (%) pelo Log das concentrações utilizadas com o objetivo de conhecer a concentração inibitória mínima capaz de inibir 50% (IC_{50}) de cada composto (Tabela 5). As faixas das concentrações de uso foram: 0,05 à 100 μ M para paclitaxel; 0,1 à 35 μ M para tamoxifeno e 0,25 à 75 μ M para SI-MF08 e a regressão linear de cada um dos compostos nos permitiu chegar às IC_{50} de 1 μ M (paclitaxel); 1,5 μ M (tamoxifeno) e 12 μ M (SI-MF08).

Tabela 5 - Definição da IC_{50} de paclitaxel, tamoxifeno e SI-MF08 em melanosferas de B16F10 (100 células/poço).

	Paclitaxel	Tamoxifeno	SI-MF08
IC_{50} (μ M)	1	1,5	12

Tabela representativa da IC_{50} obtida por meio de regressão linear do volume (%) pelo Log da concentração (μ M) de paclitaxel em melanosferas de B16F10 (100 células/poço) após 72 horas de incubação. N = 3.

A literatura vem demonstrando que o modelo 3D de cultivo celular mimetiza melhor a resposta antitumoral de modelos *in vivo* quando comparado ao modelo 2D (SOUZA et al., 2018).

Assunção e colaboradores (2017) já demonstraram a baixa toxicidade do SI-MF08 em camundongos com melanoma tratados cronicamente. Com os resultados obtidos no presente estudo, foi possível observar que o SI-MF08 obteve uma toxicidade baixa, assim como paclitaxel e tamoxifeno. Sendo assim, o SI-MF08 além de ter uma baixa IC_{50} quando incubado no modelo 3D, ainda apresentou, em estudos anteriores baixa toxicidade *in vivo*, o que reforça a importância no conhecimento da molécula em estudo (ASSUNÇÃO, 2017).

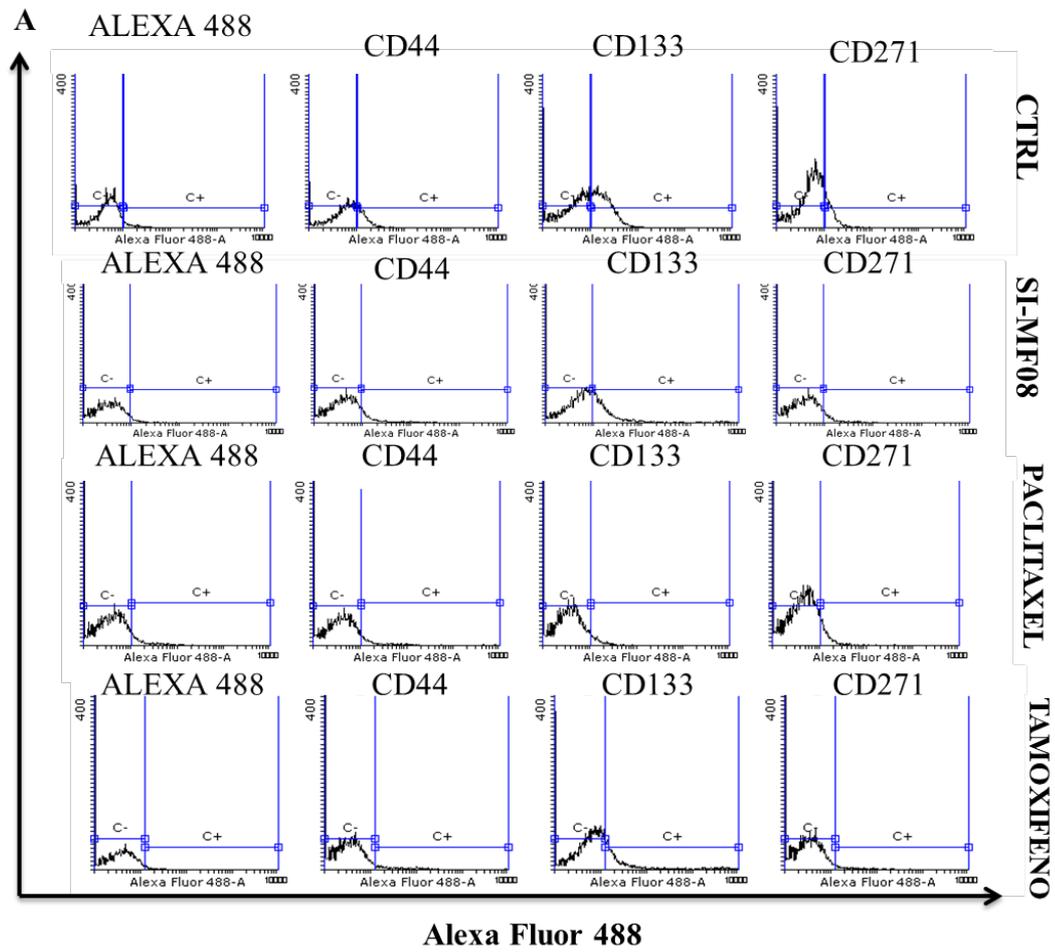
5.8 CARACTERIZAÇÃO DA PRESENÇA DE CTTS EM MELANOSFERAS APÓS INCUBAÇÃO COM SAL DE ISOTIURÔNIO (SI-MF08), PACLITAXEL E TAMOXIFENO

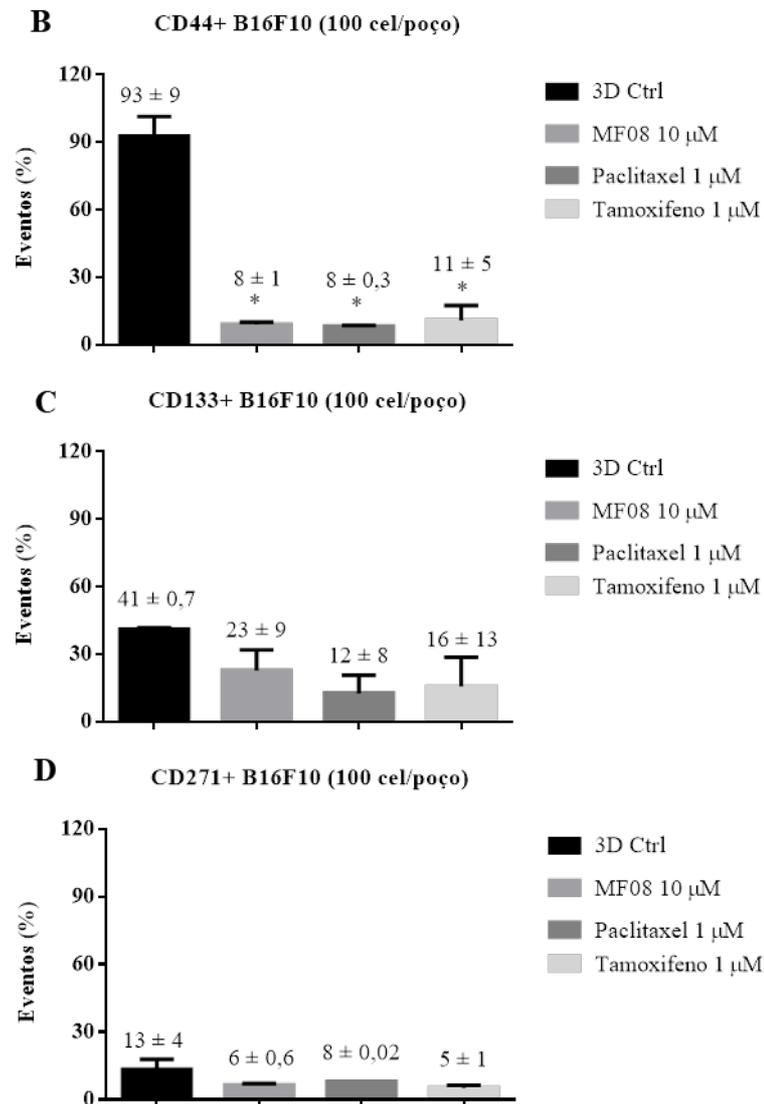
A partir das IC_{50} de paclitaxel (1 μ M), tamoxifeno (1,5 μ M) e SI-MF08 (12 μ M), previamente determinadas por meio de regressão linear, foram escolhidas as concentrações de 1 μ M para paclitaxel e tamoxifeno e 10 μ M para SI-MF08 para prosseguir os experimentos, tendo em vista que estas foram as concentrações utilizadas para a elaboração da curva do volume pelo Log da concentração, utilizada na regressão linear, mais próximas da IC_{50} projetadas dos três compostos em estudo.

Com as três concentrações de trabalho já definidas, avaliou-se a expressão das proteínas transmembranares após incubação com os compostos a fim de determinar se estas moléculas seriam capazes de modificar as características da presença dos marcadores (CD44, CD133 e CD271), quando comparadas com o modelo tridimensional controle (não incubado com nenhum composto).

O paclitaxel (1 μ M), tamoxifeno (1 μ M) e SI-MF08 (10 μ M) foram capazes de diminuir significativamente a porcentagem do CD44+ (Figura 23 B) de $93 \pm 9\%$ (controle não incubado com nenhum composto) para $8 \pm 0,3\%$, $11 \pm 5\%$ e $8 \pm 1\%$, respectivamente. Apesar de não significativa, o paclitaxel, tamoxifeno e SI-MF08, foram capazes de modificar a porcentagem do CD133+ de $41 \pm 0,7\%$ (controle) para $12 \pm 8\%$, $16 \pm 13\%$ e $23 \pm 9\%$, respectivamente (Figura 23 C). Já para o marcador de superfície CD271+ os compostos foram capazes de modificar a porcentagem de $13 \pm 4\%$ (controle) para $8 \pm 0,02\%$ (paclitaxel), $5 \pm 1\%$ (tamoxifeno) e $6 \pm 0,6\%$ (SI-MF08) (Figura 23 D).

Figura 23 - Avaliação de proteínas transmembranares por citometria de fluxo de melanosferas formadas por B16F10 na densidade de 100 células/poço após incubação com SI-MF08, Paclitaxel ou Tamoxifeno.





A) Histograma representativo da análise de células positivas para CD44, CD133 e CD271. Cultura 3D de B16F10 (100 células/poço): alexa (I), CD44 (II), CD133 (III) CD271 (IV). Cultura 3D de B16F10 (100 células/poço) incubado com SI-MF08: controle (V), CD44 (VI), CD133 (VII), CD271 (VIII). Cultura 3D de B16F10 (100 células/poço) incubado com Paclitaxel: controle (IX), CD44 (X), CD133 (XI), CD271 (XII). Cultura 3D de B16F10 (100 células/poço) incubado com Tamoxifeno: controle (XIII), CD44 (XIV), CD133 (XV), CD271 (XVI). B) Representação gráfica da análise de CD44+ em cultivo 3D de B16F10 (100 células/poço) controle ou após incubação com SI-MF08 ou Paclitaxel ou Tamoxifeno. C) Representação gráfica da análise de CD133+ em cultivo 3D de B16F10 (100 células/poço) controle ou após incubação com SI-MF08 ou Paclitaxel ou Tamoxifeno. D) Representação gráfica da análise de CD271+ em cultivo 3D de B16F10 (100 células/poço) controle ou após incubação com SI-MF08 ou Paclitaxel ou Tamoxifeno. Teste estatístico t-student não pareado. * ($p \leq 0,0001$). N = 2.

Diferente dos dados encontrados no trabalho de Marin (2017), em que o SI-MF08 nas concentrações de 9 µM, 17,5 µM e 35 µM, atingiram porcentagens de 83% (9 µM), 90% (17,5 µM) e 96% (35 µM) para CD133, bem como 74% (9 µM), 73% (17,5 µM) e 97% (35 µM) para CD44, em nosso trabalho é possível observar que, para o marcador que havia sido enriquecido (CD44+) no modelo tridimensional escolhido (B16F10 na densidade de 100

células/poço), o composto SI-MF08, assim como os outros dois compostos antitumorais clássicos (paclitaxel e tamoxifeno) foram capazes de gerar a diminuição da expressão celular desta proteína de $93 \pm 9\%$ (controle) para $11 \pm 5\%$ (tamoxifeno), $8 \pm 1\%$ (SI-MF08) e $8 \pm 0,02\%$ (paclitaxel).

Diante do exposto, foi possível perceber que o SI-MF08, assim como paclitaxel e tamoxifeno foi capaz de diminuir de maneira significativa, as porcentagens de CD44+. Com base nos conhecimentos da relação entre CD44 e CTTs, e da quimiorresistência gerada pela presença de CD44 em tumores sólidos, e tendo em vista a baixa toxicidade de SI-MF08 relatada em estudos anteriores, esta molécula parece ser interessante no estudo para o melhoramento do tratamento de melanoma maligno resistente aos antitumorais clássicos e em uso na clínica (GOLDSTEIN et al., 1989; ISHIMOTO et al., 2011; ASSUNÇÃO, 2017).

6 CONCLUSÃO

Baseados nos resultados:

- Alterações na densidade celular inicial da linhagem B16F10, mesmo que dentro da faixa de expansão clonal, influenciam o volume dos esferoides formados após sete dias de cultivo, bem como o número de células, o formato, a organização interna e o padrão de expressão de marcadores de CTTs de melanoma (CD44+ e CD271+);
- A densidade de 100 células/poço parece ser a melhor condição para avaliar toxicidade de compostos, tendo em vista que enriqueceu a população de células tronco tumorais CD44+ na linhagem de melanoma B16F10, além de formar esferoides com formato mais esférico, homogêneos e com maior viabilidade;
- Os esferoides de B16F10 incubados com paclitaxel, tamoxifeno e SI-MF08 apresentaram redução no volume e na expressão de CD44+;
- A passagem da linhagem B16F10 pelo microambiente tumoral *in vivo* altera o fenótipo celular, originando células (CP) com maior capacidade melanogênica (modelo bidimensional), com capacidade de formar esferoides maiores, com maior número de células, porém quando cultivadas em modelo tridimensional não apresentam enriquecimento dos marcadores de CTTs analisados.

Pode-se concluir que este estudo mostrou a influência da densidade celular e da origem celular no modelo de cultura tridimensional, com importantes alterações no padrão de expressão dos marcadores de CTTs, ressaltando a importância da padronização e da escolha dos modelos de cultura utilizados no *screening* de compostos com atividade antitumoral.

7 PERSPECTIVAS

Como perspectivas, tem-se:

- Caracterizar a melanogênese nos diferentes modelos tridimensionais de B16F10 e de cultura primária de B16F10;
- Analisar a capacidade de invasão (metástase) e iniciação tumoral nos diferentes modelos tridimensionais de B16F10 e de cultura primária antes e após incubação com paclitaxel, tamoxifeno e SI-MF08;
- Analisar a capacidade de iniciação tumoral nos diferentes modelos tridimensionais de B16F10 e de cultura primária antes e após incubação com paclitaxel, tamoxifeno e SI-MF08.

REFERÊNCIAS

ACERBI, I.; CASSEREAU, L.; DEAN, I.; et al. Human Breast Cancer Invasion and Aggression Correlates with ECM Stiffening and Immune Cell Infiltration. , v. 7, n. 10, p. 1120–1134, 2015.

ACS. Cancer Facts and Figures 2019. Disponível em: <<https://www.cancer.org/content/dam/cancer-org/research/cancer-facts-and-statistics/annual-cancer-facts-and-figures/2019/cancer-facts-and-figures-2019.pdf>>.

AILLES, L. E.; WEISSMAN, I. L. Cancer stem cells in solid tumors. , p. 460–466, 2007.

AL-BADR, A. A.; ALODHAIB, M. M. Dacarbazine. , v. 41, 2016.

AL-HAJJ, M.; WICHA, M. S.; BENITO-HERNANDEZ, A.; MORRISON, S. J.; CLARKE, M. F. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. , 2003.

ALBINO, A. P.; STRANGE, R. L.; OLIFF, A. I.; FURTH, M. E.; & OLD, L. J. Transforming ras genes from human melanoma: a manifestation of tumour heterogeneity? **Nature**, v. 308, p. 69–72, 1984.

ALTERI, R.; ROWLAND, J. H.; STEIN, K. D.; et al. Cancer treatment and survivorship statistics, 2016. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 66, n. 4, p. 271–289, 2016.

ARAUJO, G. D. J. G. M. DE C. N. A SIMPLE METHOD OF REDUCING THE FADING OF. , 1981.

ASSUNÇÃO, L. S. **Estudo pré-clínico da atividade antitumoral do sal de isotiourônio MF08 em modelo de melanoma murino.** 2017. 163 f. 2017.

ATKINS, M. B.; HSU, J.; LEE, S.; et al. JOURNAL OF CLINICAL O

NCOLOGY Phase III Trial Comparing Concurrent Biochemotherapy and Interferon Alfa-2b With Cisplatin , Vinblastine , and Dacarbazine Alone in Patients With Metastatic Malignant Melanoma (E3695): A Trial Coordinated by the Eastern Cooperative Oncology Group. , v. 26, n. 35, 2008.

AVENDAN, C. **Medicinal Chemistry of Anticancer Drugs Medicinal Chemistry of Anticancer Drugs.**

AVRIL, M. F.; AAMDAL, S.; GROB, J. J.; HAUSCHILD, A.; MOHR, P. Fotemustine Compared With Dacarbazine in Patients With Disseminated Malignant Melanoma : A Phase III Study. , v. 22, n. 6, 2004.

BAE, J.; HAN, M.; YAO, C.; HO, J. Chemico-Biological Interactions Chaetocin inhibits IBMX-induced melanogenesis in B16F10 mouse melanoma cells through activation of ERK. **Chemico-Biological Interactions**, v. 245, p. e15–e19, 2016.

BALCH, C. M.; GERSHENWALD, J. E.; SOONG, S.; et al. JOURNAL OF CLINICAL ONCOLOGY Final Version of 2009 AJCC Melanoma Staging and Classification. , v. 27, n. 36, 2009.

BEGUERIE, J. R.; XINGZHONG, J. Pharmacology and therapeutics : Review Tamoxifen vs . non-tamoxifen treatment for advanced melanoma : a meta-analysis. , 2010.

BIRGERSDOTTER, A.; SANDBERG, R.; ERNBERG, I. Gene expression perturbation in vitro — A growing case for three-dimensional (3D) culture systems. , v. 15, p. 405–412, 2005.

BOISSY, R. E.; NORDLUND, J. J. Molecular Basis of Congenital Hypopigmentary Disorders in Humans : A Review. , 1997.

BURDALL, S. E.; HANBY, A. M.; LANSDOWN, M. R. J.; SPEIRS, V. Breast

cancer cell lines : friend or foe ? , p. 89–95, 2003.

CISILOTTO, J.; FERREIRA, M.; FILIPPIN-MONTEIRO, F. B.; et al. Isothiouronium Salts Reduce NRAS Expression , Induce Apoptosis and Decrease Invasion of Melanoma Cells. , p. 353–362, 2015.

CIVENNI, G.; CIVENNI, G.; WALTER, A.; KOBERT, N.; ET AL. HUMAN CD271-POSITIVE MELANOMA STEM CELLS ASSOCIATED WITH METASTASIS ESTABLISH TUMOR HETEROGENEITY AND LONG-TERM GROWTH. , V. 71, N. 8, P. 3098–3110, 2011. WALTER, A.; KOBERT, N.; et al. Human CD271-Positive Melanoma Stem Cells Associated with Metastasis Establish Tumor Heterogeneity and Long-term Growth. , v. 71, n. 8, p. 3098–3110, 2011.

DICK, J. E. Breast cancer stem cells revealed. , v. 100, n. 7, p. 3547–3549, 2003.

EIGENTLER, T. K.; CAROLI, U. M.; RADNY, P.; GARBE, C. Palliative therapy of disseminated malignant melanoma : a systematic review of 41 randomised clinical trials. , v. 4, n. December, p. 748–759, 2003.

ELKASHTY, O. A.; ELGHANAM, G. A.; SU, X.; et al. Cancer stem cells enrichment with surface markers CD271 and CD44 in human head and neck squamous cell carcinomas. , , n. September, p. 1–9, 2019.

FANG, D.; NGUYEN, T. K.; LEISHEAR, K.; et al. A Tumorigenic Subpopulation with Stem Cell Properties in Melanomas. , , n. 20, p. 9328–9338, 2005.

FEDER-MENGUS, C.; GHOSH, S.; RESCHNER, A.; MARTIN, I.; SPAGNOLI, G. C. New dimensions in tumor immunology : what does 3D culture reveal ? , , n. July, p. 333–340, 2008.

FELEMBAN, M.; DORGAU, B.; CLAIRE, N.; et al. Acta Biomaterialia

Extracellular matrix component expression in human pluripotent stem cell-derived retinal organoids recapitulates retinogenesis in vivo and reveals an important role for IMPG1 and CD44 in the development of photoreceptors and interphotoreceptor matrix. **Acta Biomaterialia**, v. 74, p. 207–221, 2018.

FERLAY, J.; SOERJOMATARAM, I.; DIKSHIT, R.; et al. Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. , v. 386, 2015.

FERREIRA, M.; ASSUNÇÃO, L. S.; SILVA, A. H.; et al. AC SC. **European Journal of Medicinal Chemistry**, 2017.

FOLEY, K. E. Organoids: a better in vitro model. , v. 14, n. 6, p. 559–562, 2017.

FU, D.; WANG, L.; CHOUAIRI, F. K.; et al. Gastric squamous-columnar junction contains a large pool of cancer-prone immature osteopontin responsive Lgr5⁺CD44⁺ cells. **Nature Communications**, , n. 2020, p. 1–13, 2020.

GARBE, C.; PERIS, K.; HAUSCHILD, A.; et al. Diagnosis and treatment of melanoma . European consensus-based interdisciplinary guideline – Update 2012. **European Journal of Cancer**, v. 48, n. 15, p. 2375–2390, 2012.

GARBE, C.; PERIS, K.; HAUSCHILD, A.; et al. ScienceDirect Diagnosis and treatment of melanoma . European consensus-based interdisciplinary guideline e Update 2016. **European Journal of Cancer**, v. 63, p. 201–217, 2016.

GHOSH, S.; SPAGNOLI, G. C.; MARTIN, I.; et al. Three-Dimensional Culture of Melanoma Cells Profoundly Affects Gene Expression Profile: A High Density Oligonucleotide Array Study. , v. 531, n. September 2004, p. 522–531, 2005.

GILCHREST, B. A., ET AL. THE PATHOGENESIS OF MELANOMA INDUCED BY ULTRAVIOLET RADIATION. , p. 1341–1348, 1999.

GOLDSTEIN, L. A.; ZHOU, D. F. H.; PICKER, L. J.; et al. A Human Lymphocyte Homing Receptor , the Hermes Antigen , Is Related to Cartilage Proteoglycan Core and Link Proteins. , v. 56, p. 1063–1072, 1989.

HALPER, J.; KJAER, M. Basic Components of Connective Tissues and Extracellular Matrix : , 2014.

HAUSCHILD, A.; ROSIEN, F.; LISCHNER, S. Focus: Dermatological Oncology · Review Article Surgical Standards in the Primary Care of Melanoma Patients. , p. 218–222, 2003.

HIORNS, L. R.; BRADSHAW, T. D.; SKELTON, L. A.; YU, Q.; KELLAND, L. R. Variation in RNA expression and genomic DNA content acquired during cell culture. , p. 476–482, 2004.

HORVATH, P.; AULNER, N.; BICKLE, M.; et al. models of disease. **Nature Publishing Group**, 2016.

IELSEN, P. A. S. W. N.; ANSEN, R. I. R. I.; TEINICHE, T. O. S. Immunohistochemical CD271 expression correlates with melanoma progress in a case-control study. , v. 50, n. June, p. 402–410, 2018.

INCA. Estimativa 2018. Incidência de câncer no Brasil. 2017.

ISHIMOTO, T.; NAGANO, O.; YAE, T.; et al. Article CD44 Variant Regulates Redox Status in Cancer Cells by Stabilizing the xCT Subunit of System xc – and Thereby Promotes Tumor Growth. **Cancer Cell**, v. 19, n. 3, p. 387–400, 2011.

IVANOV, D. P.; PARKER, T. L.; WALKER, D. A.; et al. Multiplexing Spheroid Volume , Resazurin and Acid Phosphatase Viability Assays for High-Throughput Screening of Tumour Spheroids and Stem Cell Neurospheres. , v. 9, n. 8, p. 1–14, 2014.

JAFARI, R.; CRAMER, G. M. Special Issue Research Article Modulation of Extracellular Matrix Rigidity Via Ribo fl avin-mediated Photocrosslinking Regulates Invasive Motility and Treatment Response in a 3D Pancreatic Tumor Model †. , , n. 13, 2019.

KIM, YOUNGMI; LEE, Y.; CHOE, J.; et al. CD44-Epidermal Growth Factor Receptor Interaction Mediates Hyaluronic Acid-promoted Cell Motility by Activating Protein Kinase C Signaling Involving Akt , Rac1 , Phox , Reactive Oxygen Species , Focal Adhesion Kinase , , v. 283, n. 33, p. 22513–22528, 2008.

KRESO, A.; DICK, J. E. Review Evolution of the Cancer Stem Cell Model. **Stem Cell**, v. 14, n. 3, p. 275–291, 2014.

LAENNEC, R. T. H. Sur les melanoses. **Bull, Faculte Med**, v. 1, p. 23–26, 1812.

LI, J.; LI, M.; TIAN, L.; et al. **Facile Strategy by Hyaluronic Acid Functional Carbon Dot-Doxorubicin Nanoparticles for CD44 Targeted Drug Delivery and Enhanced Breast Cancer Therapy**. Elsevier B.V., 2020.

LI, N.; DAI, C.; YANG, Y.; et al. The expression levels and clinical significance of MFG-E8 and CD133 in epithelial ovarian cancer. , v. 3590, 2020.

LI, S.; YUE, D.; CHEN, X.; et al. Epigenetic regulation of CD271 , a potential cancer stem cell marker associated with chemoresistance and metastatic capacity. , p. 425–432, 2015.

LIPAR, M.; ZDILAR, B.; KRESZINGER, M.; CORI, M. Extracellular matrix supports healing of transected rabbit Achilles tendon. , , n. June, 2018.

LOHMANN, J.; SCHÄFER, E.; DAMMASCHKE, T. Histological determination of cariously altered collagen after dentin caries excavation with the polymer bur PolyBur P1 in comparison to a conventional bud bur. , p. 1–7, 2019.

LOVITT, C. J.; SHELPER, T. B.; AVERY, V. M. Cancer Drug Discovery : Recent Innovative Approaches to Tumor Modeling. , v. 0441, n. July, 2016.

LWOOD, J. M. E.; OPSON, J. J. MELANOMA AND SUN EXPOSURE : AN OVERVIEW OF PUBLISHED STUDIES. , v. 203, n. March, p. 198–203, 1997.

MA, O.; HOWLER, A. R.; BISSELL, M. J. Regulation of mammary epithelial cell function : a role for stromal and basement membrane matrices. , p. 85–95, 1990.

MARCHETTI, D.; AUCOIN, R.; BLUST, J.; MURRY, B.; GREITER-WILKE, A. p75 Neurotrophin Receptor Functions as a Survival Receptor in Brain-Metastatic Melanoma Cells. , v. 215, p. 206–215, 2004.

MARIN, M. G. P. **MODELO DE MELANOESFERA PARA PESQUISA DE NOVOS AGENTES ANTITUMORAIS.** 2018. 88 f. 2018.

MASTERS, J. R.; STACEY, G. N. Changing medium and passaging cell lines. , v. 2, n. 9, p. 2276–2284, 2007.

MCGOVERN, J.; BOOTH, J. C.; CLARK, H.; et al. And its. , 1973.

MEIRA, W. V.; HEINRICH, T. A.; MARIA, S.; CORREIA, S.; REGINA, G. Author ' s Accepted Manuscript. **Experimental Cell Research**, 2016.

MIENALTOWSKI, M. J.; BIRK, D. E. and Biochemistry of Collagens. , 2014.

MIN, S. O.; LEE, S. W.; BAK, S. Y.; KIM, K. S. Ideal sphere-forming culture conditions to maintain pluripotency in a hepatocellular carcinoma cell lines. **Cancer Cell International**, v. 15, n. 1, p. 1–9, 2015.

MITRA, A.; MISHRA, L.; LI, S. EMT , CTCs and CSCs in tumor relapse and drug-resistance. , v. 6, n. 13, 2015.

MUIZNIEKS, L. D.; WEISS, A. S.; KEELEY, F. W. ` SE REVIEW / SYNTHE
Structural disorder and dynamics of elastin 1. , v. 250, p. 239–250, 2010.

MURILLO-SAUCA, O.; CHUNG, M. K.; SHIN, J. H.; et al. CD271 is a
functional and targetable marker of tumor-initiating cells in head and neck squamous
cell carcinoma. , v. 5, n. 16, p. 6854–6866, 2014.

NOWELL, P. C. The Clonal Evolution of Tumor Cell Populations. , 1950.

OLIVIER, K. R.; SCHILD, S. E.; MORRIS, C. G.; BROWN, P. D.;
MARKOVIC, S. N. A Higher Radiotherapy Dose Is Associated With More Durable
Palliation and Longer Survival in Patients With Metastatic Melanoma. , , n. August, p.
1791–1795, 2007.

OSBORNE, C KENT; I, K. H.; TRENT, J. M.; OSBORNE, C K. Biological
differences among MCF-7 human breast cancer cell lines from different laboratories.
, p. 111–121, 1987.

PATHOL, J. CD44 EXPRESSION IN SINONASAL MELANOMAS : IS LOSS
OF ISOFORM EXPRESSION ASSOCIATED WITH ADVANCED TUMOUR STAGE ?
, v. 190, n. March 1998, p. 184–190, 1999.

PENNELLO, G.; DEVESA, S.; GAIL, M. Association of Surface Ultraviolet B
Radiation Levels with Melanoma and Nonmelanoma Skin Cancer in United States
Blacks. , v. 9, n. March, p. 291–297, 2000.

PFLUGFELDER, A.; EIGENTLER, T. K.; KEIM, U.; et al. Effectiveness of
Carboplatin and Paclitaxel as First- and Second-Line Treatment in 61 Patients with
Metastatic Melanoma. , v. 6, n. 2, 2011.

PRICE, E. R.; FISHER, D. E.; HEMATOLOGY, P. and Pigmentation Genes :
Melanocytes and the Mitf Transcriptional Network. , v. 30, p. 15–18, 2001.

PRINCE, M. E.; KACZOROWSKI, R. S. A.; WOLF, G. T.; et al. Identification of a subpopulation of cells with cancer stem cell properties in head and neck squamous cell carcinoma. , v. 104, n. 3, 2007.

PUPINYO, N.; CHATATIKUN, M.; CHIABCHALARD, A.; LAIWATTANAPAISAL, W. In situ paper-based 3D cell culture for rapid screening of the anti-melanogenic activity. , p. 290–298, 2019.

RAMOS, L. Tratamento do melanoma maligno. , p. 63, 2012.

RATE, W. R.; SOLIN, L. J.; TURRISI, A. T. R. Rate, W., Solin, L. J., & Turrisi, A. T. (1988). Palliative radiotherapy for metastatic malignant melanoma: Brain metastases, bone metastases, and spinal cord compression. *International Journal of Radiation Oncology*Biophysics*, 15(4), 859–864. doi: , v. 15, n. April, p. 859–864, 1988.

READ, J.; WADT, K. A. W.; HAYWARD, N. K. Melanoma genetics. **Journal of Medical Genetics**, v. 53, n. 1, p. 1–14, 2015.

REBELO, P.; PINTO, C.; MARTINS, T. R.; et al. Biomaterials 3D-3-culture : A tool to unveil macrophage plasticity in the tumour microenvironment. , v. 163, p. 185–197, 2018.

REYNOLDS, B.; WEISS, S. Generation of Neurons and Astrocytes From Isolated Cells of the Adult Mammalian Central Nervous System. , , n. June, 1992.

RITTIÉ, L. Method for Picrosirius Red-Polarization Detection. , v. 1627, p. 395–407, 2017.

RYU, N.; LEE, S.; PARK, H. Spheroid Culture System Methods and Applications for Mesenchymal Stem Cells. , p. 1–13, 2019.

SABATIER, L.; CHEN, D.; FAGOTTO-KAUFMANN, C.; et al. Fibrillin

Assembly Requires Fibronectin. , v. 20, p. 846–858, 2009.

SALEH, N. A. **Cultura Celular Tridimensional: Desenvolvimento de um modelo para avaliação da relação entre o microambiente tumoral e a ação de novos agentes antitumorais.** 2017. 112 f. 2017.

SANDERCOCK, A. M.; RUST, S.; GUILLARD, S.; et al. Identification of anti-tumour biologics using primary tumour models , 3-D phenotypic screening and image-based multi-parametric profiling. **Molecular Cancer**, p. 1–18, 2015.

SARTORI, L.; FABRÍCIA, I.; ALEXANDER, J.; et al. BBA - General Subjects Antitumor activity of methyl (Z) -2- (isothioureidomethyl) -2-pentenoate hydrobromide against leukemia cell lines via mitotic arrest and apoptotic pathways. **BBA - General Subjects**, v. 1863, n. 9, p. 1332–1342, 2019.

SCHALLREUTER, K. U.; KOTHARI, S.; CHAVAN, B.; SPENCER, J. D. Regulation of melanogenesis – controversies and new concepts. , , n. 5, p. 395–404, 2007.

SCHUMACHER, U.; SCHULZ, T.; MONZ, K.; et al. Cellular Biochemistry. , v. 1266, n. August, p. 1260–1266, 2008.

SHAPIRO, J. R.; YUNG, W. A.; SHAPIRO, W. R. Isolation , Karyotype , and Clonal Growth of Heterogeneous Subpopulations of Human Malignant Gliomas¹. , , n. JUNE, p. 2349–2360, 1981.

SHARMA, R.; REHANI, S.; MEHENDIRATTA, M.; KARDAM, P. Architectural Analysis of Picrosirius Red Stained Collagen in Oral Epithelial Dysplasia and Oral Squamous Cell Carcinoma using Polarization Microscopy. , p. 19–22, 2015.

SIEGEL, R.; MA, J.; ZOU, Z.; JEMAL, A. Cancer Statistics , 2014. , v. 64, n. 1, p. 9–29, 2014.

SIMBULAN-ROSENTHAL, C. M.; GAUR, A.; ZHOU, H.; et al. CD133 Is Associated with Increased Melanoma Cell Survival after Multikinase Inhibition. , v. 2019, 2019.

SINGEC, I.; KNOTH, R.; MEYER, R. P.; et al. Defining the actual sensitivity and specificity of the neurosphere assay in stem cell biology © 2006 Nature Publishing Group <http://www.nature.com/naturemethods>. , v. 3, n. 10, p. 801–806, 2006.

SINGH, S. K.; CLARKE, I. D.; TERASAKI, M.; et al. Identification of a Cancer Stem Cell in Human Brain Tumors. , p. 5821–5828, 2003.

SLOMINSKI, A.; TOBIN, D. J.; SHIBAHARA, S.; WORTSMAN, J. Melanin Pigmentation in Mammalian Skin and Its Hormonal Regulation. , p. 1155–1228, 2019.

SOURCES, D. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008 : , 2008.

SOUZA, A. G.; SILVA, I. B. B.; CAMPOS-FERNÁNDEZ, E.; et al. Comparative Assay of 2D and 3D Cell Culture Models: Proliferation, Gene Expression and Anticancer Drug Response. , p. 1689–1694, 2018.

STEWART, B. W. ET AL. **World cancer report 2014**. 2014.

TRÉDAN, O.; GALMARINI, C. M.; PATEL, K.; TANNOCK, I. F. Drug Resistance and the Solid Tumor Microenvironment. , p. 1441–1454, 2007.

TSAO, H.; ATKINS, M. B.; SOBER, A. J. Management of Cutaneous Melanoma. , p. 998–1012, 2004.

TSUBOI, T.; KONDOH, H.; HIRATSUKA, J.; MISHIMA, Y. Enhanced Melanogenesis Induced by Tyrosinase Gene-Transfer Increases Boron-Uptake and Killing Effect of Boron Neutron Capture Therapy for Amelanotic Melanoma. **Pigment**

Cell Research, v. 11, n. 5, p. 275–282, 1998.

UTTNER, W. I. B. H. Prominin , a novel microvilli-specific polytopic membrane protein of the apical surface of epithelial cells , is targeted to plasmalemmal protrusions of non-epithelial cells. , v. 94, n. November, p. 12425–12430, 1997.

WANG, L.; YANG, G.; ZHAO, D.; et al. CD103-positive CSC exosome promotes EMT of clear cell renal cell carcinoma : role of remote MiR-19b-3p. , p. 1–15, 2019.

WHITEMAN, D. C.; PAVAN, W. J.; BASTIAN, B. C. NIH Public Access. , v. 24, n. 5, p. 879–897, 2012.

WHO. **LOBOCAN 2012: cancer incidence, mortality, and prevalence worldwide in 2012**. 2013.

WHO, 2019. Cancer. Disponível em: <<https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/cancer>>. Acesso em: 3/1/2020.

WILLENBERG, A.; SAALBACH, A.; SIMON, J. C.; ANDEREGG, U. Melanoma Cells Control HA Synthesis in Peritumoral Fibroblasts via PDGF-AA and PDGF-CC : Impact on Melanoma Cell Proliferation. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 132, n. 2, p. 385–393, 2012.

WU, T.; DAI, Y. Tumor microenvironment and therapeutic response. **Cancer Letters**, v. 387, p. 61–68, 2017.

YAMADA, K. M.; CUKIERMAN, E. Review Modeling Tissue Morphogenesis and Cancer in 3D. , p. 601–610, 2007.

YOKOYAMA, M.; REACTION, S.; TUMOR, D.; MUCOSA, O. Original Alterations in Stromal Reaction During Tumor Progression in Oral Mucosa. , p. 23–

30, 2011.

ZANONI, M.; PICCININI, F.; ARIENTI, C.; et al. 3D tumor spheroid models for in vitro therapeutic screening : a systematic approach to enhance the biological relevance of data obtained. **Nature Publishing Group**, , n. November 2015, p. 1–11, 2016.

ZHU, W.; LI, S.; ZOU, B.; LIU, H.; WANG, S. Expressions and clinical significance of HER4 and CD44 in sinonasal mucosal malignant melanoma. , p. 1–6, 2018.